

Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <概要>

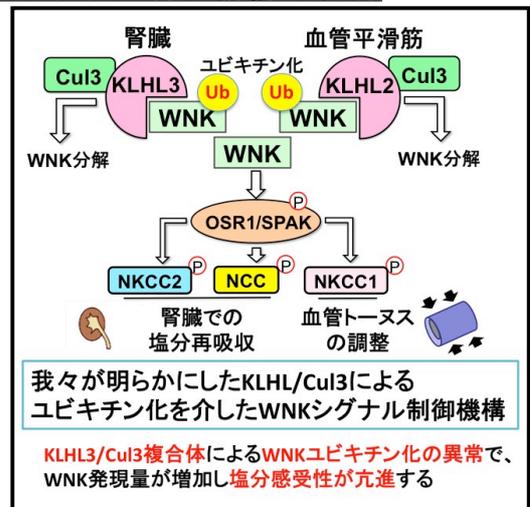
所 属	東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 腎臓内科
氏 名	蘇原 映誠
研究テーマ	WNK-SPAK 蛋白結合阻害による新規高血圧治療薬の開発

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

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。すなわち、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、「PHAI 原因遺伝子である KLHL3/Cullin3 による WNK 分解系の解明」と「WNK シグナル阻害薬開発」を目標として研究を行った。

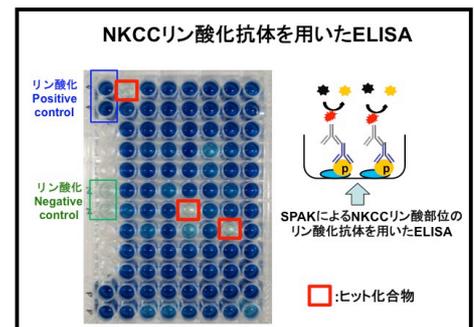
① PHAI の新規原因遺伝子 KLHL3/Cullin3 の WNK シグナル調節機構の解明

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介して分解し、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, MCB. 2017)。また、インスリン-Akt シグナルによる KLHL3 リン酸化が WNK 結合を阻害して WNK シグナル亢進による高血圧をきたす可能性を示した(BBRC. 2015)。血管平滑筋には KLHL3 と同性的のある KLHL2 が存在し、血管トーン制御を行っていることを発見し、さらに p62 が KLHL2/3 に結合し、WNK がオートファジーによる制御も受けることを明らかにした(J Am Soc Nephrol. 2015, Biochem J. 2015)。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した。また、同じく遺伝性腎疾患である腎性尿崩症の治療を検討するために AQP2 水チャネルの制御機構についての研究を行い、Wnt5a がカルシニューリン活性化を通じて、cAMP を介さない AQP2 活性化機序を有し、腎性尿崩症の新しい治療薬になりうる事を示した(Nat Commun. 2016)。



② WNK シグナル阻害による新規降圧薬の開発

蛍光相関分光法を用いた新しい方法で、WNK キナーゼと SPAK との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、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)。同様な方法で Nrf2-Keap1 阻害による抗酸化ストレス薬のスクリーニングも行った (Sci Rep. 査読中) さらに、SPAK 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、生体でも血圧効果作用がある 1 剤が明らかになった (J Am Soc Nephrol. 2015)。



Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 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

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

<目的>

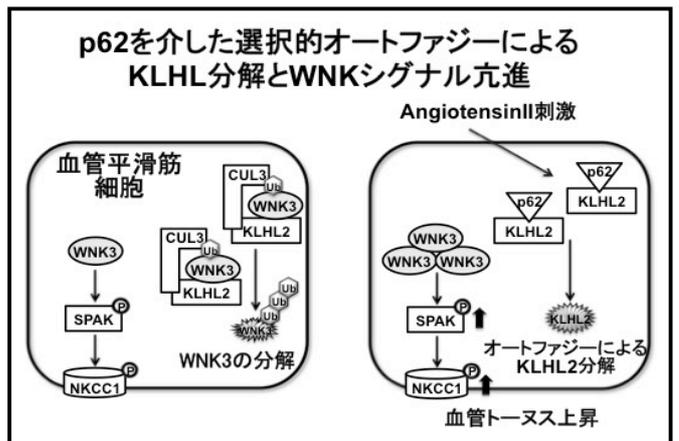
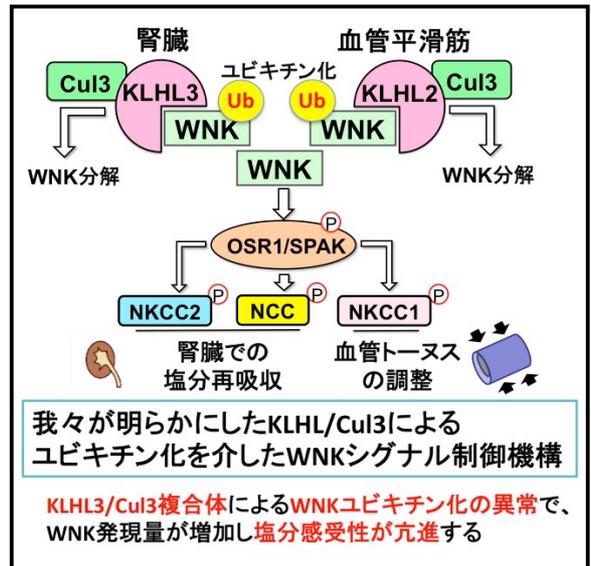
WNK キナーゼは遺伝性の塩分感受性高血圧症である偽性低アルドステロン症 II 型(PHAI)の原因遺伝子であり、我々はWNKシグナルを解明して通常の血圧や塩分出納調節にも重要な役割を担っていることを示してきた。すなわち、塩分感受性を制御する WNK キナーゼの基質に OSR1/SPAK キナーゼ、さらにその基質として SLC12A 輸送体分子の存在を明らかにし、それらが腎臓の塩分出納調節および血管のトーン調節に重要な WNK-OSR1/SPAK-SLC12A シグナル伝達系を構成していることを明らかにしてきた。本研究では、「PHAI 原因遺伝子である KLHL3/Cullin3 による WNK 分解系の解明」と「WNK シグナル阻害薬開発」を目標として研究を行った。

<研究方法/結果/考察など>

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介して分解し、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し、PHAI における高血圧の原因となることを明らかにした。さらに常染色体優性遺伝形式を呈する KLHL3 の発症メカニズムが、KLHL3 の 2 量体形成によるものであること、異常な kelch repeat を KLHL3 が一つでもあると WNK を捉えられなくなるという dominant negative effect によって優性遺伝型で発症することを明らかにした。(Hum Mol Genet. 2014, MCB 2017)。

さらに、Cullin3 変異をノックインしたマウスを作成し解析した(Biol Open. 2015)。また、インスリン-Akt シグナルなどによる KLHL3 リン酸化によって、WNK と KLHL3 との結合を阻害して WNK シグナルが亢進することを明らかにした。これは、肥満などの高インスリン血症による高血圧をきたす可能性を示した(BBRC. 2015)。血管平滑筋には KLHL3 と同性的のある KLHL2 が存在し、血管トーン制御を行っていることを発見し、アンギオテンシン II によって WNK3 の分解機構が制御されていることを発見した(右図)。さらに p62 が



KLHL2/3 に結合し、WNK がオートファジーによる制御も受けることを明らかにした(*J Am Soc Nephrol. 2015, Biochem J. 2015*)。

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スの 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。

また、同じく遺伝性腎疾患である腎性尿崩症の治療を検討するために AQP2 水チャネルの制御機構についての研究を行い、Wnt5a がカルシニューリン活性化を通じて、cAMP を介さない AQP2 活性化機序を有し、腎性尿崩症の新しい治療薬になりうる事を示した(*Nat Commun. 2016*)。

② WNK シグナル阻害による新規降圧薬の開発

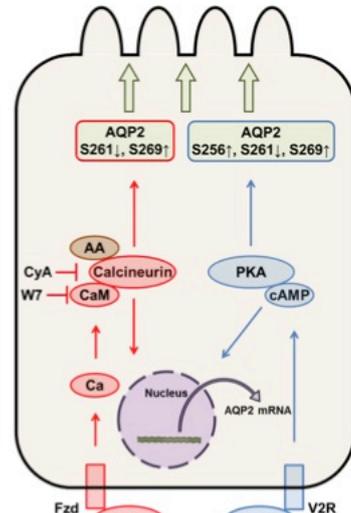
蛍光相関分光法を用いた新しい方法で、WNK キナーゼと SPAK との結合阻害活性を示す化合物のスクリーニング系を確立した。東京医科歯科大学ケミカルライブラリーセンターの化合物約2万種類に対してスクリーニングを行い、最終的に2つの化合物が NCC/NKCC のリン酸化を抑制することが明らかになった (*Biochem J 2013*)。同様な方法で Nrf2-Keap1 阻害による抗酸化ストレス薬のスクリーニングも行った(*Sci Rep. 査読中*)さらに、SPAK 阻害薬を開発するために、NKCC リン酸化抗体を用いた ELISA の系を作製した。化合物ライブラリースクリーニングを行い、生体でも血圧効果作用がある 1 剤が明らかになった (*J Am Soc Nephrol. 2015*)。

③ KLHL/Cullin3/WNK シグナルの各臓器での働きの説明:

近年、血圧調節以外の病態における WNK シグナルの重要性が明らかになりつつある。WNK キナーゼは腎臓や血管平滑筋以外にも脂肪細胞、脳/神経、免疫細胞、消化管上皮、心筋などの各臓器に発現している。我々は、この系の構成分子の遺伝子改変マウスを多数保有または作成中であり、各臓器でこの系を制御できる。特に、以下の臓器や病態において WNK シグナルとの関連性が浮かび上がっており、世界に先駆けて明らかにしていきたい。

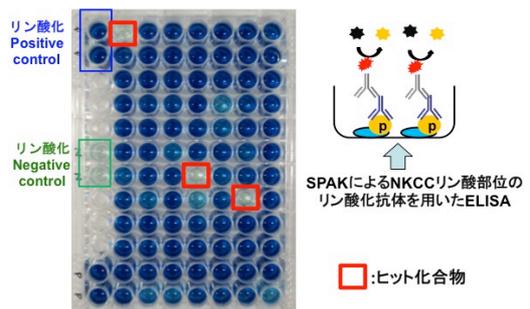
脂肪細胞における WNK4 の機能: 右図に示すように、最近我々は WNK4 ノックアウト

Wnt5a は Calcineurin を介して AQP2 水チャネルを制御する

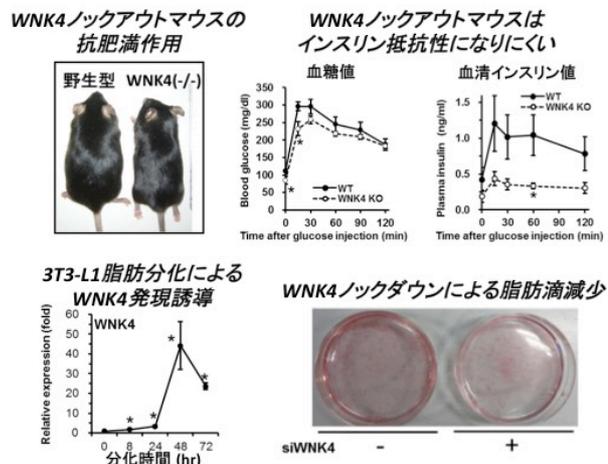


Ando F, et al. Nat Commun. 2016

NKCCリン酸化抗体を用いたELISA



WNK4は脂肪細胞分化誘導を行いノックアウトマウスは抗肥満作用を示す



マウスを用いた実験結果を示すように、最近我々は WNK4 ノックアウト

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

マウスが肥満抵抗性であり、インスリン抵抗性を起こしにくいことを発見した。また 3T3-L1 細胞において WNK4 が脂肪細胞分化に伴い強力に誘導され、WNK4 抑制は培養細胞における脂肪滴蓄積を障害することを見出した。塩分で制御される WNK シグナルと肥満の関連はメタボリック症候群病態解明のための高インパクトな知見となり、WNK4 と糖脂質代謝との関わりを明らかにする (*EBioMed* 投稿中)。

上記のように、**Banyu Foundation Research Grant** により、我々は WNK-OSR1/SPAK-SLC12A シグナル伝達の詳細を明らかにすることができた。深く感謝させていただきます。

Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>

所 属	東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 腎臓内科
氏 名	蘇原 映誠

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> ・ 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。 ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 ・ 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 <論文 PDF 添付あり>	
1	KLHL3 knockout mice reveal the physiological role of KLHL3 and the pathophysiology of PHAI caused by mutant KLHL3. Sasaki E, Susa K, Mori T, Isobe K, Araki Y, Inoue Y, Yoshizaki Y, Ando F, Mori Y, Mandai S, Zeniya M, Takahashi D, Nomura N, Rai T, Uchida S, <u>Sohara E</u> . Mol Cell Biol. 2017 In press
2	Wnt5a induces renal AQP2 expression by activating calcineurin signalling pathway. Ando F, <u>Sohara E</u> , Morimoto T, Yui N, Nomura N, Kikuchi E, Takahashi D, Mori T, Vandewalle A, Rai T, Sasaki S, Kondo Y, Uchida S. Nat Commun. 2016 Nov 28;7:13636.
3	Generation and analysis of knock-in mice carrying pseudohypoaldosteronism type II-causing mutations in the cullin 3 gene. Araki Y, Rai T, <u>Sohara E</u> , Mori T, Inoue Y, Isobe K, Kikuchi E, Ohta A, Sasaki S, Uchida S. Biol Open. 2015 Oct 21;4(11):1509-17.
4	Impaired degradation of WNK by Akt and PKA phosphorylation of KLHL3. Yoshizaki Y, Mori Y, Tsuzaki Y, Mori T, Nomura N, Wakabayashi M, Takahashi D, Zeniya M, Kikuchi E, Araki Y, Ando F, Isobe K, Nishida H, Ohta A, Susa K, Inoue Y, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S, <u>Sohara E</u> . Biochem Biophys Res Commun. 2015 Nov 13;467(2):229-34.
5	Generation of Hypertension-Associated STK39 Polymorphism Knockin Cell Lines With the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 System. Mandai S, Mori T, <u>Sohara E</u> , Rai T, Uchida S. Hypertension. 2015 Dec;66(6):1199-206.
6	Involvement of selective autophagy mediated by p62/SQSTM1 in KLHL3-dependent WNK4 degradation. Mori Y, Mori T, Wakabayashi M, Yoshizaki Y, Zeniya M, <u>Sohara E</u> , Rai T, Uchida S. Biochem J. 2015 Nov 15;472(1):33-41.
7	Kelch-like 3/Cullin 3 ubiquitin ligase complex and WNK signaling in salt-sensitive hypertension and electrolyte disorder. <u>Sohara E</u> , Uchida S. Nephrol Dial Transplant. 2016 Sep;31(9):1417-24

8	<p>Kelch-Like Protein 2 Mediates Angiotensin II-With No Lysine 3 Signaling in the Regulation of Vascular Tonus. 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, <u>Sohara E</u>, Rai T, Uchida S. J Am Soc Nephrol. 2015 Sep;26(9):2129-38.</p>
9	<p>Discovery of Novel SPAK Inhibitors That Block WNK Kinase Signaling to Cation Chloride Transporters. Kikuchi E, Mori T, Zeniya M, Isobe K, Ishigami-Yuasa M, Fujii S, Kagechika H, Ishihara T, Mizushima T, Sasaki S, <u>Sohara E</u>, Rai T, Uchida S. J Am Soc Nephrol. 2015 Jul;26(7):1525-36.</p>
10	<p>Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in mutant KLHL3 knock-in mice. 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. Hum Mol Genet. 2014 Oct 1;23(19):5052-60.</p>
<p>② <論文 PDF 添付なし></p>	

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。 アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 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	2016/11/19	Generation and Analysis of KLHL3 Knockout Mice. Emi Sasaki, Koichiro Susa, Takayasu Mori, Kiyoshi Isobe, Yuya Araki, Yuichi Inoue, Tatemitsu Rai, Shinichi Uchida, <u>Eisei Sohara</u> . Annual Meeting of American Society of Nephrology 2016, Chicago, CA
2	2016/11/19	Drug Repositioning Screening for the Discovery of Inhibitors of Keap1-Nrf2 Interaction Using Fluorescent Correlation Spectroscopy. Yuki Yoshizaki, <u>Eisei Sohara</u> , Takayasu Mori, Eriko Kikuchi, Daiei Takahashi, Moko Zeniya, Yuya Araki, Yutaro Mori, Fumiaki Ando, Naohiro Nomura, Tatemitsu Rai, Shinichi Uchida. Annual Meeting of American Society of Nephrology 2016, Chicago, CA
3. 投稿、発表予定 (投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	査読中	WNK4 is an adipogenic factor and its deletion reduces diet-induced obesity in mice Daiei Takahashi, Takayasu Mori, <u>Eisei Sohara</u> , Miyako Tanaka, Motoko Chiga, Yuichi Inoue, Naohiro Nomura, Moko Zeniya, Hiroki Ochi, Shu Takeda, Takayoshi Suganami, Tatemitsu Rai, and Shinichi Uchida. EBioMed
2	査読中	Drug-Repositioning Screening for Keap1-Nrf2 Binding Inhibitors using Fluorescence Correlation Spectroscopy. Yuki Yoshizaki, Takayasu Mori, Mari Ishigami-Yuasa, Eriko Kikuchi, Daiei Takahashi, Moko Zeniya, Naohiro Nomura, Yutaro Mori, Yuya Araki, Fumiaki Ando, Shintaro Mandai, Yuri Kasagi, Yohei Arai, Emi Sasaki, Sayaka Yoshida, Hiroyuki Kagechika, Tatemitsu Rai, Shinichi Uchida, <u>Eisei Sohara</u> . Scientific Reports