

201223006A

厚生労働科学研究費補助金

難治疾患克服研究事業（腎疾患対策研究事業）

WNK キナーゼをターゲットとした CKD 進展阻止のための新規  
治療薬の開発と最適降圧薬選択法の確立に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 内田 信一

平成25（2013）年 3月

厚生労働科学研究費補助金  
難治疾患克服研究事業（腎疾患対策研究事業）

WNKキナーゼをターゲットとしたCKD進展阻止のための新規治療薬の  
開発と最適降圧薬選択法の確立に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 内田 信一

# 目次

## I. 総括研究報告

WNKキナーゼをターゲットとしたCKD進展阻止のための新規治療薬の開発と  
最適降圧薬選択法の確立に関する研究 ----- 1

内田 信一 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科腎臓内科学)

## II. 分担研究報告

塩分感受性高血圧モデルマウスを用いた塩分ストレスバイオマーカーの探索

蘇原映誠 (東京医科歯科大学医学部附属病院腎臓内科) --- 7

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 1 1

IV. 研究成果の別刷 ----- 1 5

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治疾患克服研究事業（腎疾患対策研究事業））  
（総括）研究報告書

WNKキナーゼをターゲットとしたCKD進展阻止のための新規治療薬の開発と  
最適降圧薬選択法の確立に関する研究

研究代表者 内田信一 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科腎臓内科学  
准教授

研究要旨：

WNK-OSR1/SPAK シグナル伝達系阻害薬の開発のため、OSR1/SPAK と WNK キナーゼの結合を阻害する化合物を化合物ライブラリーからスクリーニングするシステムの構築を試みた。その結果、OSR1/SPAK と WNK キナーゼの結合を再現性よく 384 ウェルプレート上で検出できる系を蛍光相関分光法を用いて確立し、20000 種の化合物のスクリーニングを開始した。  
ヒトにおける塩分感受性の指標となるかを検討するため、尿中 NaCl 共輸送体 (NCC) ならびにリン酸化 NCC (pNCC) 測定のための ELISA 系の確立をめざした。その結果、尿からのエクソソームの ELISA に適合した単離方法と実際の ELISA 測定系を確立することができた。

研究分担者：蘇原映誠・東京医科  
歯科大学医学部附属病院腎臓内  
科・講師

A. 研究目的

慢性腎臓病（CKD）の進展阻止の重要な方策の一つが血圧の良好なコントロールであることは論を待たない。また今後はCKDの進展阻止のみならず改善をめざす事が可能な薬剤が求められている。よって本研究では、1) 新たな作用機序による腎機能改善作用を併せ持つ降圧薬の開発をめざす。並行して2) 現役の降圧薬の適切な選択のためのバイオマーカーの開発。さらに3) 血圧コントロールが至適であるかをモニターできるバイオマーカーの開発を行う。

B. 研究方法

1) について、24年度はWNK-OSR1/SPAK シグナル伝達系阻害薬の開発を目指した。WNK キナーゼと SPAK キナーゼの結合部位は判明しており、結合によりシグナル伝達が行われるため、両者の結合を阻害する薬剤をスクリーニングする。方法は、384 穴プレートで蛍光分子の揺らぎ（並進拡散時間）の速度を計測できる機器（FluoroPoint Light オリンパス）を使用し、蛍光ラベルした WNK キナーゼの並進拡散時間が、SPAK との結合で低下し、阻害薬で回復するという現象を利用してスクリーニングを行う。  
2) については、サイアザイド感受性 NaCl 共輸送体 (NCC) およびその活性化体であるリン酸化 NCC (pNCC) のヒト尿中エクソソーム内の定量を可能にする ELISA 系の確立を目指し、サイアザイド感受性を検出するバイ

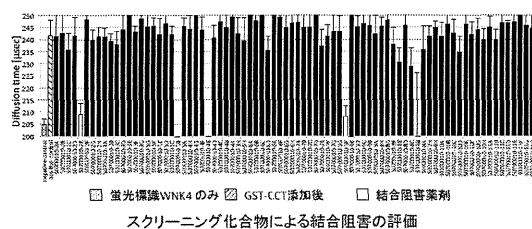
オマーカーの確立を目指した。すでに NCC に対して、その複数のエピトープに対して高感度な抗体を保有している強みを生かし、特異性の向上のため、サンドイッチ ELISA 方を作成する。あわせて、今までの尿中エクソソームの単離方法が、ELISA 法に適してはいないため、ELISA 法に最適化された単離方法の確立を目指した。

2つの実験計画とも、この時点では患者検体を扱うことはないため、特段の倫理面への配慮は必要ないと考えた。

### C. 研究結果

WNK-OSR1/SPAK シグナル伝達系阻害薬の開発については、蛍光相関分光法を用いた機器 (FluoroPoint Light、オリンパス社) にて、WNK と SPAK の結合を 384 穴プレートで検出可能なアッセイ系を確立した。ケミカルライブラリーの化合物の予備スクリーニングを開始し、図 1 に示すような結合阻害物質をスクリーニング可能なことが示された。

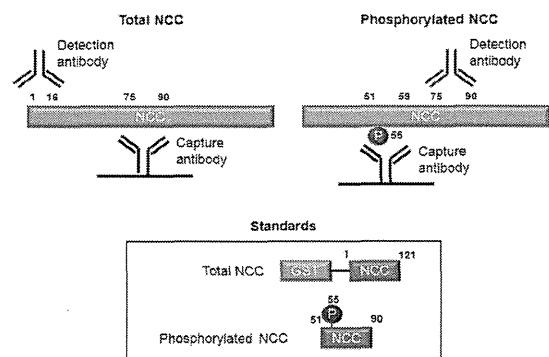
図 1



尿中エクソソームの単離は、通常超遠心法を用いる。その結果、尿に多量に含まれる Tamm-Horsfall 蛋白が混入し、ELISA 用検体として可溶化する事がむずかしい。そこで、DTT をエクソソーム調整時に追加することで ELISA 用に最適化した調整法を開発

した。ELISA についても図 2 のようにシステムを構築し、正常ボランティアの尿において、測定可能なことを明らかにした。

図 2



### D. 考察

研究計画 1) に関しては、スクリーニング系が完成したので、本スクリーニングを次年度に行い候補化合物を得られる目処がついた。2) に関しても、ELISA 系完成したため、今後は患者尿にて測定を行い、尿 NCC 測定の臨床的意義を確立する。3) に関しては次年度以降、研究分担者が進める遺伝子改変高血圧モデルマウスの検体を用いて網羅的解析を行い、新たなバイオマーカーを得る。

### E. 結論

WNK-OSR1/SPAK シグナル伝達系阻害薬およびサイアザイド感受性検査法開発のための基礎技術を確立できた。

### F. 健康危険情報

該当無し。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Hara-Chikuma M, Sugiyama Y, Kabashima K, Sohara E, Uchida S,

- Sasaki S, Inoue S, Miyachi Y. Involvement of aquaporin-7 in the cutaneous primary immune response through modulation of antigen uptake and migration in dendritic cells. *FASEB J.* 26:211-8, 2012.
2. Hossain Khan MZ, Sohara E, Ohta A, Chiga M, Inoue Y, Isobe K, Wakabayashi M, Oi K, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 and SPAK kinases regulates its ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425:456-61, 2012.
  3. Louchami K, Best L, Brown P, Virreira M, Hupkens E, Perret J, Devuyst O, Uchida S, Delporte C, Malaisse WJ, Beauwens R, Sener A. A new role for aquaporin 7 in insulin secretion. *Cell Physiol. Biochem.* 29:65-74, 2012.
  4. Naguro I, Umeda T, Kobayashi Y, Maruyama J, Hattori K, Shimizu Y, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Uchida S, Vandewalle A, Noguchi T, Nishitoh H, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H. ASK3 responds to osmotic stress and regulates blood pressure by suppressing WNK1-SPAK/OSR1 signaling in the kidney. *Nat. Commun.* 3:1285, 2012.
  5. Nishida H, Sohara E, Nomura N, Chiga M, Alessi DR, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway activates the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in hyperinsulinemic db/db mice. *Hypertension.* 60:981-90, 2012.
  6. Ohta E, Akazawa M, Noda Y, Mandai S, Naito S, Ohta A, Sohara E, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Severe hyperparathyroidism in a pre-dialysis chronic kidney disease patient treated with a very low protein diet. *J. Bone Miner. Metab.* 30:238-42, 2012.
  7. Ohtaki H, Ohara K, Song D, Miyamoto K, Tsumuraya T, Yofu S, Dohi K, Tanabe S, Sasaki S, Uchida S, Matsunaga M, Shioda S. Accumulation of autofluorescent storage material in brain is accelerated by ischemia in chloride channel 3 gene-deficient mice. *J. Neurosci. Res.* 90:2163-72, 2012.
  8. Oi K, Sohara E, Rai T, Misawa M, Chiga M, Alessi DR, Sasaki S, Uchida S. A minor role of WNK3 in regulating phosphorylation of renal NKCC2 and NCC co-transporters in vivo. *Biol. Open.* 1:120-7, 2012.
  9. Susa K, Kita S, Iwamoto T, Yang SS, Lin SH, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Alessi DR, Uchida S. Effect of heterozygous deletion of WNK1 on the WNK-OSR1/SPAK-NCC/NKCC1/NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels. *Clin. Exp. Nephrol.*

- 16:530-8, 2012.
10. Susa K, Sohara E, Isobe K, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK-OSR1/SPAK-NCC signal cascade has circadian rhythm dependent on aldosterone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427:743-7, 2012.
  11. Uchida S, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S. Does a  $\beta$ 2-adrenergic receptor-WNK4-Na-Cl co-transporter signal cascade exist in the in vivo kidney? *Nat. Med.* 18:1324-5, 2012.
2. 学会発表
1. Hossain Khan MZ, Sohara E, Ohta A, Chiga M, Inoue Y, Isobe K, Wakabayashi M, Naito S, Oi K, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 and SPAK kinases regulates its ubiquitination. The 45<sup>th</sup> Annual meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2012.
  2. Iimori S, Naito S, Eto K, Sohara E, Okado T, Noda Y, Rai T, Uchida S, Sasaki S, The effect of Educational Hospitalization (EH) on the progression of CKD. 1st Chronic Kidney Disease Frontier Meeting, Nagoya, February 2012.
  3. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Rai T, Ishibashi K, Sasaki S, Shinichi U. Impaired trafficking of polycystin-1 may be a key mechanism of cyst formation in the aquaporin-11 knockout mouse. The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2012.
  4. Isobe K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Development of sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of urinary total and phosphorylated Na-Clcotransporter (NCC) protein. The 45<sup>th</sup> Annual meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2012.
  5. Kikuchi E, Mori T, Isobe K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for direct SPAK inhibitors by a newly developed ELISA system. The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2012.
  6. Mori T, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Generation and analysis of WT-WNK4 transgenic mice revealed the physiological role of WNK4. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2012.
  7. Sasaki S, Chiga M, Kikuchi E, Uchida S. Hereditary nephrogenic diabetes insipidus (NDI) in Japanese patients: Analysis of 73 families. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology,



- San Diego, November, 2012.
8. Susa K, Sohara E, Isobe K, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S: WNK4-OSR1/SPAK-NCC signal cascade has circadian rhythm dependent on aldosterone. The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2012.
  9. Zeniya M, Sohara E, Oi K, Chiga M, Susa K, Mori T, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt intake and angiotensin II regulates WNK-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta. The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2012.
  10. Uchida S. Role of WNK kinases in the blood pressure regulation. Taiwan Society of Nephrology 2012, China Medical University, Taichung, Taiwan, December, 2012.
  11. Uchida S. Chemical library screening for drugs to correct intracellular mislocalization of R8L mutant barttin. 2012 International Ion Channel Conference. The New world of anion and cation channels. Jeju, Korea, August, 2012.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当無し。

## II. 分担研究報告

塩分感受性高血圧モデルマウスを用いた塩分ストレスバイオマーカーの探索

研究分担者 蘇原映誠 東京医科歯科大学医学部附属病院腎臓内科 講師

研究要旨：

塩分感受性高血圧モデルマウスを用いた塩分ストレスバイオマーカーの探索を行うために、新たな塩分感受性高血圧モデルマウス作成を行うとともに、既に作成した遺伝性高血圧モデルマウスであるWNK4変異ノックインマウスに高塩食を負荷し、各種臓器におきる反応を網羅的解析により明らかにする。KLHL3はその遺伝子変異が、WNK4と同様に、ヒト遺伝性塩分感受性高血圧症である偽性低アルドステロン症II型を引き起こす事が判明した。その病原性変異であるR528Hミスセンス変異を発現するノックインマウスを作成すべくターゲティングベクター作成し、それを用いてリコンビナントES細胞の単離を行った。

A. 研究目的

WNK キナーゼシグナル伝達系の亢進は、塩分感受性高血圧症を引き起こす。我々はすでに偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAII) を引き起こす WNK4 の変異と同じ変異をもつモデルマウス (WNK4 変異ノックインマウス) を作成し PHAII の病態を明らかにしてきた。最近 WNK キナーゼ以外に新たに KLHL3 と Cullin3 の遺伝子異常が PHAII を引き起こす事が示された。本研究では、WNK4 ノックインマウスにおいて塩分負荷が全身臓器に及ぼす影響を種々の網羅的解析により明らかにすることを目的とする。さらに、KLHL3 変異ノックインマウスを作成し、WNK4 ノックインマウスとの反応性の類似点と相違点を明らかにすることで、真の新たな塩分ストレス応答因子を明らかにする。

B. 研究方法

塩分感受性の亢進している WNK4 変異

ノックインマウスに、急性ないし慢性の高塩食負荷をかけ、各臓器(主として腎組織、血管系、尿、血液など)における mRNA および蛋白の網羅的解析を行い、塩分負荷で著明に反応する分子の候補を得る。また、そのスクリーニングの特異度をあげるため、WNK4 変異以外で PHAII を引き起こす病態モデルマウスを作成し、同様の解析を行い、両方のモデルで共通してみられる現象を高塩ストレスに応答する因子の有力な候補と判断する。実際には KLHL3 において、ヒト PHAII で発見された変異を導入したノックインマウスを作成する。24年度はそのためのターゲティングベクター作成、及びリコンビナント ES 細胞の単離を行った。

C. 研究結果

ヒトで PHAII を引き起こす KLHL3 の R528H 変異をもつモデルマウスを作成するために、ターゲティングベクターの作成とそれを用いた ES 細胞のス

クリーニングを行った。その結果、PCR法、サザンブロットで相同組み替えを確認できた ES 細胞が数種類単離された。一方、既存の WNK4 変異ノックインマウスに、高塩食 (NaCl 8%) を 12 週間負荷し、網羅的解析の予備実験として腎臓での繊維化等の変化を組織学的に検討したが、大きな変化は確認できなかった。

#### D. 考察

KLHL3 変異ノックインマウス作成に関しては、十分な質の良い組み替え ES 細胞のクローンを得ることができたので、次年度にキメラマウスを作成し、germ-line transmission を経て、変異ノックインマウスが得られる事が十分期待された。一方、通常の高塩負荷プロトコールでは、予想に反し組織学的には大きな変化がないこともわかり、塩分負荷にプラスして腎機能障害等の負荷を加えてみるなどいくつかの予備実験を行う予定である。その後、網羅的探索を行う予定である。

#### E. 結論

KLHL3 変異ノックインマウス作成に目処をつけることができ、新たな塩分感受性高血圧モデルを得ることができると思われた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

12. Hara-Chikuma M, Sugiyama Y, Kabashima K, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Inoue S, Miyachi Y. Involvement of aquaporin-7 in the cutaneous primary immune response through modulation of antigen

uptake and migration in dendritic cells. *FASEB J.* 26:211-8, 2012.

13. Hossain Khan MZ, Sohara E, Ohta A, Chiga M, Inoue Y, Isobe K, Wakabayashi M, Oi K, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 and SPAK kinases regulates its ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425:456-61, 2012.
14. Nishida H, Sohara E, Nomura N, Chiga M, Alessi DR, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway activates the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in hyperinsulinemic db/db mice. *Hypertension.* 60:981-90, 2012.
15. Ohta E, Akazawa M, Noda Y, Mandai S, Naito S, Ohta A, Sohara E, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Severe hyperparathyroidism in a pre-dialysis chronic kidney disease patient treated with a very low protein diet. *J. Bone Miner. Metab.* 30:238-42, 2012.
16. Oi K, Sohara E, Rai T, Misawa M, Chiga M, Alessi DR, Sasaki S, Uchida S. A minor role of WNK3 in regulating phosphorylation of renal NKCC2 and NCC co-transporters in vivo. *Biol. Open.* 1:120-7, 2012.
17. Susa K, Kita S, Iwamoto T, Yang SS, Lin SH, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Alessi DR, Uchida S.

- Effect of heterozygous deletion of WNK1 on the WNK-OSR1/SPAK-NCC/NKCC1/NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels. *Clin. Exp. Nephrol.* 16:530-8, 2012.
18. Susa K, Sohara E, Isobe K, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK-OSR1/SPAK-NCC signal cascade has circadian rhythm dependent on aldosterone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427:743-7, 2012.
  19. Uchida S, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S. Does a  $\beta$ 2-adrenergic receptor-WNK4-Na-Cl co-transporter signal cascade exist in the in vivo kidney? *Nat. Med.* 18:1324-5, 2012.
2. 学会発表
12. Hossain Khan MZ, Sohara E, Ohta A, Chiga M, Inoue Y, Isobe K, Wakabayashi M, Naito S, Oi K, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 and SPAK kinases regulates its ubiquitination. The 45<sup>th</sup> Annual meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2012.
  13. Iimori S, Naito S, Eto K, Sohara E, Okado T, Noda Y, Rai T, Uchida S, Sasaki S, The effect of Educational Hospitalization (EH) on the progression of CKD. 1st Chronic Kidney Disease Frontier Meeting, Nagoya, February 2012.
  14. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Rai T, Ishibashi K, Sasaki S, Shinichi U. Impaired trafficking of polycystin-1 may be a key mechanism of cyst formation in the aquaporin-11 knockout mouse. The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2012.
  15. Isobe K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Development of sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of urinary total and phosphorylated Na-Clcotransporter (NCC) protein. The 45<sup>th</sup> Annual meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2012.
  16. Kikuchi E, Mori T, Isobe K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for direct SPAK inhibitors by a newly developed ELISA system. The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2012.
  17. Mori T, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Generation and analysis of WT-WNK4 transgenic mice revealed the physiological role of WNK4. The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2012.
  18. Susa K, Sohara E, Isobe K, Chiga M,

Rai T, Sasaki S, Uchida S:  
WNK4-OSR1/SPAK-NCC signal  
cascade has circadian rhythm  
dependent on aldosterone. The 45<sup>th</sup>  
Annual Meeting of American  
Society of Nephrology, San Diego,  
November, 2012.

19. Zeniya M, Sohara E, Oi K, Chiga M,  
Susa K, Mori T, Rai T, Sasaki S,  
Uchida S. Dietary salt intake and  
angiotensin II regulates

WNK-SPAK-NKCC1  
phosphorylation cascade in mouse  
aorta. The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of  
American Society of Nephrology,  
San Diego, November, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当無し。

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hara-Chikuma M, Sugiyama Y, Kabashima K, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Inoue S, Miyachi Y.	Involvement of aquaporin-7 in the cutaneous primary immune response through modulation of antigen uptake and migration in dendritic cells.	FASEB J.	26	211-218	2012
Hossain Khan MZ, Sohara E, Ohta A, Chigama M, Inoue Y, Isobe K, Wakabayashi M, Oi K, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 and SPAK kinases regulates its ubiquitination.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	425	456-61	2012
Louchami K, Best L, Brown P, Virreira M, Hupkens E, Perret J, Devuyst O, Uchida S, Delporte C, Malaisse WJ, Beauwens R, Sener A.	A new role for aquaporin 7 in insulin secretion.	Cell Physiol. Biochem.	29	65-74	2012
Naguro I, Umeda T, Kobayashi Y, Maruyama J, Hattori K, Shimizu Y, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Uchida S, Vandewalle A, Noguchi T, Nishitoh H, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H.	ASK3 responds to osmotic stress and regulates blood pressure by suppressing WNK1-SPAK/OSR1 signaling in the kidney.	Nat. Commun.	3	1285	2012



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishida H, Sohara E, Nomura N, Chiga M, AlessiDR, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway activates theWNK-OSR1/SPAK- NCC phosphorylation cascade in hyperinsulinemic db/db mice.	Hypertension.	60	981-90	2012
Ohta E, Akazawa M, Noda Y, Mandai S, Naito S, Ohta A, Sohara E, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S.	Severe hyperparathyroidism in a pre-dialysis chronic kidney diseasepatient treated with avery low protein diet.	J. Bone Miner. Metab.	30	238-42	2012
Ohtaki H, Ohara K, Song D, Miyamoto K, Tsumuraya T, Yofu S, Dohi K, Tanabe S, Sasaki S, Uchida S, Matsunaga M, Shioda S.	Accumulation of autofluorescent storage material in brain is accelerated by ischemia in chloride channel 3 gene-deficient mice.	J. Neurosci. Res.	90	2163-72	2012
Oi K, Sohara E, Rai T, Misawa M, Chiga M, AlessiDR, Sasaki S, Uchida S.	A minor role of WNK3 in regulating phosphorylation of renal NKCC2 and NCC co-transporters in vivo.	Biol.Open.	1	120-7	2012
Susa K, Kita S, Iwamoto T, Yang SS, Lin SH, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Alessi DR, Uchida S.	Effect of heterozygousdeletion of WNK1 on the WNK-OSR1/SPAK- NCC/NKCC1/NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels.	Clin. Exp. Nephrol.	16	530-8	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Susa K, Sohara E, Isobe K, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	WNK-OSR1/SPAK- NCC signal cascade has circadian rhythm dependent on aldosterone.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	427	743-7	2012
Uchida S, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S.	Does a $\beta$ 2-adrenergic receptor-WNK4-Na-Cl co-transporter signal cascade exist in the in vivo kidney?	Nat. Med.	18	1324-5	2012

#### IV. 研究成果の別刷

# Involvement of aquaporin-7 in the cutaneous primary immune response through modulation of antigen uptake and migration in dendritic cells

Mariko Hara-Chikuma,<sup>\*,†,1</sup> Yoshinori Sugiyama,<sup>†</sup> Kenji Kabashima,<sup>\*</sup> Eisei Sohara,<sup>‡</sup> Shinichi Uchida,<sup>‡</sup> Sei Sasaki,<sup>‡</sup> Shintaro Inoue,<sup>†</sup> and Yoshiki Miyachi<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Department of Dermatology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan;

<sup>†</sup>Innovative Beauty Science Laboratory, Kanebo Cosmetics Inc., Odawara, Japan; and <sup>‡</sup>Department of Nephrology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

**ABSTRACT** Dendritic cells (DCs) have the ability to present antigen and play a critical role in the induction of the acquired immune response. Skin DCs uptake antigen and subsequently migrate to regional draining lymph nodes (LNs), where they activate naive T cells. Here we show that the water/glycerol channel protein aquaporin 7 (AQP7) is expressed on epidermal and dermal DCs and involved in the initiation of primary immune responses. AQP7-deficient DCs showed a decreased cellular uptake of low-molecular-mass compounds (fluorescein isothiocyanate and Lucifer yellow) and high-molecular-mass substances (ovalbumin and dextran), suggesting that AQP7 is involved in antigen uptake. AQP7-deficient DCs also exhibited reduced chemokine-dependent cell migration in comparison to wild-type DCs. Consistent with these *in vitro* results, AQP7-deficient mice demonstrated a reduced accumulation of antigen-retaining DCs in the LNs after antigen application to the skin, which could be attributed to decreased antigen uptake and migration. Coincidentally, AQP7-deficient mice had impaired antigen-induced sensitization in a contact hypersensitivity model. These observations suggested that AQP7 in skin DCs is primarily involved in antigen uptake and in the subsequent migration of DCs and is responsible for antigen presentation and the promotion of downstream immune responses.—Hara-Chikuma, M., Sugiyama, Y., Kabashima, K., Sohara, E., Uchida, S., Sasaki, S., Inoue, S., Miyachi, Y. Involvement of aquaporin-7 in the cutaneous primary immune response through modulation of antigen uptake and migration in dendritic cells. *FASEB J.* 26, 211–218 (2012). [www.fasebj.org](http://www.fasebj.org)

*Key Words:* macropinocytosis • phagocytosis • chemotaxis

THE SKIN PROVIDES A PERMEABILITY barrier and a highly refined system of immune surveillance to protect the body against unwanted substances, such as infectious agents, pathogens, or antigens from the environment. The immune system of the skin relies on a rich network of antigen-presenting dendritic cells (DCs) that localize in the epidermis and the dermis. Cur-

rently, skin DCs are divided into 3 subsets: epidermal Langerhans cells (LCs) and Langerin<sup>+</sup> or Langerin<sup>-</sup> dermal DCs (dDCs) (1, 2). DCs residing in the skin capture foreign antigens or pathogens, then mature and migrate to draining lymph nodes (LNs), where they present antigen to naive T cells and initiate immune responses (3–5). Immature DCs can constitutively uptake antigens by several pathways, such as macropinocytosis of soluble antigens; phagocytosis of particles, including viruses and bacteria; and receptor-mediated endocytosis (6, 7). Although the relative contributions of LCs or dDCs in antigen capture and processing remain undefined (8, 9), both are presumed to have key roles in eliciting cutaneous immune responses.

Aquaporins (AQPs) are integral membrane channel proteins that form a barrel-like structure surrounding pores, allowing the transport of water and other small solutes. To date, 13 AQPs (named AQP0–12) have been identified in mammals, and these are classified into 3 major subtypes according to their transport capabilities: water-selective AQPs (AQPs 1, 2, 4, and 5); aquaglyceroporins that transport water and possibly other small solutes, such as glycerol (AQPs 3, 7, 9, and 10); and unorthodox AQPs (AQPs 6, 8, 11, and 12) (10–12). The selectivity of the AQPs results both from a steric mechanism because of the pore size and from specific amino acid substitutions that regulate the preference for a hydrophobic or hydrophilic substrate (13, 14). Numerous studies have revealed the potential roles of AQPs in several organs and their functions, for example, AQPs 1–3 in the urinary concentrating system (15), AQP1 in angiogenesis (16), AQP3 in tumorigenesis (17), and AQP4 in neuromyelitis optica and brain edema (18, 19).

With regard to expression of AQPs in DCs, some

<sup>1</sup> Correspondence: Center for Innovation in Immunoregulative Technology and Therapeutics, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan. E-mail: [haramari@kuhp.kyoto-u.ac.jp](mailto:haramari@kuhp.kyoto-u.ac.jp)  
doi: 10.1096/fj.11-186627

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.