

第 37 回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

YIA 受賞記念講演 2

Discovery of novel SPAK inhibitors that block WNK kinase signaling to cation chloride transporters

菊池絵梨子

Eriko KIKUCHI

腎尿細管におけるナトリウム (Na) の再吸収は, Na/K/Cl cotransporter 2 (NKCC2), Na-Cl 共輸送体 (NCC), ENaC といったトランスポーターにより厳密にコントロールされている。遺伝性尿細管疾患の一つである偽性低アルドステロン症 II 型 (PHA II) は常染色体優性遺伝形式をとり, 高血圧, 高カリウム血症, 高クロライド性代謝性アシドーシスを特徴とするが, 以前より NCC の特異的阻害薬であるサイアザイド系利尿薬にて症状が改善することから, 長らく NCC の機能亢進がその病態と考えられていた。そのなかで, 2001 年に WNK1 と WNK4 キナーゼが PHA II の原因遺伝子として初めて同定された¹⁾。しかし, 当時は WNK キナーゼの遺伝子異常がどのようにして PHA II の病態に結びつくのかは不明であった。その後, WNK キナーゼの標的分子として, 新たに STE20/SPS1-related proline-alanine-rich protein kinase (SPAK) および oxidative stress-responsive 1 (OSR1) という相同性の高いキナーゼが同定され, 以降 WNK-SPAK/OSR1-NCC シグナルカスケードと呼ばれる一連のカスケードの存在が明らかとなった。さらに SPAK, OSR1 の両キナーゼは NCC のみならず, NKCC1, 2 などほかの SLC12A トランスポーターも活性化し, 特に血管平滑筋に存在する NKCC1 の活性化は血管トーン調整に重要な役割を果たしていることが明らかとなった (図 1)^{2~6)}。すなわち, この一連のカスケードの亢進は, 尿細管での塩分再吸収増加と血管トーンの亢進を介して血圧上昇に働いており, このカスケードを阻害する薬剤は, 一連のシグナルの下流に存在する NCC, NKCC1 といった複数のトランスポーターを阻害することで効率的に降圧効果を発揮す

ることが期待できるものと考えられた。最近ではインスリンによりこのカスケードが賦活化されることもわかっており, メタボリックシンドロームや肥満など, インスリン抵抗性から恒常的に高インスリン状態にある患者における塩分感受性高血圧の発症に, このカスケードの亢進が関与していることが示唆される。このシグナルの阻害薬は, これらの患者においてより高い降圧効果を発揮すると考えられる。

さらに, 2009 年の GWAS で本態性高血圧関連遺伝子多型として初めて報告されたのが, SPAK キナーゼの SNP であり, その後のメタアナリシスにおいても SPAK キナーゼの SNP と高血圧には強い相関が認められた^{7,8)}。これらの

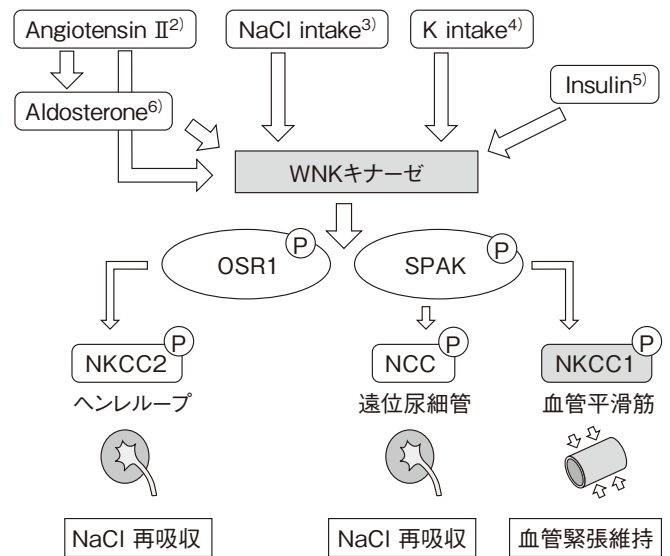


図 1 WNK-SPAK/OSR1-SLC12A シグナルカスケードの概要 (文献 2 ~ 6 より引用)

異なる2つのライブラリー

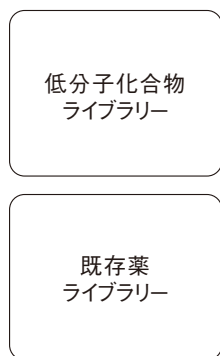
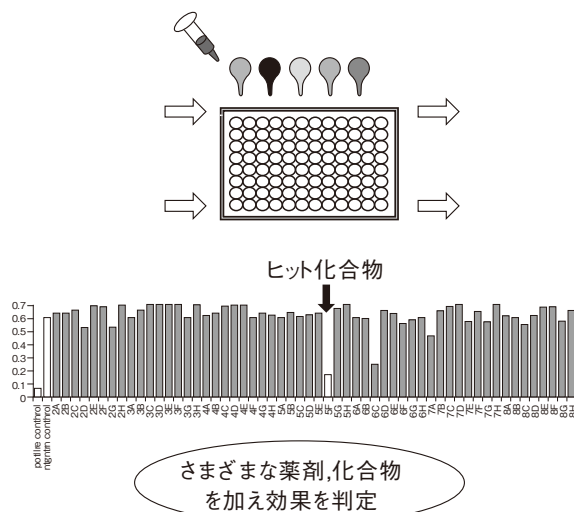
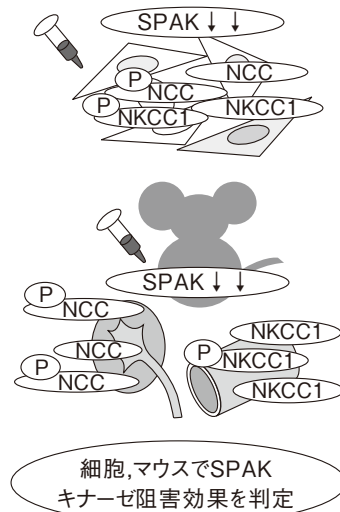
ELISA法を用いた *in vitro*スクリーニング細胞,マウスを用いた *in vivo*効果判定

図2 SPAK キナーゼ阻害薬スクリーニング概要

SNPは日本人の約20%に認められる高頻度のSNPであり、SPAK キナーゼはPHA IIの病態のみならず、広く一般的な高血圧の発症にも関与している可能性がある。SPAK ノックアウトマウスが実際に低血圧を呈することからも、われわれは薬剤ターゲットとして、このシグナルの中核に位置するSPAK キナーゼに着目し、その阻害薬の検索を行った。

われわれは、始めにELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)を用いたハイ・スループットのスクリーニング系を確立し、約20,000種類の化合物ライブラリーおよび既存薬ライブラリーを用いてスクリーニングを実施した(図2)。リン酸化基質にはSPAKによるリン酸化効率が最も高いNKCC2を用い、すでにSPAK キナーゼ活性を*in vitro*で増強することが知られていたMO25 α 蛋白をアッセイ系に加えることで、SPAK キナーゼ活性の定量化に成功した。スクリーニングの結果、複数個の化合物が一次候補薬としてあがり、細胞実験による二次スクリーニングへと進んだ結果、1つの化合物(Stock1S-14279)と既存薬のクロサンテルがマウス尿管、血管平滑筋細胞においても高いSPAK キナーゼ阻害効果を有することを発見した。クロサンテルはサリチルアニリド誘導体の一種で、抗寄生虫薬として用いられている歴史の古い薬剤であったが、これまでヒトでのキナーゼ阻害作用については知られていなかった。さらに驚いたことに、これら2つの化合物は高い構造類似性を有していた。ヒット化合物は、nM オーダー以下で濃度依存性に安定した効果を有することが求められ、標的分子であるSPAK キナーゼに直接結合して作用すること、および

選択性の高い薬剤であることの確認が必須である。これら2つの化合物はいずれも*in vitro*において濃度依存性の阻害効果を有しIC₅₀はnMオーダーであった。さらにBiacoreを用いた分子間相互解析では、いずれも濃度依存性にSPAK キナーゼに直接結合することも確認された。また、ELISA上でATP濃度を大きく振った場合のIC₅₀の変化を調べることで、ATP競合性についても検討を行った。キナーゼ阻害薬は、創薬の世界で最も注目されている分野の一つであるが、既存のキナーゼ阻害薬の多くがATP競合性であり、ATP結合部位がキナーゼ間で高度に保存されていることから、薬剤副作用や薬剤耐性の面で問題となりやすい。一方、ATP非競合型阻害薬は、特異性の高さが魅力であるが、アロステリック部位の同定が難しく、数が少ない。検討の結果、コントロールとして用いたATP競合型キナーゼ阻害薬であるスタウロsporinがATP濃度によりIC₅₀が大きく変化する一方で、今回見つかった2つの薬剤は、IC₅₀がほとんど変化せず、SPAK キナーゼに対してATPと競合することなくキナーゼ阻害効果を発揮できることが示された。並行して行ったキナーゼ・プロファイリングの結果も、ほかの主要キナーゼに対する阻害作用は低く、SPAK キナーゼ選択性の高さを支持するものであった。ATPと競合せずに阻害効果を発揮するがゆえにマルチターゲット効果を示さない点は、これらのヒット化合物を、実際の創薬に結びつくリード化合物へと発展させるにあたり大きなアドバンテージである。

さらにマウスを用いた動物実験を行い、マウス腹腔内に

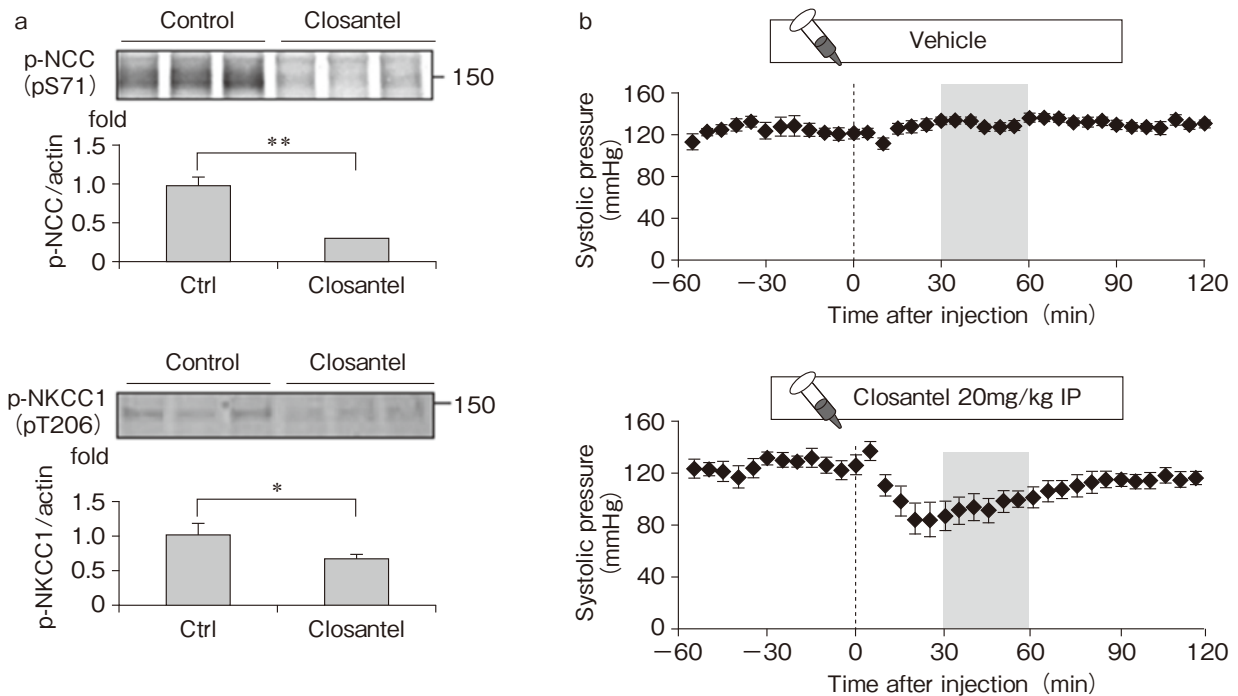


図3 Closantel 投与による SPAK 阻害効果の検証

a : Closantel 投与によりマウスの腎臓，大動脈でそれぞれ NCC，NKCC1 のリン酸化が著減
 b : Closantel 単回投与によるマウスでの降圧効果

これらの化合物を投与したところ，生体内の標的臓器においても NCC，NKCC1 のリン酸化が抑制されることを明らかにした。しかしながら急速投与による薬効持続時間は約 1 時間と短く，その効果は一過性であった。テレメトリーを挿入したマウスへの急速投与を行うと，速やかに血圧は低下したが，降圧効果は約 1 時間程度しか持続せず，先の実験での薬効持続時間とほぼ一致していた(図 3)。また，降圧効果の出現の速さから，主に血管拡張作用による効果と推察された。次にわれわれは，クロサンテルを混餌投与することで慢性投与による効果についての検証を行った。そこでも標的臓器での SPAK キナーゼ阻害作用を確認することができた。これらの結果を受けて，最近では実際の塩分感受性高血圧モデルラットを用いた実験にも着手している。その結果，高塩食により高血圧を呈するモデルラットにおいて，クロサンテルを同時投与することで高血圧の発症を抑えることができることもわかった。

高血圧患者は年々増加しており，降圧薬の需要が高まっている。WNK-SPAK シグナル系にかかわる創薬の研究は，生活習慣病における塩分感受性高血圧の治療に新しい知見をもたらすとともに，今後，発展が期待されるものと考えられる。更なる構造解析や構造活性相関の評価が必要では

あるが，SPAK キナーゼを *in vitro* のみならず *in vivo* においても効果的かつ特異的に阻害する化合物を発見でき，かつ異なるソースからみつかった化合物が類似構造を有していたことは，今後，化合物の最適化を行ううえで非常に有用な情報であり，重要な研究成果であると考えている。

謝 辞

最後に，本研究にあたり，常に支えて下さった内田信一先生はじめ東京医科歯科大学腎臓内科学教室の先生方，関係各所の方々に深く感謝いたします。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. Wilson FH, Disse-Nicodème S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X, Lifton RP. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 2001 ; 293 : 1107-1112.
2. Talati G, Ohta A, Rai T, Sohara E, Naito S, Vandewalle A, Sasaki S, Uchida S. Effect of angiotensin II on the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in cultured mpkDCT cells and *in vivo* mouse kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 ;

- 393 : 844–848. doi : 10.1016/j.bbrc.2010.02.096.
3. Chiga M, Rai T, Yang SS, Ohta A, Takizawa T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt regulates the phosphorylation of OSR1/SPAK kinases and the sodium chloride cotransporter through aldosterone. *Kidney Int* 2008 ; 74 : 1403–1409. doi : 10.1038/ki.2008.451.
 4. Naito S, Ohta A, Sohara E, Ohta E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Regulation of WNK1 kinase by extracellular potassium. *Clin Exp Nephrol* 2011 ; 15 : 195–202.
 5. Sohara E, Rai T, Yang SS, Ohta A, Naito S, Chiga M, Nomura N, Lin SH, Vandewalle A, Ohta E, Sasaki S, Uchida S. Acute insulin stimulation induces phosphorylation of the Na-Cl cotransporter in cultured distal mpkDCT cells and mouse kidney. *PLoS One* 2011 ; 6 : e24277. doi : 10.1371/journal.pone.0024277.
 6. Chiga M, Rai T, Yang SS, Ohta A, Takizawa T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt regulates the phosphorylation of OSR1/SPAK kinases and the sodium chloride cotransporter through aldosterone. *Kidney Int* 2008 ; 74 : 1403–1409. doi : 10.1038/ki.2008.451.
 7. Wang Y, O'Connell JR, McArdle PF, Wade JB, Dorff SE, Shah SJ, Shi X, Pan L, Rampersaud E, Shen H, Kim JD, Subramanya AR, Steinle NI, Parsa A, Ober CC, Welling PA, Chakravarti A, Weder AB, Cooper RS, Mitchell BD, Shuldiner AR, Chang YP. Whole-genome association study identifies STK39 as a hypertension susceptibility gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 226–231. doi : 10.1073/pnas.0808358106
 8. Xi B1, Chen M, Chandak GR, Shen Y, Yan L, He J, Mou SH. STK39 polymorphism is associated with essential hypertension: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2013 ; 8 : e59584. doi : 10.1371/journal.pone.0059584.