

201413004A

厚生労働科学研究費補助金

難治疾患等克服研究事業

(難治性疾患等実用化研究事業 (腎疾患実用化研究事業))

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 内田 信一

平成 27 (2015) 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  
(難治性疾患等実用化研究事業 (腎疾患実用化研究事業))

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26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  
(難治疾患等実用化研究事業 (腎疾患実用化研究事業) )  
(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  
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、SPAK キナーゼの直接阻害薬を、ELISA による新規スクリーニング系を開発し、その系を用いて約 2 万の化合物ライブラリーをスクリーニングした。その際、既存薬ライブラリーも探索対象とする事で、より毒性の低い seed 化合物の同定を目指した。その結果、SPAK キナーゼ活性を submicromolar オーダーで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) や NKCC1 輸送体のリン酸化を阻害する seed 化合物が同定された。

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、前年度は 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行い、seed 化合物を得た。動物レベルでの毒性の低下を目指して、精力的に最適化を進めた。一方、WNK-OSR1/SPAK シグナル伝達系阻害の第 2 の方策として、SPAK キナーゼの直接阻害薬開発を目指した。その理由として、WNK1 や OSR1 のノックアウトマウスが致死性を示すのに対し、SPAK ノックアウトマウスは致死でなく、期待される血圧低下や NCC のリン酸化の低下という形質を示

した。また、ヒトの SNP 解析で、血圧と優位に関連する SNP が SPAK 遺伝子に見つかっていることもその理由であった。

2) の研究計画については、前年度までに確立したキットを用いて、その有用性を臨床の場面で検証した。

3) については、我々の WNK シグナル系の亢進した PHAII モデルマウスに高塩負荷を行った際の各種臓器で次世代シーケンサーを用いた RNA シークエンスとヒストンのメチル化を指標とした CHIP シークエンスを行った。また、通常のマイクロアレイによるスクリーニングも並行して行い、塩分負荷や WNK シグナル亢進時の他のシグナル系の動きを探索した。この分野は分担研究者の蘇原が主として行った。

### C. 研究結果

1) SPAK 阻害薬スクリーニングについては、M025a 蛋白を導入すること、および高感度なリン酸化抗体の作成成功により(抗リン酸化NKCC2抗体)、*vitro* で初めて SPAK 活性を検出できる系を確立し(ELISAによる SPAK 活性の検出系を確立し)、阻害薬新規スクリーニング系を確立した。この系を用いて約2万の化合物ライブラリーをスクリーニングし、その際、既存薬ライブラリーも探索対象とする事で、より毒性の低い seed 化合物の同定を目指した。その結果、SPAK キナーゼ活性を submicromolar オーダーで阻害する化

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)や NKCC1 輸送体のリン酸化を阻害する seed 化合物が同定された。実際に、正常マウスの血圧を急性効果として低下させる事も明らかとなり、今後、高血圧モデルでの効果を検証する予定である。

2) 遺伝子のエクソンシーケンスからは診断に至らなかったギッテルマン症候群患者の尿においてリン酸化 NCC を定量し、臨床的な所見とあわせてその診断に役立てた。

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ため、マイクロアレイと RNA シークエンスによる発現解析を基盤とした。PHAII モデルおよび塩分負荷後のマウスでは、あるリン酸化酵素が著明に発現量が増加していた。またあるケモカインとそのレセプターの発現が塩分量に応じて変化する事も見いだした。これらの分子の挙動の意味、おおよそ病態生理学的意義を検討中である。

### 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、特に SPAK 阻害薬は、既存薬ライブラリーから得られた seed が、動物へ投与しても毒性が低く、有望なシードとして期待される。今後最も最適化を行う。2) に関しては、今

後の比較的大規模な CKD 患者を対象とした臨床研究で、測定項目の一つに入れて、CKD 患者管理における有用性を今後検討する予定である。3) に関しては、現在分子名までは公表できないが、いくつか WNK シグナル系に関与する新たな分子、また純粋に塩分負荷に応答する意外な分子が見つかってきており、塩分摂取、血圧コントロール状況をモニターする事に役立つ分子である可能性がある。病態への関与の解明とバイオマーカーとしても有用性を今後明らかにしていく。

#### E. 結論

WNK-OSR1/SPAK シグナル伝達系阻害薬の有望な seed 化合物を同定できた。塩分摂取、血圧コントロール状況をモニター出来る可能性のある分子を同定できた。

#### F. 健康危険情報

該当無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Chiga M, 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 an AQP11 knockout model. *J Am Soc Nephrol.* 25(12):2789-99, 2014.
2. Kikuchi E, Mori T, Zeniya M, Isobe K, Ishigami-Yuasa M, Fujii S,

Kagechika H, Ishihara T, Mizushima T, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S. Discovery of Novel SPAK Inhibitors That Block WNK Kinase Signaling to Cation Chloride Transporters. *J Am Soc Nephrol.* ASN.2014060560. [Epub ahead of print] 2014.

3. Susa K, Sohara E, Rai T, Zeniya M, Mori Y, Mori T, Chiga M, Nomura N, Nishida H, Takahashi D, Isobe K, Inoue Y, Takeishi K, Takeda N, Sasaki S, Uchida S. Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in mutant KLHL3 knock-in mice. *Hum Mol Genet.* 23(19):5052-60, 2014.
4. Takahashi D, Mori T, Nomura N, Khan MZ, Araki Y, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK4 is the major WNK kinase positively regulating NCC in the mouse kidney. *Biosci Rep.* 34:195-205, 2014.
5. Uchida S, Sohara E, Rai T, Sasaki S. Regulation of with-no-lysine kinase signaling by Kelch-like proteins. *Biol Cell.* 106(2):45-56, 2014.
6. Uchida S. Regulation of blood pressure and renal electrolyte balance by Cullin-RING ligases. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 23:487-493, 2014.

## 2. 学会発表

1. Arai Y, Kanda E, Kawasaki T, Sato H, Ando R, Iimori S, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Administration of vitamin D analogs for patients with pre-dialysis chronic kidney disease reduces the risk for progression of chronic kidney disease: A report from the CKD-ROUTE study. The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology. Tokyo, May. 2014.
2. Arai Y, Kanda E, Ando R, Iimori S, Sasaki S, Sohara E, Okado T, Rai T, Uchida S. Vitamin D Analogs Reduce the Progression of Chronic Kidney Disease: Chronic Kidney Disease Research of Outcomes in Treatment and Epidemiology Study (CKD-ROUTE Study). The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.
3. Ihara K, Iimori S, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Association renal prognosis with clinical and pathological findings in Immunoglobulin A nephropathy. The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology. Tokyo, May. 2014.
4. Ihara K, Iimori S, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Association renal prognosis with clinical and pathological findings in IgA nephropathy: A three year follow-up. 51st ERA-EDTA Congress. Amsterdam, June. 2014.
5. Iimori S, Nishida H, Yamamura C, Kihira H, Yui N, Ohta A, Okado T, Noda Y, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Anemia management and cardiovascular risk in newly visited CKD patients in Japan. The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology. Tokyo, May. 2014.
6. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Rai T, Ishibashi K, Horie S, Su X, Zhou J, Sasaki S, Uchida S. Elongated ciliary length of proximal tubules in a PKD model AQP11 knockout mouse. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.
7. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Chiga M, 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 14th Asian Pacific Congress of Nephrology. Tokyo, May. 2014.
8. Kawasaki T, Ando R, Maeda Y, Arai Y, Sato H, Iimori S, Sohara E, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Higher



- serum phosphorus levels at the initial visit predict more rapid decline in kidney function in pre-dialysis CKD patients in Japan. 51st ERA-EDTA Congress. Amsterdam, June. 2014.
9. Mori T, Hosomichi K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Inoue I, Uchida S. Comprehensive diagnosis of hereditary kidney diseases by a customized diagnostic panel of targeted exome sequencing The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.
  10. Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. p62-mediated selective autophagy is involved in KLHL3-dependent WNK4 degradation. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.
  11. Naito S, Iimori S, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Association between the blood pressure control status and one year decline of renal function in newly visited CKD patients in Japan. 51st ERA-EDTA Congress. Amsterdam, June. 2014.
  12. Nishida H, Iimori S, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Anemia management and cardiovascular risk in newly visited CKD patients in Japan. 51st ERA-EDTA Congress. Amsterdam, June. 2014.
  13. Sohara E, Susa K, Rai T, Zeniya M, Mori Y, Sasaki S, Uchida S. Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in Mutant KLHL3 knock-in mice. The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology. Tokyo, May. 2014.
  14. Susa K, Sohara E, Rai T, Zeniya M, Mori Y, Mori T, Chiga M, Takahashi D, Isobe K, Inoue Y, Takeda N, Sasaki S, Uchida S. Molecular Pathogenesis of PHAII in KLHL3R528H/+ Knock-In Mice. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.
  15. Uchida S. Impaired KLHL3-Mediated Ubiquitination of WNK4 Causes Human Hypertension. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.
  16. Yamaguchi W, Yui N, Nagao T, Azetsu H, Iimori S, Sohara E, Okado T, Rai T, Sasaki S, Uchida S. BJP lambda-type multiple myeloma successfully withdrawn from maintenance hemodialysis after long-term continuous bortezomib and dexamethasone therapy. The

- 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.
17. Yoshizaki Y, Sohara E, Mori T, Mori Y, Araki Y, Wakabayashi M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphorylation of KLHL3 in the kelch-repeat regulates its binding ability to WNK4. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.
  18. Yui N, Sasaki S, Uchida S. Increased phosphorylation of Ser-269 is not sufficient for regulated AQP2 apical accumulation. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.
  19. Zeniya M, Morimoto N, Takahashi D, Mori Y, Mori T, Ando F, Araki Y, Yoshizaki Y, Inoue Y, Ishobe K, Nomura N, Oi K, Nishida H, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S. KLHL2 mediates angiotensin II-WNK3 signaling involved in the regulation of vascular tonus The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当無し。

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金 難治疾患克服研究事業（難治疾患等実用化研究事業  
（腎疾患実用化研究事業））  
（分担）研究報告書

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。蛋白レベルでの網羅的解析が、現在のテクノロジーでも、未だその限界がある事を認識し、mRMA レベルの発現解析をアレイと次世代シーケンサーを用いた RNA-seq で行い、あわせてマーカーとしての記憶特性を期待してエピジェネティックな変化も CHIP シークエンス法にて探索した。

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 (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、昨年度作成に成功した KLHL3 変異ノックインマウスも解析に加え、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、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 発現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 (KLHL3 ノックインマウス) も利用して同様の解析を行い、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。mRMA レベルの発現解析はアレイと次世代シーケンサーを用いた RNA-seq で行い、あわせてマーカーとしての記憶特性を期待してエピジェネティックな変化も CHIP シークエンス法を用いたヒストンのメチル化を指標として探索した。さらに、網羅的な蛋白解析の困難さを自覚

したため、採血データで再現性のよい特定の分子に限って、塩分負荷時の動態をスクリーニングした。

#### C. 研究結果

高血圧モデルマウス作成後、網羅的解析による、塩分負荷に応答するマーカーの探索を継続した。DNA マイクロアレイおよび次世代シーケンサーを用いたRNA-seqを行う事で、再現性のよいデータが得られた。腎臓と心臓を最優先し、パスウェイ解析等も導入して、塩分負荷、血圧変化で変化が見られる分子を同定した。一方、同時並行でヒストンのメチル化に対する抗体でCHIPシーケンスも行い、mRNA レベルで変動する遺伝子の情報とあわせて、エピジェネティックな変化が、転写制御の原因となっている分子を数種同定に成功した。これらの候補分子のバイオマーカーとしての資質や、実際の病態にどのように関わっているかの検討を、個別に行っている。一方、採血データからのスクリーニングでも、炎症関連分子が塩分負荷と関連することを見だし、病態への関与を検討中である。

#### D. 考察

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、mRNA レベルでの検討および特定蛋白の採血データを収集し、有望な候補分子を得られた。

#### E. 結論

新規高血圧モデル動物の導入により、塩分負荷や血圧のバイオマーカー探索に有用な情報が得られた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Chiga M, 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 an AQP11 knockout model. *J Am Soc Nephrol.* 25(12):2789-99, 2014.
2. Kikuchi E, Mori T, Zeniya M, Isobe K, Ishigami-Yuasa M, Fujii S, Kagechika H, Ishihara T, Mizushima T, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S. Discovery of Novel SPAK Inhibitors That Block WNK Kinase Signaling to Cation Chloride Transporters. *J Am Soc Nephrol.* ASN.2014060560. [Epub ahead of print] 2014.
3. Susa K, Sohara E, Rai T, Zeniya M, Mori Y, Mori T, Chiga M, Nomura N, Nishida H, Takahashi D, Isobe K, Inoue Y, Takeishi K, Takeda N, Sasaki S, Uchida S. Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in mutant KLHL3 knock-in mice. *Hum Mol Genet.* 23(19):5052-60, 2014.
4. Takahashi D, Mori T, Nomura N, Khan MZ, Araki Y, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK4 is the major WNK kinase

- positively regulating NCC in the mouse kidney. *Biosci Rep.* 34:195-205, 2014.
5. Uchida S, Sohara E, Rai T, Sasaki S. Regulation of with-no-lysine kinase signaling by Kelch-like proteins. *Biol Cell.* 106(2):45-56, 2014.
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. Elongated ciliary length of proximal tubules in a PKD model AQP11 knockout mouse. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.
  2. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Chiga M, 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 14th Asian Pacific Congress of Nephrology. Tokyo, May. 2014.
  3. Kawasaki T, Ando R, Maeda Y, Arai Y, Sato H, Iimori S, Sohara E, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Higher serum phosphorus levels at the initial visit predict more rapid decline in kidney function in pre-dialysis CKD patients in Japan. 51st ERA-EDTA Congress. Amsterdam, June. 2014.
  4. Mori T, Hosomichi K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Inoue I, Uchida S. Comprehensive diagnosis of hereditary kidney diseases by a customized diagnostic panel of targeted exome sequencing The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.
  5. Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. p62-mediated selective autophagy is involved in KLHL3-dependent WNK4 degradation. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.
  6. Sohara E, Susa K, Rai T, Zeniya M, Mori Y, Sasaki S, Uchida S. Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in Mutant KLHL3 knock-in mice. The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology. Tokyo, May. 2014.
  7. Susa K, Sohara E, Rai T, Zeniya M, Mori Y, Mori T, Chiga M, Takahashi D, Isobe K, Inoue Y, Takeda N, Sasaki S, Uchida S. Molecular Pathogenesis of PHAII in KLHL3R528H/+ Knock-In Mice. The 47th Annual Meeting of

American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.

8. Yamaguchi W, Yui N, Nagao T, Azetsu H, Iimori S, Sohara E, Okado T, Rai T, Sasaki S, Uchida S. BJP lambda-type multiple myeloma successfully withdrawn from maintenance hemodialysis after long-term continuous bortezomib and dexamethasone therapy. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.
9. Yoshizaki Y, Sohara E, Mori T, Mori Y, Araki Y, Wakabayashi M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphorylation of KLHL3 in the kelch-repeat regulates its binding ability to WNK4. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.
10. Zeniya M, Morimoto N, Takahashi D, Mori Y, Mori T, Ando F, Araki Y, Yoshizaki Y, Inoue Y, Ishobe K, Nomura N, Oi K, Nishida H, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S. KLHL2 mediates angiotensin II-WNK3 signaling involved in the regulation of vascular tonus The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.

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
Kikuchi E, Mori T, Zeniya M, Isobe K, Ishigami-Yuasa M, Fujii S, Kagechika H, Ishihara T, Mizushima T, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S.	Discovery of novel SPAK inhibitors that block WNK kinase signaling to cation chloride transporters.	J Am Soc Nephrol		Epub ahead of print	2015
Zeniya M, Morimoto N, Takahashi D, Mori Y, Mori T, Ando F, Araki Y, Yoshizaki Y, Inoue Y, Isobe K, Nomura N, Oi K, Nishida H, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S.	Kelch-like protein 2 mediates angiotensin II with no lysine 3 signaling in the regulation of vascular tonus	J Am Soc Nephrol		Epub ahead of print	2015
Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Chiga M, 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 an AQP11 knockout model.	J Am Soc Nephrol	25	2789-99	2014
Susa K, Sohara E, Rai T, Zeniya M, Mori Y, Mori T, Chiga M, Nomura N, Nishida H, Takahashi D, Isobe K, Inoue Y, Takeishi K, Takeda N, Sasaki S, Uchida S.	Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in mutant KLHL3 knock-in mice.	Hum Mol Genet.	23	5052-60	2014
Takahashi D, Mori T, Nomura N, Khan MZ, Araki Y, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	WNK4 is the major WNK kinase positively regulating NCC in the mouse kidney.	Biosci Rep.	34	195-205	2014

Uchida S, Sohara E, Rai T, Sasaki S.	Regulation of with-no-lysine kinase signaling by Kelch-like proteins.	Biol Cell.	106	45-56	2014
Uchida S.	Regulation of blood pressure and renal electrolyte balance by Cullin-RING ligases.	Curr Opin Nephrol Hypertens.	23	487-493	2014

#### IV. 研究成果の別刷

## Discovery of Novel SPAK Inhibitors That Block WNK Kinase Signaling to Cation Chloride Transporters

Eriko Kikuchi,\* Takayasu Mori,\* Moko Zeniya,\* Kiyoshi Isobe,\* Mari Ishigami-Yuasa,<sup>†</sup> Shinya Fujii,<sup>‡</sup> Hiroyuki Kagechika,<sup>†‡</sup> Tomoaki Ishihara,<sup>§</sup> Tohru Mizushima,<sup>§</sup> Sei Sasaki,\* Eisei Sohara,\* Tatemitsu Rai,\* and Shinichi Uchida\*

\*Department of Nephrology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, <sup>†</sup>Chemical Biology Screening Center, and <sup>‡</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; and <sup>§</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Keio University, Tokyo, Japan

### ABSTRACT

Upon activation by with-no-lysine kinases, STE20/SPS1-related proline–alanine-rich protein kinase (SPAK) phosphorylates and activates SLC12A transporters such as the Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter (NCC) and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter type 1 (NKCC1) and type 2 (NKCC2); these transporters have important roles in regulating BP through NaCl reabsorption and vasoconstriction. SPAK knockout mice are viable and display hypotension with decreased activity (phosphorylation) of NCC and NKCC1 in the kidneys and aorta, respectively. Therefore, agents that inhibit SPAK activity could be a new class of antihypertensive drugs with dual actions (*i.e.*, NaCl diuresis and vasodilation). In this study, we developed a new ELISA-based screening system to find novel SPAK inhibitors and screened >20,000 small-molecule compounds. Furthermore, we used a drug repositioning strategy to identify existing drugs that inhibit SPAK activity. As a result, we discovered one small-molecule compound (Stock 1S-14279) and an antiparasitic agent (Closantel) that inhibited SPAK-regulated phosphorylation and activation of NCC and NKCC1 *in vitro* and in mice. Notably, these compounds had structural similarity and inhibited SPAK in an ATP-insensitive manner. We propose that the two compounds found in this study may have great potential as novel antihypertensive drugs.

*J Am Soc Nephrol* 26: ●●●–●●●, 2014. doi: 10.1681/ASN.2014060560

Hypertension is one of the most important health problems worldwide because it may cause heart attack and stroke, which occur frequently at present. New insight into the mechanisms of BP regulation was recently provided by studies on monogenic hypertensive diseases such as Liddle's syndrome and pseudohypoaldosteronism type II (PHAII).<sup>1,2</sup> PHAII is an autosomal dominant disease characterized by hypertension, hyperkalemia, and metabolic acidosis. With-no-lysine kinase WNK1 and WNK4 mutations were identified as the genes responsible for PHAII.<sup>3</sup> We previously generated PHAII model mice (the Wnk4<sup>D561A/+</sup> knock-in mouse) that carried the same mutation as patients with PHAII and discovered that the constitutive activation of the WNK-Oxidative stress-responsive 1 (OSR1) and STE20/SPS1-related proline–alanine-rich protein kinase (SPAK)-NaCl cotransporter (NCC) signal cascade is the major pathogenic mechanism of

PHAII.<sup>4,5</sup> The increased phosphorylation and activation of NCC induces excessive NaCl reabsorption in the kidney and causes salt-sensitive hypertension. OSR1/SPAK kinases phosphorylate and activate not only NCC but also other Slc12a transporters such as Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter type 1 (NKCC1) and type 2 (NKCC2).<sup>6</sup> Recent studies demonstrated the notion that WNK-OSR1/SPAK-NKCC1 phosphorylation and activation in vascular smooth muscle cells

Received June 10, 2014. Accepted September 20, 2014.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

**Correspondence:** Dr. Shinichi Uchida, Department of Nephrology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan. Email: suchida.kid@tmd.ac.jp

Copyright © 2014 by the American Society of Nephrology