

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2014～2015

課題番号：26670428

研究課題名(和文)尿中輸送体測定を用いた降圧利尿薬オーダーメイド医療の開発

研究課題名(英文)Development of order-made treatment of hypertension by measurement of urinary transporters

研究代表者

蘇原 映誠(SOHARA, EISEI)

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：90510355

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):偽性低アルドステロン症II型(PHAI1)は、塩分感受性高血圧を呈する遺伝性疾患であり、原因遺伝子としてWNK1及びWNK4に加えて、KLHL3とCullin3が新たに同定された。我々はPHAI1変異を持つKLHL3R528H/+ノックインマウスを作製し、変異KLHL3がWNK1、WNK4と結合できず、WNKキナーゼのユビキチン化が減弱し、WNK1及びWNK4の蛋白量が増加し、その結果結果としてWNKシグナルが過剰亢進するためPHAI1が発症することを報告した。その他、血管でのWNKシグナルの働き、KLHL3リン酸化でのWNKシグナル制御、SPAK阻害薬スクリーニングなどの報告を行った。

研究成果の概要(英文):Pseudohypoaldosteronism type II (PHAI1) is a hereditary disease characterized by salt-sensitive hypertension, hyperkalemia and metabolic acidosis, and genes encoding with-no-lysine kinase 1 (WNK1) and WNK4 kinases are known to be responsible. Recently, Kelch-like 3 (KLHL3) and Cullin3, components of KLHL3-Cullin3 E3 ligase, were newly identified as responsible for PHAI1. To investigate the pathogenesis of PHAI1 caused by KLHL3 mutation, we generated KLHL3R528H/+ knock-in mice. KLHL3R528H/+ knock-in mouse is an ideal mouse model of PHAI1. Interestingly, the protein expression of both WNK1 and WNK4 was significantly increased in the KLHL3R528H/+ mouse kidney, confirming that increases in these WNK kinases activated the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in KLHL3R528H/+ knock-in mice. Thus, we found that increased protein expression levels of WNK1 and WNK4 kinases cause PHAI1 by KLHL3 R528H mutation due to impaired KLHL3-Cullin3-mediated ubiquitination.

研究分野：腎臓内科

キーワード：WNKキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

我々は塩分感受性高血圧を呈する偽性低アルドステロン症 II 型(PHAI1)という遺伝性疾患の病態解明を通して、WNK キナーゼによる腎臓での新たな塩分出納・血圧制御機構を明らかにしてきた。WNK1 と WNK4 は腎臓において、OSR1 と SPAK という 2 つのキナーゼをリン酸化し、OSR1 と SPAK はさらに NaCl 共輸送体(NCC)をリン酸化・活性化し、原尿から塩分を再吸収させる。PHAI1 では WNK シグナルの亢進により NCC が活性化し、塩分感受性高血圧となる。最近、新たに KLHL3 と Cullin3(CUL3)が PHAI1 の原因遺伝子として同定された。CUL3 と KLHL3 は複合体を形成し、基質蛋白をユビキチン化し分解に導く E3 リガーゼとしての役割を持つと推定されていたが、生体内での KLHL3 の基質と、KLHL3 変異による PHAI1 発症メカニズムは不明のままであった。

また、近年、高齢者の高血圧症に降圧利尿薬が第一選択薬の一つとして挙げられるなど、利尿薬が再び注目されている。利尿薬の作用機序は腎臓尿細管での塩分輸送体や水チャネルを阻害することによって、塩分や水を再吸収せずに尿中に出すという単純なものである。サイアザイド系利尿薬、ループ利尿薬に加えて、最近ではバソプレシン V2 受容体拮抗薬(トルバプタン)も使用される。サイアザイドは Na-Cl 共輸送体(NCC)、ループ利尿薬は Na-K-Cl 共輸送体(NKCC2)、トルバプタンはバソプレシン V2 レセプターを介して AQP2 水チャネルの機能を阻害することによって利尿剤として機能する。申請者はこれらの腎臓の水チャネルや塩分輸送体についてこれまで研究を行ってきた。大学院生時代には AQP2 をはじめとする水チャネルについて研究を行い(PNAS 2006, AJP 2005 など)、近年では、偽性低アルドステロン症 II 型(PHAI1)の原因遺伝子である WNK キナーゼの基質に OSR1/SPAK キナーゼ、さらにその基質として Na-Cl 共輸送体(NCC)の存在を明らかにし、それらが腎臓の塩分出納調節に重要な WNK-OSR1/SPAK-NCC シグナル伝達系を構成していることを明らかにし(Cell Metab 2007 など)、メタボリック症候群では WNK シグナル亢進によって、塩分感受性高血圧が起きる事を報告した(PLoS One 2011, Hypertension 2012 など)。今後の研究の方向性の一つとして、これらの知見の臨床応用への発展を目指しており、最近我々は尿中 NCC を ELISA で検出するシステムを開発した(AJP 2013)。NCC 機能亢進をきたす PHAI1 患者では、尿中 NCC 量は家族内健常者の 10 倍もの排泄量が認められ、NCC 機能低下によって発症するギッテルマン患者では検出感度以下であった。この結果は、尿中 NCC 量は尿細管細胞膜上での NCC 蛋白の多寡、すなわちサイアザイド感受性を推定することに役立つ可能性を示した。尿中 NCC とサイアザイド感受性の関連が臨床的に証明されれば、標的輸送体である尿中 NCC 自

身がサイアザイド有効性予測のバイオマーカーになると考えられる。我々は他の利尿剤の標的輸送体である AQP2 の尿中 ELISA を過去に報告し(Clin Exp Nephrol 2012)、さらに NKCC2 の ELISA もペプチドを検体として検出できるレベルまで完成していた。

2. 研究の目的

塩分感受性を制御する WNK キナーゼの分解系として新しく発見された KLHL3/Cul3 ユビキチンライゲースのさらなるメカニズムを明らかにしていくことを目的の一つとした。

また、近年、降圧利尿薬が再び注目されているが、その作用機序はサイアザイド、ループ利尿薬、トルバプタンと各々違う塩分/水輸送体を阻害する事によって機能しており、症例によってどの薬剤が最も有効であるかを予見する指標はまだない。本研究は、現在使用されている利尿薬の標的輸送体である NCC、NKCC2、AQP2 を尿から直接、定量的測定をする事により、最適降圧利尿薬選択のためのバイオマーカーを誕生させることを目的とした

3. 研究の方法

尿中 NCC を制御するメカニズムとして明らかになった、WNK 分解系である KLHL/Cul3 を検討し、塩分感受性高血圧と塩分出納機構の詳細を明らかにし、新しい知見からさらなる臨床応用を目指していく。

また、我々の開発した尿中輸送体定量測定系を発展させ、最適降圧利尿薬選択のためのバイオマーカーを誕生させるために、現在使用されている利尿薬の標的輸送体である NCC、NKCC2、AQP2 の尿中での定量測定が可能な各々の ELISA の立ち上げを試みた。

4. 研究成果

尿中 NCC と尿中 AQP2 はヒト検体で検出可能なレベルまで ELISA システムを構築して報告したが、NKCC2 の ELISA は抗体を 4 種類も検討したが、非特異的な反応が多かったため、ヒト検体を正確に測定できるレベルの尿中 NKCC2 検出用 ELISA は残念ながら完成に至らなかった。

しかし、もう一つのプロジェクトである WNK シグナルのさらなる解明には大きな発展があった。

まず我々は塩分感受性高血圧を呈する偽性低アルドステロン症 II 型(PHAI1)という遺伝性疾患の病態解明を通して、WNK キナーゼによる腎臓での新たな塩分出納・血圧制御機構を明らかにした(Hum Mol Genet, 2014)。我々はヒト PHAI1 患者家系と同じ KLHL3 変異を持つ遺伝子改変マウスを作製し、WNK との KLHL3 の結合能が変異によって低下することで、腎臓遠位尿細管で WNK1 と WNK4 の蛋白分解が障害され、蛋白量が増加し、下流の OSR1/SPAK-NCC リン酸化シグナル亢進につながり、塩分再吸収が過剰になり、塩分感

受性高血圧を呈することを明らかにした。本研究は、WNK キナーゼが CUL3/KLHL3 複合体による蛋白分解系で発現調節されるという、全く新しい塩分感受性制御機構を初めて生体内で明らかにしたものであった。

次に質量分析を用いて KLHL3 のリン酸化サイトを同定し、その部位に対するリン酸化抗体を作成し検討した (Biochem Biophys Res Commun. 2015)。質量分析によって KLHL3 の S433 がリン酸化サイトであると同定され、WNK4 によって免疫沈降された KLHL3 は S433 リン酸化が減少しており、S433 リン酸化によって KLHL3 は WNK4 との結合が減少することがわかった。PKA と Akt、さらには forskolin と insulin の刺激で KLHL3 S433 リン酸化が各々亢進し、PKA と Akt による KLHL3 リン酸化が WNK4 との結合を制御することがわかり、インスリンやバゾプレッシンによる WNK シグナル制御の生理的メカニズムの 1 つを解き明かした。

次にマウス血管平滑筋細胞において、angiotensinII 投与による WNK3-SPAK-NKCC1 シグナル活性化を確認し、その際の KLHL2 の関与を検討した (J Am Soc Nephrol. 2015)。大動脈血管平滑筋細胞には KLHL2 が発現しており、angiotensinII の投与で KLHL2 蛋白量の減少し、さらに大動脈血管平滑筋においても angiotensinII や塩分摂取により KLHL2 のは制御されることを確認し、最終的にマウスの血管平滑筋において、angiotensinII は選択的オートファジーというタンパク分解機構を介して KLHL2 を減少させ、KLHL2 が減少することで WNK3 の分解が抑えられ、結果 WNK3-SPAK-NKCC1 シグナルが活性化するという、新しい血管収縮の機序を発見した。

また、SPAK キナーゼ阻害薬の新しいスクリーニング系を確立した (J Am Soc Nephrol. 2015)。約 20,000 個の低分子化合物と約 900 個の既存薬をスクリーニングした結果、クロサンテルが SPAK キナーゼの阻害効果を有することを発見した。細胞実験やマウス実験でも、これらの薬剤により SPAK キナーゼの作用ターゲットである NCC や NKCC1 のリン酸化が抑制されることが確認された。

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 14 件)

Mori T, Hosomichi K, Chiga M, Mandai S, Nakaoka H, Sohara E, Okado T, Rai T, Sasaki S, Inoue I, Uchida S. Comprehensive genetic testing approach for major inherited kidney diseases, using next-generation sequencing with a custom panel. Clin Exp Nephrol. 2016 (In press)
doi なし、査読有

Araki Y, Rai T, Sohara E, Mori T, Inoue Y, Isobe K, Kikuchi E, Ohta A, Sasaki S, Uchida S. Generation and analysis of knock-in mice carrying pseudohypoaldosteronism type II-causing mutations in the cullin 3 gene. Biol Open. 2015 Oct 21;4(11):1509-17.
doi: 10.1242/bio.013276. 査読有

Yoshizaki Y, Mori Y, Tsuzaki Y, Mori T, Nomura N, Wakabayashi M, Takahashi D, Zeniya M, Kikuchi E, Araki Y, Ando F, Isobe K, Nishida H, Ohta A, Susa K, Inoue Y, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S, Sohara E. Impaired degradation of WNK by Akt and PKA phosphorylation of KLHL3. Biochem Biophys Res Commun. 2015. 467(2):229-34. (Corresponding Author)
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.184. 査読有

Sohara E, Uchida S. Kelch-like 3/Cullin 3 ubiquitin ligase complex and WNK signaling in salt-sensitive hypertension and electrolyte disorder. Nephrol Dial Transplant. 2015. (In press)
doi なし、査読有

Zeniya M, Morimoto N, Takahashi D, Mori Y, Mori T, Ando F, Araki Y, Yoshizaki Y, Inoue Y, Isobe K, Nomura N, Oi K, Nishida H, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S. Kelch-Like Protein 2 Mediates Angiotensin II-With No Lysine 3 Signaling in the Regulation of Vascular Tonus. J Am Soc Nephrol. 2015; 26(9): 2129-38.
doi: 10.1681/ASN.2014070639. 査読有

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. 2015; 26(7): 1525-36.
doi: 10.1681/ASN.2014060560 査読有

Mandai S, Mori T, Sohara E, Rai T, Uchida S. Generation of Hypertension-Associated STK39 Polymorphism Knockin Cell Lines With

the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 System. Hypertension. 2015. 66(6):1199-206.
doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05872.
査読有

Araki Y, Rai T, Sohara E, Mori T, Inoue Y, Isobe K, Kikuchi E, Ohta A, Sasaki S, Uchida S. Generation and analysis of knock-in mice carrying pseudohypoaldosteronism type II-causing mutations in the cullin 3 gene. Biol Open. 2015.
doi: 10.1242/bio.013276.
査読有

Mori Y, Mori T, Wakabayashi M, Yoshizaki Y, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Uchida S. p62/SQSTM1-mediated selective autophagy is involved in KLHL3-dependent WNK4 degradation. Biochem J. 2015. 472(1):33-41.
doi: 10.1042/BJ20150500.
査読有

Miyauchi T, Yamamoto H, Abe Y, Yoshida GJ, Rojek A, Sohara E, Uchida S, Nielsen S, Yasui M. Dynamic subcellular localization of aquaporin-7 in white adipocytes. FEBS Lett. 2015; 589(5) :608-14.
doi: 10.1016/j.febslet.2015.01.025.
査読有

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. 2014; 23(19):5052-60. (Corresponding Author)
doi: 10.1093/hmg/ddu217.
査読有

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. 2014 25(12):2789-99. (Corresponding Author)
doi: 10.1681/ASN.2013060614.
査読有

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. 2014; 34(3) :e00107
doi: 10.1042/BSR20140047
査読有

Uchida S, Sohara E, Rai T, Sasaki S. Regulation of with-no-lysine kinase signaling by Kelch-like proteins. Biol Cell. 2014; 106(2): 45-56.
doi: 10.1111/boc.201300069.
査読有

[学会発表](計 21 件)

蘇原映誠, 森 崇寧, 頼 建光, 内田 信一 遺伝性腎疾患が明らかにする腎生理と新たな創薬への道. 第 58 回日本腎臓学会学術総会ワークショップ, 2015 年 6 月 7 日, 名古屋, 名古屋国際会議場(愛知県, 名古屋市)

蘇原映誠. WNK キナーゼ分解を介した新たな塩分感受性制御機構. 第 40 回関東腎研究会 2015 年 7 月 25 日, 東京, クラブ関東(東京都, 千代田区)

蘇原映誠 基礎研究から多発性嚢胞腎を考える 第 1 回多発性嚢胞腎フォーラム 2015 年 4 月 5 日, 東京, 東京ステーションホテル(東京都, 千代田区)

蘇原映誠. 基礎研究から多発性嚢胞腎を考える. 日本人類遺伝学会第 60 回大会, 2015 年 10 月 15 日, 東京, 京王プラザホテル(東京都, 新宿区)

蘇原映誠. 頼 建光, 佐々木 成, 内田 信一 偽性低アルドステロン症 2 型が明らかにした WNK シグナルとその制御機構. 第 57 回日本腎臓学会学術総会ワークショップ, 2014 年 6 月 4 日, 横浜, パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市)

Araki Y, Rai T, Sohara E, Mori T, Inoue Y, Kikuchi E, Uchida S. Generation and analysis of knock-in mice carrying pseudohypoaldosteronism type II-causing mutations in the cullin 3 gene. The 48th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2015.

Susa K, Sohara E, Takahashi D, Rai T, Uchida S. The Major Contribution of WNK4 to the Pathogenesis of Pseudohypoaldosteronism Type II (PHAII) Caused by the KLHL3 Mutation

R528H. The 48th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2015.

Mandai S, Mori T, Sohara E, Rai T, Uchida S. Generation of Hypertension-Associated STK39 Polymorphism Knock-in Cell Lines with the CRISPR/Cas9 System. The 48th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2015.

Kikuchi H, Kanda E, Iimori S, Naito S, Sasaki S, Sohara E, Okado T, Rai T, Uchida S. Combination of Low Body Mass Index and Serum Albumin Level Leads to Chronic Kidney Disease Progression: The Chronic Kidney Disease-Research of Outcomes in Treatment and Epidemiology Study. The 48th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2015.

Nomura N, Shoda W, Sohara E, Rai T, Uchida S. Potassium-induced dephosphorylation of renal sodium-chloride cotransporter is NOT dependent on the anions. The 48th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2015.

Naito S, Iimori S, Sohara E, Okado T, Sasaki S, Uchida S, Rai T. The Effects of Diuretics on the Progression of CKD and Incidence of Cardiovascular Events: Results from the CKD-ROUTE Study - A Prospective Cohort Study of Newly Visiting CKD Patients in Japan. The 48th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2015.

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, May. 2014.

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 AQP11-knockout mice The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology. Tokyo, May. 2014.

Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Rai T, Ishibashi K, Horie S, Su X, Zhou J, Sasaki S, Uchida S. Elongated ciliary length of proximal tubules in a PKD model AQP11 knockout mouse. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.

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, November. 2014.

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, November. 2014.

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, November. 2014.

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, November. 2014.

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, November. 2014.

Arai Y, Kanda E, Ando R, Iimori S, Sasaki S, Sohara E, Okado T, Rai T,

Uchida S. Vitamin D Analogs Reduce the Progression of Chronic Kidney Disease: Chronic Kidney Disease Research of Outcomes in Treatment and Epidemiology Study (CKD-ROUTE Study). The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.

- 21 Yamaguchi W, Yui N, Nagao T, Azetsu H, Iimori S, Sohara E, Okado T, Rai T, Sasaki S, Uchida S. BJP lambda-type multiple myeloma successfully withdrawn from maintenance hemodialysis after long-term continuous bortezomib and dexamethasone therapy. The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November. 2014.

〔図書〕(計0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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蘇原 映誠 (SOHARA Eisei)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：90510355

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし