

Banyu Foundation Research Grant 2012—生活習慣病領域—

研究成果報告書(最終) <概要>

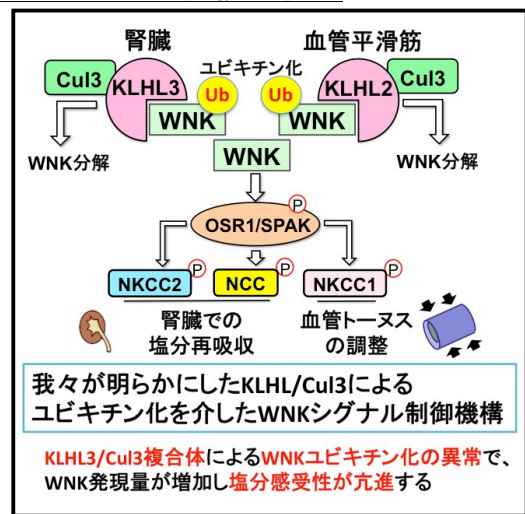
所 属	東京医科歯科大学医学部附属病院 腎臓内科
氏 名	蘇原 映誠
研究テーマ	WNK-SPAK 蛋白結合阻害による新規高血圧治療薬の開発

- ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- ・ 概要の構成は自由とするが、研究目的、手法、成果など、一般の方にもわかりやすくすること。
- ・ 枚数は1ページにまとめること。(図表、写真などの添付を含む)

WNK キナーゼは遺伝性の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(PHAI)の原因遺伝子であり、我々は WNK シグナルを解明して通常の血圧や塩分出納調節にも重要な役割を担っていることを示してきた。我々は、塩分感受性を制御する WNK キナーゼの基質に OSR1/SPAK キナーゼ、さらにその基質として SLC12A 輸送体分子の存在を明らかにし、それらが腎臓の塩分出納調節および血管のトーン調節に重要な WNK-OSR1/SPAK-SLC12A シグナル伝達系を構成していることを明らかにしてきた。本研究では、「新たに PHAI の原因遺伝子として発見された KLHL3/Cullin3 の WNK シグナル調節機構の解明」と「WNK シグナル阻害による新規降圧薬の開発」を目標として研究を行った。

① PHAI の新規原因遺伝子 KLHL3/Cullin3 の WNK シグナル調節機構の解明

Cullin3/KLHL3 複合体が WNK キナーゼを捕捉し、WNK キナーゼのユビキチン化を経て、分解することによって WNK 蛋白発現量が制御されることを報告した (*Cell Reports*, 2013)。さらに、PHAI を起こす変異 KLHL3 の knock-in マウスを作製し、腎臓内での WNK キナーゼ分解障害による WNK 蛋白増加が下流の WNK- OSR1/SPAK-NaCl 共輸送体(NCC)シグナル系の過剰亢進を起こし、PHAI における高血圧の原因となることを明らかにした。(*Hum Mol Genet*, 2014)。また、血管平滑筋においてアンジオテンシン II(AngII)によって WNK3 が NKCC1 リン酸化を亢進させ、血管トーンを亢進させることを WNK3 ノックアウトマウスの解析によって発見した(*Hypertension*, 2013)。さらに、血管平滑筋には KLHL3 と同種性のある KLHL2 が存在し、AngII による WNK3 蛋白発現制御を KLHL2 が行うことによって、血管トーン制御を行っていることを発見した(*J Am Soc Nephrol*, 論文リバイス中)。総じて WNK キナーゼのユビキチン化によって制御される、全く新しい塩分再吸収と血管トーンの WNK シグナルによる調節機構を本研究によって明らかにすることができた(右上図)。



② WNK シグナル阻害による新規降圧薬の開発

WNK キナーゼと SPAK との間に結合モチーフが存在することを利用し、蛍光相関分光法を用いた新しい方法(右図)で、結合阻害活性を示す化合物のスクリーニング系を確立した。東京医科歯科大学ケミカルライブラリーセンターの化合物約2万種類に対してスクリーニングを行い、最終的に2つの化合物が NCC/NKCC のリン酸化を抑制することが明らかになった (*Biochem J* 2013)。さらに、SPAK による NCC/NKCC リン酸化阻害薬を開発するために、NKCC リン酸化抗体を用いた ELISA の系を作製した。化合物ライブラリースクリーニングを行い、1種類の化合物は生体でも血圧効果作用があることが明らかになった (*J Am Soc Nephrol*, 論文リバイス中)。



Banyu Foundation Research Grant 2012—生活習慣病領域—
研究成果報告書(最終) <発表実績/予定一覧>

所	属	東京医科歯科大学医学部附属病院 腎臓内科
氏	名	蘇原 映誠

1. 論文発表実績	
	<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。 ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 ・ 国内外雑誌を問わない。 ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。
1	Susa K, <u>Sohara E</u> *, 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 PHAI1 in mutant KLHL3 knock-in mice. <i>Hum Mol Genet.</i> 2014 (in press) (*Corresponding Author)
2	Inoue Y, <u>Sohara E</u> *, 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. <i>J Am Soc Nephrol.</i> 2014 (in press) (*Corresponding Author)
3	Takahashi D, Mori T, Nomura N, Khan MZ, Araki Y, Zeniya M, <u>Sohara E</u> , Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK4 is the major WNK kinase positively regulating NCC in the mouse kidney. <i>Biosci Rep.</i> 2014. 34(3). e00107.
4	Zeniya M, <u>Sohara E</u> *, 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> 2013; 62(5): 872-878. (*Corresponding Author)
5	Mori T, Kikuchi E, Watanabe Y, Fujii S, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, <u>Sohara E</u> , Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for WNK signaling inhibitors using fluorescence correlation spectroscopy. <i>Biochem J.</i> 2013; 455: 339-45.
6	Isobe K, Mori T, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Kumagai N, Kamada F, Morimoto T, Hayashi M, <u>Sohara E</u> , 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> 2013; 305(9): F1374-81.
7	Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, <u>Sohara E</u> , 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> 2013; 3(3): 858-68.
	以上、すべて査読あり

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 国内外を問わない。 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2014年7月	第57回日本腎臓学会、ワークショップ講演 蘇原 映誠、頼 建光、佐々木 成、内田 信一 偽性低アルドステロン症2型が明らかにしたWNKシグナルとその制御機構
2	2014年7月	第57回日本腎臓学会 銭谷 慕子、高橋 大栄、森 崇寧、森本 靖久、蘇原 映誠、頼 建光、佐々木 成、内田 信一。マウス血管平滑筋においてangiotensinII刺激はKLHL2を介してWNK3-SPAK-NKCC1リン酸化カスケードを制御する
3	2014年7月	第57回日本腎臓学会 須佐 紘一郎、蘇原 映誠、頼 建光、銭谷 慕子、森 雄太郎、竹田 直樹、佐々木 成、内田 信一。KLHL3変異マウスはWNK1及びWNK4の分解低下により偽性低アルドステロン症II型を発症する
4	2014年7月	第57回日本腎臓学会 高橋 大栄、森 崇寧、野村 尚弘、Muhammad Zakir Hossain Khan、荒木 雄也、銭谷 慕子、蘇原 映誠、頼 建光、佐々木 成、内田 信一。WNK4は腎NCCの正の制御因子である
5	2014年7月	第57回日本腎臓学会 森 雄太郎、若林 麻衣、蘇原 映誠、頼 建光、内田 信一、佐々木 成。p62が関わる選択的オートファジーがKLHL3依存性のWNK4分解機構に関与している
6	2014年6月	The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology. Young Investigators Award for Asian Nephrologists (YIAAN). Eisei Sohara.
7	2014年1月	第24回バゾプレシン研究会 特別講演 蘇原映誠 WNKキナーゼと塩分感受性高血圧
8	2013年11月	The 46 th Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2013. Mai Wakabayashi, Takayasu Mori, Kiyoshi Isobe, Eisei Sohara , Koichiro Susa, Yuya Araki, Motoko Chiga, Eriko Kikuchi, Naohiro Nomura, Yutaro Mori, Tatemitsu Rai, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. Impaired KLHL3-Mediated Ubiquitination of WNK4 Activates OSR1 and SPAK Kinases-NaCl Cotransporter (NCC) Signaling and Causes Hypertension
9	2013年11月	The 46 th Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2013. Yutaro Mori, Mai Wakabayashi, Takayasu Mori, Yuya Araki, Eisei Sohara , Tatemitsu Rai, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. Analyses of KLHL3 Mutants That Cause Pseudohypoaldosteronism Type II
10	2013年11月	The 46 th Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2013. Daiei Takahashi, Takayasu Mori, Mai Wakabayashi, Yutaro Mori, Koichiro Susa, Moko Zeniya, Tatemitsu Rai, Eisei Sohara , Sei Sasaki, Shinichi Uchida. KLHL2 Interacts with and Ubiquitinates WNK Kinases

11	2013年11月	The 46 th Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2013. Moko Zeniya, Eisei Sohara , Katsuyuki Oi, Motoko Chiga, Koichiro Susa, Takayasu Mori, Daiei Takahashi, Tatemitsu Rai, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. WNK3 Regulates Blood Pressure through the Regulation of Vascular OSR1/SPAK-NKCC1 Phosphorylation Cascade
12	2013年11月	The 46 th Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2013. Yuichi Inoue, Eisei Sohara , Katsuki Kobayashi, Tatemitsu Rai, Kenichi Ishibashi, Shigeo Horie, Xuefeng Su, Jing Zhou, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. Aberrant Glycosylation and Localization of Polycystin-1 Cause Polycystic Kidney in AQP11-Knockout Mice
13	2013年11月	The 46 th Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2013. Takayasu Mori, Eriko Kikuchi, Eisei Sohara , Tatemitsu Rai, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. Chemical Library Screening for WNK Signaling Inhibitors by Using Fluorescent Correlation Spectroscopy
14	2013年11月	The 46 th Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2013. Kiyoshi Isobe, Takayasu Mori, Eisei Sohara , Tatemitsu Rai, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. Clinical Significance of Urinary Thiazide-Sensitive Na-Cl Cotransporter (NCC) Measurement by Newly Developed Enzyme-Linked Immunosorbent Assays
15	2013年11月	The 46 th Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2013. Koichiro Susa, Eisei Sohara , Moko Zeniya, Tatemitsu Rai, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. Low Salt Intake Decreased Transcription and Protein Level of KLHL3 in Mouse Kidney
16	2013年5月	第56回日本腎臓学会 大島賞受賞講演 Eisei Sohara Investigation of Pathophysiology of Renal Sodium and Water Transport
17	2013年5月	第56回日本腎臓学会 銭谷 慕子、 蘇原 映誠 、大井 克征、千賀 宗子、須佐 紘一郎、森崇寧、頼 建光、佐々木 成、内田 信一. マウス血管平滑筋における塩分摂取による WNK3-SPAK-NKCC1 カスケードの制御
18	2013年5月	第56回日本腎臓学会 菊池 絵梨子、森崇寧、磯部 清志、 蘇原映誠 、頼 建光、内田 信一、佐々木 成. ELISA 法による化合物ライブラリースクリーニングを用いた新規降圧剤としての SPAK キナーゼ阻害薬の開発
19	2013年5月	第56回日本腎臓学会 若林 麻衣、森 崇寧、磯部 清志、千賀 宗子、森 雄太郎、松尾 浩司、村田 智博、野村 信介、 蘇原 映誠 、頼 建光、内田 信一、佐々木 成. KLHL3 を介した WNK4 のユビキチン化障害がヒト遺伝性高血圧症の発症メカニズムである
20	2013年5月	第56回日本腎臓学会 森 崇寧、 蘇原 映誠 、頼 建光、内田 信一、佐々木 成. 新規降圧薬としての WNK-OSR1/SPAK 複合体形成阻害薬の開発
21	2013年5月	第56回日本腎臓学会 磯部 清志、 蘇原 映誠 、頼 建光、内田 信一、佐々木 成. 尿 Exosome 中の total およびリン酸化 NCC のサンドイッチ ELISA 測定系の確立

3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	投稿済み 現在リバイス中	Moko Zeniya, Yasuhisa Morimoto, Daiei Takahashi, Yutaro Mori, Takayasu Mori, Fumiaki Ando, Kiyoshi Isobe, Naohiro Nomura, Katsuyuki Oi, Hidenori Nishida, Sei Sasaki, Eisei Sohara , Tatemitsu Rai, Shinichi Uchida. KLHL2 mediates angiotensin II-WNK3 signaling involved in the regulation of vascular tonus. <i>Journal of American Society of Nephrology</i> .
2	投稿済み 現在リバイス中	Eriko Kikuchi, Takayasu Mori, Moko Zeniya, Kiyoshi Isobe, Mari Ishigami-Yuasa, Shinya Fujii, Hiroyuki Kagechika, Tomoaki Ishihara, Tohru Mizushima, Sei Sasaki, Eisei Sohara , Tatemitsu Rai, Shinichi Uchida. Discovery of noval SPAK inhibitors that block WNK-SLC12A transporter signaling in vivo. <i>Journal of American Society of Nephrology</i> .
3	2014年11月	The 47 th Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2014. Koichiro Susa, Eisei Sohara , Tatemitsu Rai, Moko Zeniya, Yutaro Mori, Takayasu Mori, Motoko Chiga, Daiei Takahashi, Kiyoshi Isobe, Yuichi Inoue, Naoki Takeda, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. Molecular pathogenesis of PHAI in KLHL3 ^{R528H/+} knock-in mice
4	2014年11月	The 47 th Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2014. Yutaro Mori, Mai Wakabayashi, Takayasu Mori, Moko Zeniya, Eisei Sohara , Tatemitsu Rai, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. p62-mediated selective autophagy is involved in KLHL3-dependent WNK4 degradation
5	2014年11月	The 47 th Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2014. Moko Zeniya, Yasuhisa Morimoto, Daiei Takahashi, Takayasu Mori, Yutaro Mori, Fumiaki Ando, Naohiro Nomura, Katsuyuki Oi, Hidenori Nishida, Eisei Sohara , Tatemitsu Rai, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. KLHL2 mediates angiotensin II-WNK3 signaling involved in the regulation of vascular tonus
6	2014年11月	The 47 th Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2014. Yuki Yoshizaki, Eisei Sohara , Takayasu Mori, Yutaro Mori, Yuya Araki, Mai Wakabayashi, Tatemitsu Rai, Sei Sasaki, Shinichi Uchida Phosphorylation of KLHL3 at kelch-repeat regulates binding ability of KLHL3 to WNK4