

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659412

研究課題名(和文) 蛋白相互作用阻害による新規高血圧治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel hypertensive drugs based on inhibition of protein interaction

研究代表者

頼 建光 (Rai, Tatemitsu)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：80334431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：WNKキナーゼ-OSR1/SPAKキナーゼ-SLC12a輸送体シグナル伝達系は、腎臓での塩分再吸収や血管平滑筋収縮の調節を通じて、血圧調節に重要な役割を果たしている。本研究では、蛋白-蛋白相互作用阻害という観点から、このシステムの阻害物質のスクリーニングを行い、新規の高血圧治療薬の創薬を行うことを目的とした。(1) 蛍光相関分光法を用いたWNK - SPAK結合阻害薬のスクリーニングと(2) ELISAを用いたSPAK直接阻害薬のスクリーニングという二つのアプローチから、WNKシグナル遮断薬、ひいては新規作用機序を持つ降圧利尿薬の有望なシーズを得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：The WNK (with-no-lysine kinase) phosphorylation signal cascade plays an important role in blood pressure control through regulation of NaCl reabsorption and vasoconstriction. Therefore, agents that can modulate this signal cascade could be a new class of antihypertensive drugs with dual actions (i.e., NaCl diuresis and vasodilation). In this study, we organized two high-throughput drug-screening systems to find novel specific inhibitors of the WNK - OSR1 / SPAK - Slc12a cascade. First, fluorescent correlation spectroscopy was employed to detect inhibition of the binding of WNK and SPAK. Next, a new ELISA-based screening system was developed to find drugs that inhibit SPAK activity. As a result of screening over 20,000 compounds by these two methods, we discovered several compounds that could inhibit the WNK cascade activation, namely the activation of Slc12a transporters in vitro and in mice. These compounds could be promising seeds of new types of antihypertensive drugs.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：WNKキナーゼ OSR1 SPAK SLC12A輸送体 NCC NKCC1 NKCC2 蛍光相関分光法

1. 研究開始当初の背景

近年、腎臓内科学領域において、慢性腎臓病 (CKD) という新たな概念が提唱され、国民の健康を脅かす疾患群として、その対策は緊急の課題となっている。CKD において、高血圧は腎障害の結果として発症するのみならず、腎症の進行を促進し、慢性腎不全へと進展させる最大の危険因子となっている。それゆえ、CKD における高血圧発症のメカニズムの解明及びその制御は、CKD 克服にむけての最重要課題である。高血圧の発症には腎臓が深く関わっており、腎臓における水、電解質の再吸収調節機構の破綻による体液貯留こそが高血圧発症のキーステップといっても過言ではない。

申請者 頼建光は平成 6 年以来、腎臓において水・電解質輸送に重要な役割を果たしている膜輸送体タンパクの単離と機能解析を行ってきた。その過程で、遺伝性的高血圧疾患である偽性低アルドステロン症 型 (PHA) の病態解明を通して、血圧調節にきわめて重要な WNK-OSR1/SPAK リン酸化シグナル伝達系を世界に先駆けて発見した。WNK キナーゼ - OSR1 / SPAK キナーゼ - SLC12a 輸送体シグナル伝達系は、腎臓における塩分再吸収や血管平滑筋収縮の調節を通じて、生体の血圧の調節に重要な役割を果たしており、その破綻は高血圧症を引き起こす。これらの成果から、輸送体分子が単独ではなく、ほかの分子とともに複合体として機能することが、生体でのシステムを緻密に制御する上で重要であることが示された。そして、このような研究の進展から、必然的に、蛋白-蛋白相互作用の制御を通して、輸送体機能を制御できるのではないかとこの着想にいたった。

2. 研究の目的

WNK-OSR1/SPAK リン酸化シグナル伝達系において、蛋白-蛋白相互作用阻害という観点から、このシステムの阻害物質のスクリーニングを行い、新規の高血圧治療薬の創薬を行うことが本研究の目的である (図 1)。

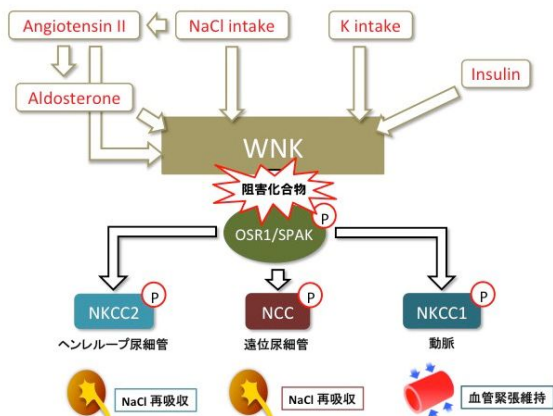


図 1: WNK-OSR1/SPAK リン酸化シグナル伝達系と阻害薬スクリーニング

3. 研究の方法

WNK-OSR1/SPAK リン酸化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 キナーゼ内の RFxV/I モチーフと結合する。OSR1/SPAK 由来の 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 の RFxV/I モチーフを含むペプチドとの結合を蛍光相関分光法にて確認する。その後、東京医科歯科大学ケミカルバイオロジー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反応系に添加し、結合阻害活性を測定する。スクリーニングで得られた候補の薬物については、さらに培養細胞系、生体での阻害活性を検討する。

4. 研究成果

(1) 蛍光相関分光法を用いた WNK - SPAK 結合阻害薬のスクリーニング

腎における WNK - OSR1 / SPAK キナーゼ - SLC12a 輸送体 (NCC / NKCC1 / NKCC2) リン酸化カスケードの亢進は本態性高血圧発症の重要な一因である。また、WNK シグナルは大動脈における NKCC1 のリン酸化も制御し、血管トーンの調節に関わる事も示されている。この系の阻害剤は、降圧作用及び血管拡張作用という dual effect を持つ新規降圧薬となり得、本研究ではその開発を目的とした。この可能性を実現すべく、WNK キナーゼと OSR1/SPAK との間に結合モチーフが存在することを利用し、両者の結合阻害をしてこの系を阻害するというアプローチを行った。蛍光相関分光法 (FCS) を用いて、迅速かつ効果的に、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 (図 2)。

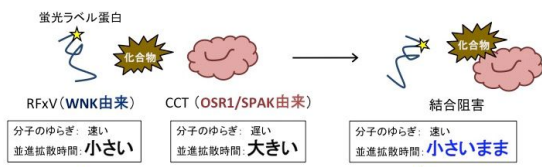


図 2: 結合阻害効果検出の原理
結合阻害活性のある化合物が介在した場合には、蛍光ラベルタンパクの並進拡散時間の変化が小さくなる。

WNK キナーゼ由来の RFxV/I モチーフを蛍光 TAMRA で標識し、他方 SPAK 由来の CCT ドメインを GST 融合蛋白として精製し、両者を混合して $K_d=73 \text{ nM}$ という高親和性の結合反応の検出に成功した (図 3)。

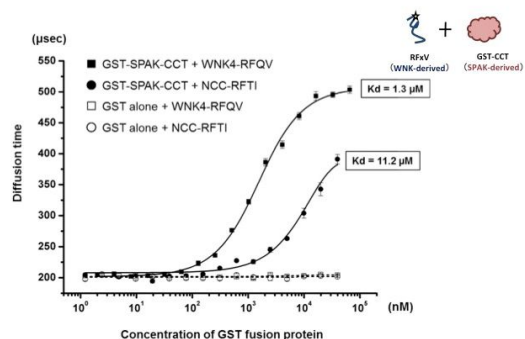


図 3: WNK4-SPAK 間の結合反応検出

この系を利用して、東京医科歯科大学医療機能分子開発室のケミカルライブラリーセンターの化合物約 20 万種類で結合阻害活性を持つ物質のスクリーニングを行ったところ、3 種類の有望化合物を同定した (IC₅₀: 15~25 μM)。これらの化合物はマウス遠位尿管細胞 (mpkDCT) においてもシグナル阻害活性を認めた (図 4)。

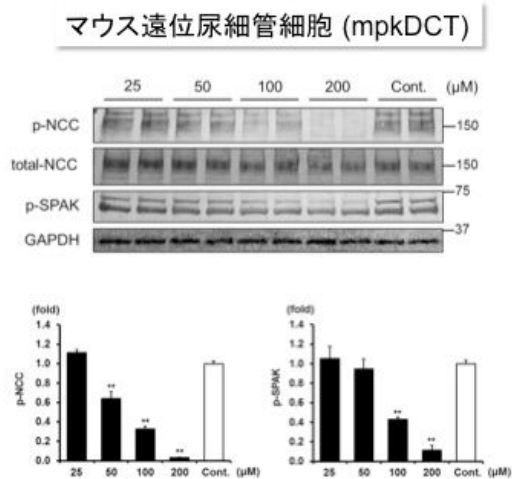


図4: 化合物によるWNKシグナル阻害効果

続いて毒性及び薬剤活性の改善を期待して、学内共同研究のもと化合物誘導体展開を実施した。得られた誘導化合物 (IC₅₀: 8.1 μM) はマウスに投与可能なレベルまで毒性の改善を認め、マウス腎においても WNK シグナルのアウトプットである各種 SLC12A 輸送体のリン酸化低下を認め、併せて大動脈に発現する NKCC1 のリン酸化阻害効果も確認され、血管拡張作用も期待された。こうして、新規降圧薬開発へ向けて有望な化合物を得ることに成功した。(以上雑誌論文、学会発表に発表)

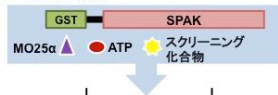
(2) ELISA を用いた SPAK 直接阻害薬のスクリーニング

WNK - OSR1 / SPAK キナーゼ - SLC12A 輸送体 (NCC / NKCC1 / NKCC2) リン酸化カスケードにおいて中心的な役割を果たす SPAK キナーゼの直接阻害薬のスクリーニングを行った。ELISA 法を用いた invitro スクリーニング系を確立し、東京医科歯科大学医療機能分子開発室のケミカルライブラリーセンターの様々な化合物を加え効果を判定、候補化合物についてはマウスを用いた in vivo での SPAK キナーゼ阻害効果判定を行った。具体的にはリン酸化基質として GST - NKCC2 を ELISA プレートにコーティングし、スクリーニング化合物を加えた状態でキナーゼ反応を誘導して NKCC2 をリン酸化し、リン酸化 NKCC2 抗体を用いて、NKCC2 のリン酸化 (すなわち SPAK の機能) の阻害の有無を測定した (図 5)。

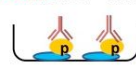
1. リン酸化基質: GST-NKCC2 を ELISA プレートにコーティング



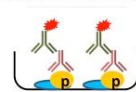
2. スクリーニング化合物を加えた状態でキナーゼ反応を誘導 (NKCC2をリン酸化)



3. リン酸化NKCC2 抗体を加え、一次抗原抗体反応



4. 酵素標識された二次抗体を加える



5. 酵素反応で発色、吸光度を測定



図5: ELISA法を用いた一次スクリーニング

約 23,000 種類の化合物のスクリーニングを行った結果、有望な SPAK キナーゼ阻害活性を持つ 2 種の候補化合物の同定に成功した。これらの化合物をマウスに投与したところ、腎臓に置ける NCC のリン酸化の低下、大動脈における NKCC1 のリン酸化の低下が見られた (図 6)。

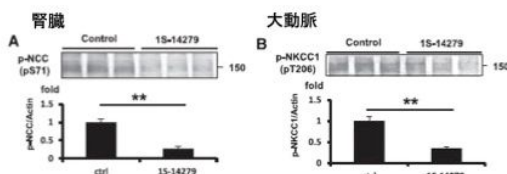


図6: マウスを用いた効果判定

また、投与後 60 分程度持続する血圧降下がみられた (図 7)。

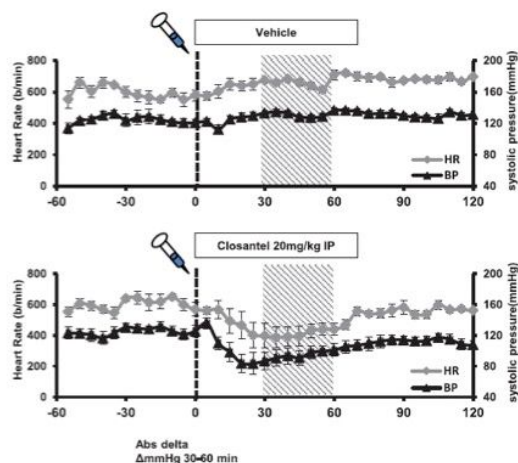


図7: マウスにおける降圧効果の判定

このように、SPAK キナーゼ阻害というアプローチから、WNK シグナル遮断薬、ひいては新規作用機序を持つ降圧利尿薬の有望なシーズを得ることに成功した。(以上雑誌論文、学会発表に発表)

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3件)

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, Sohara E, Rai T, Uchida S. **J Am Soc Nephrol**. 2014 Nov 5. doi: 10.1681 / ASN.2014060560. [Epub ahead of print] 査読あり

Development of enzyme-linked immunosorbent assays for urinary thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter (NCC) measurement. 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. **Am J Physiol Renal Physiol**. 2013; 305(9): F1374-81. 査読あり

Chemical library screening for WNK signalling inhibitors using fluorescence correlation spectroscopy. Mori T, Kikuchi E, Watanabe Y, Fujii S, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. **Biochem J**. 2013; 455(3): 339-45. doi: 10.1042 / BJ20130597. 査読あり

〔学会発表〕(計7件)

森崇寧、蘇原映誠、頼建光、内田信一、佐々木成. 新規降圧剤としてのWNK - OSR1/SPAK 複合体形成阻害薬の開発. 第56回日本腎臓学会学術総会. 東京. 2013年5月.

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. 第56回日本腎臓学会学術総会. 東京. 2013年5月.

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. 第56回日本腎臓学会学術総会. 東京. 2013年5月.

磯部清志、森崇寧、千賀宗子、蘇原映誠、頼建光、浅野貴子、川口裕之、野々山恵章、熊谷直憲、鎌田史顕、森本哲司、林松彦、内田信一、佐々木成. 尿中 NCC の ELISA 測定系の確立とその有用性. 第45回臨床体液研究会、東京、2013年9月. Mori T, Kikuchi E, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for WNK signaling inhibitors by using fluorescent correlation spectroscopy. American Society of Nephrology Kidney Week 2013, Atlanta, November 2013. 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. American Society of Nephrology Kidney Week 2012, San Diego, October 2012. 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 developed enzyme-linked immunosorbent assays. American Society of Nephrology Kidney Week 2013, Atlanta, November 2013.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.tmd.ac.jp/grad/kid/index.html>

6. 研究組織
(1)研究代表者
頼建光 (RAI, Tatemitsu)
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
腎臓内科学

研究者番号：80334431

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：