

## 肥満患者における WNK キナーゼを介した塩分感受性高血圧メカニズムの解明

内田 信一

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科腎臓内科学

**概要** メタボリックシンドロームや肥満のようにインスリン抵抗性のために、高インスリン血症を来す患者に塩分感受性高血圧を多く認めることは臨床的にはすでに報告されている。過去の報告でインスリンが尿細管での塩分再吸収を亢進することはよく知られているが、その詳細なメカニズムは不明である。我々は偽性低アルドステロン症 II 型 (以下 PHAII) の研究を通じて WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードが腎臓尿細管での塩分再吸収を制御する機構である事を明らかにしてきた。PHAII 研究において、変異 WNK4 R1185C による PHAII 発症メカニズムは WNK4 1190S の過剰なリン酸化により、WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードの亢進を起こして発症する事を発見したが、この WNK4 1190S のリン酸化はインスリンによって亢進し、細胞レベルでは下流となる内因性の NCC のリン酸化も亢進することを見いだした。この知見から、細胞、動物モデル、ヒト検体を用いて、メタボリックシンドロームや肥満など高インスリン状態における塩分感受性高血圧のメカニズムを本研究では探求した。細胞実験では、mpkDCT 細胞においてインスリン投与により SPAK と NCC のリン酸化亢進をインスリン負荷量依存性に認めた。次にマウスへインスリン腹腔内投与 (5U /kg) を行い、腎臓での OSR1/SPAK-NCC のリン酸化を評価したところ、投与 30 分後に OSR1/SPAK リン酸化亢進のピークを認めた。NCC リン酸化亢進は遅れて 90 分後まで持続しており、OSR1/SPAK リン酸化の下流で制御されていることが示唆された。同実験を WNK4 hypomorphic mouse と SPAK ノックアウトマウスに施行したところ、各々下流の OSR1/SPAK、NCC のリン酸化亢進を認めず、インスリンの急性負荷による NCC のリン酸化亢進は WNK4 と OSR1/SPAK を介していると考えられた。高インスリン血症メタボリック症候群モデルである db/db マウス腎臓を用いて検討もおこなった。サイアザイド負荷で db/db マウスの Na 排泄は亢進し、これは NCC の機能亢進を示唆し、実際に db/db マウス腎臓では OSR1/SPAK と NCC のリン酸化が亢進していた。高アルドステロン状態となる低塩食においてもコントロールと比較して OSR1/SPAK-NCC リン酸化は亢進しており、インスリンによる制御機構はアルドステロンと一部独立していると考えられた。さらには WNK によるリン酸化を受けない OSR1 T185A/+、SPAK T243/+ノックインマウスを db/db マウスと交配した結果、OSR1 と SPAK 各々の不活化により db/db マウス腎臓での NCC リン酸化が抑制されることが明らかになった。結果として、db/db マウス腎臓における NCC リン酸化亢進は WNK による OSR1/SPAK のリン酸化を介していると考えられた。

以上、メタボリックシンドロームや肥満など高インスリン状態における塩分感受性高血圧のメカニズムに我々の発見した、Insulin-PI3K-WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化シグナルが関与している可能性を細胞と動物モデルで明らかにし、今後ヒトでの確証を得ようとしている段階である。メタボリックシンドロームでの塩分感受性高血圧の機序が明らかになったことで、今後の本研究の臨床への応用と発展が必ずなされると確信している。

従来、腎臓領域における遺伝性高血圧疾患は腎臓尿細管の Na チャネルやトランスポーター蛋白自身の変異により Na の再吸収が異常に増加するというメカニズムで報告されてきていたが、2001 年に遺伝性高血圧疾患である

偽性低アルドステロン症 II 型 (以下 PHAII) 患者には WNK キナーゼに変異があることが linkage analysis によって報告された<sup>1)</sup>。この事実は、トランスポーター蛋白単独の異常ではなく、WNK キナーゼを介して血圧をコントロール

するネットワークが腎臓に存在することを示唆するという点で非常に興味深く、申請者内田信一は東京医科歯科大学腎臓内科において近年 WNK キナーゼについての研究を指揮してきた<sup>2-6)</sup>。

最近、東京医科歯科大学腎臓内科では PHAII モデルマウスを作成し解析を行った<sup>2)</sup>。このモデルマウスの作成と解析により、Na-Cl 共輸送体(以下 NCC)が OSR1/SPAK というキナーゼとともに病態モデルマウスでは過度にリン酸化され、リン酸化された NCC は細胞膜上に集積し、NaCl を過度に再吸収し高血圧症を引き起こしていることが明らかになった。OSR1/SPAK は *in vitro* で WNK4 の基質として同定されており、WNK4-OSR1/SPAK-NCC というリン酸化カスケードが腎臓での新たな体液調節系として重要な役割を持っていることが明らかとなり、塩分感受性高血圧の一端を担っていることが示唆されている。さらに、WNK4 hypomorphic mouse の作成も行い、WNK4 が下流の OSR1/SPAK-NCC のリン酸化に対して正のシグナルを送っていることを証明した<sup>3)</sup>。すなわち、PHAII は WNK4 の過剰な機能亢進により WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードが亢進するために、塩分再吸収が過度に起きるために発症することを当研究室は明らかにしてきた。

最近、当研究室では、過去に作成した PHAII モデルマウス(WNK4 D561A)とは別の PHAII 患者の変異 WNK4 R1185C に注目して研究を行ってきた。R1185 は Akt/SGK1 リン酸化 motif である R-X-R-X-X-S-φ motif 内にあることから、同 motif 中の Serine である 1190S のリン酸化状態が変化することを予想して、同部位のリン酸化抗体を作成し、細胞に発現させた mutant WNK4 R1185C における 1190S のリン酸化状態を評価したところ、R1185C mutant ではリン酸化が異常に亢進していることを発見し(図 1)、アメリカ腎臓学会に発表した。事実、Phospho-mimic mutant WNK4 S1190D は MDCK 細胞において下流の OSR1/SPAK のリン酸化を亢進させ、結果として、WNK4 R1185C 変異における S1190 の過剰なリン酸化が WNK4-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードを亢進させることが PHA II の発症機序になることが推察された。

以上の結果より、WNK4 S1190 リン酸化は生体内で生理的に機能していることが明らかになったため、我々はさらにその制御機構を検討した。同部位をリン酸化する Akt/SGK1 は Insulin-PI3K 系などのシグナル伝達系で制

御されることから、Flag-tag を付けたヒト WNK4 を MDCK や mpkDCT 細胞に強制発現してインスリン投与し、co-IP で WNK4 を回収した後、WNK4 1190S リン酸化特異的抗体で確認したところ、1190S リン酸化は更新しており、WNK4 1190S はインスリンによってリン酸化を受けることが明らかになった(図 2)。すなわち、生体内で高インスリン血症がおきると WNK4 1190S リン酸化を介して、Insulin-WNK-NCC のリン酸化カスケードが亢進し、NCC からの塩分再吸収が亢進する可能性が示唆された。

以上をまとめると、

- 1: 変異 WNK4 R1185C による PHAII 発症メカニズムは WNK4 1190S の過剰なリン酸化により、WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードの亢進を起こして発症すると考えられる。
- 2: WNK4 1190S のリン酸化はインスリンによって亢進し、細胞レベルでは下流となる内因性の NCC のリン酸化も亢進することが確認できている。
- 3: すなわち、メタボリックシンドロームや肥満などの高インスリン状態において WNK1190S のリン酸化が亢進する

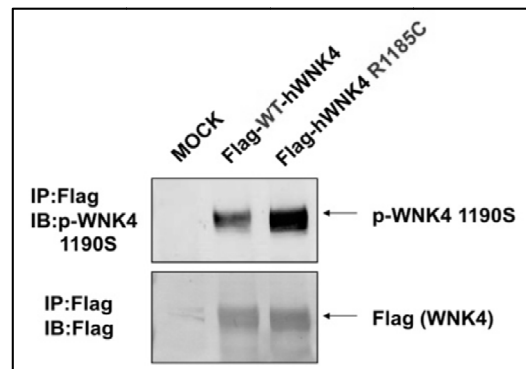


図 1. PHAII WNK4 R1185C 変異で WNK4 1190S のリン酸化が亢進する

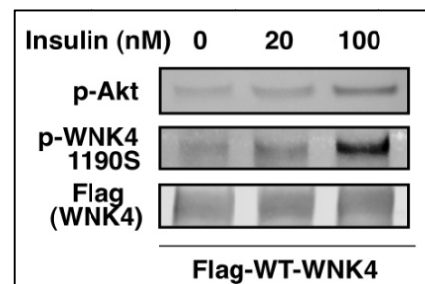


図 2. インスリンによって WNK1190S はリン酸化される

ことにより、下流の OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードが亢進し、NCC を介した塩分再吸収の増加が起きていると予想され、同疾患群における塩分感受性高血圧のメカニズムとなっている可能性が示されている。

メタボリックシンドロームや肥満のようにインスリン抵抗性のために、高インスリン血症を来す患者に塩分感受性高血圧を多く認めることは臨床的にはすでに報告されているが<sup>7)</sup>、その詳細なメカニズムは明らかにはなっていない。近年、メタボリックシンドロームや肥満の患者は生活習慣病とともに年々増加の一途をたどっており、その生命予後因子となりうる高血圧のコントロールは急務となっている。過去の報告でインスリンが尿細管での塩分再吸収を亢進することはよく知られているが<sup>8-10)</sup>、その詳細なメカニズムは不明である。また、現在までインスリンによる NCC 制御の報告はない。そのメカニズムに我々の発見した Insulin-WNK-NCC カスケードが関与していることを明らかにすることで、本患者群に対する新しい高血圧治療ターゲットを検討すること、すなわち PHAII/WNK 研究から得られた知見をもとに、細胞、動物モデル、ヒト検体を用いて、メタボリックシンドロームや肥満など高インスリン状態における塩分感受性高血圧のメカニズムを本研究では探求した。

具体的な研究の流れは以下の3つに大きく分けられた。

1: 細胞レベルでの新規 Insulin-WNK-NCC リン酸化カスケードの研究

2: マウスにおける Insulin-WNK-NCC リン酸化カスケードの研究 (インスリン投与マウス、肥満/糖尿病モデルマウス、OSR1、SPAK 遺伝子改変モデルマウス、WNK4 R1164C BACトランスジェニックマウス)

3: メタボリックシンドローム/肥満患者における尿中 NCC の研究

1. 細胞レベルでの新規 Insulin-WNK-NCC リン酸化カスケードの研究

1. 1 mpkDCT 細胞でのインスリンによる SPAK-NCC リン酸化の検討

まず我々は内因性に NCC を発現する mpkDCT 細胞を用いて、インスリン投与による SPAK と NCC リン酸化の推移を確認した。インスリン投与により、用量依存性に内因性 SPAK と NCC のリン酸化は亢進した(図 3)。また、インスリン投与からの時系列を観察すると、SPAK リン酸化が 5 分後から上昇するのに比較して、NCC のリン酸化は 15 分から 60 分で最大になった(図 4)。これは SPAK が NCC リン酸化の上流にあることを示唆した。また、PI3K 阻害薬である Ly294002 を用いたところ、下流の SPAK、NCC のリン酸化は阻害され、これはインスリンを介した PI3K の活性化がこのリン酸化シグナルの上流にある事を示した(図 5)。後述する、SPAK ノックアウトや WNK4 hypomorphic マウスでインスリンによる OSR1/SPAK-NCC リン酸化亢進が抑制された事からも Insulin-PI3K-WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化のカスケードがある事が示唆された。

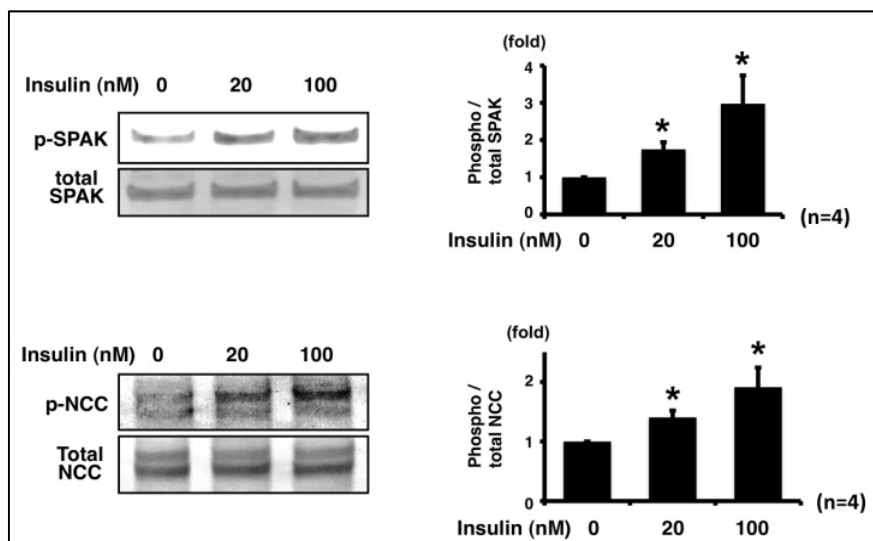


図 3. インスリン用量依存性に mpkDCT 細胞の SPAK と NCC はリン酸化される

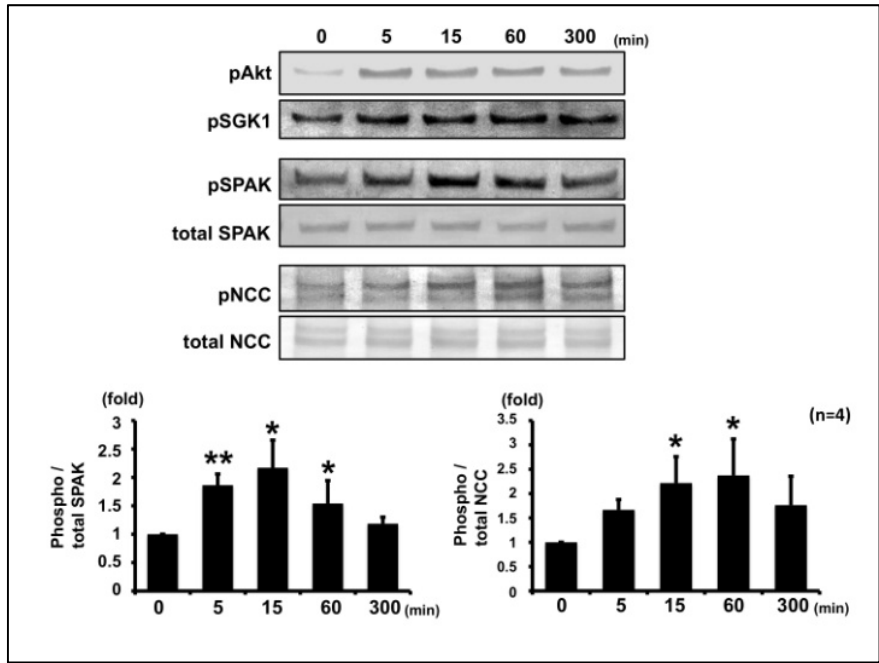


図 4. インスリン投与による SPAK と NCC リン酸化のタイムコース

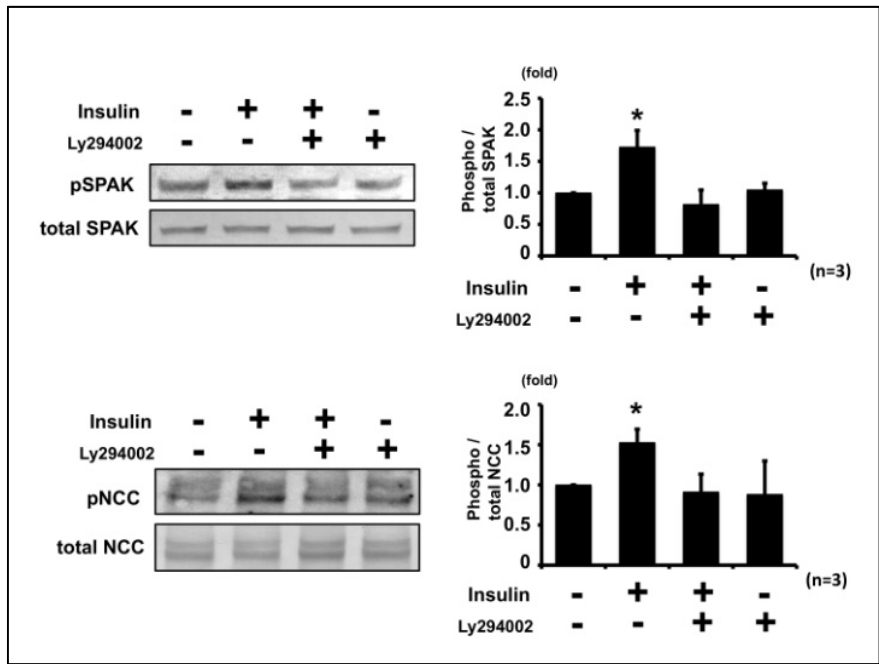


図 5. PI3K によってインスリンによる SPAK と NCC リン酸化は阻害される

## 1. 2 インスリンでの WNK4 活性機序の研究

WNK4 の 1190 Serine(1190S)リン酸化の過剰亢進が、PHAI I の発症メカニズムとなること、さらに同部位のリン酸化がインスリンによって亢進すること、その下流の NCC リン酸化も増加することを細胞レベルで確認しているが、イン

スリンから WNK リン酸化亢進に至るまでの詳細なメカニズムは不明である。インスリンによって WNK4 1190S をリン酸化できるキナーゼ候補としては SGK1、Akt、S6K などがあるが、これらがリン酸化する事が可能な RxRxxS モチーフが WNK4 内に複数含まれている。インスリン投与でリン酸

化亢進する RxRxxS モチーフの Serine は 1190S 以外にもあることが予想されたため、各々/複数の Serine を Aspartic acid にした Phospho-mimicking mutant WNK4 と Alanin にした Phospho-deficient mutant WNK4 を作成した。同時に、WNK4 kinase assay の系を立ち上げており、今後、作成したを発現ベクターを用いた WNK4 kinase assay を行うことにより、生理的に重要な WNK4 内の RxRxxS モチーフを見いだす予定である。

## 2. マウスにおける Insulin-WNK-NCC リン酸化カスケードの研究

### 2.1 インスリン急性負荷マウスにおける WNK-OSR1/SPAK-NCC カスケードの研究

過去の報告でインスリンがヒトやマウスでの尿細管での塩分再吸収を亢進することは知られており、我々はマウス腎臓で WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードをインスリンが制御するか検討した。B6 マウスへインスリン腹腔内投与 (5U /kg) を行い、腎臓での OSR1/SPAK-NCC のリン酸化を評価したところ、投与 30 分後に OSR1/SPAK リン酸化亢進のピークを認めた (図 6)。NCC リン酸化亢進は遅れて 90 分後までピークが持続しており、OSR1/SPAK リン酸化の下流で制御されていることが示唆された。インス

リンによる NCC リン酸化が WNK と SPAK の下流に実際にある事を証明するために、インスリン急性負荷実験を同様に WNK4 hypomorphic mouse と SPAK ノックアウトマウスに施行したところ、各々下流の OSR1/SPAK、NCC のリン酸化亢進を認めなかった (図 7, 8)。これによりインスリンの急性負荷による NCC のリン酸化亢進は WNK4 と OSR1/SPAK を介していることが明らかになった。また、マウスに PI3K 阻害剤である NVP-BE235 を投与すると SPAK、NCC とともにリン酸化が抑制され (図 9)、また、NVP-BE235 の事前投与によりインスリン急性負荷によるマウス腎 NCC リン酸化亢進が抑制された。これはインスリンによる PI3K の活性化により、WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化が活性化することの証明であると考えている。総じて、生体内でも Insulin-PI3K-WNK-SPAK/OSR1-NCC リン酸化のシグナルが存在する事が明らかになった。

### 2.2 メタボリックシンドローム db/db マウスにおける WNK-OSR1/SPAK-NCC カスケードの研究

db/db マウスはレプチンレセプター異常のために過食を呈するマウスであり、高インスリン血症を呈するメタボリックシンドロームのモデルと考えられている。肥満やメタボリックシンドロームにおいてはインスリン抵抗性のために高インスリン血症を呈することが知られており、インスリンは腎

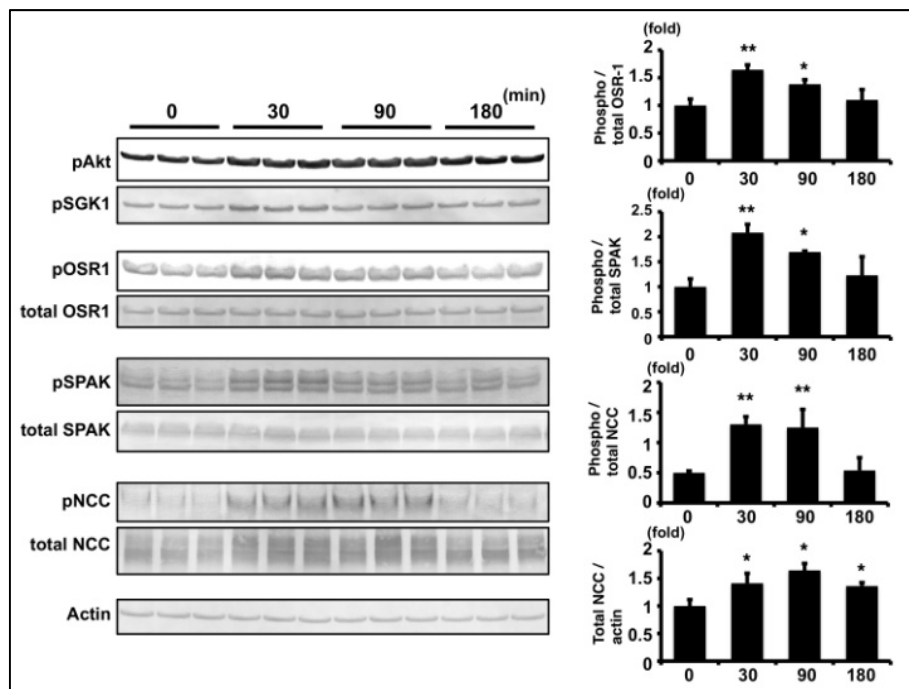


図 6. B6 マウスへのインスリン投与で SPAK と NCC リン酸化が亢進する

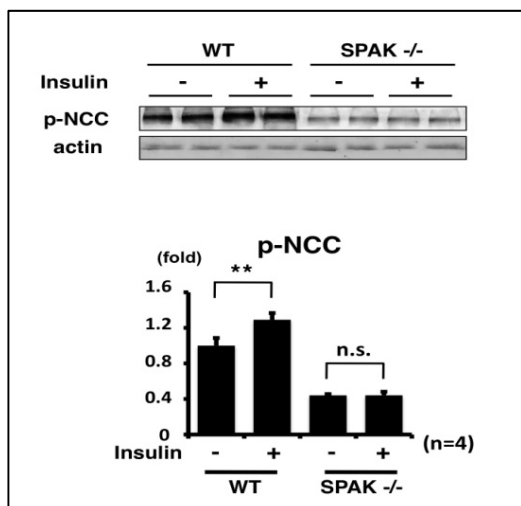


図 7. SPAK ノックアウトマウスではインスリンによる NCC リン酸化亢進を認めない

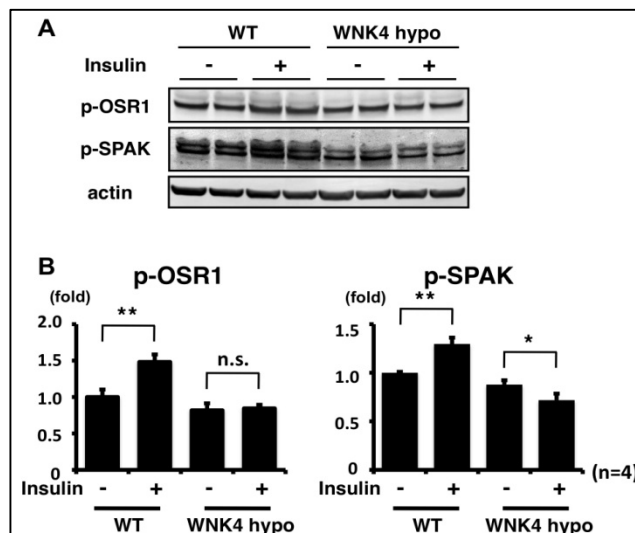


図 8. WNK4 hypomorphic マウスでインスリンによる OSR1/SPAK リン酸化を認めない

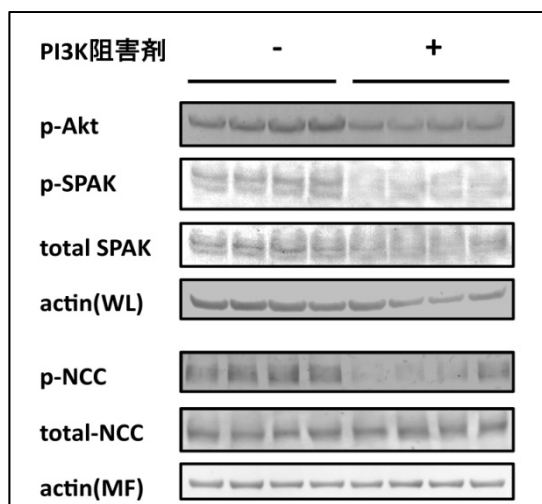


図 9. PI3K 阻害薬 NVP-BEZ235 投与による SPAK と NCC リン酸化の抑制

臓尿細管での塩分再吸収を亢進することが報告されているが、その詳細な機序はまだ明らかになっていない。我々はインスリンの急性負荷により OSR1/SPAK-NCC のリン酸化が亢進することを発見したが、これらがメタボリックシンドロームのような慢性的な高インスリン状態においても認めるかを高インスリン血症モデルである db/db マウス腎臓を用いて検討した。

db/db マウスはコントロールと比較して、高血圧を呈するとともに、NCC 阻害薬であるサイアザイド負荷で db/db マウスの Na 排泄は亢進し、これは NCC の機能亢進を示唆し

た。事実、db/db マウス腎臓では OSR1/SPAK と NCC のリン酸化が亢進していた(図 10)。db/db マウスは高塩食でコントロールマウスと比較してアルドステロン低値を示しており、通常、低アルドステロン状態において NCC リン酸化は抑制されることが知られているにも関わらず、db/db マウス腎臓では逆に OSR1/SPAK と NCC リン酸化が亢進していた。これはアルドステロン以外の因子が db/db マウスの NCC リン酸化亢進に寄与している事を意味しており、上記のようにインスリンが OSR1/SPAK-NCC リン酸化を亢進する事からも、db/db マウスの NCC リン酸化亢進にはインスリンが寄与していると推定され、実際にコントロールマウスにおいても PI3K 阻害剤である NVP-BEZ235 の投与により NCC のリン酸化が抑制された事から、インスリン/PI3K シグナルの下流にあると考えられた。また、高塩食とは逆に高アルドステロン状態となる低塩食においても、NCC のリン酸化がアルドステロンによってすでに亢進しているコントロールと比較して、db/db マウスは OSR1/SPAK-NCC リン酸化のさらなる亢進を認め、インスリンによる制御機構はアルドステロンと一部独立していると考えられた。さらに、このメカニズムが WNK-OSR1/SPAK のカスケードに依存しているかを検討するために、我々は WNK によるリン酸化を受けない OSR1 T185A/+、SPAK T243A/+ノックインマウスを db/db マウスと交配した。結果、OSR1 と SPAK 各々が WNK によってリン酸化されなくなった事で、SPAK/OSR1 の不活化ノックイン db/db マウス腎臓での NCC リン酸化は

抑制された(図 11)。実際、コントロールと比較し db/db マウスで認められた高血圧は OSR1 及び SPAK の不活化により消失した。また、インスリン抵抗性を示す db/db マウスにおいて、糖代謝に関わる脂肪や筋肉では Akt リン酸化は抑制されるが、逆に腎臓では Akt リン酸化が亢進しており、db/db マウス腎臓ではインスリンによる PI3K の活性化が直接的に NCC のリン酸化に影響している事が示唆された。実際、PI3K 阻害剤である NVP-BEZ235 の投与によって、コントロール及び db/db マウスにおいて NCC リン酸化は抑制された(図 12)。結果として、db/db マウス腎臓における NCC リン酸化亢進は WNK による OSR1/SPAK のリン酸化を介しており、その亢進にインスリン/PI3K シグナルの亢進

が寄与していると考えられた。これらは肥満やメタボリック シンドローム等に見られる塩分感受性高血圧の機序の一因となっている可能性があり、今後の生活習慣病における高血圧治療に対する新しい治療方針を示すものと考え

### 2. 3 WNK4 R1164C BAC トランスジェニックマウスの研究

上記(細胞の項参照)のようにヒト PHAII 変異 WNK4 R1185C による PHAII 発症メカニズムは WNK4 1190S の過剰なリン酸化により、WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードの亢進を起こして発症することが細胞レベルの実験で推定されている。しかしながら、これらの検討は主

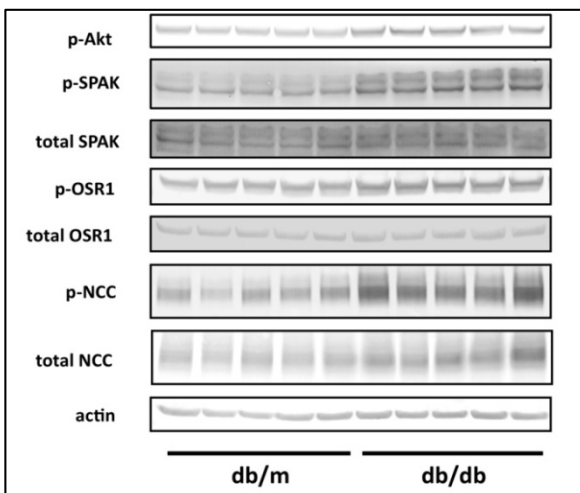


図 10. 高インスリン血症 db/db マウスで OSR1/SPAK と NCC リン酸化が亢進する

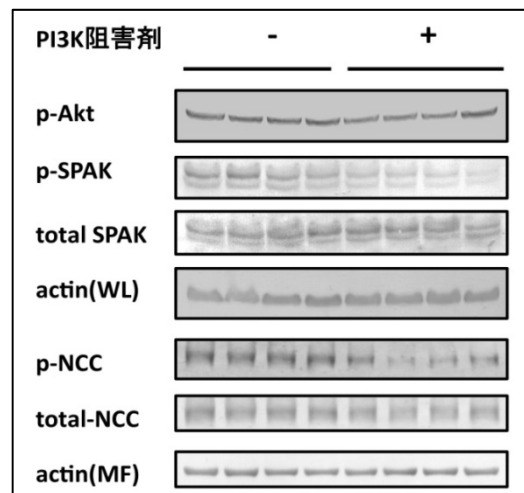


図 12. PI3K 阻害薬 NVP-BEZ235 投与による db/db マウスでの SPAK と NCC リン酸化の抑制

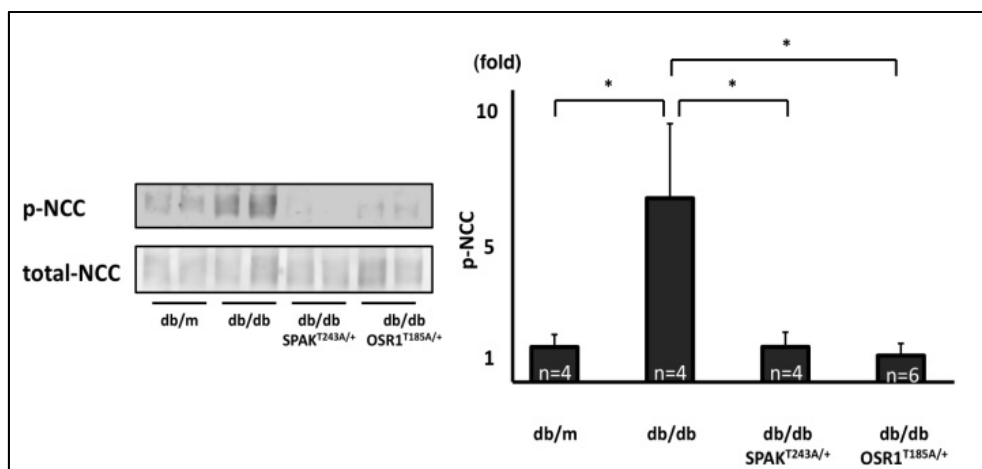


図 11. OSR1/SPAK 不活化ノックイン db/db マウスで NCC リン酸化は抑制される

に細胞での強制発現系での実験に依存しており、実際の生体内の検討が可能になれば、これらのデータが確実なものになると考えられる。そのために我々はヒトの R1185C のホモログとなる WNK4 R1164C BAC トランスジェニック マウスを作成した。Founder は作製され、現在増殖している段階である。前述の通り、細胞レベルでは WNK4 R1185C では 1190S のリン酸化が亢進しているデータが得られており、細胞でインスリン投与によって 1190S のリン酸化は亢進するデータは得られているので、マウスで実際にこの系が得られれば、WNK4 の 1190S リン酸化がインスリンシグナルと OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードをつなぐ強力な証明となると考えている。

### 3. メタボリックシンドローム／肥満患者における尿中 NCC の研究

上記のことが証明されれば、メタボリックシンドロームや肥満の患者でも Insulin-WNK-NCC リン酸化カスケードの異常によって塩分感受性高血圧が起きていることを示したい。患者の腎臓自体を手に入れることは困難なので、WNK のカスケードの最終段階としてのリン酸化 NCC を検出する方法を検討する。リン酸化 NCC は尿細管上皮側に集積して尿中に排泄されることが予想されるので、尿中 NCC の検出量と尿中リン酸化 NCC を高インスリン血症患者と健常人または本態性高血圧患者の間で比較することにより、NCC とそのリン酸化がメタボリックシンドローム患者で亢進していることを示せば Insulin-WNK-NCC リン酸化カスケードがヒトでも機能している事を証明する研究になると考えている。尿中の NCC は、尿細管細胞膜上にあった輸送体蛋白が、何らかの機構で尿中に排泄されたものであり、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と思われる。よって本研究では、1) 尿中 NCC 排泄量を規定する諸因子(腎機能、薬剤投与、原疾患など)の検索と、2) 高血圧症例に対する尿中 NCC 量と血圧及び尿中 Na<sup>+</sup> 排泄に対するサイアザイド感受性との相関を調べると同時に、3) 高インスリン血症を来す群での尿中 NCC を検討したい。尿中 NCC の検出は今までも行われているが、その尿中排泄量を定量的に多くの症例で評価した研究はない。今回我々は高感度な NCC に対する抗体を独自に作成しており、NCC 検出の感度および定量性を改善した方法をす

に取得している。

以上、我々はメタボリックシンドロームや肥満など高インスリン状態における塩分感受性高血圧のメカニズムを細胞と動物モデルで明らかにし、今後ヒトでの確証を得ようとしている段階である。メタボリックシンドロームでの塩分感受性高血圧の機序が明らかになったことで、本患者群の治療に新しい知見をもたらし、創薬ターゲットにもなると考えられる。我々は WNK-SPAK 系に関わる創薬の研究も行っており、今後の本研究の臨床への応用と発展が必ずなされると確信している。

### 参考文献

- 1) Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, *et al.* : Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293 : 1107-1112, 2001
- 2) Yang SS, Morimoto T, Rai T, *et al.*: Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II: generation and analysis of a Wnk4 (D561A/+) knockin mouse model. *Cell Metab* 5 : 331-344, 2007
- 3) Ohta A, Rai T, Yui N, *et al.* Targeted disruption of the Wnk4 gene decreases phosphorylation of Na-Cl cotransporter, increases Na excretion and lowers blood pressure. *Hum Mol Genet.* 15; 18(20): 3978-86, 2009
- 4) Chiga M, Rai T, Yang SS, Ohta A, Takizawa T, *et al.* (2008) Dietary salt regulates the phosphorylation of OSR1/SPAK kinases and the sodium chloride cotransporter through aldosterone. *Kidney Int* 74: 1403-1409.
- 5) Talati G, Ohta A, Rai T, Sohara E, Naito S, *et al.* (2010) Effect of angiotensin II on the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in cultured mpkDCT cells and in vivo mouse kidney. *BiochemBiophys Res Commun* 393: 844-848.
- 6) Naito S, Ohta A, Sohara E, Ohta E, Rai T, *et al.* (2010) Regulation of WNK1 kinase by extracellular potassium. *Clin Exp Nephrol.*
- 7) Chen J, Gu D, Huang J, Rao DC, Jaquish CE, *et al.* (2009) Metabolic syndrome and salt sensitivity of blood pressure in non-diabetic people in China: a dietary intervention study. *Lancet* 373: 829-835.



- 8) DeFronzo RA, Cooke CR, Andres R, Faloona GR, Davis PJ (1975) The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. *J Clin Invest* 55: 845-855.
- 9) DeFronzo RA, Goldberg M, Agus ZS (1976) The effects of glucose and insulin on renal electrolyte transport. *J Clin Invest* 58: 83-90.
- 10) Tiwari S, Nordquist L, Halagappa VK, Ecelbarger CA (2007) Trafficking of ENaC subunits in response to acute insulin in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F178-185.

## WNK Kinase Links Salt-Sensitive Hypertension with Hyperinsulinemia

Shinichi Uchida

Department of Nephrology, Tokyo Medical and Dental University

### Summary

The metabolic syndrome causes hyperinsulinemia and salt-sensitive hypertension. However, the mechanism responsible for this greater salt-sensitivity is still unknown. We recently demonstrated that constitutive activation of the WNK kinase-OSR1/SPAK kinase-NaCl cotransporter (NCC) phosphorylation cascade is the molecular pathogenesis of hypertension in pseudohypoaldosteronism type II (PHAII). In this study, we focused on one of the PHAII-causing mutants, WNK4 R1185C, and found that the mutation abnormally increased phosphorylation of WNK4 at 1190S, thereby activating the phosphorylation cascade. Since the 1190S constitutes an Akt/SGK consensus phosphorylation site, we further investigated whether 1190S phosphorylation of WNK4 was regulated by insulin. In MDCK and mpkDCT cells, insulin increased phosphorylation of WNK4 at 1190S, SPAK and NCC in a dose-dependent manner. Ly294002, a PI3K inhibitor, decreased the insulin effect on SPAK and NCC phosphorylation, indicating that insulin phosphorylates SPAK and NCC through PI3K in mpkDCT cells. Similar activation of the cascade was also observed in acute insulin-administered mice. However, such activation by insulin was not observed in WNK4 hypomorphic and SPAK deficient mice, confirming the existence of the insulin-WNK4-OSR1/SPAK-NCC signal cascade in the kidney. Moreover, hyperinsulinemic db/db mice fed a high salt diet indeed showed greater thiazide-sensitivity and increased WNK4, OSR1/SPAK, and NCC phosphorylation, compared with wild-type mice. To clarify the contribution of WNK and OSR1/SPAK to NCC phosphorylation, we mated db/db mice with SPAK(T243A/+) and OSR1(T185A/+) knock-in mice, whose SPAK and OSR1 cannot be phosphorylated by WNK kinases respectively. We found that NCC phosphorylation was decreased in SPAK(T243A/+) or OSR1(T185A/+) knock-in db/db mice. Compared to control mice, db/db mice showed increased blood pressure, which was disappeared in inactivated OSR1 or SPAK knock-in db/db mice. Thus, a novel regulatory mechanism linking hyperinsulinemia with salt-sensitive hypertension was identified. WNK4 may be a target molecule for the treatment of salt-sensitive hypertension under hyperinsulinemic conditions, such as obesity or metabolic syndrome.