

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659439

研究課題名（和文）蛋白相互作用阻害によるWNKキナーゼ阻害薬の効率的スクリーニング

研究課題名（英文）Efficient chemical library screening for WNK signaling inhibitors by inhibiting WNK-SPAK interaction

研究代表者

内田 信一 (UCHIDA SHINICHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：50262184

研究成果の概要（和文）：血圧調節における WNK シグナルカスケードの重要性に着目し、新規高血圧治療薬開発を目的としてシグナル分子間相互作用阻害薬探索を試みた。蛍光相関分光法を用いたハイスループット・スクリーニング系を確立し、17,000 種類のライブラリーから、2 種類の有望リード化合物を得た。医薬品としての最適化を図るため化合物修飾による誘導体展開を実施し、リード化合物よりも優れ、生体内でも阻害活性を示す新規化合物の創出に成功した。

研究成果の概要（英文）：We focused on the With-no-lysine kinases (WNK) signaling cascade which has a pivotal role in regulating blood pressure. Agents that inhibit this signal cascade could be a new class of antihypertensive drugs. We sought to discover inhibitors of WNK-SPAK binding by screening chemical compounds that disrupt the binding. For this purpose, we developed a high-throughput screening method using fluorescent correlation spectroscopy. As a result of screening 17,000 compounds, we discovered two novel compounds that reproducibly disrupted the binding of WNK to SPAK. We then performed the modification of the seed compounds, and obtained novel compounds that exhibit the higher inhibitory activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：水・電解質代謝学

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は血圧調節における WNK キナーゼカスケードの重要性を報告してきた (*Cell Metab* 2007, *Hum Mol Genet* 2009 など)。WNK キナーゼ-OSR1/SPAK キナーゼ-SLC12a 輸送体シグナル伝達系は、主に NKCC2, NCC を介した腎臓での NaCl 出納調節や、NKCC1 を介した血管平滑筋のトーン調節を介して生体内での血圧調節に関わり、その破綻は高血圧症を引き起こす。

(2) 輸送体分子が単独ではなく他の分子との複合体として機能し、このことが生体内で各輸送体蛋白が緻密に制御され機能する上でなくてはならない非常に重要なメカニズムであるというエビデンスを得た (*Cell Metab* 2007 など)。蛋白相互作用阻害によるこのシグナルの遮断は、新規降圧薬開発をめざす第一歩となることが推測された。

2. 研究の目的

(1) 新規降圧薬開発をめざす第一歩として、

このリン酸化シグナルカスケードを阻害する化合物の同定を目的とする。具体的には蛋白・蛋白間結合阻害によるシグナル遮断を目的とする。

(2) 蛍光相関分光法を用いたハイスループット・スクリーニングは蛋白をチップに固層化する必要はなく、液相中にてより生理的な状況での結合阻害薬スクリーニングが実施できる可能性があるが、蛋白相互作用の阻害薬スクリーニング法としてはまだ一般的であるとは言い難く、本研究でその有用性を確立する。

3. 研究の方法

(1) WNK-OSR1/SPAK-NCC のシグナル伝達系において、OSR1/SPAK の C 末端領域 (CCT ドメイン) が WNK キナーゼおよび NCC 内の RFxVI/1 モチーフとの結合ドメインとなる。この CCT ドメインを GST 融合蛋白として発現精製し、蛍光ラベルした WNK4 ないし NCC の RFxVI/1 モチーフを含むペプチドとの結合を蛍光相関分光法 (Fluoro-PointLight, Olympus) にて確認する。

(2) 東京医科歯科大学ケミカルバイオロジクススクリーニングセンター所有の化合物ライブラリーの化合物を、その反応系に添加し、結合阻害活性を測定する。

(3) スクリーニングで得られた化合物は、さらに別の方法 (表面プラズモン共鳴法など) により、その阻害活性を確認する。

(4) さらに培養細胞系や、生体での阻害活性を検討する。

(5) 医薬品としての最適化を目指し、リード化合物の誘導体展開を行う。

4. 研究成果

(1) 蛍光相関分光法を用いた結合検出系で、WNK4 と SPAK の結合反応 ($K_d = 1.3 \mu\text{M}$)、及び NCC と SPAK の結合反応 ($K_d = 11.2 \mu\text{M}$) を再現性良く検出することに成功した (図 1)。

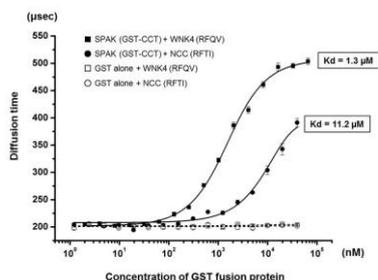


図 1 蛍光相関分光法による WNK4 と SPAK, NCC と SPAK の結合反応検出

(2) この系に、約 17,000 種類のスクリーニング化合物を添加することで、阻害薬スクリーニングを実施した。再現性良く阻害効果を示す 10 種類の Hit 化合物が得られた (図 2)。本法の利点は、表面プラズモン共鳴法に比して、液相中アッセイというより生理的状况に近い条件下で、384 well マイクロタイタープレート上でのハイスループット・スクリーニングが可能という大きな特徴がある。

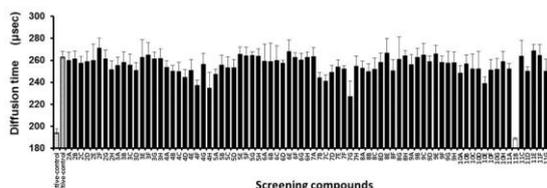


図 2 WNK-SPAK 結合阻害薬ハイスループット・スクリーニングの一例 (有望化合物は白で図示)

(3) さらに阻害効果の高い化合物 2 種類 (化合物 A, B) に限定し、蛍光相関分光法による結合阻害アッセイを実施したところ、化合物 A, B の 50% 結合阻害濃度 (IC_{50} 値) はそれぞれ $37 \mu\text{M}$, $16 \mu\text{M}$ と比較的良好な結果であった (図 3)。

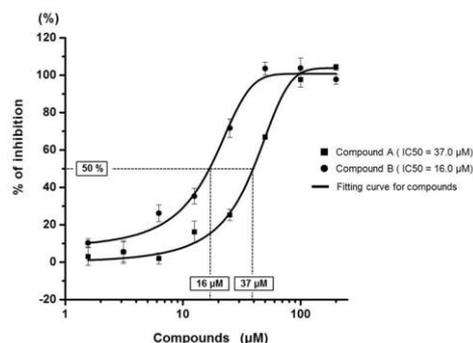


図 3 蛍光相関分光法による、2 種の有望化合物の結合阻害アッセイ

(4) これら 2 種の有望化合物について、WNK もしくは SPAK のどちらのタンパクに結合しているかをプラズモン共鳴法 (Biacore™) で解析した。以下図 4 に示すように、いずれの化合物も SPAK と結合することが判明した。また、化合物 A に関しては解離速度が緩やかであり、医薬品としての適性に優れていると考えられた。

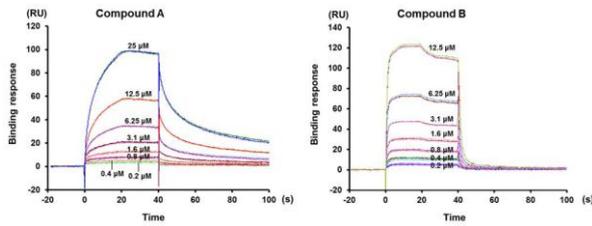


図4 Biacore™による化合物・SPAK 間結合反応検出

(5) 以下図5, 6に示すように化合物 A はマウス遠位尿管細胞 (mpkDCT 細胞) 及びマウス血管平滑筋細胞 (MOVAS 細胞) において化合物濃度依存性に SPAK, NCC, NKCC1 のリン酸化が抑制された (WNK シグナル阻害活性を示した)。このことは、化合物が細胞内でも機能することに加え、WNK シグナルにおける蛋白相互作用を阻害することでこのシグナルが制御できる可能性を示唆した。なお、化合物 B もほぼ同等の阻害活性を示した。

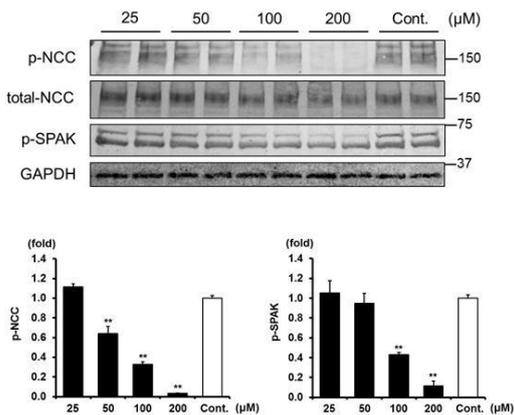


図5 マウス遠位尿管細胞における、化合物 A の WNK シグナル阻害効果

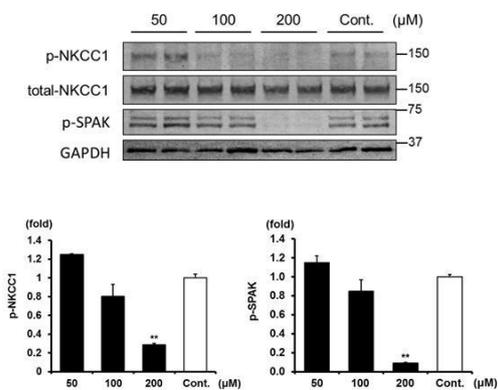


図6 マウス血管平滑筋細胞における、化合物 A の WNK シグナル阻害効果

(6) マウスへ投与可能なレベルまでの毒性改善、及び医薬品としての最適化を図る目的で本学薬化学研究室との共同研究から、化合物 B をリード化合物とし約 30 種類の誘導体展開を行った。この中から得られた化合物 B-1 は、蛍光相関分光法で IC_{50} : 6.9 μ M と阻害活性の改善を認めた (リード化合物 IC_{50} : 16 μ M)。マウスに腹腔内投与すると、短期的に腎臓での SPAK, OSR1, NCC, NKCC1 のリン酸化阻害効果を認めた (図7)。また図8に示すように、マウス大動脈に発現する NKCC1 のリン酸化阻害効果も認めた。これらの結果から、有望な新規降圧薬シーズとしての期待が得られた。

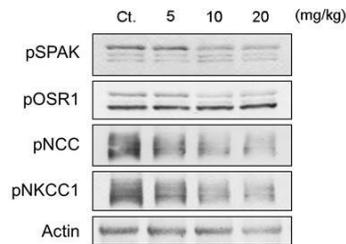


図7 誘導化合物 B-1 のマウス腹腔内投与による WNK シグナル阻害効果 (腎臓)

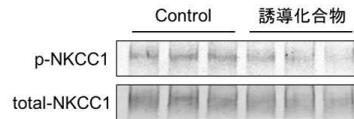


図8 誘導化合物 B-1 のマウス大動脈における WNK シグナル阻害効果

結語

蛍光相関分光法を用いた WNK-SPAK 結合阻害薬探索のためのハイスループット・スクリーニング系を確立し、その誘導体展開も行うことで生体レベルで阻害効果を示す創薬シーズを得ることができた。これは新しいタイプの降圧薬シーズとして極めて有望である。また今回我々が確立した蛍光相関分光法を用いたスクリーニング手法は、他の2分子間の結合を阻害する化合物の同定にも応用可能と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

1. Hara-Chikuma M, Sugiyama Y, Kabashima K, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Inoue S,

- Miyachi Y.
Involvement of aquaporin-7 in the cutaneous primary immune response through modulation of antigen uptake and migration in dendritic cells. *FASEB J.* 26:211-8, 2012. 査読有
2. Hossain Khan MZ, Sohara E, Ohta A, Chiga M, Inoue Y, Isobe K, Wakabayashi M, Oi K, Rai T, Sasaki S, Uchida S.
Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 and SPAK kinases regulates its ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425:456-61, 2012. 査読有
3. Louchami K, Best L, Brown P, Virreira M, Hupkens E, Perret J, Devuyt O, Uchida S, Delporte C, Malaisse WJ, Beauwens R, Sener A.
A new role for aquaporin 7 in insulin secretion. *Cell Physiol. Biochem.* 29:65-74, 2012. 査読有
4. Naguro I, Umeda T, Kobayashi Y, Maruyama J, Hattori K, Shimizu Y, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Uchida S, Vandewalle A, Noguchi T, Nishitoh H, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H.
ASK3 responds to osmotic stress and regulates blood pressure by suppressing WNK1-SPAK/OSR1 signaling in the kidney. *Nat. Commun.* 3:1285, 2012. 査読有
5. Nishida H, Sohara E, Nomura N, Chiga M, Alessi DR, Rai T, Sasaki S, Uchida S.
Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway activates the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in hyperinsulinemic db/db mice. *Hypertension.* 60:981-90, 2012. 査読有
6. Ohtaki H, Ohara K, Song D, Miyamoto K, Tsumuraya T, Yofu S, Dohi K, Tanabe S, Sasaki S, Uchida S, Matsunaga M, Shioda S.
Accumulation of autofluorescent storage material in brain is accelerated by ischemia in chloride channel 3 gene-deficient mice. *J. Neurosci. Res.* 90:2163-72, 2012. 査読有
7. Oi K, Sohara E, Rai T, Misawa M, Chiga M, Alessi DR, Sasaki S, Uchida S.
A minor role of WNK3 in regulating phosphorylation of renal NKCC2 and NCC co-transporters in vivo. *Biol. Open.* 1:120-7, 2012. 査読有
8. Susa K, Kita S, Iwamoto T, Yang SS, Lin SH, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Alessi DR, Uchida S.
Effect of heterozygous deletion of WNK1 on the WNK-OSR1/ SPAK-NCC/NKCC1/NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels. *Clin. Exp. Nephrol.* 16:530-8, 2012. 査読有
9. Susa K, Sohara E, Isobe K, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S.
WNK-OSR1/SPAK-NCC signal cascade has circadian rhythm dependent on aldosterone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427:743-7, 2012. 査読有
10. Uchida S, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S.
Does a β 2-adrenergic receptor-WNK4-Na-Cl co-transporter signal cascade exist in the in vivo kidney? *Nat. Med.* 18:1324-5, 2012. 査読有
11. Chiga M, Rafiqi FH, Alessi DR, Sohara E, Ohta A, Rai T, Sasaki S, Uchida S.
Phenotypes of pseudohypoaldosteronism type II caused by the WNK4 D561A missense mutation are dependent on the WNK-OSR1/SPAK kinase cascade. *J. Cell Sci.* 124:1391-5, 2011. 査読有
12. Lin SH, Yu IS, Jiang ST, Lin SW, Chu P, Chen A, Sytwu HK, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Yang SS.
Impaired phosphorylation of Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter by oxidative stress-responsive kinase-1 deficiency manifests hypotension and Bartter-like syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 108:17538-43, 2011. 査読有
13. Naito S, Ohta A, Sohara E, Ohta E, Rai T, Sasaki S, Uchida S.
Regulation of WNK1 kinase by extracellular potassium. *Clin. Exp. Nephrol.* 15:195-202, 2011. 査読有
14. Nomura N, Tajima M, Sugawara N, Morimoto T, Kondo Y, Ohno M, Uchida K, Mutig K, Bachmann S, Soleimani M, Ohta E, Ohta A, Sohara E, Okado T, Rai T, Jentsch TJ, Sasaki S, Uchida S.
Generation and analyses of R8L barttin knockin mouse. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 301:F297-307, 2011. 査読有
15. Ohashi T, Uchida K, Uchida S, Sasaki S, Nitta K.
Dexamethasone increases the phosphorylation of nephrin in cultured podocytes. *Clin. Exp. Nephrol.* 15:688-93, 2011. 査読有
16. Ohno M, Uchida K, Ohashi T, Nitta K, Ohta A, Chiga M, Sasaki S, Uchida S.
Immunolocalization of WNK4 in mouse kidney. *Histochem. Cell Biol.* 136:25-35, 2011. 査読有
17. Oi K, Sohara E, Rai T, Misawa M, Chiga M, Alessi DR, Sasaki S, Uchida S.
A minor role of WNK3 in regulating phosphorylation of renal NKCC2 and NCC

co-transporters in vivo. *Biology Open*. 1(2):120-7, 2011. 査読有

18. Sohara E, Rai T, Yang SS, Ohta A, Naito S, Chiga M, Nomura N, Lin SH, Vandewalle A, Ohta E, Sasaki S, Uchida S. Acute insulin stimulation induces phosphorylation of the Na-Cl cotransporter in cultured distal mpkDCT cells and mouse kidney. *PLoS One*. 6:e24277, 2011. 査読有

[学会発表] (計 20 件)

1. Uchida S. Role of WNK kinases in the blood pressure regulation. Taiwan Society of Nephrology 2012, China Medical University, Taichung, Taiwan, December, 2012.

2. Uchida S. Chemical library screening for drugs to correct intracellular mislocalization of R8L mutant barttin. 2012 International Ion Channel Conference. The New world of anion and cation channels. Jeju, Korea, August, 2012.

3. Hossain Khan MZ, Sohara E, Ohta A, Chiga M, Inoue Y, Isobe K, Wakabayashi M, Naito S, Oi K, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 and SPAK kinases regulates its ubiquitination. The 45th Annual meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November, 2012.

4. Isobe K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Development of sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of urinary total and phosphorylated Na-Cl cotransporter (NCC) protein. The 45th Annual meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November, 2012.

5. Kikuchi E, Mori T, Isobe K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for direct SPAK inhibitors by a newly developed ELISA system. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November, 2012.

6. Mori T, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Generation and analysis of WT-WNK4 transgenic mice revealed the physiological role of WNK4.

The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November, 2012.

7. Sasaki S, Chiga M, Kikuchi E, Uchida S. Hereditary nephrogenic diabetes insipidus (NDI) in Japanese patients: Analysis of 73 families. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November, 2012.

8. Susa K, Sohara E, Isobe K, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK4-OSR1/SPAK-NCC signal cascade has circadian rhythm dependent on aldosterone. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November, 2012.

9. Zeniya M, Sohara E, Oi K, Chiga M, Susa K, Mori T, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt intake and angiotensin II regulates WNK-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November, 2012.

10. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Rai T, Ishibashi K, Sasaki S, Uchida S. Generation and analyses of AQP11 BAC transgenic mice. The 44th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia (USA), November, 2011.

11. Isobe K, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Development of new systems to measure total and phosphorylated Na-Cl cotransporter (NCC) protein in human urine. The 44th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia (USA), November, 2011.

12. Kahn MZH, Sohara E, Ohta A, Naito S, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Urinary excretion of Na-Cl Cotransporter in exosomes is increased by high salt diet as well as low salt diet. The 44th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia (USA), November, 2011.

13. Kobayashi K, Uchida S, Sasaki S. CFTR is highly expressed in the cyst-lining epithelial cells of the AQP11 knockout mouse kidney. The 44th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia (USA), November, 2011.

14. Mori T, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S.

High throughput screening of drugs that inhibit WNK-OSR1/SPAK signaling cascade. The 44th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia (USA), November, 2011.

15. Nishida H, Sohara E, Alessi DR, Nomura N, Rai T, Sasaki S, Uchida S.

Increased Na-Cl cotransporter phosphorylation in hyperinsulinemic db/db mice is regulated by insulin/PI3K pathway. The 44th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia (USA), November, 2011.

16. Nomura N, Naito S, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S.

Chemical library screening for drugs to correct intracellular mislocalization of R8L mutant barttin.

The 44th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia (USA), November, 2011.

17. Oi K, Sohara E, Rai T, Chiga M, Alessi DR, Sasaki S, Uchida S.

Renal phenotype of WNK3 knockout mouse. The 44th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia (USA), November, 2011.

18. Sohara E, Rai T, Yang SS, Ohta A, Chiga M, Nomura N, Lin SH, Vandewalle A, Sasaki S, Uchida S.

Acute insulin stimulation induces phosphorylation of the Na-Cl cotransporter in cultured distal mpkDCT cells and mouse kidney.

The 44th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia (USA), November, 2011.

19. Susa K, Ohta A, Sohara E, Rai T, Kita S, Iwamoto T, Alessi DR, Sasaki S, Uchida S.

WNK-OSR1/SPAK-SLC12A phosphorylation cascade in the WNK1 (+/-) mice.

The 44th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia (USA), November, 2011.

20. Wakabayashi M, Naito S, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S.

Increased protein abundance of the mutant WNK4 may be a cause of the increased WNK4 kinase activity in the mouse model of pseudohypoaldosteronism type II.

The 44th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia (USA), November, 2011.

[図書] (計 9 件)

1. 内田信一. WNK キナーゼによる輸送体制御とその異常. 細胞工学 31:558-564, 2012.

2. 笠木祐里, 内田信一. 脱水 腎と透析 2012. Vol172. 増刊号 77-81.

3. 高橋大栄, 内田信一. 尿細管輸送異常症 Liddle 症候群. 日本臨床別冊腎臓症候群 (上): 790-793, 2012.

4. 須佐紘一郎, 内田信一. WNK キナーゼによる腎電解質トランスポーターの機能と局在の制御とその異常. 遺伝子医学MOOK19 トランスポートソーム 生体膜輸送機構の全体像に迫る: 260-264, 2011.

5. 三澤慕子, 内田信一. WNK キナーゼと高血圧の分子病態. 医学のあゆみ 239:792-793, 2011.

6. 森崇寧, 内田信一. 偽性低アルドステロン症 II 型. 日本腎臓学会 53 : 155-159.

7. 若林麻衣, 内田信一. 上皮 Na チャネル (ENaC) の機能制御と蛋白分解-Liddle 症候群発症のメカニズム. 内分泌・糖尿病・代謝内科 33:306-313, 2011.

8. 野村尚弘, 内田信一. 2 バソプレシンと病態形成の関わり (10) 腎性尿崩症. バソプレシンと受容体拮抗—その基礎と臨床—. p165-170. 折田義正監修, 和泉徹/石川三衛編集, メディカルレビュー社 2011.

9. 日比野浩, 内田信一, 野村尚弘. 2-6 非興奮性細胞 (非興奮性組織) のイオンチャネル 2-6-2 上皮. p136-141. トランスポートソームの世界. 金井好克/竹島浩/森泰生/久保義弘編著, 京都廣川書店 2011.

[その他]

東京医科歯科大学腎臓内科学ホームページ
<http://www.tmd.ac.jp/grad/kid/kid-J.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 信一 (UCHIDA SHINICHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号 : 50262184