

第4回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

大島賞受賞講演
水・電解質輸送体の
制御機構解明と新規治療薬の開発

Investigation of the regulatory mechanism of renal water and ion transporters
and the development of novel treatments

野村尚弘

Naohiro NOMURA

はじめに

腎臓における水・電解質輸送体は、生体内の水・電解質バランスを精密に調節する役割を担っており、その機能障害は Bartter 症候群や腎性尿崩症など電解質異常や脱水などを伴う遺伝性尿細管疾患の原因となる。

水・電解質輸送体の働きや制御機構を明らかにするためには、遺伝性尿細管疾患の研究は非常に有用である。これまでさまざまな遺伝性尿細管疾患に対して、疾患責任遺伝子が同定されている。その責任遺伝子に対して、遺伝子組み換え技術を用いてノックアウトマウスやノックインマウスなどの疾患モデル動物が作製され、その解析により水・電解質輸送体の分子メカニズムが明らかとなった。これらの研究は、遺伝性尿細管疾患の新規治療薬の開発や、水・電解質輸送体の新規制御因子の発見につながり、このことは高血圧や心不全など、水・電解質異常にかかわる一般的な疾患の病態生理の解明や治療などに応用できることが期待される。

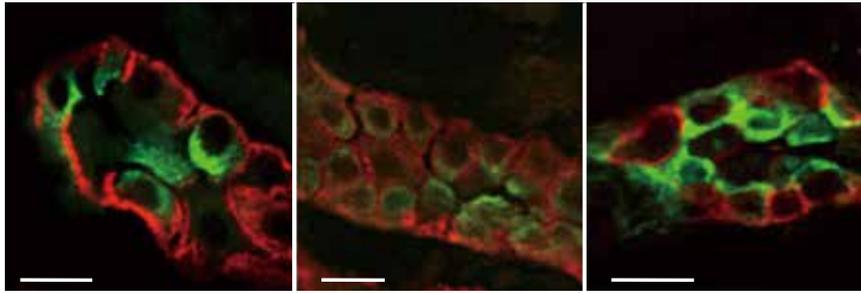
IV 型 Bartter 症候群の病態解明と治療法の開発

Bartter 症候群(BS)は、塩喪失性多尿、低カリウム血症、代謝性アルカローシスなどを特徴とする常染色体劣性遺伝性尿細管疾患である。主にヘンレの太い上行脚に発現して

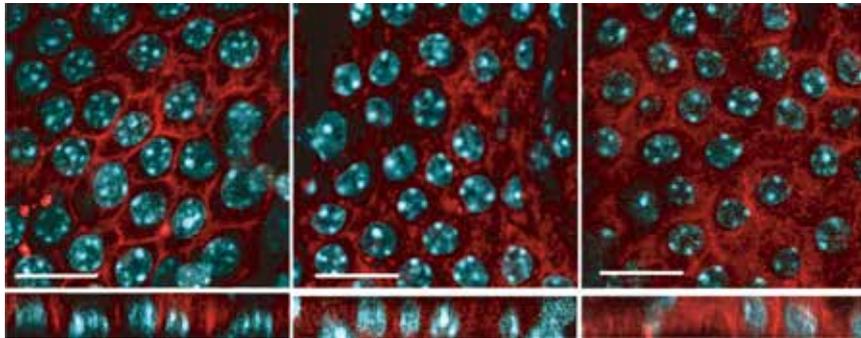
いる輸送体の変異が原因であり、責任遺伝子により I～IV 型に分類されている。IV 型 BS は CIC-K クロライドチャネルの β サブユニットである barttin (*BSND* 遺伝子)の変異によって起こり、通常は新生児期より発症し、重篤な塩喪失と感音性難聴を伴う。

われわれは IV 型 BS の病態を明らかにするために、既知の疾患原因変異である R8L 変異を持つ R8L ホモノックインマウスを作製した¹⁾。野生型マウスの腎臓では CIC-K および barttin は細いヘンレの上行脚から集合管にかけて尿細管細胞の基底膜側に発現しているが、R8L ノックインマウスでは、変異 barttin は基底膜上に発現できず細胞質内にとどまることが明らかとなった。また、barttin は内耳の血管条にも発現しており、内耳においても R8L 変異 barttin の細胞膜上の発現が低下し細胞質内にとどまっていることを発見した。このことから、R8L 変異による BS では、変異 barttin の局在異常(細胞膜上の発現低下)が、電解質異常や感音性難聴を引き起こしていると考えられた。多くの疾患の原因となる変異蛋白は、蛋白の折りたたみが正常に行われず、その結果小胞体内にとどまり分解されることが知られている。ケミカルシャペロンは、蛋白の正常な折りたたみを促すことができる化合物で、すでにライソソーム病など一部の疾患の治療薬として臨床試験が行われているものも存在している。われわれは、ケミカルシャペロンの一つである 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) を用いて、R8L ノックインマウスの治療を行った²⁾。17-AAG は尿細管および内耳における変異 barttin の細胞膜

a 赤: barttin, 緑: AQP2, 青: DAPI
腎臓: 接合部集合管



内耳: 血管条



WT

R8L-Vehicle

17-AAG

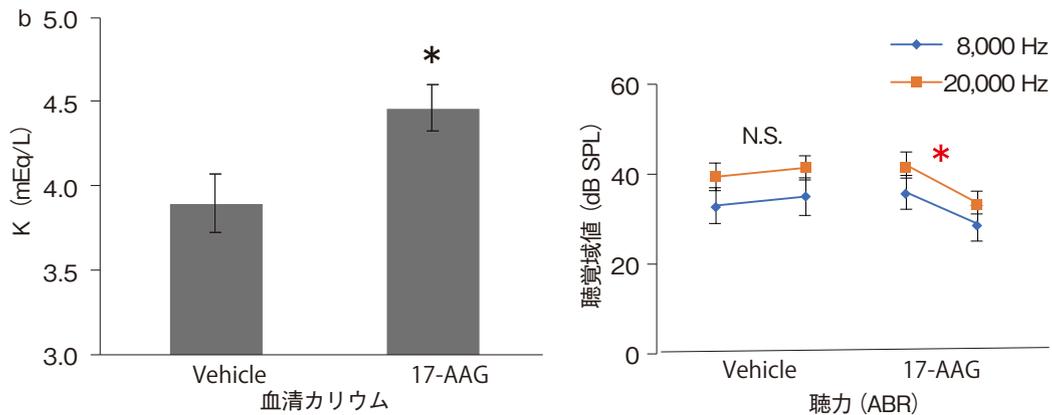


図1 ケミカルシャペロンによるR8L変異barttinの局在の改善効果

a: 17-AAGは尿細管および内耳における変異barttinの細胞膜発現を増加させた。

b: 17-AAGにより低カリウム血症や聴力の改善効果が認められた。

(文献2より引用, 一部改変)

発現を増加させた。さらに、17-AAGの投与により低カリウム血症や聴力の改善が認められた(図1)。以上より、IV型BSの治療方法としてケミカルシャペロン療法が有効である可能性を示すことができた。

腎性尿崩症の新規治療薬の開発とアクアポリン2の新規制御機構の発見

脱水など血漿浸透圧が上昇すると、下垂体よりバソプレ

シンが分泌され、バソプレシンは腎臓集合管に存在する V_2 受容体(V_2R)に結合し、アクアポリン(AQP)2の活性化を介して水の再吸収が行われる。腎性尿崩症はバソプレシンに対する反応が喪失し、水再吸収障害による多尿と脱水、高ナトリウム血症という特徴を有する。遺伝性腎性尿崩症の責任遺伝子として V_2R とAQP2が知られているが、その内の約90%は V_2R の変異が原因である。このことから、 V_2R を介さずに直接AQP2を活性化することが多くの腎性尿崩症患者に対して有効な治療方法になると考えられてい

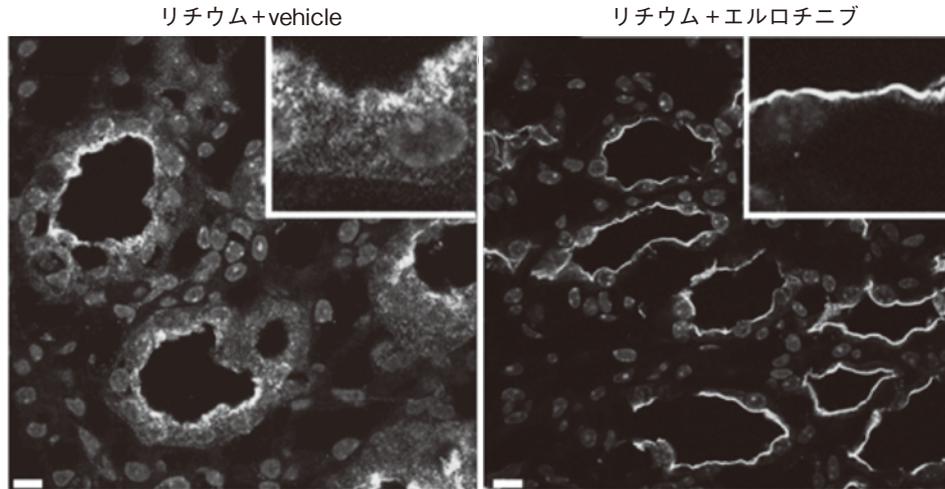


図2 エルロチニブによる AQP2 の局在の改善効果

エルロチニブをリチウム誘発性腎性尿崩症モデルマウスに投与したところ、AQP2 の管腔側膜上の発現量の改善が認められた。(文献 4 より引用、一部改変)

る。AQP2 は exocytosis と endocytosis によって細胞膜と細胞質間をリサイクルしているため、AQP2 の exocytosis を促す薬剤が腎性尿崩症の治療薬になると考え、exocytosis アッセイを用いて化合物のスクリーニングを行った。このスクリーニングには、生理活性を有する既知化合物ライブラリーの 3,464 種類の化合物を使用した。この結果、上皮成長因子受容体 (EGFR) 阻害活性を持つ AG-490 という化合物が同定された³⁾。この化合物は、AQP2 の exocytosis を促進し、培養細胞および尿崩症モデルラットの腎臓において AQP2 の管腔側膜の発現を増加させ、さらに尿浸透圧を増やす効果があることがわかった³⁾。AG-490 が EGFR 阻害活性を持つことから、すでに肺の非小細胞癌の治療に使われている EGFR 阻害薬のエルロチニブ(タルセバ[®])にも腎性尿崩症の治療効果があるか検討を行った。リチウム誘発性腎性尿崩症モデルマウスに対してエルロチニブの投与を行ったところ、AQP2 の管腔側膜上の発現が増加し、尿量の増加を抑えることが可能であった(図 2)⁴⁾。以上の実験結果より、バソプレシニングナルとは独立した EGFR がかわる新たな AQP2 の制御機構の存在が明らかとなり、腎性尿崩症の治療薬として EGFR 阻害薬が利用可能であると考えられた。

カリウムによる新規ナトリウム-クロライド共輸送体の制御機構の解明

高血圧は食習慣と密接なかかわりがあり、食塩摂取が多

いほど血圧上昇のリスクが高いことは一般的によく知られている。近年の大規模臨床研究によりカリウム(K)と血圧の関連が明らかとされ、K 摂取量が少ないほうが血圧は低く心血管疾患のリスクが低い⁵⁾。K 摂取不足による血圧上昇において、腎臓の遠位曲尿細管(DCT)に存在するナトリウム(Na)-クロライド(Cl)共輸送体(NCC)が重要である。マウスでもヒトと同様に高食塩低K食を与えると血圧上昇が認められるが、遺伝的に NCC を欠損させたマウスではこの血圧上昇が認められない。また、NCC の機能低下によって起こる遺伝性疾患である Gitelman 症候群の患者では血清 K 濃度の低下が認められること、逆に NCC の機能亢進を伴う遺伝性疾患である偽性低アルドステロン II 型 (PHA II) の患者では血清 K の上昇がみられることから、NCC が K 制御に重要であると考えられる。NCC が直接 K 輸送を行うのではなく、NCC は DCT において Na の再吸収を行うことで、それより遠位にある接合部尿細管(CNT)や皮質集合管(CCD)へ流れる Na の量を調節している。CNT や CCD に流入した Na は上皮性ナトリウムチャンネル (ENaC) によって再吸収され、Na を再吸収した分の電気勾配により K が ROMK チャンネルより管腔側へ排泄される(図 3)。

NCC は SPAK および OSR1 キナーゼによってリン酸化され、SPAK/OSR1 はその上流の制御因子である WNK キナーゼによってリン酸化(=活性化)される。通常、食塩摂取量が多くなると WNK-OSR1/SPAK 経路が抑制され、NCC のリン酸化が低下し、Na 再吸収が減少するため、尿中 Na 排泄が増加する。一方で、K 摂取が低下すると NCC のリン酸

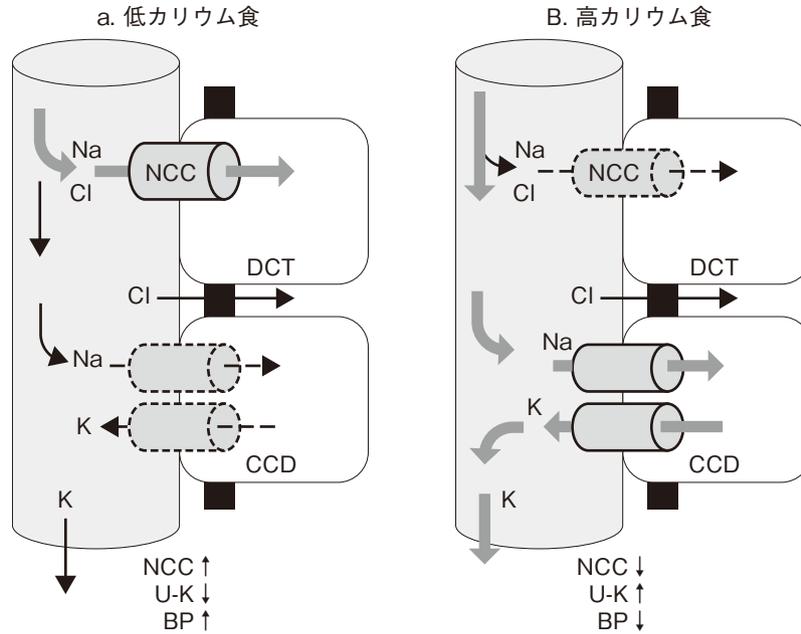


図3 NCCによるカリウム排泄調節

- a: 低カリウム(K)時, NCCは活性化しナトリウム(Na)を再吸収する。下流に流れるNaが減少するため, K排泄が減少する。Naの再吸収が増えるため血圧は上昇する。
 b: 高K時, NCCの活性は抑制されNaの再吸収は減るため, K排泄は増加する。
 NCC: ナトリウム-クロライド共輸送体, DCT: 遠位曲尿細管, CCD: 皮質集合管, U-K: 尿中カリウム, BP: 血圧

化は亢進し, 尿中K排泄を抑制する。このKによるNCCの制御はNaによる制御より優先され, 高食塩低K食を与えられたマウスの腎臓ではNCCのリン酸化は著明に亢進する。その結果, Na過剰摂取にもかかわらずNaの再吸収が亢進し, 血圧は上昇する(図3)。

では, どのようにKはNCCを制御しているのでしょうか。低K食によるNCCのリン酸化亢進はWNK4-SPAKシグナルに依存する。WNKキナーゼはClイオンと直接結合して活性が抑制されることが明らかとなり, その後, 培養細胞を用いた実験によって低K時のWNKキナーゼの活性化に細胞内Cl濃度の低下が重要であることが明らかとなった⁶⁾。すなわち, 細胞外K濃度の低下による細胞外へのKの流出が細胞膜電位依存的に細胞内からClの流出を促し, 細胞内Cl濃度が低下する。その結果, WNKキナーゼとClの結合が低下し, WNKキナーゼは活性化すると考えられる。DCTの基底膜側の主要なClチャネルとしてCIC-K2が知られており, このCIC-K2の発現にはβサブユニットであるbarttinが必須である。われわれはbarttinおよびCIC-Kの低発現マウス(*Bsnd^{neo/neo}*マウス)を用いて, 低K時の細胞内Cl濃度低下およびNCCのリン酸化にCIC-K2/barttinが関与しているか検討を行った。野生型マウスに低

食塩低K食を与えるとSPAKとNCCのリン酸化は亢進するが, *Bsnd^{neo/neo}*マウスではこのSPAKとNCCのリン酸化亢進は認められなかった。このとき, 野生型マウスでは血圧上昇傾向を示すものの, *Bsnd^{neo/neo}*マウスでは血圧上昇が認められなかった。以上より, 低K時のNCCリン酸化亢進および血圧上昇においてCIC-K2/barttinを介したCl輸送が重要であると考えられた(図4)⁷⁾。

一方, 高KによるNCC制御は単に低KによるNCCリン酸化亢進メカニズムの裏返しではない。われわれは, 高K溶液をマウスに投与後にNCCが速やかに脱リン酸化され, このとき, リン酸化SPAKやWNK4の発現量はほぼ変化が認められないことを発見した⁸⁾。このことから高KによるNCCの脱リン酸化は, WNK-SPAK制御系とは独立したメカニズムによって起こると考えられた。われわれはNCCの脱リン酸化にプロテインフォスファターゼが関与しているという仮説を立て, 種々のプロテインフォスファターゼ阻害剤を用いて, どのプロテインフォスファターゼが高KによるNCCの脱リン酸化に関与しているかの検討を行った。その結果, カルシニューリン阻害剤であるタクロリムスとその上流の制御因子であるカルモジュリンの阻害剤(W7)が, K負荷によるNCCの脱リン酸化を抑制する

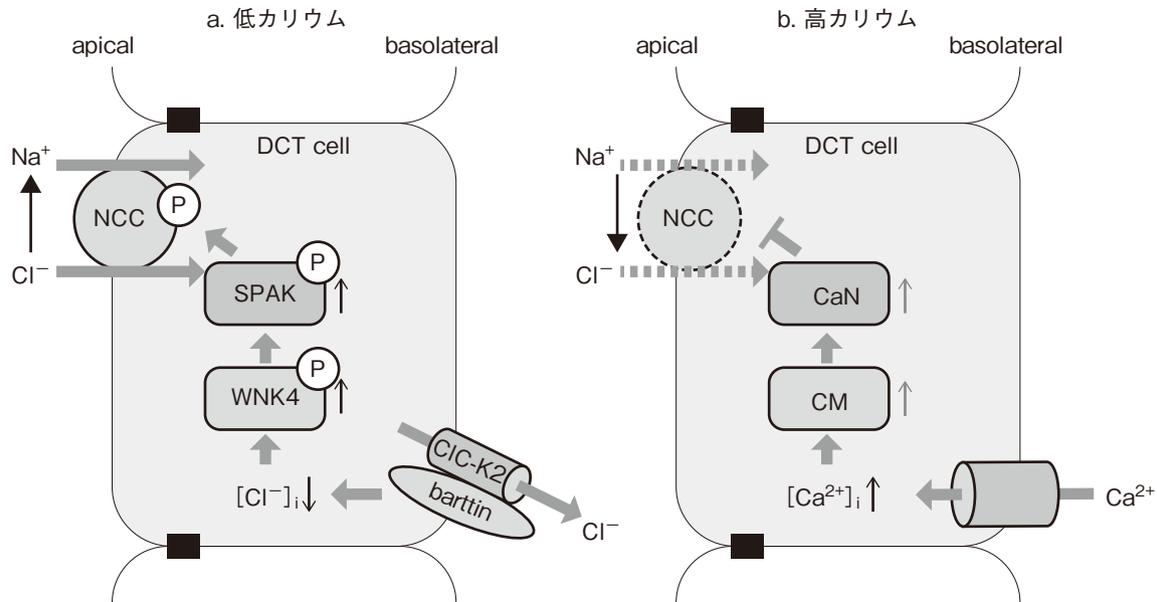


図4 カリウムによる新たな NCC リン酸化制御機構

a: 低カリウム (K) 時, CIC-K2/barttin を介してクロライド (Cl) が流出することで, WNK4-SPAK-NCC シグナルが活性化する。
b: K 摂取過多の時, 細胞内にカルシウム (Ca) が流入し, カルモジュリン (CM) とカルシニューリン (CaN) が活性化し NCC を脱リン酸化する。

ことを発見した⁸⁾。また, タクロリムスの投与は急性期における尿中 K 排泄を抑制することを明らかにした。タクロリムスの副作用として高カリウム血症と高血圧が知られており, タクロリムスによる NCC の脱リン酸化抑制がこれらの副作用の発症にかかわっていると考えられた。カルシニューリンはカルシウム依存的なプロテインフォスファターゼであることから, 現在, われわれは高 K がカルシウムシグナルを介してカルシニューリンを活性化する新たな NCC の制御メカニズムの解明に取り組んでいる。

おわりに

このように, われわれは Bartter 症候群, 腎性尿崩症, Gitelman 症候群など, 単一遺伝子による遺伝性尿細管疾患の研究を通して, 水・電解質輸送体の制御メカニズムを明らかとしてきた。これらの知見が遺伝性尿細管疾患患者の治療や, その他の水・電解質にかかわる疾患の治療に貢献できることを期待したい。

謝辞

東京医科歯科大学腎臓内科の内田信一教授をはじめ, これまでの研究の遂行にあたりご指導とご支援をいただきました先生方に深く感謝いたします。

利益相反自己申告: 申告すべきものなし

文献

1. Nomura N, et al. Generation and analyses of R8L barttin knockin mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011 ; 301 (2) : F297-307.
2. Nomura N, et al. Treatment with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin ameliorated symptoms of Bartter syndrome type IV caused by mutated Bsnd in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 ; 441 (3) : 544-549.
3. Nomura N, et al. High-throughput chemical screening identifies AG-490 as a stimulator of aquaporin 2 membrane expression and urine concentration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014 ; 307 (7) : C597-605.
4. Cheung PW, Nomura N, et al. EGF receptor inhibition by erlotinib increases aquaporin 2-mediated renal water reabsorption. *J Am Soc Nephrol* 2016 ; 27 : 3105-3116.
5. Mente A, et al. Association of urinary sodium and potassium excretion with blood pressure. *N Engl J Med* 2014 ; 371 (7) : 601-611.
6. Terker AS, et al. Potassium modulates electrolyte balance and blood pressure through effects on distal cell voltage and chloride. *Cell Metab* 2015 ; 21 (1) : 39-50.
7. Nomura N, et al. Role of CIC-K and barttin in low potassium-induced sodium chloride cotransporter activation and hypertension in mouse kidney. *Biosci Rep* 2018 ; 38 (1) : BSR20171243.
8. Shoda W, et al. Calcineurin inhibitors block sodium-chloride cotransporter dephosphorylation in response to high potassium intake. *Kidney Int* 2017 ; 91 (2) : 402-411.