

免疫機構による WNK シグナル制御がもたらす、 慢性腎臓病における塩分感受性高血圧の機序解明

蘇原 映誠

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

With-no-lysine kinase (WNK), STE20-related proline / alanine-rich kinase (SPAK) キナーゼはリン酸化カスケードを形成し、腎臓遠位尿細管の Na-Cl 共輸送体 (NCC) の活性化を介して塩分排出を正に制御している。このシグナルは WNK1, WNK4 の二つのキナーゼが SPAK をリン酸化、活性化し、活性化した SPAK が NCC をリン酸化して活性化させるという正のリン酸化カスケードである。WNK-SPAK-NCC シグナルは塩分摂取過多になると抑制され、NCC を介したナトリウム再吸収が抑制される。その結果、尿中ナトリウム排泄が増加し、体内総ナトリウム量によって規定される体液量が高塩食下でも一定に保たれる。一方、このシグナル構成分子の遺伝子変異で発症する偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAI) では WNK-SPAK-NCC シグナルが恒常的に活性化しており、高塩食下でも抑制されないため体液量過剰となり塩分感受性高血圧を呈する。近年、このシグナルの過剰亢進は PHAI だけでなく、メタボリック症候群やカリウム摂取不足といった一般的な病態における塩分感受性高血圧発症に寄与することが明らかとなってきた。

一方、慢性腎臓病 (CKD) では塩分感受性が亢進しており、そのメカニズムとして糸球体濾過量の減少に加えて尿細管でのナトリウム再吸収の増加が報告されているが、WNK シグナルの関与については不明である。また、近年骨髄系細胞や T 細胞、炎症性サイトカインと高血圧発症の関連が報告されているが免疫機構による WNK シグナル制御についても不明である。

今回、我々はこの二つの点を明らかにするため、3 種類のマウス CKD モデル (アリストロキア酸腎症モデル、アデニン腎症モデル、5/6 腎摘モデル) を作成し WNK シグナルを評価した。その結果アリストロキア酸腎症モデルにおいて WNK1-SPAK-NCC シグナルが亢進していることを発見した。アリストロキア酸腎症モデルは NCC の阻害薬であるサイアザイドによる利尿効果が増強しており、機能的にも NCC が活性化していることを確認した。アリストロキア酸腎症モデルに 4% 高塩食を 10 日間投与しても亢進した WNK1-SPAK-NCC シグナルは十分に抑制されず、アリストロキア酸腎症マウスは塩分感受性高血圧を呈した。さらに、SPAK ノックアウトマウスのアリストロキア酸腎症モデルでは WNK1 蛋白の増加は見られるものの、NCC の活性化は見られず、塩分感受性高血圧も観察されなかった。以上よりアリストロキア酸腎症では増加した WNK1 蛋白が SPAK を介して NCC を活性化させていること、このシグナルの亢進がアリストロキア酸腎症の塩分感受性高血圧発症に寄与していることが明らかとなった。興味深いことに、アリストロキア酸腎症では WNK1 蛋白が増加しているものの WNK4 蛋白の増加はなかった。WNK1, WNK4 は Kelch-like3 (KLHL3), Cullin3 (CUL3) からなる E3 リガーゼ複合体によって分解されその量が制御されているが、WNK1, WNK4 が異なる動態を示していることから CKD においては KLHL3-CUL3 E3 リガーゼ複合体とは異なる新たな制御メカニズムの存在が推測された。また、アリストロキア酸腎症で WNK1 の転写の増加は認めなかった。

WNK1 蛋白単独の増加はアデニン腎症モデルでも観察された一方、5/6 腎摘モデルでは認めなかった。我々はモデル間の違い、特にアリストロキア酸腎症とアデニン腎症が高度な炎症性 CKD モデルである一方、C57BL/6 バックグラウンド

で作成した 5/6 腎摘モデルが炎症に乏しいモデルであることに注目した。WNK1 蛋白増加に関わる因子の探索のため 3 種類の CKD モデル腎臓の mRNA 発現を炎症性サイトカインに注目して比較したところ、TNF α と IFN γ の転写がアリストロキア酸腎症とアデニン腎症モデルで共通して増加していた。この結果を受けて、腎臓遠位尿細管上皮培養細胞 (mpkDCT 細胞) に TNF α 、IFN γ を負荷したところ TNF α を負荷した群でのみ WNK1 蛋白発現の増加が確認された。我々は生体内でも TNF α が WNK1 蛋白発現の増加に寄与しているかどうかを明らかにするため、TNF α 阻害薬エタネルセプトをアリストロキア酸腎症モデルマウスに投与した。その結果、エタネルセプトは遠位尿細管において WNK1-SPAK-NCC シグナルの亢進を抑制し、塩分感受性を是正することが明らかになった。

以上より、TNF α は WNK1-SPAK-NCC シグナルを亢進させ、CKD の塩分感受性高血圧に関与することがわかった。本研究によって WNK シグナルが腎臓内の炎症/免疫シグナルと塩分感受性をつないでいることが明らかとなった。また、CKD ではサイアザイド系利尿薬の効果が個人差があることが知られている。本研究の結果は、サイアザイド系利尿薬の有効な CKD 患者において TNF α -WNK1-SPAK-NCC シグナルの亢進している可能性を示唆していると考えられる。腎内での TNF α 産生を反映する尿中 TNF α の測定が WNK1-SPAK-NCC シグナルの活性、サイアザイド系利尿薬の有効性を事前に判断するバイオマーカーとなる可能性があり今後の研究を進めていきたい。

1. 研究目的

本邦における高血圧に起因する死亡者数は年間約 10 万人と推定され、高血圧は心血管病の最大の危険因子である。塩分摂取は直接的な血圧増悪因子の一つであり、日本人において塩分摂取過多は高血圧治療における大きな課題である。特に、塩分摂取過多によって血圧が上昇し、逆に塩分制限によって血圧が低下する反応を塩分感受性と呼び、同一個体で再現性をもって観察されることから一つの病態と考えられている。一般に高血圧患者の 30-50% が塩分感受性であるが、同程度の血圧であっても塩分感受性の場合、抵抗性に比べて心血管系疾患発症や死亡のリスクが高いことが知られており、治療法という点でも塩分制限がその他の降圧療法に優先されることから塩分感受性の適切な評価は临床上重要である¹⁾。しかしながら、塩分感受性高血圧のメカニズムについては不明な点が多い。

我々は、本研究財団助成などにより、塩分感受性高血圧を呈する遺伝性疾患である偽性低アルドステロン症 II 型の分子病態を遺伝子改変マウス作成と解析により明らかにしてきた。近年、塩分感受性調節機構として腎臓尿細管での塩分再吸収を担う輸送体を制御する WNK (With no lysine kinase) シグナルに注目が集まっている。腎臓遠位尿細管では、WNK1、WNK4 の二つの WNK アイソフォームが oxidative stress-responsive kinase 1 (OSR1) と STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase (SPAK)

をリン酸化することによって活性化し、リン酸化された OSR1、SPAK はさらに Na-Cl cotransporter (NCC) をリン酸化・活性化するという WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードを構成している事を我々は報告した(図参照²⁾)。

このカスケードについては我々を含めて、これまでに複数のモデルマウスを用いた検討がなされており、このカスケードが亢進すると腎臓の遠位尿細管におけるナトリウム再吸収が亢進し、塩分感受性高血圧を呈することが確認されている。興味深いことに、臨床的に塩分感受性を呈することが明らかとなっているメタボリック症候群³⁾やカリウム摂取不足⁴⁾といった病態においてもこの WNK シグナルが亢進しており偽性低アルドステロン症 II 型という限られた病態だけでなく、種々の塩分感受性高血圧を呈する病態に関わることを明らかにしてきた。

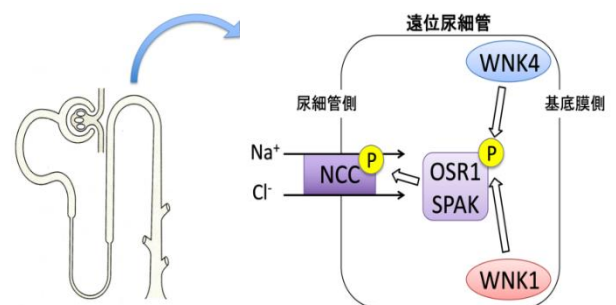


図: WNK-OSR1/SPAK-NCC シグナルによる Na 再吸収調節機構

一方で慢性腎臓病 (CKD) では塩分感受性が亢進していることが知られている。CKD には高血圧が高率に合併し、心血管疾患発症のリスクになるとともにさらなる腎障害進行につながる。しかしながら多くの場合 CKD における血圧コントロールは難しく、塩分感受性の亢進が一因と考えられている。CKD における塩分感受性亢進には糸球体濾過量の減少が原因と考えられてきたが、近年尿細管でのナトリウム再吸収増加が関わるということが報告されている⁵⁾。しかしながらその詳細なメカニズム、特に WNK シグナルの関与については不明である。また、免疫機構による塩分感受性の制御が近年報告され、骨髄系細胞、T 細胞、そして炎症性サイトカイン (TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-17A) が高血圧発症に関わることが知られている⁶⁾がその詳細なメカニズムや、免疫機構と WNK シグナルの関わりについても不明である。本研究ではこれらを明らかにするためアリストロキア酸腎症モデル、アデニン腎症モデル、5/6 腎摘モデルの 3 種類の CKD マウスモデルを用いて検討した。

2. 研究方法・結果

目的に記したように、アリストロキア酸腎症モデル、アデニン腎症モデル、5/6 腎摘モデルを作成し解析を行った。

2.1 アリストロキア酸腎症モデルの作製

我々はまずアリストロキア酸腎症モデル (AAN) 腎臓において WNK1 蛋白発現が増加し、それに伴い下流の SPAK, NCC のリン酸化が亢進していることをウェスタンブロットリング法で確認した (Figure 1)。一方でもう一つのアイソフォームである WNK4 の蛋白発現は低下していた。

2.2 アリストロキア酸腎症モデルは WNK1-SPAK-NCC シグナルの亢進を介して塩分感受性高血圧を呈する

次にアリストロキア酸腎症モデルに 4% 高塩食を 10 日間負荷したが、WNK1-SPAK-NCC シグナルの亢進は抑制されず、アリストロキア酸腎症マウスは塩分感受性高血圧を呈した (Figure 2)。一方で SPAK ノックアウトマウス⁷⁾を用いてアリストロキア酸腎症モデルを作成した所、WNK1 蛋白発現は増加していたものの NCC のリン酸化は亢進せず、塩分感受性高血圧も呈さなかった (Figure 3)。このことからアリストロキア酸腎症マウスにおける NCC 活性化、塩分感受性高血圧は WNK1-SPAK シグナルの亢進によるものであると考えられた。

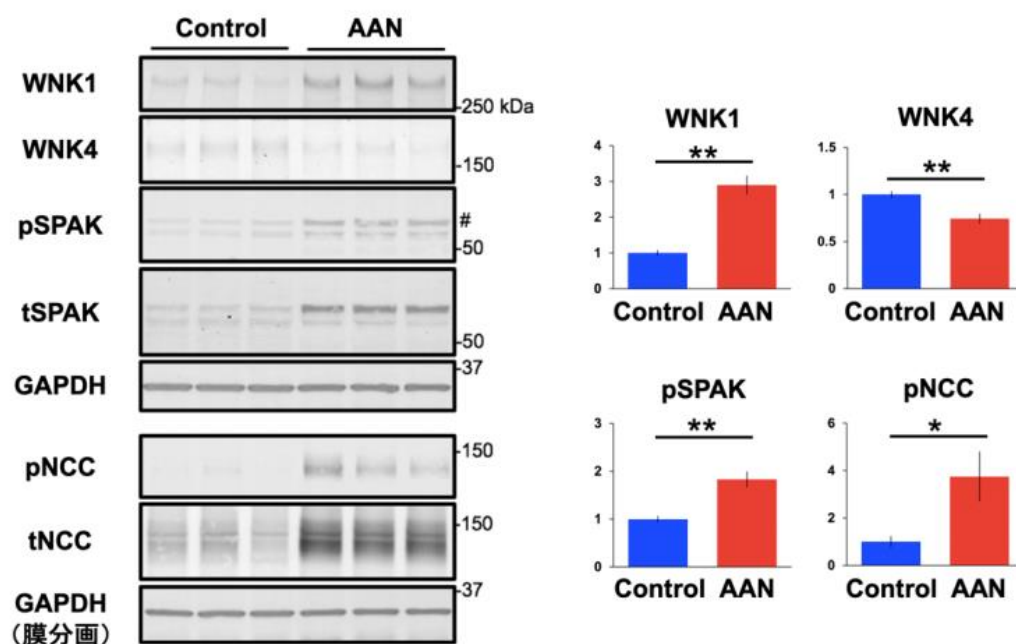


Figure 1: アリストロキア酸腎症モデル (AAN) の腎では WNK1-SPAK-NCC シグナルが亢進している

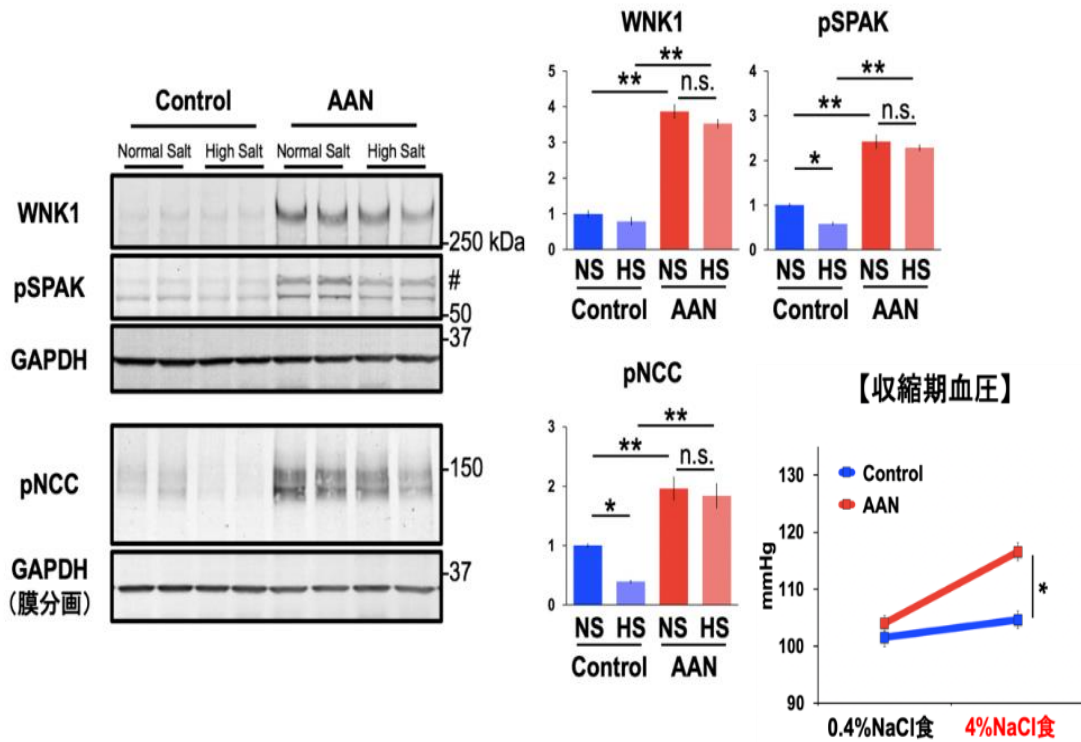


Figure 2: アリストロキア酸腎症モデル(AAN)では高塩食負荷下(HS)でも WNK1-SPAK-NCC シグナルが亢進している

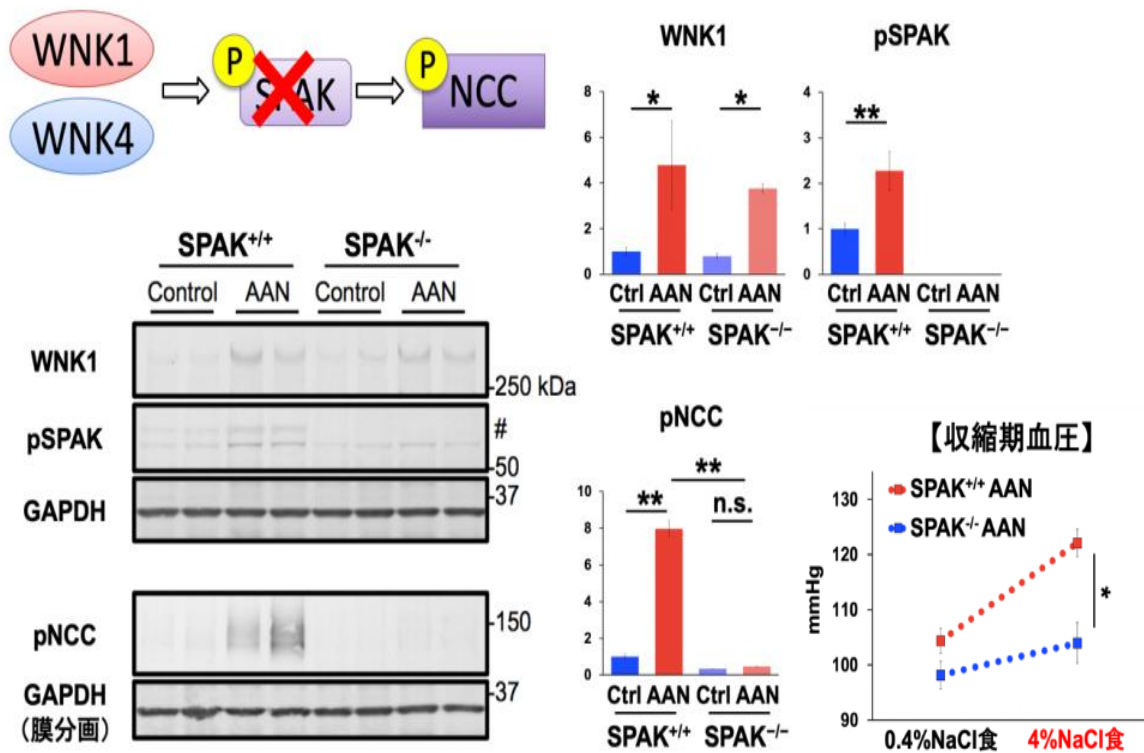


Figure 3: SPAK ノックアウトマウスのアリストロキア酸腎症モデル(AAN)では NCC のリン酸化亢進と塩分感受性高血圧が見られない

2.3 アリストロキア酸腎症モデルの WNK1 蛋白発現は転写や既知の分解系とは異なるメカニズムで制御を受けている

これまでの研究から、WNK1, WNK4 はともに Kelch-like 3 (KLHL3), Cullin (CUL3) からなる E3 リガーゼ複合体によって分解されることが知られている⁸⁾。KLHL3, CUL3 の機能低下は WNK1, WNK4 の分解不全による蛋白発現増加につながるが、アリストロキア酸腎症モデル腎臓における KLHL3, CUL3 の蛋白発現の減少は認めなかった (Figure 4)。この結果および WNK1 が増加、WNK4 が減少という異なる制御を受けていることから CUL3-KLHL3 E3 リガーゼ複合体は WNK1 蛋白発現の主原因ではないと考えられた。また、WNK1 の mRNA 発現の増加はなかった (Figure 5)。

2.4 アデニン腎症においても WNK1 蛋白発現が増加している

WNK1 蛋白発現増加のメカニズムを明らかにするため、WNK シグナルを他の CKD モデルでも評価したところ、アデニン腎症モデル腎臓においてアリストロキア酸腎症と同様に WNK1 蛋白発現の増加を認めた一方、5/6 腎摘モデル (5/6Nx) ではそのような変化はなかった (Figure 6)。

2.5 腎内炎症性サイトカインのモデル間での比較

我々は WNK1 の蛋白発現増加がモデルによって異なることに注目した。近年、骨髄系細胞や T 細胞、炎症性サイトカインが高血圧発症に関わることが報告されており、アリストロキア酸腎症、アデニン腎症が炎症性 CKD であるのに対して C57BL/6J マウスの 5/6 腎摘モデルは炎症に乏しいことが知られている。これを踏まえ、WNK1 蛋白発現増加に関わる因子の探索のため 3 種類の CKD モデル腎臓の mRNA 発現を炎症性サイトカインに注目して比較したところ、TNF α , IFN γ がアリストロキア酸腎症、アデニン腎症でのみ増加していた (Figure 7)。

2.6 TNF α は転写非依的に WNK1 蛋白の発現を増加させる

これらのサイトカインが遠位尿細管上皮細胞に与える影響を評価するため、フィルター上で培養した mpkDCT 細胞 (遠位尿細管上皮培養細胞) に TNF α , IFN γ を 5 日間負荷したところ、TNF α 負荷でのみ WNK1 蛋白発現の増加が観察された (Figure 8)。

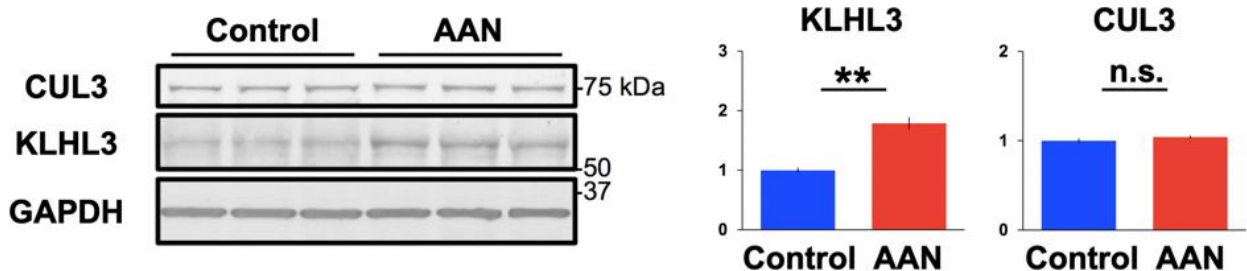


Figure 4: アリストロキア酸腎症 (AAN) において KLHL3、CUL3 の蛋白発現低下は認めない

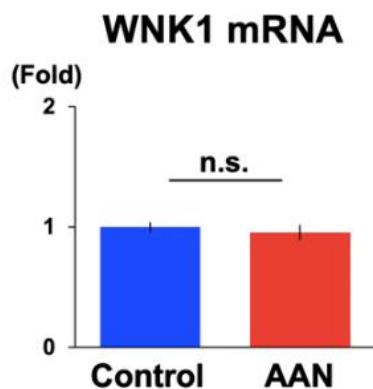


Figure 5: アリストロキア酸腎症 (AAN) の WNK1 蛋白発現増加は転写によるものではない

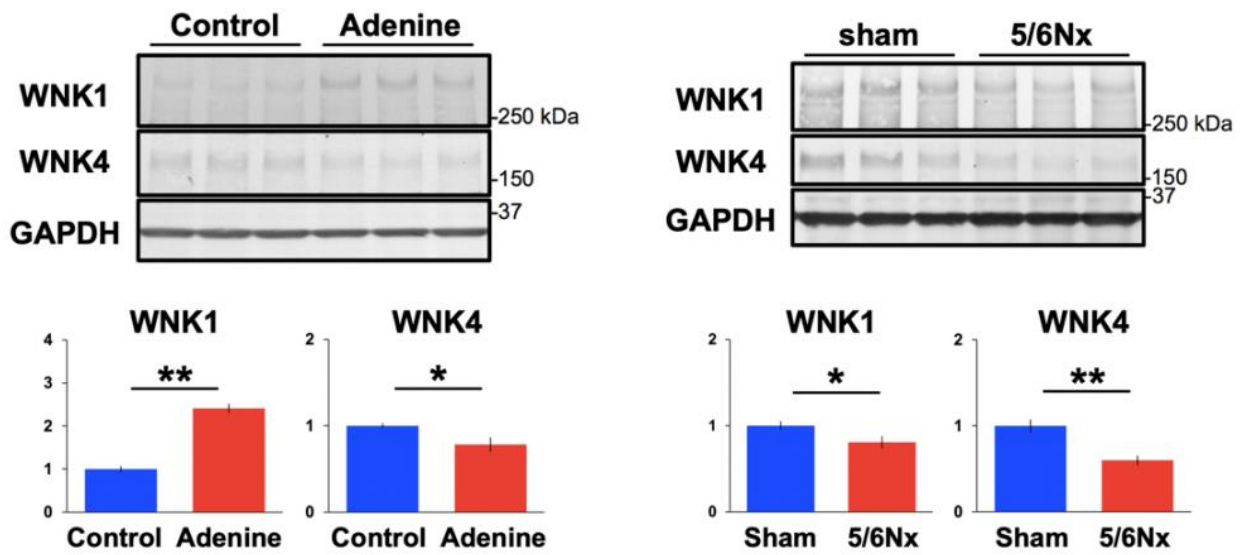


Figure 6: アデニン腎症においても WNK1 蛋白発現が増加している (5/6Nx:5/6 腎摘モデル)

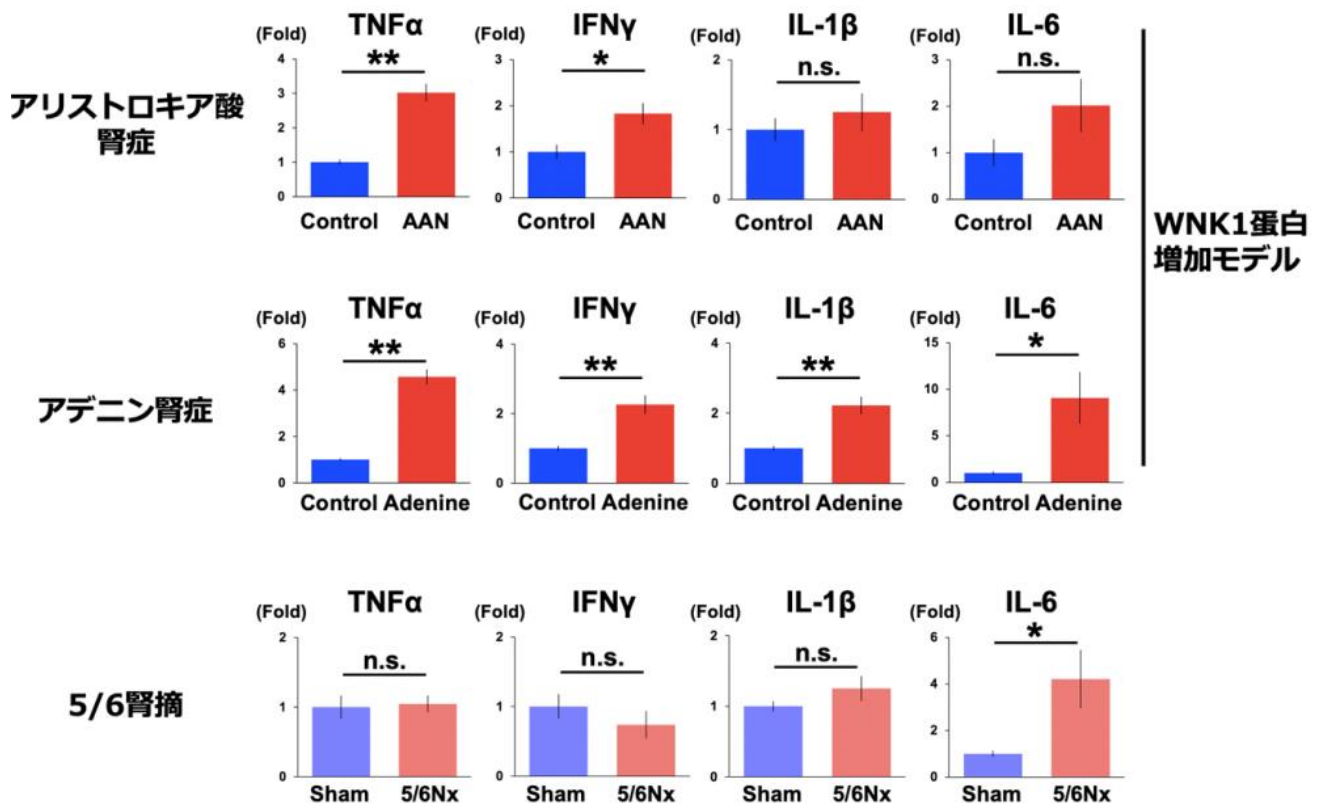


Figure 7: アリストロキア酸腎症 (AAN)、アデニン腎症で TNFα、IFNγ の転写発現増加を認める (5/6Nx:5/6 腎摘モデル)

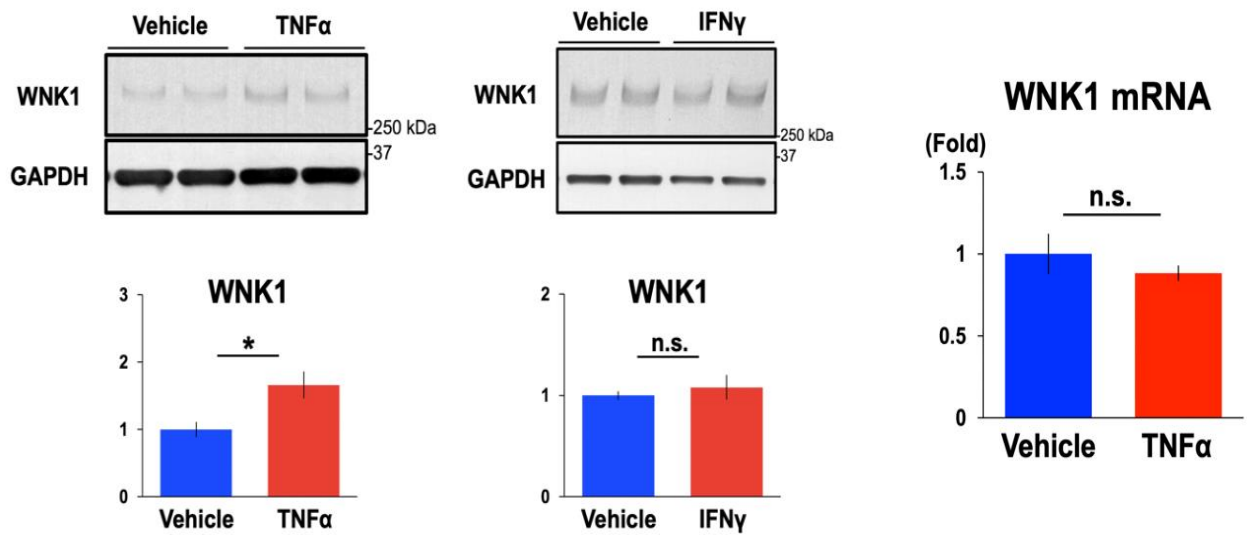


Figure 8: TNF α は mpkDCT 細胞において転写非依存的に WNK1 蛋白発現を増加させる

さらに、TNF α による WNK1 蛋白発現の増加は転写の増加によるものではなかった。この結果を踏まえて、TNF α の CKD 腎組織での役割を評価するためアリストロキア酸腎症モデルに対して TNF α 阻害薬エタネルセプトを投与した所、エタネルセプトは亢進した WNK1-SPAK-NCC シ

グナルを抑制し、高塩食負荷による血圧上昇を抑制した (Figure 9)。以上より、CKD 腎臓において TNF α が WNK1 蛋白発現を増加させ、下流の SPAK-NCC シグナルが亢進し塩分感受性高血圧を惹起することが明らかとなった。

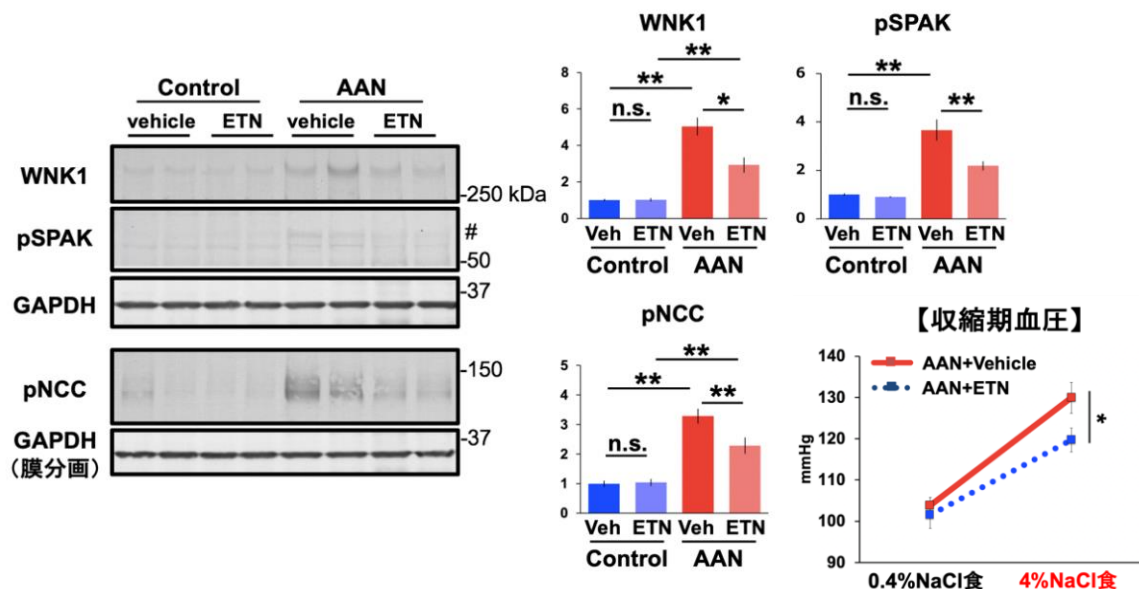


Figure 9: TNF α 阻害薬エタネルセプト(ETN)はアリストロキア酸腎症(AAN)で亢進した WNK1-SPAK-NCC シグナルを抑制し、塩分感受性高血圧を是正する

3. 考察・今後の課題

本研究によりTNF α がCKD腎臓においてWNK1蛋白発現を増加させ、下流のSPAK-NCCシグナルを活性化し塩分感受性高血圧を惹起することが明らかになった(Figure 10)。炎症、免疫による塩分感受性の制御の一端をWNKシグナルが担っていると考えられる。一方で非炎症性のCKDである5/6腎摘モデルではTNF α の増加がなく、WNKシグナルの亢進を認めなかった。ヒトCKDでもサイアザイド系利尿薬の反応性に個人差があることが知られており⁹⁾、この反応性に腎臓での炎症、TNF α -WNK1-SPAK-NCCシグナルの活性の違いが影響している可能性がある。今後はTNF α がWNK1蛋白発現を増加させるメカニズムの解明や実臨床におけるTNF α とサイアザイド利尿薬の反応性の関連を検討したい。

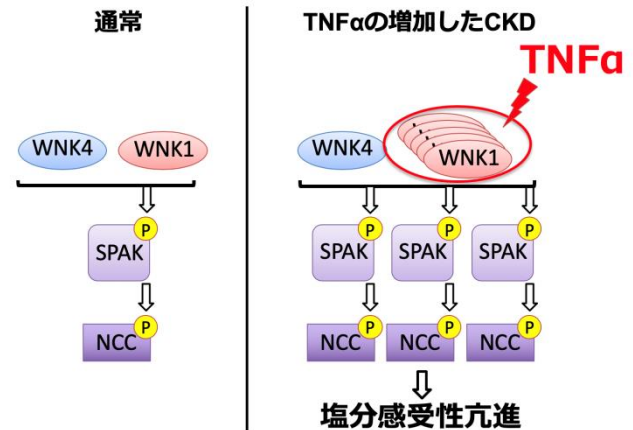


Figure 10: TNF α 発現の増加した CKD における塩分感受性亢進メカニズム

4. 文献

- 1) Kotchen, T., Jr, A., Frohlich, E. (2013). Salt in Health and Disease — A Delicate Balance. *New England Journal of Medicine* 368(13), 1229 - 1237.
- 2) Sohara, E., Uchida, S. (2016). Kelch-like 3/Cullin 3 ubiquitin ligase complex and WNK signaling in salt-sensitive hypertension and electrolyte disorder. *Nephrology Dialysis Transplantation* 31(9), 1417 - 1424.
- 3) Nishida, H., Sohara, E., Nomura, N., Chiga, M., Alessi, D., Rai, T., Sasaki, S., Uchida, S. (2012). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway activates the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in hyperinsulinemic db/db mice. *hypertension* 60(4), 981 - 990.
- 4) Terker, A., Zhang, C., McCormick, J., Lazelle, R., Zhang, C., Meermeier, N., Siler, D., Park, H., Fu, Y., Cohen, D., Weinstein, A., Wang, W., Yang, C., Ellison, D. (2015). Potassium Modulates Electrolyte Balance and Blood Pressure through Effects on Distal Cell Voltage and Chloride. *Cell Metabolism* 21(1), 39 - 50.
- 5) Gonzalez-Villalobos, R., Janjoulia, T., Fletcher, N., Giani, J., Nguyen, M., Riquier-Brisson, A., Seth, D., Fuchs, S., Eladari, D., Picard, N., Bachmann, S., Delpire, E., Peti-Peterdi, J., Navar, L., Bernstein, K., McDonough, A. (2013). The absence of intrarenal ACE protects against hypertension. *Journal of Clinical Investigation* 123(5), 2011 - 2023.
- 6) Rucker, A., Rudemiller, N., Crowley, S. (2018). Salt, Hypertension, and Immunity. *Annual review of physiology* 80(1), 283 - 307.
- 7) Yang, S., Lo, Y., Wu, C., Lin, S., Yeh, C., Chu, P., Sytwu, H., Uchida, S., Sasaki, S., Lin, S. (2010). SPAK-knockout mice manifest Gitelman syndrome and impaired vasoconstriction. *Journal of the American Society of Nephrology* 21(11), 1868 - 1877.
- 8) 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. (2013). Impaired KLHL3-Mediated Ubiquitination of WNK4 Causes Human Hypertension. *CellReports* 3(3), 858 - 868.
- 9) Sica, D. (2011). Diuretic use in renal disease. *Nature Reviews Nephrology* 8(2), 100 - 109.

ソルトサイエンス研究財団助成期間の1年間で、査読有りの英文誌に以下の7報の報告を行った。(○印:ソルトサイエンス財団への Acknowledgement あり)

- Kikuchi H, Sasaki E, Nomura N, Mori T, Minamishima YA, Yoshizaki Y, Takahashi N, Furusho T, Arai Y, Mandai S, Yamashita T, Ando F, Maejima Y, Isobe K, Okado T, Rai T, Uchida S, Sohara E. Failure to sense energy depletion may be a novel therapeutic target in chronic kidney disease *Kidney Int.* 2019.01; 95(1); 123-137
- Fujiki T, Ando F, Murakami K, Isobe K, Mori T, Susa K, Nomura N, Sohara E, Rai T, Uchida S. Tolvaptan activates the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway through PERK phosphorylation *Scientific Reports.* 2019.06; 9(1); 9245
- Matsuura Y, Nomura N, Shoda W, Mori T, Isobe K, Susa K, Ando F, Sohara E, Rai T, Uchida S. Tacrolimus ameliorates the phenotypes of type 4 Bartter syndrome model mice through activation of sodium-potassium-2 chloride cotransporter and sodium-chloride cotransporter. *Biochemical and biophysical research communications.* 2019.09; 517(2); 364-368
- Furusho T, Sohara E, Mandai S, Kikuchi H, Takahashi N, Fujimaru T, Hashimoto H, Arai Y, Ando F, Zeniya M, Mori T, Susa K, Isobe K, Nomura N, Yamamoto K, Okado T, Rai T, Uchida S. Renal TNF α activates the WNK phosphorylation cascade and contributes to salt-sensitive hypertension in chronic kidney disease. *Kidney International.* 2020. 97; 713–727.
- Furusho T, Uchida S, Sohara E. The WNK signaling pathway and salt-sensitive hypertension *Hypertension Research.* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41440-020-0437-x>
- Mandai S, Sato H, Imori S, Naito S, Tanaka H, Ando F, Susa K, Isobe K, Mori T, Nomura N, Sohara E, Okado T, Uchida S, Fushimi K, Rai T. Nationwide in-hospital mortality following major fractures among hemodialysis patients and the general population: An observational cohort study. *Bone.* 2019.10; 130; 115122
- Nomura N, Shoda W, Uchida S. Clinical importance of potassium intake and molecular mechanism of potassium regulation. *Clinical and Experimental Nephrology.* 2019.10; 23(10); 1175-1180

Mechanisms of Salt-Sensitive Hypertension in Chronic Kidney Disease Caused by WNK Signal Regulation by Immune Mechanism

Eisei Sohara

Tokyo Medical and Dental University, Department of Nephrology

Summary

The inappropriate over-activation of with-no-lysine kinase(WNK) –STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase(SPAK) –NaCl cotransporter(NCC) phosphorylation cascade increases sodium reabsorption in distal kidney nephrons, resulting in salt-sensitive hypertension. The discovery of the WNK phosphorylation cascade has implications not only for rare inherited diseases but also for salt-sensitive hypertension associated with several (patho-) physiological conditions such as low-potassium diet and metabolic syndrome.

Hypertension is a common comorbidity associated with chronic kidney disease (CKD) and is also an important modifiable risk factor of CKD progression and cardiovascular disease. However, appropriate blood pressure control is often difficult to achieve due to increased salt-sensitivity in CKD. Recently, several studies suggest that not only reduced glomerular filtration but also increased renal tubular sodium reabsorption contributes to hypertension in CKD. However, involvement of WNK phosphorylation cascade in salt-sensitive hypertension in CKD is unknown. Moreover, the effect of immune systems on WNK kinases has not been investigated despite the fact that immune systems are important for salt sensitivity. To answer these questions, we investigated WNK phosphorylation cascade in three mouse CKD models (aristolochic acid nephropathy, adenine nephropathy, subtotal nephrectomy).

First, we created aristolochic acid nephropathy model. Protein abundance of WNK1, but not of WNK4, was increased at the distal convoluted tubules (DCT) in aristolochic acid nephropathy model. Accordingly, the phosphorylation of SPAK and phosphorylation of NCC was also increased. Moreover, a high-salt diet did not adequately suppress the activation of WNK1–SPAK–NCC phosphorylation cascade in aristolochic acid nephropathy model, leading to salt-sensitive hypertension. WNK1 protein abundance also was increased in adenine nephropathy, but not in subtotal nephrectomy, models.