

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 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：2013～2014

課題番号：25670406

研究課題名(和文) SPAKキナーゼ阻害薬の開発

研究課題名(英文) Development of SPAK kinase inhibitors

研究代表者

内田 信一 (UCHIDA, SHINICHI)

東京医科歯科大学・医歯(薬)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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：血圧調節において重要な役割を担うWNK-SPAK/OSR1-SLC12aシグナルカスケードに着目し、利尿効果と血管拡張作用を併せ持つ新規降圧剤開発を目的として目指してSPAKキナーゼ直接阻害薬の開発を試みた。ELISA法を用い、*in vitro* で初めてSPAKキナーゼ活性を定量評価するスクリーニング系を確立し、約2万種類の低分子化合物および既存薬ライブラリーから2種類の有望化合物を得た。うち1種類は抗寄生虫薬として認知されている既存薬であり、培養細胞系およびマウス実験においても良好なキナーゼ阻害効果を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：WNK-STE20/SPS1-related proline-alanine-rich protein kinase (SPAK)-SLC12a transporters cascade regulates blood pressure through NaCl reabsorption in kidney and vasoconstriction. Therefore, drugs that inhibit this signal cascade could become new antihypertensive drugs that have dual effects as a diuretic and vasodilator. We sought to discover SPAK kinase inhibitors by screening chemical compounds and existing drugs. We developed a new screening system using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and screened over 20,000 small-molecule compounds. As a result of this screening effort, we discovered one small-molecule compound and Closantel, an antiparasitic agent, which inhibited SPAK-regulated NCC and NKCC1 phosphorylation and activation not only *in vitro* but also in cultured cell lines and in mice.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：高血圧 創薬

1. 研究開始当初の背景

(1)我々は、血圧調節における WNK-SPAK・OSR1-SLC12a シグナルカスケードの重要性を報告してきた (*Cell Metab* 2007, *Hum. Mol. Genet.* 2009 ほか)。WNK に始まる一連のカスケードは NCC を介した腎尿細管での塩分再吸収調節のみならず、NKCC1 を介した血管平滑筋のトーン調整を行うことで、生体内での重要な血圧調節機構として機能しており、その破綻は塩分感受性高血圧を生じる。

(2)我々は、塩分摂取量以外にもアンジオテンシン II を始め様々な生理的な因子により、このカスケードが制御されていることを明らかにしてきた (*Hypertension* 2012 など)。近年では、インスリンがこのカスケードの強力な正の制御因子であることも明らかになった (*PLoS One* 2011, *hypertension* 2012)。すなわち、肥満や生活習慣病などにより恒常的に高インスリン状態にある患者での塩分感受性高血圧の発症に、この一連のカスケードの亢進が寄与していることが示唆された。このシグナルの遮断は、腎臓における利尿効果および血管拡張作用を併せ持つ新しいタイプの降圧剤となるのみならず、生活習慣病に付随する塩分感受性高血圧に対して、より効率的な降圧効果が期待できる。

2. 研究の目的

(1)新規降圧剤開発の第一歩として、WNK-SPAK・OSR1-SLC12a シグナルカスケードにおいて中核的役割を担う SPAK キナーゼに着目し、SPAK キナーゼ活性を直接的に阻害する物質の同定を目的とする。SPAK キナーゼを創薬標的とした理由として、WNK1 および OSR1 ノックアウトマウスがいずれも胎仔致死である一方、SPAK ノックアウトマウスは低血圧の表現型を示しながらも、ほかに明らかな病型を示さなかったことがある。具体的には ELISA を用いて SPAK キナーゼ活性を定量化する方法を開発し、化合物ライブラリーから、キナーゼ阻害活性を有する化合物をスクリーニングする。

(2)得られたヒット化合物に関しては、さらに培養細胞系を用いて SPAK キナーゼの SLC12a 輸送体リン酸化に対する阻害効果を検証する。培養細胞系でも阻害効果を有した化合物は、マウスに投与することで生体に対する効果について検証する。

3. 研究の方法

(1) SPAK 恒常活性型変異体およびリン酸化基質となる NKCC2、SPAK キナーゼ活性を触媒する M025 α 蛋白を GST 融合蛋白として発現精製して、ELISA プレート上でキナーゼ反応を誘導する。最終的に NKCC2 リン酸化特異的抗体を用いて NKCC2 のリン酸化を定量化する。

(2)東京医科歯科大学ケミカルバイオロジーセンター所有の低分子化合物ライブラリー

および既存薬ライブラリー (慶応義塾大学薬学部水島研究室所蔵) の化合物を、上記の反応系に添加し、SPAK キナーゼによる NKCC2 リン酸化に対する阻害効果を測定する。

(3)スクリーニングで得られた化合物の IC₅₀ を測定するとともに、ATP 競合性の有無、SPAK キナーゼとの分子間相互作用について Biacore™等を用いて確認する。

(4)培養細胞系およびマウスにおける阻害活性を評価する。

(5)得られた化合物の構造類似性などから構造活性相関について明らかにし、医薬品としての最適化を目指す。

4. 研究成果

(1)恒常活性型 SPAK を用いて、ELISA プレート上で NKCC2 をリン酸化するアッセイ系を確立し、NKCC2 リン酸化特異的抗体を用いてキナーゼ活性を定量化することに成功した。

(2)この系に約 20,000 種類の化合物を添加することで、阻害薬スクリーニングを行った (図 1)。結果、阻害効果の高い 2 種類の候補化合物を得ることが出来た。うち 1 種類は、既存薬ライブラリーから同定されたクロサンテルという古くから使用されている抗寄生虫薬であった。更に、もう 1 種類は機能未知の低分子化合物であったが、クロサンテルと高い構造類似性を有しており、このアッセイ系の精度の高さを裏付けるものであった。

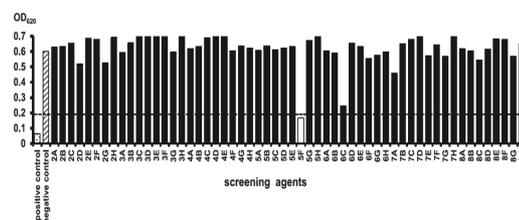


図 1 SPAK キナーゼ阻害薬スクリーニングの一例 (有望化合物は白で図示)

(3) *in vitro* におけるクロサンテルの IC₅₀ は 0.77 μ M と非常に良好であった (図 2)。また、SPAK キナーゼとの分子間相互作用について Biacore™を用いて解析したところ、濃度依存性に SPAK キナーゼに直接結合している事も判明した (図 3)。そこで、ATP との競合性を調べたところ、クロサンテルによる SPAK キナーゼに対する IC₅₀ は ATP 濃度に依存しないものであった (図 4)。すなわち、クロサンテルは ATP 非競合型 SPAK キナーゼ阻害薬であるといえた。これは、ATP 競合型キナーゼ阻害薬の多くが、キナーゼ間の ATP 結合部位の類似性により特異性の確保が困難なこと、細胞内 ATP 濃度が数 mM と高いために、生体内で効果が得にくいことを考えると、創薬の

上で大きなアドバンテージと考えられる。なお、もう 1 種類の低分子化合物も、クロサンテルとほぼ同等の結果を示した。

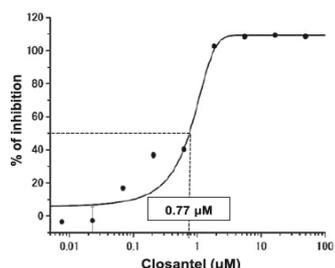


図 2 ELISA 法でみたクロサンテルの SPAK 阻害効果

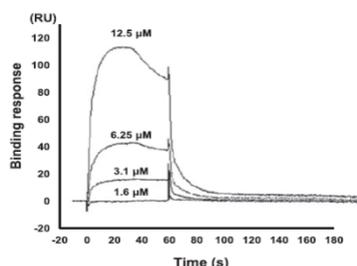


図 3 Biacore™による SPAK・クロサンテル分子間結合の検出

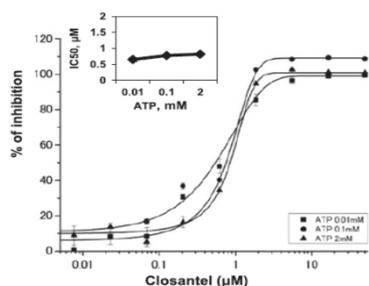


図 4 各 ATP 濃度におけるクロサンテルの IC50 の変化 (ELISA)

(4) クロサンテルはマウス尿細管細胞および血管平滑筋細胞においても、濃度依存性に NCC, NKCC1 のリン酸化を抑制することが明らかになった (図 5, 6)。もう 1 種類の低分子化合物もほぼ同等の阻害効果を示した。すなわち、これらの化合物は生きた細胞内でも、SPAK キナーゼに対し阻害効果を発揮することを明らかにした。

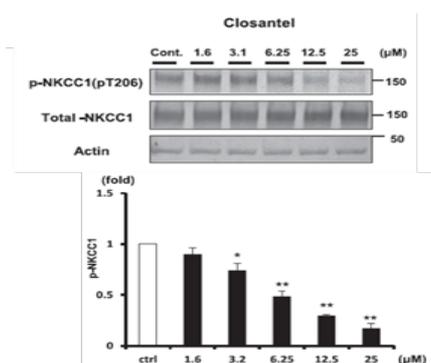
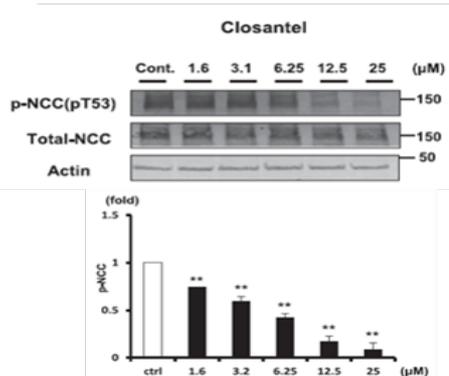


図 5 マウス遠位尿細管細胞における、クロサンテルの NCC リン酸化抑制効果

図 6 マウス血管平滑筋細胞における、クロサンテルの NKCC1 リン酸化抑制効果

(5) クロサンテルは類似構造を有するもう一つの低分子化合物に比べ、毒性が低かったことから、クロサンテルを用いて動物実験 (マウス) を行った。クロサンテルの急速投与により、一過性の血圧低下作用を確認でき (図 7)、血管や腎臓での標的輸送体のリン酸化の低下を確認できた (図 8)。

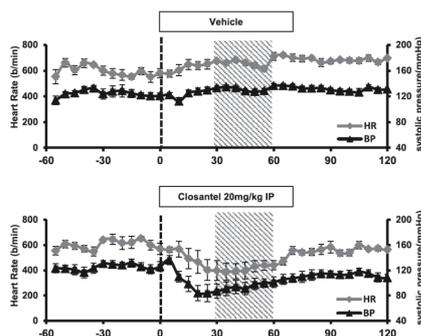


図 7 クロサンテル急速投与による降圧効果

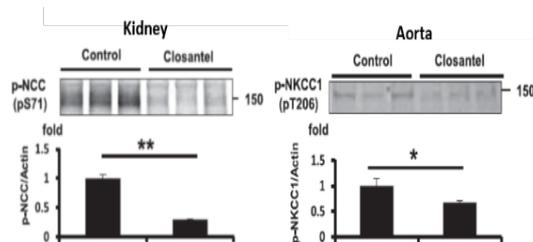


図 8 マウス腎臓、大動脈におけるクロサンテルの NCC, NKCC1 リン酸化抑制効果

結語

ELISA を用いた SPAK キナーゼ阻害薬探索のためのスクリーニング法を確立し、生体レベルで阻害効果を有する創薬シーズを得ることが出来た。2 種類の候補化合物が高い構造類似性を有しており、そのうちクロサンテルは抗寄生虫薬としての使用実績があることに加え、ATP 非競合型の阻害形式を示したこと

は、今後、創薬シードとしてきわめて有望であると考えられる。

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6件)

1. Inoue Y, Sohara E, 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. *J Am Soc Nephrol*. 25(12):2789-99, 2014. doi: 10.1681/ASN.2013060614. 査読あり
2. 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. Discovery of Novel SPAK Inhibitors That Block WNK Kinase Signaling to Cation Chloride Transporters. *J Am Soc Nephrol*. ASN.2014060560. [Epub ahead of print] 2014. doi: 10.1681/ASN.2014060560 査読あり
3. Susa K, Sohara E, 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 PHAII in mutant KLHL3 knock-in mice. *Hum Mol Genet*. 23(19):5052-60, 2014. doi: 10.1093/hmg/ddu217 査読あり
4. Takahashi D, Mori T, Nomura N, Khan MZ, Araki Y, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK4 is the major WNK kinase positively regulating NCC in the mouse kidney. *Biosci Rep*. 34:195-205, 2014. doi:10.1042/BSR20140047. 査読あり
5. Uchida S, Sohara E, Rai T, Sasaki S. Regulation of with-no-lysine kinase

signaling by Kelch-like proteins. *Biol Cell*. 106(2):45-56, 2014. doi:

10.1111/boc.201300069. 査読あり

6. Uchida S. Regulation of blood pressure and renal electrolyte balance by Cullin-RING ligases. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 23:487-493, 2014. doi: 10.1097/MNH.000000000000049. 査読あり

[学会発表] (計8件)

1. Mori T, Hosomichi K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Inoue I, Uchida S. Comprehensive diagnosis of hereditary kidney diseases by a customized diagnostic panel of targeted exome sequencing The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, USA. November 14, 2014.
2. Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. p62-mediated selective autophagy is involved in KLHL3-dependent WNK4 degradation. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, USA. November 14, 2014.
3. Sohara E, Susa K, Rai T, Zeniya M, Mori Y, Sasaki S, Uchida S. Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in Mutant KLHL3 knock-in mice. The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology. Tokyo, May15, 2014.
4. Susa K, Sohara E, Rai T, Zeniya M, Mori Y, Mori T, Chiga M, Takahashi D, Isobe K, Inoue Y, Takeda N, Sasaki S, Uchida S. Molecular Pathogenesis of PHAII in KLHL3R528H/+ Knock-In Mice. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, USA November 14, 2014.
5. Uchida S. Impaired KLHL3-Mediated

- Ubiquitination of WNK4 Causes Human Hypertension. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, USA. November 13, 2014.
6. Yoshizaki Y, Sohara E, Mori T, Mori Y, Araki Y, Wakabayashi M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphorylation of KLHL3 in the kelch-repeat regulates its binding ability to WNK4. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, USA. November 14, 2014.
 7. Yui N, Sasaki S, Uchida S. Increased phosphorylation of Ser-269 is not sufficient for regulated AQP2 apical accumulation. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, USA. November 15, 2014.
 8. Zeniya M, Morimoto N, Takahashi D, Mori Y, Mori T, Ando F, Araki Y, Yoshizaki Y, Inoue Y, Ishobe K, Nomura N, Oi K, Nishida H, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S. KLHL2 mediates angiotensin II-WNK3 signaling involved in the regulation of vascular tonus The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, USA. November 14, 2014.

[その他]

ホームページ等

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

1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 信一 (UCHIDA SHNICHU)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：50262184