

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390168

研究課題名(和文)腎臓における新規の血圧調節機構WNK-NCCシグナル伝達系の解明

研究課題名(英文)Analysis of WNK-NCC signaling cascade, a novel blood pressure controlling system, in the kidney

研究代表者

頼 建光 (RAI, TATEMITSU)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80334431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規血圧調節系であるWNK4-NCC刺激伝達系の詳細を明らかにし、これらの知見をもとに、高血圧の新しい治療戦略を立ち上げることを目的とした。野生型WNK4がNCCの正の制御因子である事を確認した。WNK4はKLHL3とCullin3と結合してユビキチン化されることで発現量を制御され、疾患起因性変異によるWNK4のユビキチン化障害がPHAII発症の共通の病態であることを明らかにした。WNK キナーゼとOSR1/SPAK との間の結合の阻害活性を持つ化合物のスクリーニングを行い、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。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to further characterize the WNK-NCC signal transduction system and to propose a novel strategy for treatment of hypertension.

Transgenic mice overexpressing WNK4 showed PHAII phenotypes, indicating that wild-type WNK4 protein was a positive regulator of NCC. KLHL3 interacted with Cullin3 and WNK4, induced WNK4 ubiquitination, and reduced the WNK4 protein level. PHAII-causing mutations in either protein reduced the ubiquitination of WNK4, resulting in an increased level of WNK4 protein. Thus, we found that WNK4 was a target for KLHL3-mediated ubiquitination, and impaired ubiquitination of WNK4 was the common mechanism of human hereditary hypertension.

As a result of screening chemical compounds that disrupted WNK/SPAK binding, we discovered three novel compounds that could be promising seeds of new types of antihypertensive drugs.

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：水・電解質代謝学

キーワード：偽性低アルドステロン血症II型 KLHL3 Cullin3 ユビキチン SPAK Na-K-Cl共輸送体 OSR1 angiotensin II

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) という概念が提唱され、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、腎症の進行を促進させる最大の危険因子となっている。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なっている。

申請者 頼建光はすでに腎臓での水・電解質輸送に重要な役割を果たしている分子について、疾患患者解析により明らかになった変異に焦点をあて、分子変異がもたらす病態メカニズムを解明してきた。そして 2007 年に偽性低アルドステロン血症 II 型 (PHAI) という、遺伝性的高血圧性疾患について、原因遺伝子 WNK4 キナーゼの疾患起因性変異をもつノックインマウスを作製し、高血圧発症が、変異 WNK4 による尿細管 Na-Cl 共輸送体 (NCC) の活性の亢進による塩分再吸収に起因することを見出した。すなわち、新規の血圧調節系 (WNK4-NCC 刺激伝達系) の存在を、世界に先駆けて明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、新規血圧調節系である WNK4-NCC 刺激伝達系の詳細を明らかにし、これらの知見をもとに、高血圧の新しい治療戦略を立ち上げることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 野生型 WNK4 の生理的意義：
WNK4 BAC トランスジェニックマウスを作成し、解析した。

(2) 細胞内ユビキチン化による WNK-NCC シグナル系の制御：
PHAI の原因遺伝子として新たに同定された KLHL3 と Cullin 3 について、WNK との関係性を細胞での強制発現系において検討し、

PHAI の発症機序の解明を試みた。

(3) 血管平滑筋における WNK - SPAK - NKCC1 シグナル系の制御：

血管平滑筋での SPAK-NKCC1 リン酸化の制御因子について検討するため、マウスに塩分負荷, angiotensin II 投与を行い、解析した。

(4) WNK/SPAK 結合阻害による新規高血圧治療薬の開発：

WNK-OSR1/SPAK-SLC12A 輸送体リン酸化系の阻害剤は、降圧作用と血管拡張作用の dual effect を持つ新規降圧薬となり得る。この可能性を実現すべく、WNK キナーゼと OSR1/SPAK との間の結合モチーフを阻害するというアプローチを行った。

4. 研究成果

(1) 野生型 WNK4 の生理的意義：

WNK4 BAC トランスジェニックマウスを WNK4 発現量に応じて解析したところ、WNK4 発現量増加に応じて血圧上昇、代謝性アシドーシス、腎における OSR1/SPAK, NCC のリン酸化の亢進を認め、PHA 様の表現型を呈した。これより野生型 WNK4 が NCC の正の制御因子である事が確認された。
(雑誌論文 9)

(2) 細胞内ユビキチン化による WNK-NCC シグナル系の制御：

細胞での強制発現系において KLHL3 は WNK4 および Cullin3 と結合し、WNK4 ユビキチン化の増強と WNK4 蛋白質量の減少をもたらした。変異 WNK4/KLHL3/Cullin3 はこれらの結合を阻害し、WNK4 蛋白質量が増加した。以上より、WNK4 は KLHL3 によるユビキチン化の基質であり、WNK4 のユビキチン化障害が PHAI 発症の共通の病態であることが明らかとなった。(雑誌論文 1,2,3,7,8,9)

(3) 血管平滑筋における WNK - SPAK - NKCC1 シグナル系の制御：

マウスに塩分負荷, angiotensin II 投与を行ったところ、血管平滑筋で SPAK と NKCC1

リン酸化の亢進を認めた。WNK3ノックアウトマウスでは、これらの効果はみられなかった。これより、塩分摂取は血管平滑筋においてangiotensin IIとWNK3 – SPAK / NKCC1シグナル伝達系を介して、トーンスを制御していることが示された。(雑誌論文5)

(4) WNK/SPAK結合阻害による新規高血圧治療薬の開発：

WNK由来のRFxV/Iモチーフを蛍光TAMRAで標識し、SPAK由来のCCTドメインをGST融合蛋白として精製し、蛍光相関分光法(FCS)を用いて、高親和性の結合反応の検出に成功した。この系を利用して、ケミカルライブラリーの化合物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。これらの化合物は培養細胞でシグナル阻害活性を認め、マウス投与でも腎と大動脈でのSLC12A輸送体のリン酸化低下を認めた。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。(雑誌論文6)

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20件)

1. Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in mutant KLHL3 knock-in mice. 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. Hum Mol Genet. 2014 May. [Epub ahead of print] 査読あり
2. WNK4 is the major WNK kinase positively regulating NCC in the mouse kidney. Takahashi D, Mori T, Nomura N, Khan MZ, Araki Y, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Biosci Rep. 2014 Mar. [Epub ahead of print] 査読あり

3. Regulation of with-no-lysine kinase signaling by Kelch-like proteins. Uchida S, Sohara E, Rai T, Sasaki S. Biol Cell. 2014; 106(2): 45-56. 査読あり doi: 10.1111 / boc.201300069.
4. 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 doi: 10.1152 / ajprenal.00208.2013.
5. Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II. Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Hypertension. 2013; 62(5): 872-8. 査読あり doi: 10.1161 / HYPERTENSIONAHA.113.01543.
6. 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. 査読あり doi: 10.1042 / BJ20130597.
7. Decrease of WNK4 ubiquitination by disease-causing mutations of KLHL3 through different molecular mechanisms. Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Araki Y, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Biochem Biophys Res Commun. 2013; 439(1): 30-4. 査読あり doi: 10.1016 / j.bbrc.2013.08.035.
8. KLHL2 interacts with and ubiquitinates WNK kinases. Takahashi D, Mori T, Wakabayashi M, Mori Y, Susa K, Zeniya M,

- Sohara E, [Rai T](#), Sasaki S, Uchida S. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 437(3): 457-62. 査読あり doi: 10.1016 / j.bbrc.2013.06.104.
9. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Matsuo H, Murata T, Nomura S, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, [Rai T](#), Sasaki S, Uchida S. *Cell Rep.* 2013; 3(3): 858-68. 査読あり doi: 10.1016 / j.celrep. 2013.02.024.
10. A minor role of WNK3 in regulating phosphorylation of renal NKCC2 and NCC co-transporters in vivo. Oi K, Sohara E, [Rai T](#), Misawa M, Chiga M, Alessi DR, Sasaki S, Uchida S. *Biol Open.* 2012; 1(2): 120-7. 査読あり doi: 10.1242 / bio.2011048.
11. WNK-OSR1/SPAK-NCC signal cascade has circadian rhythm dependent on aldosterone. Susa K, Sohara E, Isobe K, Chiga M, [Rai T](#), Sasaki S, Uchida S. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 427(4): 743-7. 査読あり doi: 10.1016 / j.bbrc.2012.09.130.
12. Does a $\beta(2)$ -adrenergic receptor - WNK4 - Na-Cl co-transporter signal cascade exist in the in vivo kidney? Uchida S, Chiga M, Sohara E, [Rai T](#), Sasaki S. *Nat Med.* 2012; 18(9): 1324-5. 査読あり doi: 10.1038 / nm.2809.
13. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway activates the WNK - OSR1/SPAK - NCC phosphorylation cascade in hyperinsulinemic db/db Mice. Nishida H, Sohara E, Nomura N, Chiga M, Alessi DR, [Rai T](#), Sasaki S, Uchida S. *Hypertension.* 2012; 60(4): 981-90. 査読あり doi: 10.1161 / HYPERTENSIONAHA.
14. Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 and SPAK kinases regulates its ubiquitination. Hossain Khan MZ, Sohara E, Ohta A, Chiga M, Inoue Y, Isobe K, Wakabayashi M, Oi K, [Rai T](#), Sasaki S, Uchida S. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 425(2): 456-61. 査読あり doi: 10.1016 / j.bbrc.2012.07.124.
15. Effect of heterozygous deletion of WNK1 on the WNK-OSR1 / SPAK-NCC / NKCC1 / NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels. Susa K, Kita S, Iwamoto T, Yang SS, Lin SH, Ohta A, Sohara E, [Rai T](#), Sasaki S, Alessi DR, Uchida S. *Clin Exp Nephrol.* 2012; 16(4): 530-8. 査読あり
16. Acute insulin stimulation induces phosphorylation of the Na-Cl cotransporter in cultured distal mpkDCT cells and mouse kidney. Sohara E, [Rai T](#), Yang SS, Ohta A, Naito S, Chiga M, Nomura N, Lin SH, Vandewalle A, Ohta E, Sasaki S, Uchida S. *PLoS One.* 2011; 6(8): e24277. 査読あり doi: 10.1371 / journal.pone.0024277.
17. Phenotypes of pseudohypoaldosteronism type II caused by the WNK4 D561A missense mutation are dependent on the WNK-OSR1 / SPAK kinase cascade. Chiga M, Rafiqi FH, Alessi DR, Sohara E, Ohta A, [Rai T](#), Sasaki S, Uchida S. *J Cell Sci.* 2011; 124(Pt 9): 1391-5. 査読あり doi: 10.1242 / jcs.084111.
18. Regulation of WNK1 kinase by extracellular potassium. Naito S, Ohta A, Sohara E, Ohta E, [Rai T](#), Sasaki S, Shinichi Uchida. *Clin Exp Nephrol.* 2011; 15(2): 195-202. 査読あり doi: 10.1007 / s10157-010-0378-9.
19. Mechanisms for hypercalciuria in pseudohypoaldosteronism type II-causing WNK4 knock-in mice. Yang SS, Hsu YJ, Chiga M, [Rai T](#), Sasaki S, Uchida S, Lin SH.

Endocrinology. 2010; 151(4): 1829-36. 査読あり doi: 10.1210 / en.2009-0951.

20. Effect of angiotensin II on the WNK-OSR1 / SPAK-NCC phosphorylation cascade in cultured mpkDCT cells and in vivo mouse kidney. Talati G, Ohta A, Rai T, Sohara E, Naito S, Vandewalle A, Sasaki S, Uchida S. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 393(4): 844-8. 査読あり doi: 10.1016 / j.bbrc.2010.02.096.

[学会発表](計 19 件)

1. 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, U.S.A., Nov 5-10 2013.

2. Susa K, Sohara E, Zeniya M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Low salt intake decreased transcription and protein level of KLHL3 in mouse kidney. American Society of Nephrology Kidney Week 2013, Atlanta, U.S.A., Nov 5-10 2013.

3. 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, U.S.A., Nov 5-10 2013.

4. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Impaired KHLH3-mediated ubiquitination of WNK4 activates OSR1 and SPAK kinases - NaCl cotransporter (NCC) signaling and causes hypertension. American Society of Nephrology Kidney Week 2013, Atlanta, U.S.A., Nov 5-10 2013.

5. Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Araki Y, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Analyses of KHLH3 mutants that cause Pseudohypoaldosteronism type II. American Society of Nephrology Kidney Week 2013, Atlanta, U.S.A., Nov 5-10 2013.

6. Takahashi D, Mori T, Wakabayashi M, Mori Y, Susa K, Zeniya M, Rai T, Sohara E, Sasaki S, Uchida S. KHLH2 interacts with and ubiquitinates WNK4 kinases. American Society of Nephrology Kidney Week 2013, Atlanta, U.S.A., Nov 5-10 2013.

7. Zeniya M, Sohara E, Oi K, Chiga M, Susa K, Mori T, Takahashi D, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK3 regulates blood pressure through the regulation of vascular OSR1 / SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade. American Society of Nephrology Kidney Week 2013, Atlanta, U.S.A., Nov 5-10 2013.

8. 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, U.S.A., Oct 30 - Nov 4 2012.

9. Isobe K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Development of sandwich enzyme linked immunosorbent assay for measurement of urinary total and phosphorylated Na-Cl cotransporter protein. American Society of Nephrology Kidney Week 2012, San Diego, U.S.A., Oct 30 - Nov 4 2012.

10. 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. American Society of Nephrology Kidney Week 2012, San Diego, U.S.A., Oct 30 - Nov 4 2012.

11. Kahn MZH, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 and SPAK kinases regulates its ubiquitination. American Society of Nephrology Kidney Week 2012, San Diego, U.S.A., Oct 30 - Nov 4 2012.

12. Mori T, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Generation and analysis of WT-WNK4 transgenic mice reveal the physiological role of WNK4. American Society of Nephrology Kidney Week 2012, San Diego, U.S.A., Oct 30 - Nov 4 2012.

13. 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. American Society of Nephrology Kidney Week 2012, San Diego, U.S.A., Oct 30 - Nov 4 2012.

14. Nishida H, Sohara E, Alessi D, Nomura N, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Increased Na-Cl cotransporter phosphorylation in hyperinsulinemic db/db mice is regulated by insulin/PI3K pathway. American Society of Nephrology Kidney Week 2011, Philadelphia, U.S.A., Nov 8-13 2011.

15. 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 (PHA II). American Society of Nephrology Kidney Week 2011, Philadelphia, U.S.A., Nov 8-13 2011.

16. Sohara E, Rai T, Yang SS, Ohta A, 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. American Society of Nephrology

Kidney Week 2011, Philadelphia, U.S.A., Nov 8-13 2011.

17. Isobe K, 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. American Society of Nephrology Kidney Week 2011, Philadelphia, U.S.A., Nov 8-13 2011.

18. 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. American Society of Nephrology Kidney Week 2011, Philadelphia, U.S.A., Nov 8-13 2011.

19. Susa K, Sohara E, Rai T, Kita S, Iwamoto T, Alessi D, Sasaki S, Uchida S. WNK - OSR1/SPAK - SLC12A phosphorylation cascade in the WNK1 (+/-) mice. American Society of Nephrology Kidney Week 2011, Philadelphia, U.S.A., Nov 8-13 2011.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等：特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

頼 建光 (RAI, TATEMITSU)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：80334430

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：