

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分  
平成28年3月7日現在

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

Salt stress-induced responses in health and disease:  
the role of WNK kinases and new therapeutic strategies

課題番号：25221306

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



研究の概要

WNK シグナル伝達系の各臓器での役割の解明、新規の上流の制御因子と制御機構の解明と下流の標的分子の同定を試みた。その結果、WNK の E3 リガーゼを同定し、分解機構によるこのシグナル系の制御を発見し、塩分負荷がこの系を介して血管平滑筋のトーン調節をしていることを解明した。本シグナル系の阻害薬のスクリーニング法を確立し、シード化合物を同定した。

研究分野：医歯薬学

キーワード：塩分ストレス、高血圧

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である 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、多くの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（創薬やバイオマーカー開発）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出納制御のように、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。

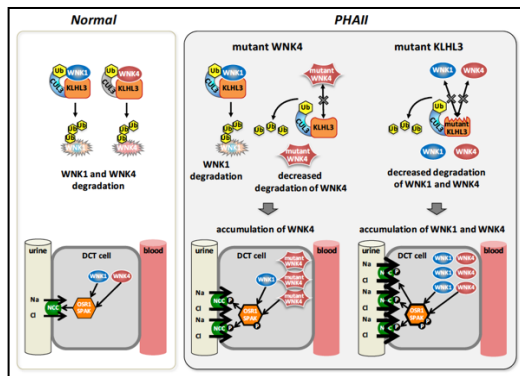
4. これまでの成果

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

1. WNK4 ノックアウト (KO) マウスが、長期飼育においても、野性型マウスに比して肥満していないことに着目し、その機序を追求した。高脂肪食下において、明らかに WNK4KO の体重減少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、脂肪細胞への分化に重要な役割を担っていることが判明し、詳細を解明し投稿中である。WNK 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。
2. 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 (*JASN2014*)。

## 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 (PHAII) 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してきたが、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、PHAII に新たな原因遺伝子が発見され (KLHL3 と Cullin3)、WNK をふくめて 3 つの異なる遺伝子の異常がいかにして同一の PHAII という病態を引き起こすのかを解明した。左図に示す如く、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 (*Cell Rep* 2013)、遺伝子変異によるこの WNK の分解障害 (*BBRC* 2013) と細胞内 WNK 量の増加が、PHAII の共通した分子メカニズムである事を証明した (*Hum Mol Genet* 2014) (以下図)。



この発見から、KLHL3 以外にも KLHL2 が 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)、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* 2014) 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、PHAII 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なく、オートファジーも関与している事も明らかにし (*JASN* 2014, *Biochem J* 2015)、今後オートファジーを介した現象と WNK シグナルのクロストークに研究が進展している。

## WNK シグナル伝達系の阻害薬探索

上記の種々の研究成果から、本シグナル阻害薬は、降圧薬としのみならず、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、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、小規模な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* 2014)。

### 5. 今後の計画

上記の成果を各々さらに進展させるとともに、**塩分負荷が各細胞・臓器にどのような影響を与えているか**を探る試みは、次世代シーケンサーを使用した網羅的解析を手がかりとして行う。注目すべき候補分子の選定をすすめ、特に免疫関連分子、において塩分負荷の与える影響を、細胞・マウスレベルで解析し、今まで見過ごされていた塩分負荷が形成する病態について明らかにする。また、慢性腎臓病 (CKD) モデルでの塩分負荷の与える影響の解析、同時に蛋白負荷が与える影響についても解析を行い、塩分負荷が CKD 進展に影響する分子の解析も行う。網羅的解析の対象は、他臓器にも広げ、臓器連関をダイナミックに俯瞰することで、病態メカニズムを明らかにする。

### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. 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
2. Zeniya M, Uchida S, et al. Kelch-Like protein 2 mediates angiotensin II-with no lysine 3 signaling in the regulation of vascular tonus. *J Am Soc Nephrol* 26:2129-38, 2015.
3. Kikuchi E, Uchida S et al. Discovery of novel SPAK inhibitors that block WNK kinase signaling to cation chloride transporters. *J Am Soc Nephrol* 26:1525-36, 2015.
4. Susa K, 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.

ホームページ等

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