

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 PHAII 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 PHAII 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いに期待される。

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、これらのアクセシビリティを腎臓、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 46<sup>th</sup> 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 46<sup>th</sup> 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 46<sup>th</sup> 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 46<sup>th</sup> 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 46<sup>th</sup> 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 46<sup>th</sup> 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. 50<sup>th</sup> 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. 50<sup>th</sup> 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 46<sup>th</sup> 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 46<sup>th</sup> 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 46<sup>st</sup> 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 46<sup>th</sup> 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 46<sup>th</sup> 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。