

201316004A

厚生労働科学研究費補助金

難治疾患等克服研究事業（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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 内田 信一

平成 26（2014）年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
難治疾患等克服研究事業（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25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 3

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(難治疾患等克服研究事業 (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し、OSR1/SPAK と WNK キナーゼの結合を阻害する化合物を数種同定し、培養細胞系、マウスにおいて再現性よく NaCl 共輸送体(NCC)のリン酸化を阻害する seed 化合物 2 種を同定し報告した。

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 系の確立し、ギッテルマン症候群、偽性低アルドステロン症 II 型の診断に有用である事を報告するとともに、100 名程度の CKD 患者での測定も終了し、尿中 NCC 測定のもつチアジド薬感受性スクリーニング法の確立の為の基礎臨床データが得られ、論文報告した。

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) の研究計画に関しては、**WNK-OSR1/SPAK** シグナル伝達系阻害薬の開発のため、**WNK** キナーゼと **SPAK** キナーゼの結合を阻害する薬剤のスクリーニングを 24 年度に開発した方法で開始し、約 2 万種の化合物のスクリーニングを終了した。

2) の研究計画については、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** 系を 24 年度に確立し、25 年度はヒト検体の尿検体の測定を開始することがで

きた。この研究はヒト尿検体を扱うため、東京医科歯科大学倫理委員会の承認のもと行われた。

3) については、我々の PHAI1 モデルマウスに高塩負荷を行った際の各種臓器で蛋白レベルの網羅的解析を試みた。また、新規の PHAI1 モデルマウス (KLHL3 ノックインマウスの作成を研究分担者の蘇原らが行った)。

C. 研究結果

1) スクリーニングの結果 2 種類の seed 化合物を得て、論文報告した。次年度は、これらの seed 化合物に化学修飾を施し、生体内でより効果を得られる薬剤開発を目指す。また、SPAK キナーゼ自体の阻害薬の開発も行い、こちらも有望な 5 種類の seed 化合物を得ることに成功した。特に既存薬ライブラリーのスクリーニングも行い、そこから得られた seed は毒性の点で次のステップを短縮できる可能性もあり、動物レベルでの効果確認が大きい期待される。

2) 確立した測定法が、ギッテルマン症候群、偽性低アルドステロン症 II 型の診断に有用である事を報告するとともに、100 名程度の CKD 患者での測定も終了し、尿中 NCC 測定のもつチアジド薬感受性スクリーニング法の確立の為の基礎臨床データが得られ、論文報告した。

3) 蛋白レベルで網羅的解析を行う事には、試料の可溶性の問題等で未だ多

くの問題点がある事が判明した。そこで仮に蛋白レベルでの制御だとしても、mRNA 量の変化が 2 次的にでも反映されていることが多いことを考慮し、スクリーニングとしては DNA アレイや、次世代シーケンサーを用いたチップシーケンスにより、これらのアクセシを腎臓、血管、心臓、脂肪細胞等をターゲットとして行い、塩分負荷や高血圧状態で変化する遺伝子群の同定を試み、その有用性を種々の高血圧モデルや新たに作成した腎機能障害モデルで検証する。

D. 考察

研究計画 1) に関しては 2 つのアプローチからともに有望な seed 化合物が得られており、次年度中に最適化を行う。2) に関しても、ヒトでの 100 例程度の測定が終了し基礎データが得られたため、今後測定系の更なる brush-up を行い、臨床的有用性を確立する。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上記の網羅的解析を行い、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臨床応用への基礎データを確立できた。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Isobe K, Mori T, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Kumagai N, Kamada F, Morimoto T, Hayashi M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for urinary thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter (NCC) measurement. *Am J Physiol Renal Physiol.* 305: F1374-81, 2013.
2. Inoue R, Sohara E, Rai T, Satoh T, Yokozeki H, Sasaki S, Uchida S. Immunolocalization and translocation of aquaporin-5 water channel in sweat glands. *J Dermatol Sci.* 70: 26-33, 2013.
3. Mori T, Kikuchi E, Watanabe Y, Fujii S, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for WNK signalling inhibitors using fluorescence correlation spectroscopy. *Biochem J.* 455: 339-45, 2013.
4. Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Araki Y, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Decrease of WNK4 ubiquitination by disease-causing mutations of KLHL3 through different molecular mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 439: 30-4, 2013.
5. Nomura N, Kamiya K, Ikeda K, Yui N, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Treatment with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin ameliorated symptoms of Bartter syndrome type caused by mutated *Bsnd* in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 441: 544-49, 2013.
6. Sasaki S, Chiga M, Kikuchi E, Rai T, Uchida S. Hereditary nephrogenic diabetes insipidus in Japanese patients: analysis of 78 families and report of 22 new mutations in *AVPR2* and *AQP2*. *Clin Exp Nephrol.* 17: 338-344, 2013.
7. Takahashi D, Mori T, Wakabayashi M, Mori Y, Susa K, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. KLHL2 interacts with and ubiquitinates WNK kinases. *Biochem Biophys Res Commun.* 437: 457-62, 2013.
8. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Matsuo H, Murata T, Nomura S, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension. *Cell Rep.* 3: 858-68, 2013.
9. Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II. *Hypertension.* 62: 872-878, 2013.

2. 学会発表

1. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Rai T, Ishibashi K, Horie S, Su X, Zhou J, Sasaki S, Uchida S. Aberrant Glycosylation and Localization of Polycystin-1 Cause Polycystic Kidney in AQP11-Knockout Mice. The 46th Annual Meeting of American

- Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
2. Ishigami J, Tajima M, Motomura A, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Association between Mortality Risk and Severity of Acute Kidney Injury among Critical-care Patients from Remote Islands: A Single Center Prospective Cohort Study. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
 3. Ishimoto I, Sohara E, Ito E, Chiga M, Iimori S, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S. A case of fibronectin glomerulopathy with rapidly progressive, severe nephrotic syndrome leading to end-stage renal disease. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
 4. Isobe K, Mori T, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Clinical Significance of Urinary Thiazide-Sensitive Na-Cl Cotransporter (NCC) Measurement by Newly Development Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. The 46th Annual meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
 5. Mori T, Eriko K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for WNK signaling inhibitors by using fluorescent correlation spectroscopy. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
 6. Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Araki Y, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Analyses of KLHL3 mutants that cause Pseudohypoaldosteronism type II. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
 7. Naito S, Iimori S, Okado T, Noda Y, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Evaluation of blood pressure control of chronic kidney disease patients prior to nephrologist care in Japan. 50th European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA) Congress, Istanbul, May, 2013.
 8. Okado T, Iimori S, Noda Y, Yamamura C, Kihira H, Yui N, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Anemia status of middle stage CKD patients on their first visit to the nephrology clinic in Japan. 50th ERA-EDTA Congress, Istanbul, Turkey, May, 2013.
 9. Susa K, Sohara E, Zeniya M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Low salt intake decreased transcription and protein level of KLHL3 in mouse kidney. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
 10. Takahashi D, Mori T, Wakabayashi M, Mori Y, Susa K, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. KLHL2 interacts with and ubiquitinates WNK kinases. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
 11. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 activates OSR1 and SPAK

- kinases-NaCl cotransporter (NCC) signaling and causes hypertension. The 46st Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
12. Yui N, Uchida S, Sasaki S. Ser-261 phosphorylation is an endocytic signal of aquaporin-2 water channel. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, USA, November, 2013.
13. Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK3 Regulates Blood Pressure Through the Regulation of Vascular OSR1/SPAK-NKCC1 Phosphorylation Cascade. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
- 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が、その生体内での病態生理は不明であった。そこで病原性変異であるR528Hミスセンス変異を発現するノックインマウスを作成し解析した。その結果、腎臓でWNK1とWNK4のタンパク発現量が増大し、下流のOSR1/SPAKキナーゼ-NCC輸送体刺激伝導系が活性化されていることが判明した。

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 (PHAI) 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 PHAI 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 PHAI 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 PHAI 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効な候補と判断する。実際には KLHL3 において、ヒト PHAI 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。25 年度はその作成に成功し、解析を行った。

C. 研究結果

網羅的解析による、塩分負荷に応答するマーカーの探索は、腎臓での網羅的なリン酸化プロテオームを共同研究

にて行ったが、実質臓器からのリン酸化蛋白の精製、特に可溶性の問題から検出される蛋白の数に限りが見られた。そこで、方針を変更し、まずは最近その精度と再現性が向上したDNAマイクロアレイにてmRNAレベルで変動する遺伝子の同定を行い、現在候補遺伝子の選別と再現性の有無を検証中である。また、エピジェネティックな変化は、最近の次世代シーケンサーの発達とともに、網羅的解析を行えるようになってきている。今回我々は、まだ実質臓器では難しかった網羅的なチップシーケンス解析を腎臓で行う事に成功した。上記のマイクロアレイ解析の結果やRNAシーケンスの結果とあわせて、次年度に取り組むべきターゲットを明らかにする。

一方、ヒトで PHAII を引き起こす KLHL3 の R528H 変異をもつモデルマウスの作成に成功し、解析を行った。その結果、腎臓での WNK1, WNK4 の蛋白量が著増しており、当初の仮説通り、KLHL3 の変異が WNK の分解を阻害し、細胞内で増加した WNK が下流のシグナル系を活性化して PHAII を引き起こしていると思われた。

D. 考察

KLHL3 変異ノックインマウス作成により、PHAII の病態の本質、すなわちユビキチン化障害による WNK 蛋白量の増加、が明らかとなった。今後は、この系の破綻が PHAII のみならず、他の WNK キナーゼの制御においても関わりがないかを探るとともに、KLHL を外的に制御して WNK キナーゼシグナル系を

制御する方策を探索する。

塩分負荷や血圧のバイオマーカー探索は、蛋白レベルでは難しいことも判明し、DNA レベルでの検討を行いデータは既に得られた。解析をすすめて、次年度以降に更なる検討を加える。

E. 結論

KLHL3 変異ノックインマウス作成と解析を終了し、WNK キナーゼの新たな分解による制御系を明らかにすることができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Isobe K, Mori T, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Kumagai N, Kamada F, Morimoto T, Hayashi M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for urinary thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter (NCC) measurement. *Am J Physiol Renal Physiol.* 305: F1374-81, 2013.
2. Inoue R, Sohara E, Rai T, Satoh T, Yokozeki H, Sasaki S, Uchida S. Immunolocalization and translocation of aquaporin-5 water channel in sweat glands. *J Dermatol Sci.* 70: 26-33, 2013.
3. Mori T, Kikuchi E, Watanabe Y, Fujii S, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for WNK signalling inhibitors using fluorescence correlation spectroscopy. *Biochem J.* 455: 339-45, 2013.
4. Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Araki Y, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Decrease of WNK4

- ubiquitination by disease-causing mutations of KLHL3 through different molecular mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 439: 30-4, 2013.
5. Nomura N, Kamiya K, Ikeda K, Yui N, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Treatment with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin ameliorated symptoms of Bartter syndrome type caused by mutated *Bsnd* in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 441: 544-49, 2013.
 6. Takahashi D, Mori T, Wakabayashi M, Mori Y, Susa K, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. KLHL2 interacts with and ubiquitinates WNK kinases. *Biochem Biophys Res Commun.* 437: 457-62, 2013.
 7. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Matsuo H, Murata T, Nomura S, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension. *Cell Rep.* 3: 858-68, 2013.
 8. Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II. *Hypertension.* 62: 872-878, 2013.
2. 学会発表
1. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Rai T, Ishibashi K, Horie S, Su X, Zhou J, Sasaki S, Uchida S. Aberrant Glycosylation and Localization of Polycystin-1 Cause Polycystic Kidney in AQP11-Knockout Mice. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
 2. Ishimoto I, Sohara E, Ito E, Chiga M, Iimori S, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S. A case of fibronectin glomerulopathy with rapidly progressive, severe nephrotic syndrome leading to end-stage renal disease. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
 3. Isobe K, Mori T, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Clinical Significance of Urinary Thiazide-Sensitive Na-Cl Cotransporter (NCC) Measurement by Newly Development Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. The 46th Annual meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
 4. Mori T, Eriko K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for WNK signaling inhibitors by using fluorescent correlation spectroscopy. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
 5. Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Araki Y, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Analyses of KLHL3 mutants that cause Pseudohypoaldosteronism type II. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.

6. Susa K, Sohara E, Zeniya M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Low salt intake decreased transcription and protein level of KLHL3 in mouse kidney. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
7. Takahashi D, Mori T, Wakabayashi M, Mori Y, Susa K, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. KLHL2 interacts with and ubiquitinates WNK kinases. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
8. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 activates OSR1 and SPAK kinases-NaCl cotransporter (NCC) signaling and causes hypertension. The 46st Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
9. Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK3 Regulates Blood Pressure Through the Regulation of Vascular OSR1/SPAK-NKCC1 Phosphorylation Cascade. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.

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レイアウト

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
Isobe K, Mori T, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Kumagai N, Kamada F, Morimoto T, Hayashi M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	Development of enzyme-linked immunosorbent assays for urinary thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter (NCC) measurement.	<i>Am J Physiol Renal Physiol.</i>	305	F1374-81	2013
Inoue R, Sohara E, Rai T, Satoh T, Yokozeki H, Sasaki S, Uchida S.	Immunolocalization and translocation of aquaporin-5 water channel in sweat glands.	<i>J. Dermatol Sci.</i>	70	26-33	2013
Mori T, Kikuchi E, Watanabe Y, Fujii S, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	Chemical library screening for WNK signalling inhibitors using fluorescence correlation spectroscopy.	<i>Biochem J.</i>	29	65-74	2013
Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Araki Y, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	Decrease of WNK4 ubiquitination by disease-causing mutations of KLHL3 through different molecular mechanisms.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	439	30-4	2013
Nomura N, Kamiya K, Ikeda K, Yui N, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	Treatment with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin ameliorated symptoms of Bartter syndrome type caused by mutated <i>Bsnd</i> in mice.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	441	544-9	2013
Sasaki S, Chiga M, Kikuchi E, Rai T, Uchida S.	Hereditary nephrogenic diabetes insipidus in Japanese patients: analysis of 78 families and report of 22 new mutations in AVPR2 and AQP2.	<i>Clin Exp Nephrol.</i>	17	338-344	2013

Takahashi D, Mori T, Wakabayashi M, Mori Y, Susa K, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	KLHL2 interacts with and ubiquitinates WNK kinases.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	437	457-62	2013
Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Matsuo H, Murata T, Nomura S, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension.	<i>Cell Rep.</i>	3	858-68	2013
Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II.	<i>Hypertension</i>	62	872-8	2013

IV. 研究成果の別刷

TRANSLATIONAL PHYSIOLOGY

Development of enzyme-linked immunosorbent assays for urinary thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter measurement

Kiyoshi Isobe,¹ Takayasu Mori,¹ Takako Asano,² Hiroyuki Kawaguchi,² Shigeaki Nonoyama,² Naonori Kumagai,³ Fumiaki Kamada,³ Tetsuji Morimoto,⁴ Matsuhiko Hayashi,⁵ Eisei Sohara,¹ Tatemitsu Rai,¹ Sei Sasaki,¹ and Shinichi Uchida¹

¹Department of Nephrology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Yushima, Bunkyo, Tokyo, Japan; ²Department of Pediatrics, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama, Japan; ³Department of Pediatrics, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Miyagi, Japan; ⁴Department of Pediatrics, Nihon University School of Medicine, Bunkyo, Tokyo, Japan; and ⁵Apheresis and Dialysis Center, School of Medicine, Keio University, Shinjuku, Tokyo, Japan

Submitted 11 April 2013; accepted in final form 30 August 2013

Isobe K, Mori T, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Kumagai N, Kamada F, Morimoto T, Hayashi M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for urinary thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter measurement. *Am J Physiol Renal Physiol* 305: F1374–F1381, 2013. First published September 11, 2013; doi:10.1152/ajprenal.00208.2013.—The Na-Cl cotransporter (NCC) in the distal convoluted tubules in kidney is known to be excreted in urine. However, its clinical significance has not been established because of the lack of quantitative data on urinary NCC. We developed highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for urinary total NCC (tNCC) and its active form, phosphorylated NCC (pNCC). We first measured the excretion of tNCC and pT55-NCC in urinary exosomes in pseudohypoaldosteronism type II (PHAII) patients since PHAII is caused by NCC activation. Highly increased excretion of tNCC and pNCC was observed in PHAII patients. In contrast, the levels of tNCC and pNCC in the urine of patients with Gitelman's syndrome were not detectable or very low, indicating that both assays could specifically detect the changes in urinary NCC excretion caused by the changes of NCC activity in the kidney. Then, to test whether these assays could be feasible for a more general patient population, we measured tNCC and pNCC in the urine of outpatients with different clinical backgrounds. Although urinary protein levels >30 mg/dl interfered with our ELISA, we could measure urinary pNCC in all patients without proteinuria. Thus we established highly sensitive and quantitative assays for urinary NCC, which could be valuable tools for estimating NCC activity *in vivo*.

WNK kinase; hypertension; pseudohypoaldosteronism type II; exosome

EXOSOMES ARE NANOVESICLES (40–100 nm) released by cells on fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane (5, 26). Pisikun et al. (22, 23) reported that urine also contains exosomes. Urinary exosomes are derived from all types of cells facing the urine flow along the nephrons, and they contain not only membrane proteins but also cytosolic proteins trapped during the formation of multivesicular bodies (23, 33). Therefore, urine is regarded as the most attractive biomarker sample

for the early detection of kidney diseases and their therapeutic monitoring. Recently, to search for biomarkers of kidney diseases, such as IgA nephritis (17), minimal change nephrotic syndrome (30), and Lupus nephritis (19, 24), several proteomic analyses of urinary exosomes were conducted (10, 15, 18, 23). Although immunoblots are usually used to evaluate these exosomal biomarkers, this method is too labor intensive and not easily scaled up for larger clinical samples. Accordingly, another efficient, sensitive, and quantitative measurement of urinary exosomal proteins is necessary.

In the present study, we focused on the thiazide-sensitive sodium chloride cotransporter (NCC). NCC localizes to the apical membrane of the distal convoluted tubules in the kidney (4, 6, 9) and is responsible for reabsorbing 5–10% of the filtered load of sodium chloride. Pseudohypoaldosteronism type II (PHAII) is an autosomal dominant hereditary hypertensive disease characterized by hyperkalemia and metabolic acidosis (11). By analysis of PHAII model mice that carry a heterozygous D561A missense mutation in the *Wnk4* gene, which corresponds to the PHAII-causing D564A mutation in the human *WNK4* gene, we identified a new signal cascade, namely the WNK-OSR1/SPAK kinases, which phosphorylate NCC (2, 32). When phosphorylated, NCC becomes functionally active and is concentrated on the plasma membranes of the distal convoluted tubules. Mayan et al. (14) reported that the abundance of urinary NCC was increased in patients with the PHAII Q565E mutation in the *WNK4* gene. Conversely, in Gitelman syndrome, NCC is genetically inactivated and absent or reduced in urinary exosomes (12). The excretion of phosphorylated NCC (pNCC) in urinary exosomes is increased in patients with low-salt intake and primary hyperaldosteronism (27) since the WNK-OSR1/SPAK kinase cascade is regulated by aldosterone (3). Although these investigations indicated that the excretion of total NCC (tNCC) and pNCC in urinary exosomes could be biomarkers to estimate NCC activity *in vivo*, the levels of urinary tNCC and pNCC were evaluated only by immunoblots.

To establish the clinical significance of urinary tNCC and pNCC measurements, a large amount of data from patients with different backgrounds must be collected. To gather such data, an efficient, sensitive, and quantitative assay is absolutely

Address for reprint requests and other correspondence: S. Uchida, Dept. of Nephrology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental Univ., 1-5-45 Yushima, Bunkyo, Tokyo 113-8519, Japan (e-mail: suchida.kid@tmd.ac.jp).

necessary. For this purpose, we sought to establish sandwich ELISA systems to measure the absolute amount of urinary tNCC and pNCC. The measurements in the urine of patients with PHAII and Gitelman syndrome convinced us that these assays can adequately evaluate the activity of NCC in the kidney. Furthermore, we confirmed that these assays are feasible for outpatients with different clinical backgrounds.

METHODS AND MATERIALS

Urine collection and urinary exosome isolation. Mid-stream urine specimens (spot urine samples) were collected from normal volunteers and patients. In most cases, urine was collected in the morning. Urinary exosomes were prepared by an ultracentrifugation method optimized for ELISA. Twenty-five milliliters of urine samples treated with a protease inhibitor (0.5 tablet/0.25 ml urine; Complete Protease Inhibitor Cocktail; Roche Applied Science, Penzberg, Germany) were centrifuged at 3,000 *g* for 20 min at room temperature to remove cells and debris. Then, the supernatants were transferred to 26.3-ml polycarbonate ultracentrifuge tubes (no. 355618; Beckman Coulter, Brea, CA) and ultracentrifuged (Ultra Beckman Coulter OPTIMATM 1-90K Ultracentrifuge, Beckman Type 70 Ti rotor; Beckman Coulter) at 240,000 *g* for 1 h at 25°C. The pellets were resuspended in 600 μ l of TBS buffer containing 100 mM DTT. This suspension was incu-

bated at 37°C for 2 min and then at 95°C for 2 min. After the incubation, the samples were centrifuged again at 17,000 *g* for 2 min to remove debris and large membrane fractions. The 17,000-*g* supernatants were diluted with 24.4 ml TBS buffer and ultracentrifuged at 240,000 *g* for 1 h at 25°C. The resulting pellets were resuspended in 300 μ l TBS-0.02% Tween20 and centrifuged at 17,000 *g* for 2 min. The supernatants were the final samples for ELISA. The Medical Research Ethics Committee of Tokyo Medical and Dental University approved this human study (No. 1031). Urine samples from the *Wnk4^{D361A/+}* knockin (PHAII model) mice were collected for 24 h, and the urine exosomes were prepared as described above. The animal experiment was approved by the Animal Care and Use Committee of Tokyo Medical and Dental University.

Immunoblotting and antibodies. Urinary exosomal samples prepared for ELISA were boiled with SDS sample buffer (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) and subjected to SDS-PAGE. Blots were probed with the following primary antibodies: rabbit anti-tNCC (Millipore, Temecula, CA), rabbit anti-phosphorylated T55 NCC (3), goat anti-aquaporin 2 (anti-AQP2; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), mouse anti-Tamm-Horsfall protein (Cerderlane Laboratories, Hornby, ON, Canada), and mouse anti-TSG101 (Abcam, Cambridge, UK).

A guinea pig anti-NCC antibody was previously generated by using the same peptide sequence as the antigen (residues 75–90: QPGEPRKVRPTLADLH) that was used for the commercially avail-

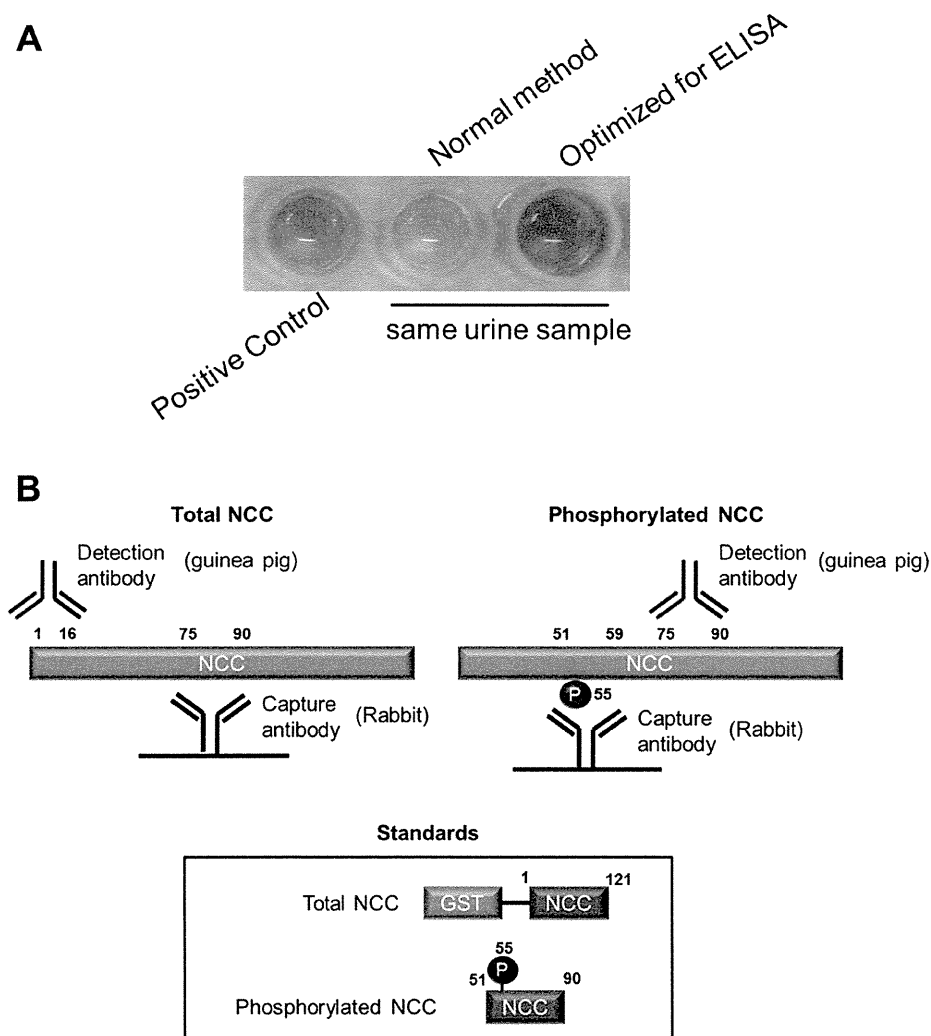


Fig. 1. Development of sandwich ELISA for total (tNCC) and phosphorylated Na-Cl cotransporter (pNCC). **A**: optimization of sample preparation method for ELISA. A urine sample was obtained from a healthy human volunteer. Exosomes were prepared by 2 different methods from the same urine sample. The urinary pNCC signal could not be detected by the original method for exosome preparation without DTT treatment (23). However, a urinary pNCC signal was detected in the sample obtained by our ultracentrifugation method optimized for ELISA. **B**: summary of sandwich ELISA for tNCC and pNCC. For tNCC, the epitopes of the capture antibody and detection antibody are the residues from 75 to 90 and from 1 to 16 of the NCC protein, respectively. For pNCC, the epitope of the capture antibody is the residues from 51 to 59, where 55T is phosphorylated. The detection antibody recognizes the residues from 75 to 90. The capture antibodies are from rabbit, and the detection antibodies are from guinea pig. The standard protein for tNCC was prepared as a GST-fusion protein of the amino terminal portion of NCC (GST-NCC; 1–121) expressed in bacteria. For pNCC, we prepared the phosphorylated peptide (pNCC peptide; 51–91, p55T) corresponding to the epitope of anti-pNCC antibody and also containing the epitope of the detection antibody.