

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2017

課題番号：25221306

研究課題名(和文) WNKシグナルによる塩分ストレス応答の分子病態解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Salt stress-induced responses in health and disease: the role of WNK kinases and new therapeutic strategies

研究代表者

内田 信一 (UCIDA, Shinichi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50262184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 154,800,000円

研究成果の概要(和文)：塩分負荷が生体に与える影響について、WNKシグナル伝達系を糸口に研究を行った。WNKシグナル系自体が新規の制御系であり、まずは各臓器での役割を解明し、制御機構の解明、下流標的分子の同定を試みた。その結果、WNKシグナルは腎臓での塩出納以外に血管平滑筋のトーン調節を介した血圧調整、また脂肪細胞・筋細胞の分化、免疫系のシグナル制御など多岐にわたる重要な役割を果たす事が判明した。またその新規制御メカニズムも解明し、塩分負荷時や腎障害時にどのようにその制御機構が破綻し病態を形成するかを明らかにした。また独自の化合物スクリーニング系を確立し、シグナル制御薬のシーズを得て、病態への介入への道筋もつけた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the effects of salt loading to the living organism, we started with investigating the WNK signaling system. Since the WNK signal is a recently discovered, novel regulatory system with most of its functions unknown, we first sought to elucidate its roles in each organ, to clarify its regulatory mechanisms, and to identify downstream target molecules. As a result, we have revealed that, in addition to its role in renal sodium handling, the WNK signal plays important roles in various tissues such as regulation of blood pressure via tonus regulation in vascular smooth muscle, adipocyte and myocyte differentiation, and control of immunological response. Next, we have shown how its dysregulation can lead to pathological consequences in response to salt loading or kidney injury. Moreover, we have established a unique chemical compound screening system and obtained promising drug seeds to regulate WNK signaling, paving the way for developing novel therapeutic intervention.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：キナーゼ 腎臓 塩分感受性高血圧 メタボリックシンドローム ケミカルライブラリー

1. 研究開始当初の背景

本研究では、塩分ストレスが血圧・体液恒常性維持機構の破綻のみならず、全身の臓器障害を引き起こす分子病態を解明し、それに基づいた治療法の開発を行う事を目的とする。その際、研究の糸口となるのが、遺伝性塩分感受性高血圧症の原因遺伝子 WNK キナーゼである。我々は、機能未知であった WNK キナーゼの基質同定を含めた下流のシグナル伝達系を世界ではじめて解明し、最近では上流の制御因子を数多く同定してきた。その結果、この系の制御機構の破綻が単なる高血圧症のみならず、各臓器において塩分負荷による病態形成に関わる事が明らかとなってきた。

2. 研究の目的

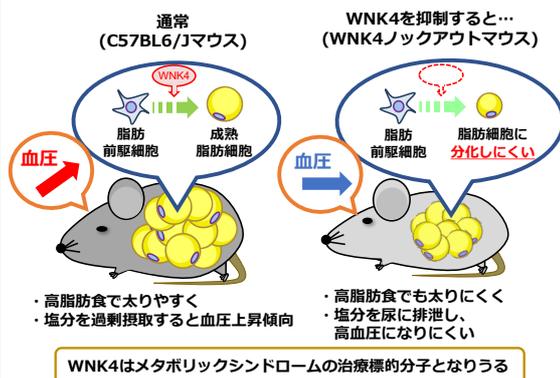
本研究では、多様な研究手法を駆使して上記の病態を解明し、病態に基づいたトランスレショナルリサーチへと発展させる。

3. 研究の方法

- (1) 遺伝子改変マウスの解析により WNK シグナル系が担う各臓器での役割を解明する。
- (2) この情報をもとに WNK キナーゼの新規の上流の制御因子と下流の標的を解明する。
- (3) 明らかになった各臓器での役割が、腎臓での WNK シグナル系による塩分排出制御のように、塩分負荷によって制御を受けているかを検討する。
- (4) WNK キナーゼが恒常的に活性化された遺伝子改変マウスや病態モデル動物で、塩分負荷が実際に引き起こす病態を各臓器において細胞レベルで解析する。
- (5) 腎機能障害を上記モデルに負荷し、上記病態に与える変容を解析する。
- (6) WNK シグナル伝達系(等)の阻害薬の探索をおこなう。

4. 研究成果

遺伝子改変マウスの解析による WNK シグナル系が担う各臓器での役割の解明  
 WNK4 ノックアウト(KO)マウスの解析により、WNK4 が腎臓の NaCl 共輸送体の正の制御因子である事を明確に示し、長年の論争に終止符を打った(Biosci Rep 2014)。一方、長期飼育においても、野性型マウスに比して肥満になりやすいことに着目し、その機序を追求した。高脂肪食下において、明らかに WNK4KO の体重増加は野性型に比して抑えられており、野性型で見られるインスリン抵抗性の増加も見られなかった。この機序として、WNK4 が脂肪細胞に発現している事、3T3-L1 細胞を用いた脂肪分化過程において、WNK4 発現が分化初期に著増し、PPAR $\gamma$  や C/EBP $\alpha$  などの既知の脂肪細胞分化マスターレギュレーターの発現制御と共に脂肪細胞分化を制御している事を発見した(EBioMedicine 2017)。WNK4 キナーゼは塩分だけでなく、脂肪も蓄積させる方向に働いていることが示され、以下で述べるこのシグナル系の阻害薬が、生活習慣病治療に有効で



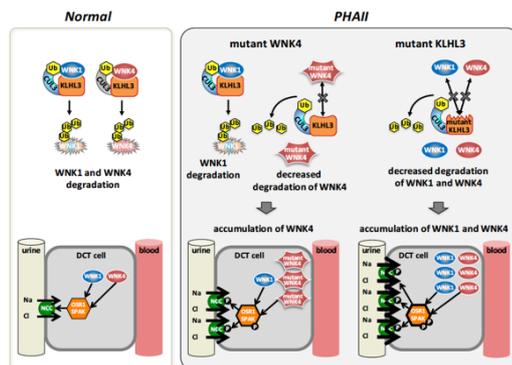
ある事を示すエビデンスが得られた(上図)。

WNK3KO マウスを用いて、WNK3 が塩分摂取に応じた血管のトーン維持において、極めて本質的な細胞内シグナル伝達を担っている事を示し (Hypertension 2013)、さらにその制御機構に以下に示す WNK 分解系とオートファジーの関与を解明した (JASN2015)。

骨格筋とくにサルコペニアとの関係でデータが得られた。WNK キナーゼ系で制御される Na-K-Cl 共輸送体 1 (NKCC1) が、骨格筋において筋芽細胞の分化や骨格筋肥大の制御因子であることを突き止め、サルコペニアの病態解明の一助となり (Sci Rep 2017)、臨床研究もコホートを形成して行い、利尿剤使用が CKD 患者のサルコペニアと関連がある事を世界で初めて示した (PLoS One 2017)。

WNK キナーゼの新規上流制御因子と下流標的の解明

WNK キナーゼの制御機構の解明においては、一つのブレークスルーとなる発見をした。今まで、種々の液性因子が WNK シグナル系を制御していることを報告してきたが、その分子機序は多くは不明であった。何より、WNK4 の遺伝子変異で起こる偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAI) で、WNK シグナルが恒常的に活性化されている事は明らかになってきたが、WNK4 の特定の部位の変異が、何故このような活性化をもたらすのか? という疑問さえも、遺伝子異常が発見されて 10 年以上たっても明らかではなかった。今回、PHAI に新たな原因遺伝子が発見され (Klh3 と Cullin3)、WNK をふくめて 3 つの異なった遺伝子の異常がいかにして同一の PHAI という病態を引き起こすのかを解明した。KLHL3KO マウス、KLHL3 病



態モデルノックイン (KI) マウス, ならびに CUL3 病態モデル KI マウスの作成と解析を通じて、WNK キナーゼは KLHL3 と Cullin3 が形成する E3 ユビキチンリガーゼの基質であり、遺伝子変異によるこの WNK の分解障害と細胞内 WNK 量の増加が、PHAI1 の共通した分子メカニズムである事を証明した (Cell Rep 2013; BBRC 2013/2017; Hum Mol Genet 2014; Biol Open 2015; Mol Cell Biol 2017) (上図)。

また KLHL3 と非常に高い相同性を持つ KLHL2 にも着目し、この KLHL2 も KLHL3 同様 Cullin3 と複合体を形成して WNK に対する E3 リガーゼとして機能する事 (BBRC 2013/2017)、この KLHL2 が血管平滑筋における WNK3 のアンギオテンシン II による制御機構に関わっている事 (JASN 2015) を明らかにした。また、KLHL3 蛋白質の WNK との結合部位にあるセリン残基をインスリンやバゾプレシンがリン酸化し、それにより WNK との結合が阻害され、細胞内で WNK 量が増加するというメカニズムも解明した (BBRC 2015)。つまり、PHAI1 の病態だけでなく、今まで未解明であった液性因子における WNK シグナル制御が、WNK の分解制御という形で行われていたことを突き止めた。さらに、KLHL2/3-Cullin3 による WNK の分解過程は、通常のプロテアソーム系だけで無く、オートファジーも関与している事も明らかにした (JASN 2015, Biochem J 2015)。この他、GWAS により報告されていた、WNK の直接の器質である SPAK キナーゼ遺伝子内に存在する一塩基多型 (SNP) と高血圧との相関について、我々は CRISPR/Cas9 システムを用いてこの SNP を HEK293 細胞に導入しその影響を検証した。この SNP は SPAK そのものの発現量を増加させ、WNK シグナルを活性化させることにより本態性高血圧の病態に関わる事を見出し、多くの本態性高血圧患者で WNK シグナル活性化がその機序の一旦を担っている可能性について報告した (Hypertension 2015)。

#### WNK シグナル伝達系の阻害薬探索

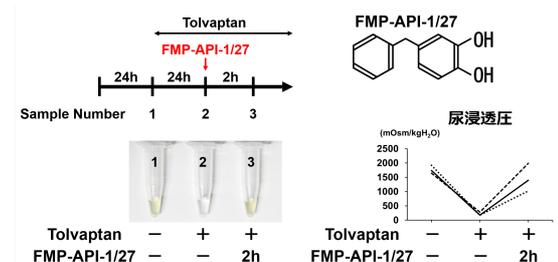
上記の研究成果および他の研究者の解析から、本シグナル阻害薬は、降圧薬としてのみならず、抗肥満、抗炎症、抗腫瘍、虚血による細胞死軽減作用等、種々の薬効が期待され、メタボリックシンドローム治療薬、CKD や心血管障害進展防止に有効な薬剤となる事が期待された。よって、2つのアプローチ (WNK-SPAK 結合阻害薬、SPAK 直接阻害薬) で WNK シグナル阻害の方策を立案し、そのスクリーニング法を開発し、東京医科歯科大学の化合物ライブラリーや既存薬スクリーニングも終了し、リード化合物を得ることができた (Biochem J 2013, JASN 2015)。以下に SPAK 直接阻害薬として同定された駆虫薬のクロサンテルの構造を示す。この薬剤は、Dahl 食塩感受性ラットにおいても食塩負荷後の血圧上昇を抑制した (投稿準備中)。

#### 食塩負荷が引き起こす病態の解明

WNK4 が恒常的に活性化された遺伝子改変マウスで、塩分負荷をさらに行い、その後起こる変化を RNA シークエンス、プロテオミクス、メタボロミクス、などのマルチオミクス解析にて検討した。その結果、食塩負荷により腎臓で炎症細胞を誘引する作用を持ったケモカインの一種である CXCL9・10 と、これらに炎症細胞が反応するために必要な受容体である CXCR3 が抑制されていることを発見した。このことは塩分負荷によって IFN $\gamma$ 誘導性の免疫応答が腎臓で抑制され、その機序としては、塩分濃度の上昇が近位尿細管細胞の膜表面上における IFN $\gamma$ 受容体の発現減少をもたらし、下流の JAK1/STAT1 シグナルを抑制するという 塩分負荷による新たな免疫抑制機構を発見した (Sci Rep 2017)。又最近、WNK1 がマクロファージに発現し、炎症性サイトカイン産生を抑制している事、WNK1 発現が塩分負荷により低下することから、WNK1 を介したマクロファージにおける塩分ストレスによる制御の変容を明らかにしている (投稿準備中)。

生体での塩分負荷は、水分負荷も同時に起こすこととなる。よって、得られた次世代シークエンサーによるゲノム解析を含むマルチオミクスデータの中から、我々は図らずも新規の腎臓での水の出入調節系を発見した。腎臓での水の再吸収の制御は集合尿細管に存在する水チャネル AQP2 によるが、その制御系として今まではバゾプレシンしか知られていなかったが、我々は Wnt5a という分子がカルシウム/カルモジュリン/カルシニューリンシグナルを介して、バゾプレシンとは異なる機序で AQP2 水チャネルを活性化させ、水再吸収を促進できる事を見出した (Nat Commun 2016)。さらにカルシニューリンから AQP2 までのシグナル伝達を研究に、PKA とそのアンカータンパクである A-kinase-anchoring proteins (AKAPs) との結合を切り離す化合物 FMP-API-1 が集合管細胞の PKA 活性化を介して AQP2 を活性化する事を見出した。

驚くべきことにこの化合物の活性はバゾプレシンとほぼ同等の AQP2 活性化効果を持つことが確認され、バゾプレシン受容体遺伝子異常による従来治療法のなかった先天性腎性尿崩症に対する有望な治療薬シーズとして期待される (Nat Commun 2018) (下図)。



慢性腎臓病 (CKD) が引き起こす WNK シグナルの変容  
最近我々は 5/6 腎摘 CKD モデルにおいて残存

腎における WNK キナーゼ活性の上昇を確認した。但し、WNK4 の活性増加はなく WNK1 のみの増加であり、上記で明らかにした KLHL3-Cul3 の系を介した制御ではないと思われた。さらに検討を加えて、TNF- $\alpha$ などの液性因子が WNK1 特異的に活性を上昇させ、CKD 時の腎臓での塩分貯留に関与し、また他臓器の CKD における障害へのこの系の関与が示唆された(投稿準備中)。又、上記のように WNK シグナルは骨格筋の分化にも重要な役割を担っていることが予想されたが、最近我々は WNK1 が FOXO4 を介して筋肉の hypertrophy に関わる事、CKD では WNK1 の運動による発現誘導が低下することを見だし(投稿中)、CKD による本来の WNK の制御の変容が病態形成に重要な事を見いだしている。

この様に、研究当初の目的・方法にそって着実に研究成果を報告、ないし報告予定である。

#### 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 31 件うち 9 件掲載)

- (1) Ando F, Sasaki S, Uchida S, et al. AKAPs-PKA disruptors increase AQP2 activity independently of vasopressin in a model of nephrogenic diabetes insipidus. *Nat Commun.* 9(1):1411, 2018. DOI:10.1038/s41467-018-03771-2. 査読有
- (2) Takahashi D, Uchida S, et al. WNK4 is an adipogenic factor and its deletion reduces diet-induced obesity in mice. *EBioMedicine.* 18:118-127, 2018. DOI:10.1016/j.ebiom.2017.03.011. 査読有
- (3) Sasaki E, Uchida S, et al. KLHL3 knockout mice reveal the physiological role of KLHL3 and the pathophysiology of pseudo-hypoaldosteronism Type II caused by mutant KLHL3. *Mol Cell Biol.* 37(7). e00508-16, 2017. DOI:10.1128/MCB.00508-16. 査読有
- (4) Arai Y, Uchida S, et al. Salt suppresses IFN $\gamma$  inducible chemokines through the IFN $\gamma$ -JAK1-STAT1 signaling pathway in proximal tubular cells. *Sci Rep.* 7:746580, 2017. DOI:10.1038/srep46580. 査読有
- (5) Shoda W, Nomura N, Uchida S, et al. Calcineurin inhibitors block sodium-chloride cotransporter dephosphorylation in response to high potassium intake. *Kidney Int.* 91(2):402-411, 2017. DOI:10.1016/j.kint.2016.09.00. 査読有
- (6) Ando F, Sasaki S, Uchida S, et al. Wnt5a induces renal AQP2 expression

by activating calcineurin signalling pathway. *Nat Commun.* 7:13636, 2016. DOI:10.1038/ncomms13636. 査読有

- (7) Kikuchi E, Sasaki S, Uchida S, et al. Discovery of novel SPAK inhibitors that block WNK Kkinase signaling to cation chloride transporters. *J Am Soc Nephrol.* 26(7):1525-36, 2015. DOI:10.1681/ASN.2014.06.056. 査読有
- (8) Mandai S, Uchida S, et al. Generation of Hypertension-Associated STK39 polymorphism knockin cell lines with the CRISPR/Cas9 System. *Hypertension.* 66(6):1199-1206, 2015. DOI:10.1161/HPERTENSIONAHA.115.05872. 査読有
- (9) Susa K, Sasaki S, Uchida S, et al. Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in mutant KLHL3 knock-in mice. *Hum Mol Genet* 23(19):5052-60, 2014. DOI:10.1093/hmg/ddu217. 査読有

[学会発表] (計 110 件うち 2 件掲載)

- (1) Uchida S. Translational researches in the field of water and electrolyte disorders, *Kidney Week 2017*, San Diego, 2017.
- (2) Uchida S. Impaired KLHL3-Mediated Ubiquitination of WNK4 Causes Human Hypertension. *Kidney Week 2014*, Philadelphia, 2014.

[その他]

ホームページ

東京医科歯科大学腎臓内科学

<http://www.tmd.ac.jp/grad/kid/kid-J.htm>

プレスリリース (計 9 件うち 2 件掲載)

- (1) 高橋大栄, 内田信一. 血圧制御因子 WNK4 が脂肪組織では脂肪細胞の分化を制御する — メタボリックシンドロームの病態解明に期待 —. 2017.
- (2) 菊池絵梨子, 内田信一. 塩分感受性高血圧に関わる SPAK キナーゼの新規阻害物質を発見 — 生活習慣病を伴う高血圧に有効な新規治療薬の開発に期待 —. 2014.

#### 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・教授 研究者番号: 50262184

(2) 連携研究者

佐々木 成 (SASAKI, Sei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・名誉教授

研究者番号: 60170677