

妊娠時の WNK-NKCC1 シグナル活性動態に関する基盤的研究

井上 浩一, 福田 敦夫, 古川 智範

浜松医科大学医学部神経生理学講座

概要 妊娠時の妊娠高血圧症候群(子癇前症)や子癇は先進諸国でもいまだ数%に発症し、周産期の母児障害の大きなリスクとなっている。その原因には胎盤血流循環不全をはじめさまざまな要因が挙げられているが、明確なメカニズムは不明である。さらに進行した状態である子癇では多くの症例で脳浮腫が認められるが、高血圧と脳浮腫という主症状から、我々は細胞内に Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- を汲み入れるイオン輸送体である NKCC1 及び NKCC2 がこの病態に関与しているのではないかと考えた。その場合、妊娠の有無により NKCC1 の活性が変化している可能性がある。その可能性を検証するために、 β -エストラジオールを投与し大脳皮質神経細胞の初代培養を行ったところ、過去の報告から推察されるように、細胞内 Cl^- 濃度 ($[\text{Cl}^-]_i$) が増加することを見出した。このことは NKCC の活性が上昇していることを示唆している。この現象が生体内で起こった場合、妊娠の進行に伴い体内へのイオン貯留、引き続き水分貯留がおこり、高血圧や脳浮腫を起こすとも考えられる。そこで、まず正常な妊娠における大脳と腎臓で NKCC1/2 の発現量を検討することにした。大脳では妊娠の有無で NKCC1/2 の発現量は変化が認められなかったが、腎臓では NKCC1/2 の減少が認められた。また、大脳での NKCC のカウンターパートとして知られる KCC2 も変化は認められなかった。次に、NKCC、KCC の活性調節に関与するリン酸化酵素である SPAK のリン酸化状態を調べたところ、妊娠マウスの大脳皮質で有意に減少がみられた。しかし、腎臓では明確な変化は認められなかった。以上より、大脳、腎臓とも NKCC/KCC のバランスとしては KCC 優位になることが推察された。それを確かめるために、脳スライスを用いて Cl^- トランスポーターの活性を検討した。グラミシン穿孔パッチクランプ法を行い $[\text{Cl}^-]_i$ を調べたところ、妊娠マウスの神経細胞で $[\text{Cl}^-]_i$ が低下する傾向があった。これらのことから、正常な妊娠時には NKCC/KCC 活性のバランスは腎臓、大脳いずれにおいても $\text{NKCC} < \text{KCC}$ となり、体内、細胞内への Cl^- の流入と引き続き起こる受動的な水分の移動は抑制される可能性が示唆された。今後は、多臓器での検討、そのメカニズムの解明などを行い、妊娠時の全身における塩バランスの調節を明らかにし、妊娠高血圧症候群への関与を検討したい。

1. 研究目的

最近発見されたリン酸化シグナルカスケードである WNK→SPAK/OSR1→NCC/NKCC/KCC のシグナル経路はヒトの高血圧に重要な役割を担っていることが示唆されている (Richardson and Alessi, 2008; Kahle *et al.*, 2011)。このシグナルは、当初腎機能の異常を伴う遺伝性疾患において変異が発見された (Wilson *et al.*, 2001) ことや、臨床で用いる利尿剤の標的である (Wang *et al.*, 2001) ことから、特に腎臓でのイオン輸送におけるこのシグナルの役割が精力的に研究されているが、脳においても重要であることが指摘されており、我々も発達期の大脳皮質構築に

このシグナルが重要である可能性を報告している (Inoue, *in press*)。

妊娠時の妊娠高血圧症候群(子癇前症)や子癇の発症は先進諸国でも数%に及び、周産期の母児障害の大きなリスクとなっている。その原因には胎盤での循環不全などさまざまな要因が挙げられているが、明確なメカニズムは不明である。 (Pennington *et al.*, 2012)。

妊娠高血圧症候群・子癇では脳浮腫、易痙攣性が認められるが、高血圧と脳浮腫、易痙攣性という現象から、我々はこの疾患の病態に NKCC1/2 及びその活性調節因子 WNK-SPAK/OSR1 の活性が関与している可能性を考

えた。NKCC は主に細胞内への Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- の取り込みを行い、腎臓においては尿細管からの塩の再吸収を起こす。その結果、受動的な水の再吸収も促進されるため、細胞外体液量の増加を促し、循環血液量を調節、維持に貢献する。同様に神経細胞でも細胞内への水の取り込みを促進するが、同時に細胞内 Cl^- 濃度 ($[\text{Cl}^-]_i$) にも影響を与える。神経細胞では $[\text{Cl}^-]_i$ は GABA の抑制性作用に影響を与えるため、高次脳機能の発現に非常に重要な要素となっている。実際、NCC1 の相対的な活性上昇は、てんかん発作の可能性を高めることが示唆されている (Dzhala *et al.*, 2005)。

これまでに女性ホルモンによる NKCC1 や SPAK の発現レベルの上昇が報告されている (Nakamura *et al.*, 2004; Nunez *et al.*, 2005; Nugent *et al.*, 2012) が、女性ホルモンが通常の性周期のピーク時と比べても数十倍の濃度に達する妊娠時にこれらの発現量や活性がどのように変化しているかということに関しては全く報告されていない。これまでの *in vitro* での報告を考えると、妊娠時、特に妊娠後期では NKCC1/2 の活性が大きく変化している可能性は十分にあると考えている。そのため、 β -エストラジオール (E2) 投与時の NKCC の活性変化の検討と、正常妊娠時の NKCC1/2 の発現レベル及び WNKs、SPAK/OSR1 の活性状態などこのシグナルにかかわる分子の動態を検討した。

2. 研究方法

2.1 動物

妊娠後期の C57BL/6 マウス、Wistar ラットとその対照 (同じ週齢で無妊娠) は日本エスエルシーより購入した。

2.2 神経初代培養

妊娠 15 日齢のラットをペントバルビタールで麻酔後、胎仔の脳皮質を取り出し、実態顕微鏡下で脳軟膜を剥離した後、分散用の酵素処理を行い神経組織の細胞を分散した。Poly-L-lysine でコートしたカバーグラス入りの 24 ウェルプレートに 2×10^4 個/ウェルで細胞を分散し培養した。プレーティング 5 時間後より E2 (100 nM) の投与を開始し、3 日間維持した。培養液は 2 日 1 回半量を交換した。

2.3 Western blotting 法

妊娠動物及びその対照を麻酔後、脳及び腎臓を摘出し、組織の一部をホモジナイズし、Lysis バッファーにて

攪拌・溶解した。30 分氷冷後、12,000 x g で遠心し、上清液を取得した。ブラッドフォード法にて蛋白量を定量後、30 μg の蛋白を Laemmli 法にて調整した。その後、SDS-PAGE にて蛋白を電気泳動し、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンは各種一次抗体を反応させた後、HRP 標識二次抗体を用いて発光させ、シグナルの検出を行った。

2.4 脳スライス標本作成

10~11 週齢の雌マウスと同週齢の妊娠 17 日の母マウスを麻酔後、全脳を取り出し、氷冷したスクロース人工脳脊髄液を浸潤させた。酸素化したスクロース人工脳脊髄液中で脳スライス作成機 (VT1000S, ライカ) を用いて厚さ 350 μm の脳スライスを作製した。作製した脳スライスは室温で酸素化した標準人工脳脊髄液に入れ 1 時間回復させた後、電気生理学実験に使用した。

2.5 電気生理学実験

細胞・組織の観察と電気生理学実験は、正立顕微鏡を用いた (BX51WI, オリンパス)。電気生理には Axopatch 200B、Dididata1332 (いずれも Axon Instruments) などの機器を用いた。

初代培養神経細胞を用いた実験はホールセル・パッチクランプ記録を行った。低 Cl^- のピペット内液を用いると、正確ではないが相対的な $[\text{Cl}^-]_i$ を比較することができる。

脳スライスにはグラミシン穿孔パッチクランプ法を行った。グラミシジンは細胞膜上に陰イオンを通過しない膜孔を形成するため、操作によって $[\text{Cl}^-]_i$ は影響を受けず、元来の正確な $[\text{Cl}^-]_i$ を測定することができる。

いずれの場合も、任意の膜電位に固定した後、GABA (100 μM) を投与し、GABA 電流、つまり Cl^- の流出入の逆転電位 (reversal potential of GABA; E_{GABA}) を求めた。ネルンストの式より $[\text{Cl}^-]_i$ が多いほど E_{GABA} は脱分極方向にシフトする。記録中は人工脳脊髄液には脱分極時の活動電位発生を阻害するためにテロドトキシンを加えた。

いずれの実験方法も著者らの最近の報告 (Inoue, *in press*) に詳細が記載されているものと同様の方法で行った。

3. 研究結果

3.1 エストロゲンによる Cl^- の調節

Cl^- トランスポーターである NKCC1 やその調節因子で

ある SPAK の発現調節に女性ホルモンが関与する (Nakamura *et al.*, 2004; Nunez *et al.*, 2005; Nugent *et al.*, 2012) ことがいくつかのグループから報告されているが、機能的な活性の変化については報告されていない。活性の変化を調べるために、大脳皮質神経細胞の初代培養を作製し、E2 (100 nM) を 3 日間投与した。その後、ホールセル・パッチクランプ法にて簡易的に E_{GABA} を測定したところ、対照と比べ E2 投与群では E_{GABA} は脱分極方向にシフトした (Fig. 1)。これは NKCC1 の活性が上昇している可能性を示唆している。

3. 2 妊娠マウスでの腎臓および大脳での Cl⁻ トランスポーター関連因子の変化

妊娠時には E2 を含めた女性ホルモンのほか、糸球体濾過量など体液量及びイオン濃度を左右する因子も大きく変化する。そこで、妊娠による Cl⁻ トランスポーター関連因子の変化を調べるために、Western blotting 法を用いて、それらの因子の蛋白レベルなどを大脳と腎臓で検討した。NKCC1/2 に関しては、大脳では妊娠の有無で変化が認められなかったが、腎臓では、妊娠によりその蛋白量が減

少した。また、大脳で NKCC1 のカウンターパートとして作用する KCC2 の蛋白量も相違は認められなかった (Fig. 2A)。

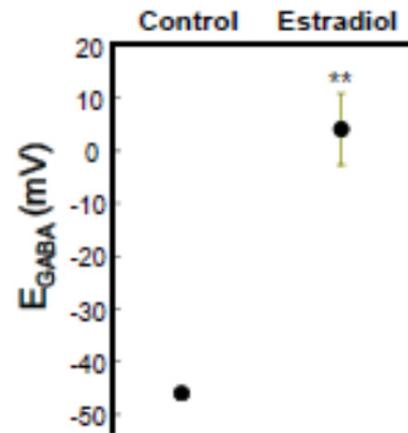


Fig. 1. Rat embryonic brains were dissected at E15. Neurons were then cultured in the absence or presence of 100 nM E2 for 3 days, followed by whole-cell patch-clamp recordings. E_{GABA} of E2-treated cells were significantly more positive compared with that of control cells. (n=3; **p<0.01 vs. control, unpaired t-test).

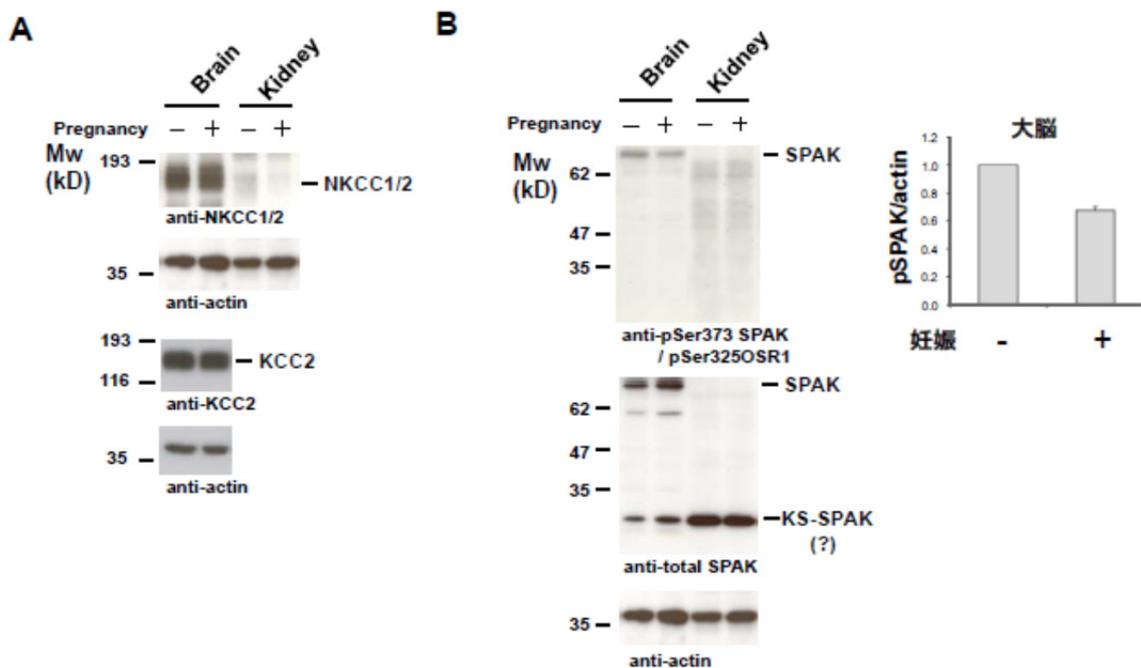


Fig. 2. Cerebral cortices were homogenized and lysed as described in the Methods section. Aliquots of 30 mg protein were loaded and analyzed by Western blotting with the indicated antibodies. (A) NKCC1 protein decreased in kidney, but not in brain, in pregnant mice. KCC2 protein does not change in brain. Bar graphs show that phosphorylated levels of Ser373 of SPAK was significantly lesser in pregnant brain. (B) The phosphorylated level of Ser373 in SPAK decreased in brain in pregnant mice.

NKCC1/2 をリン酸化するシグナル経路として WNK-SPAK/OSR1 が知られている。そこで、NKCC1/2 を直接リン酸化し活性調節を起こす SPAK/OSR1 のリン酸化状態を調べたところ、大脳では妊娠によりリン酸化が減弱したが、腎臓では明確な違いは認められなかった (Fig.2 B)。

3.3 妊娠マウスでの大脳皮質神経細胞の Cl⁻ ホメオスタシスの検討

大脳皮質で WNK-SPAK/OSR1 シグナルの活性が低下している可能性が示唆されたことから、このシグナルの標的である NKCC1 の活性を検討するために、脳スライス標本を作製し、大脳皮質神経細胞でグラミシジン穿孔パッチクランプ法による記録を行った。その結果、妊娠マウスでは非妊娠マウスに比べ E_{GABA} が過分極方向にシフトする傾向があり、妊娠により [Cl⁻]_i が低下している可能性が示唆された (Fig. 3)。

4. 考察

女性ホルモンにより NKCC1 の発現が変化するという報告は散見されていたが、その機能的変化の報告はなかつ

た。本研究の成果として E2 による NKCC1 の潜在的な機能上昇が示唆されたことから、E2 を含めた女性ホルモン量が大きく変化する妊娠時の Cl⁻ トランスポーター関連因子の動態を検討することとした。

ただ、ヒトの場合、非妊娠時の血清 E2 は性周期におけるピーク時でも 300 pg/ml ほどであるが、妊娠後期では、10 ng/ml まで数十倍も上昇することになる (Jerome *et al.*, 2009)。ところが、ラットでは妊娠初期と比べ後期でも 2~3 倍程度にしか上昇せず (de Lauzon *et al.*, 1974)、E2 の効果はあまり期待できない可能性はあった。

実際に妊娠後期のマウスの大脳・腎臓における Cl⁻ トランスポーター関連因子の発現やリン酸化を Western blotting 法を用いて検討したところ、腎臓では NKCC の発現量が減少していたが、大脳では NKCC、KCC2 の蛋白量の変化は認められなかった。これに対して、NKCC/KCC の調節シグナルとして知られる SPAK のリン酸化は、妊娠により大脳で減弱していた。NKCC は SPAK によるリン酸化によりその活性が上昇するが、KCC は逆にリン酸化で活性が抑制される (Richardson and Alessi, 2008)。そのため、妊娠時の腎臓における NKCC の減少と大脳での

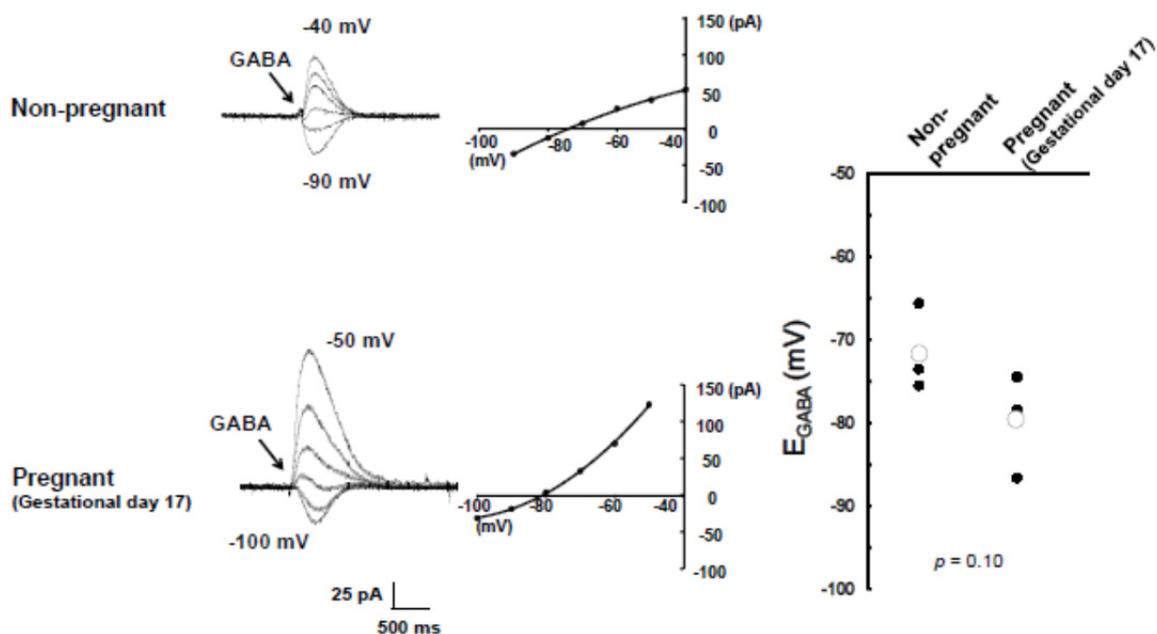


Fig. 3. Brain slices were prepared for electrophysiological experiments. Typical currents activated by GABA were recorded by a gramicidin-perforated patch-clamp technique. Graph represents the current-voltage relationship for GABA-activated responses shown in the traces. E_{GABA} in pregnant mice tends to be more negative (n=3-4; p=0.10 vs. KCC2-negative, unpaired t-test).

SPAK の活性抑制は体内及び細胞内への Cl^- の取り込みを抑制するという点で一致している。この機構が働くことにより、腎臓では妊娠時に体内塩量及び体内細胞外液の減少を促し、血圧上昇に拮抗的に作用している可能性がある。神経系においても、単純に女性ホルモンによる NKCC の活性上昇を増加させ、GABA の抑制作用減弱による易痙攣性を起すことが考えられるが、 Cl^- の調節のために代償性に SPAK の活性調節がおこっているのかもしれない。

次に、SPAK の活性変化による $[\text{Cl}^-]_i$ の変化を検討するために、脳スライスを用いて大脳皮質神経細胞での $[\text{Cl}^-]_i$ を妊娠の有無で比較した。その結果、まだサンプル数は少ないが、妊娠により $[\text{Cl}^-]_i$ が減少している傾向が示された。これは、Western blotting 法で得られた生化学的なエビデンスと一致する。これらを総合すると、妊娠時には NKCC/KCC 活性のバランスは腎臓、大脳いずれにおいても $\text{NKCC} < \text{KCC}$ となり、体内、細胞内への Cl^- の流入と引き続き起こる受動的な水分の移動は抑制されることが示唆される。NKCC、KCC は WNK-SPAK/OSR1 シグナルの他にリン酸化により活性調節を受けることが知られているので、妊娠によりほかのシグナルも変化する可能性もあり、SPAK のリン酸化のみでは $[\text{Cl}^-]_i$ の変化は不明であったが、電気生理学的手法によって Western blotting 法で示唆されたとおり、 $[\text{Cl}^-]_i$ が低下している、つまり KCC の活性が相対的に優位になっている可能性が示された。

5. 今後の課題

今回の研究から妊娠による体液量、あるいは細胞容積の調節に WNK-SPAK/OSR1 シグナルも関与した NKCC/KCC のバランスの変化が関与していることが示唆された。E2 は神経細胞において $[\text{Cl}^-]_i$ を増加するが、E2 が上昇しているにもかかわらず $[\text{Cl}^-]_i$ は減少しており、WNK-SPAK/OSR1 シグナルの妊娠時の調節メカニズムの解明は重要な課題である。そのためより多くのエビデンスを取得する必要があるが、現時点で多くのエビデンスがあるとは言えない。腎臓では NKCC1/2 の他に遠位尿細管では NCC も同様の働きをすることが知られる。また NKCC1/2 や NCC は尿細管側から細胞内への塩の取り込みに寄与しているのに対し、KCC1、3、4 等の KCC が基底膜側から血管側への取り込みに重要であることなどから、これらの発現レベルも検討していく必要がある。神経と腎

臓でその機能発現のメカニズムが異なることから、他の諸臓器での変化も興味深い。

これらの妊娠による全身の NKCC/KCC の活性バランスの評価とともに、妊娠高血圧症候群の病態における WNK-SPAK/OSR1 の関与の可能性を検討したいと考えている。

謝辞

本研究を進めるに当たり助成をいただきました公益財団法人ソルトサイエンス研究財団の関係各位に深く感謝申し上げます。

文献

- de Lauzon S, Uhrich F, Vandel S, Cittanova N, Jayle MF (1974) Determination of progesterone and of free and conjugated estrogens in pregnant and pseudo-pregnant rats. *Steroids* 24: 31-40.
- Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen FE, Staley KJ (2005) NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 11: 1205-1213.
- Inoue K, Furukawa, T, Kumada, T, Yamada, J, Wang, T, Inoue, R, Fukuda, A. (in press) Taurine inhibits K^+ - Cl^- cotransporter KCC2 to regulate embryonic Cl^- homeostasis via with-no-lysine (WNK) protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem*.
- Jerome SF, Robert BL, Samuel YSC, Robert JB (2009) Yen & Jaffe's Reproductive endocrinology.
- Kahle KT, Rinehart J, Lifton RP (2011) Phosphoregulation of the Na-K-2Cl and K-Cl cotransporters by the WNK kinases. *Biochim Biophys Acta* 1802: 1150-1158.
- Nakamura NH, Rosell DR, Akama KT, McEwen BS (2004) Estrogen and ovariectomy regulate mRNA and protein of glutamic acid decarboxylases and cation-chloride cotransporters in the adult rat hippocampus. *Neuroendocrinology* 80: 308-323.
- Nugent BM, Valenzuela CV, Simons TJ, McCarthy MM (2012) Kinases SPAK and OSR1 are upregulated by estradiol and activate NKCC1 in the developing hypothalamus. *J Neurosci* 32: 593-598.

- Nunez JL, Bambrick LL, Krueger BK, McCarthy MM (2005) Prolongation and enhancement of gamma-aminobutyric acid receptor mediated excitation by chronic treatment with estradiol in developing rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 21: 3251-3261.
- Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, Schulz LC, Schust DJ (2012) Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. *Dis Model Mech* 5: 9-18.
- Richardson C, Alessi DR (2008) The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signalling pathway. *J Cell Sci* 121: 3293-3304.
- Wang XY, Masilamani S, Nielsen J, Kwon TH, Brooks HL, Nielsen S, Knepper MA (2001) The renal thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as mediator of the aldosterone-escape phenomenon. *J Clin Invest* 108: 215-222.
- Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X, Lifton RP (2001) Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293: 1107-1112.

Fundamental Research of WNK-NKCC1 Signaling Activity in Pregnant Mice

Koichi Inoue, Tomonori Furukawa, Atsuo Fukuda

Department of Neurophysiology, Hamamatsu University School of Medicine

Summary

Pregnancy-induced hypertension (PIH) is condition with high blood pressure related to pregnancy, and can affect 5-8% in pregnancy. The severe cases, regarded as eclampsia, further have brain swelling and subsequent convulsions. Although the exact mechanism by which PIH develops remains uncovered, we hypothesized that Cl⁻ transporter, NKCCs and KCCs are associated with the pathophysiology of the disorders because high blood pressure and brain edema are involved in the main symptoms. NKCCs make an influx of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ into cells while KCCs extrude K⁺ and Cl⁻ out of cells. Our preliminary experiments indicated that β -estradiol activates NKCC activity in rat neuronal cells by means of whole-cell patch-clamp recordings. Therefore, to examine the relation between NKCC/KCC and pregnancy, expression and phosphorylation of Cl⁻ transporter-related proteins were investigated in brain and kidney in the absence or presence of pregnancy. Immunoblot analysis revealed that NKCC1/2 protein decreased in kidney, but not in brain, in mice on gestational day 17. Indeed, KCC2, a counterpart of NKCC1, did not change in brain. On the other hand, the phosphorylation of SAPK, an upstream kinase of NKCC/KCC, decreased in brain, but not in kidney, in pregnant mice. These results may suggest that in both brain and kidney Cl⁻ transporter activity shifts not to import salt and the resultant passive water intake. To study the possibility, brain slices were prepared, and gramicidin-perforated patch-clamp recordings were carried out on cortical neurons in the absence or presence of pregnancy. Reversal potential of GABA in pregnant mice was likely to be more hyperpolarized than that of non-pregnant ones, suggesting the reduction of NKCC activity. This is consistent with that biochemical data in which NKCC activity decreased in pregnancy. Taken together, ion balance may forward to export Cl⁻ outside cells and body in normal pregnancy. The system could play a role in maintenance of systemic ion and water circulation. Elucidation of the mechanism and the effect on PIH would be expected in future.