

# WNK シグナルを介した塩分負荷によるマクロファージからのサイトカイン分泌制御機構の解明

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** 最近, 申請者はマクロファージにおける WNK シグナルに興味をもって研究を開始し, マクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞とマウス腹腔マクロファージにおいて WNK1 の発現と機能について検討を行い, 報告した (*Biochem Biophys Res Commun.* 2020;533(4):1290-97.)。敗血症のエンドトキシンショックなどで血中に分泌されているグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であるリポ多糖 (LPS) 刺激はマクロファージのサイトカインを分泌誘導するが, このマクロファージの LPS 刺激で WNK1 の蛋白量が増加し, WNK1 が LPS 刺激によるマクロファージのサイトカイン産生分泌を抑制することを明らかにしたが, その詳細や生理的な制御機構, 塩との関わりについては不明なままであり, さらなる研究が必要である。本研究では, 以下のマクロファージにおける塩と WNK シグナルによるサイトカイン産生分泌制御機構に関わるメカニズムを検討した。まず, RAW264.7 細胞とマウス腹腔マクロファージではともに, WNK1 の発現が確認でき, 下流の構成分子としては OSR1/SPAK と SLC12A2 の発現を認め, マクロファージには WNK1-OSR1/SPAK-SLC12A2 pathway が存在することが明らかとなった。さらに, LPS 刺激およびインスリン刺激により WNK pathway は亢進し, 高塩濃度刺激で抑制されることを示した。LPS 刺激にて WNK1 の蛋白量自体が増加することが確認され, LPS 誘導性の免疫応答に WNK pathway が関与する可能性が示唆された。また高塩濃度刺激により WNK1 の蛋白量が減少し, インスリン刺激で WNK1 の蛋白量が増加することが確認され, これまでに腎臓尿細管において WNK pathway を上流で制御することが証明されている生理的因子によって, 同様の制御を受けていることが示唆された。

我々は WNK1<sup>+/-</sup>マウスへの LPS 注射によって血中 IL-6 濃度の増悪を認めることを確認した。このことは WNK1 さらに塩分摂取が, 生体におけるサイトカインストームを制御する可能性を示唆したため, さらにサイトカイン過剰産生モデルとして盲腸結紮穿孔法によるマウス腹膜炎モデルを作成した。WNK1<sup>+/-</sup>マウスの死亡率は高く, WNK1 はサイトカインストームを抑制している可能性が示唆された。さらに我々はサイトカイン分泌に関わる TGF- $\beta$ -activated kinase1 (TAK1) 活性がマクロファージ内で WNK1 発現量によって制御されていることをつかんだ。

我々はマクロファージに高 NaCl 刺激を行うと, 腎臓と同じように WNK1 の蛋白量が減少するという結果を得た。このことは塩分摂取過多がマクロファージのサイトカイン産生を亢進し, 逆に塩分制限は改善する可能性を示唆しており, 過去の臨床的知見と合致する。WNK1 は塩とマクロファージの古典的活性化をつなぐ新たな制御因子である可能性がある。

## 1. 研究目的

我々は, 本研究財団などの助成により, 塩分感受性高血圧症を呈する遺伝性疾患である偽性低アルドステロン症 II 型の原因である WNK1/WNK4 キナーゼの研究を通して, 腎臓での新規 NaCl 出納調節系である WNK キナ

ーゼ-OSR1/SPAK-NaCl 共輸送体 (NCC)/Na-K-Cl 共輸送体 (NKCC) リン酸化刺激伝達系とその WNK キナーゼ分解系である KLHL3-Cullin3 E3 ligase を発見した (*Cell Metab* 2007, *Cell Rep* 2013, *Hum Mol Genet* 2014, *Mol Cell Biol* 2017 など) (図1)。

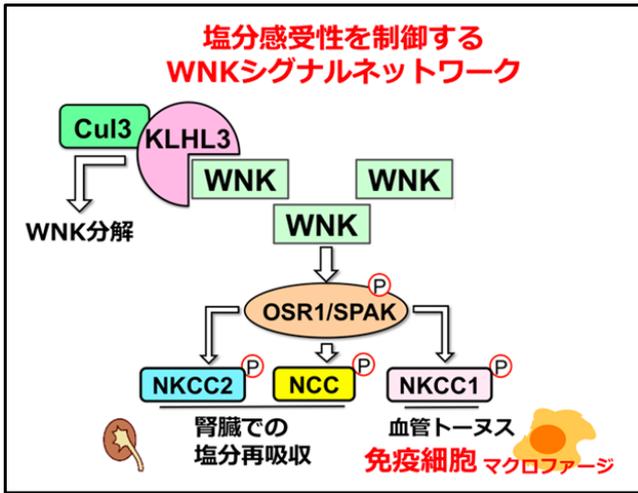


図 1

さらに、腎臓の WNK シグナルが塩分摂取、アルドステロン、アンギオテンシン II、インスリン、さらにはカリウム摂取により制御される事を報告し、生理的な NaCl や K 出納調節における重要性を明らかにした (*Kidney Int* 2008, *PLoS One* 2011, *Hypertension* 2012, *Kidney Int* 2017/2020 など)。さらに最近、WNK が腎臓での NCC を介した塩分再吸収のみならず、血管平滑筋の収縮や脂肪細胞の分化あるいは骨格筋の筋肥大にも深く関わっていることを発見し、高血圧のみならず様々な全身性疾患に対する創薬のターゲットとなる可能性を見出している (*J Am Soc Nephrol*. 2015, *E Bio Medicine*. 2017)。

そのような中、「WNK シグナルを介した塩と炎症/免疫のクロストーク」に注目が集まっている。最近、我々は TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインが腎臓の WNK1 発現量を増加させ、NCC を介した塩の再吸収を亢進し、塩分感受性高血圧を起こすことを報告した (*Kidney Int* 2020)。逆に、興味深いことに、塩分摂取や WNK シグナルが免疫細胞そのものにおいて重要であるとの報告がされはじめた。

塩分摂取が生体の免疫応答に影響を及ぼすことが示唆されるなか、その分子機構の解明が進み、塩分排泄を制御する遺伝子群が塩分制御とは独立して免疫系も制御していることが明らかになってきた (*Kleinewietfeld M, et al. Nature* 2013, *Wu C, et al. Nature* 2013)。WNK pathway は、その制御機構の中心的分子機構の一つであり (*Kochl R, et al. Nat Immunol* 2016)、マクロファージにおいてリポ多糖 (LPS) 刺激が WNK の発現を増強することがわかっている (*Zhou Q, et al. J Immunol* 2007)。しかし、生体におい

てマクロファージの WNK pathway が免疫系をどのように制御しているのかについてはわかっていなかった。WNK と共に塩分排泄を制御する遺伝子の一つである serum/glucocorticoid regulated kinase1 (SGK1) が塩分摂取と自己免疫疾患をつなぐ重要な分子であることが示され (*Nature*. 2013), WNK1 がリンパ球の接着や遊走を制御することも報告されている (*Nat Immunol*. 2016, *J Biol Chem*. 2017)。このように免疫細胞における WNK1 の機能について注目が集まっているが、免疫細胞において WNK1 を上流で制御する生理的因子やその制御機構、WNK1 が標的とする分子についてはまだ解明されておらず、どのような疾患で創薬のターゲットとなりえるのか、などについては議論が進んでいない。

臨床的にも塩分摂取過多が自己免疫性疾患を増悪させるということは報告されているが、その機序は全く不明であった。そのような中、WNK1 がリンパ球の接着や遊走を制御することが報告されたが (*Nat Immunol*. 2016/2019), 炎症性サイトカインを分泌するマクロファージと WNK シグナルの関連については全く未知の領域であった。

最近、申請者はマクロファージにおける WNK シグナルに興味をもって研究を開始し、マクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞とマウス腹腔マクロファージにおいて WNK1 の発現と機能について検討を行い、報告した (*BBRC* 2020)<sup>1)</sup> (図 2)。

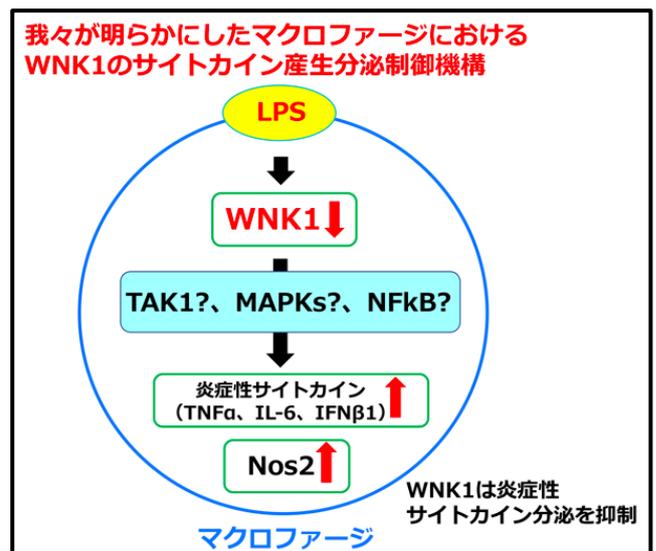


図 2

敗血症のエンドトキシンショックなどで血中に分泌されているグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であるリポ多糖 (LPS) 刺激はマクロファージのサイトカインを分泌誘導するが、このマクロファージの LPS 刺激で WNK1 の蛋白量が増加することを確認した。さらに、WNK1 ノックダウン培養マクロファージや WNK1 の発現が減弱している WNK1 ヘテロノックアウトマウスの腹腔マクロファージでは、LPS 刺激で誘導される炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ , IL-6 など) や古典的活性化マーカー分子である nitric oxide synthase 2 (Nos2) の発現が増強したことから、WNK1 が LPS 刺激によるマクロファージのサイトカイン産生分泌を抑制することを明らかにしたが、その詳細や生理的な制御機構、塩との関わりについては不明なままであり、さらなる研究が必要である。本研究では、以下のマクロファージにおける塩と WNK シグナルによるサイトカイン産生分泌制御機構に関わるメカニズムを解明したい。

本研究では、未解決である、以下の点を明らかにしたく設定された。

- 1) 塩分摂取や Cl<sup>-</sup>イオン濃度は WNK シグナルの制御因子として知られているが、これはマクロファージの WNK1 機能を制御し、サイトカイン分泌に影響するのか？
- 2) そもそも、マクロファージにおいて WNK1 とサイトカイン産生分泌をつなぐのはどのようなシグナルか？これは塩輸送体と関連するのか？
- 3) マクロファージにおける WNK シグナル制御が、サイトカイン過剰産生が関与する病態に対する新規治療法の標的となりえるのか？

これらの解明によって、塩分摂取や WNK シグナル活性/阻害によるマクロファージからのサイトカイン産生分泌制御機構の詳細を明らかにする。同時に、これは感染症、全身性炎症症候群 (SIRS)、自己免疫疾患などに伴うサイトカイン過剰産生 (サイトカインストーム) に対する新規治療法の開発応用に繋がると考える。

## 2. 研究方法

### 2.1 実験計画

本研究の実験計画を図 3 に示した。

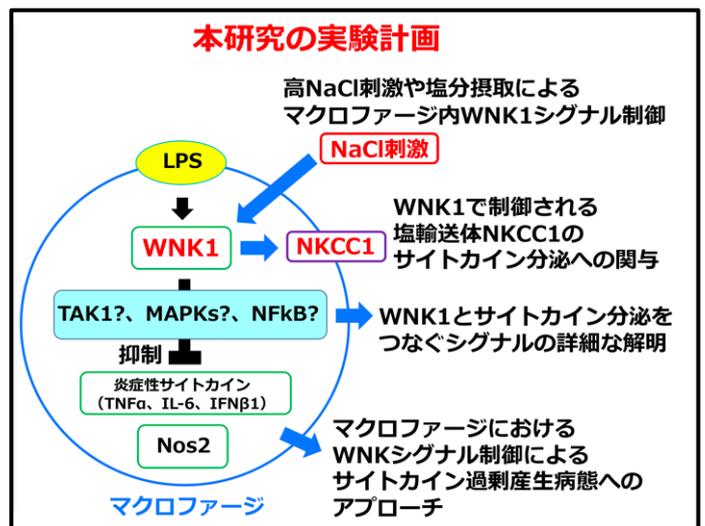


図 3 本研究の実験計画

## 3. 研究結果

以下の研究結果を得た。

### 3.1 マクロファージには WNK1-OSR1/SPAK-SLC12A2 pathway が存在する

RAW264.7 細胞とマウス腹腔マクロファージではともに、WNK1 の発現が確認でき、下流の構成分子としては OSR1/SPAK と SLC12A2 の発現を認め、マクロファージには WNK1-OSR1/SPAK-SLC12A2 pathway が存在することが明らかとなった。

### 3.2 LPS 刺激およびインスリン刺激により WNK pathway は亢進した (図 4)。

LPS 刺激にて WNK1 の蛋白量自体が増加することが確認され、LPS 誘導性の免疫応答に WNK pathway が関与する可能性が示唆された。また高塩濃度刺激により WNK1 の蛋白量が減少し、インスリン刺激で WNK1 の蛋白量が増加することが確認され、これまでに尿細管において WNK pathway を上流で制御することが証明されている生理的因子によって、同様の制御を受けていることが示唆された。

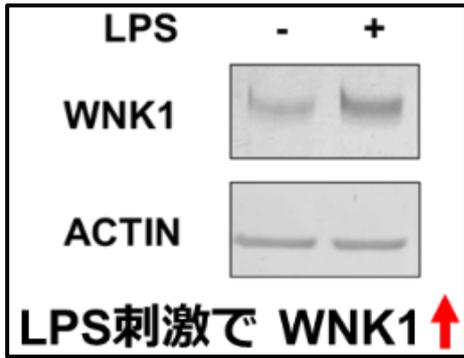


図 4

### 3. 3 WNK1 の抑制で LPS 誘導性のサイトカイン分泌が増加する(図 5)

shRNA で RAW264.7 細胞の WNK1 の発現量を抑制すると、LPS 誘導性の炎症性サイトカインとI型インターフェロンの分泌が増加し、活性化マーカーである Nos2 の発現も増加した。また同様に野生型と比較し WNK1 ヘテロノックアウトマウスから採取した腹腔マクロファージで、LPS 誘導性の炎症性サイトカインとI型インターフェロンの分泌が増加して、Nos2 の発現も増加した。したがって WNK pathway は、マクロファージにおける LPS 誘導性のサイトカイン分泌と活性化を抑制している可能性が示唆された。

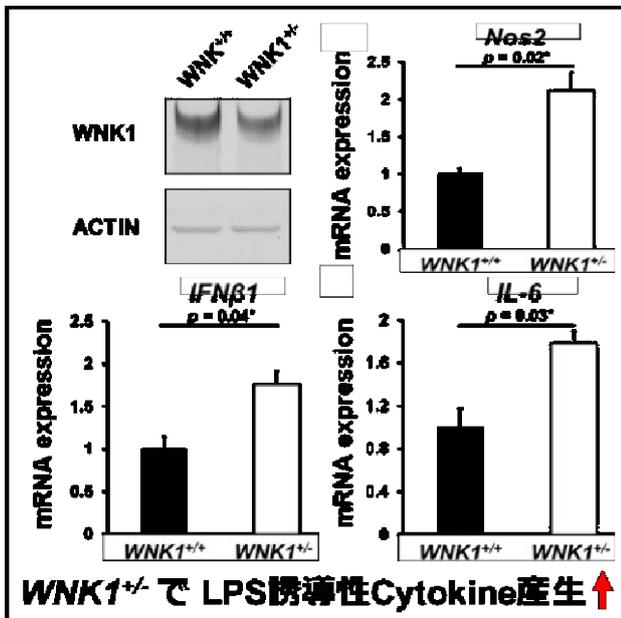


図 5

### 3. 4 マウス敗血症モデルを用いた新たな創薬のターゲットとしての可能性の検討

我々は WNK1<sup>+/-</sup>マウスへの LPS 注射によって血中 IL-6 濃度の増悪を認めることを確認した(図 6)。

このことは WNK1 さらに塩分摂取が、生体におけるサイトカインストームを制御する可能性を示唆しており、サイトカイン過剰産生モデルとして、LPS 腹腔内投与や盲腸結紮穿刺法によるマウス腹膜炎モデルを作成し、WNK1 ノックアウトマウスにおいて生存率が修飾されるかを確認した。

図7に示すように、盲腸結紮穿刺法によるマウス腹膜炎モデルにおいて、WNK1<sup>+/-</sup>マウスの死亡率は高く、サイトカインストームを抑制している可能性が示唆された。

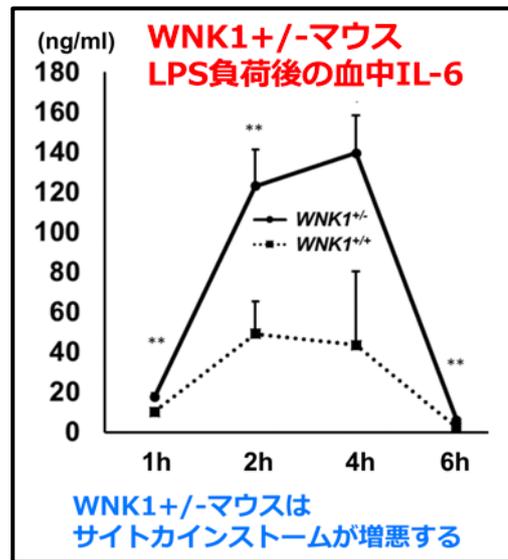


図 6

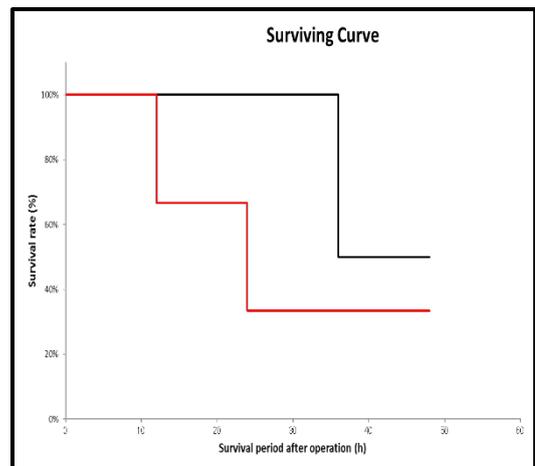


図7

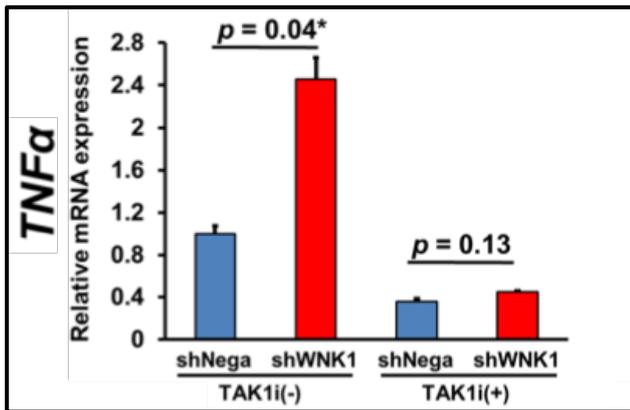


図 8

TAK1 inhibitor(TAK1i)により shWnk1 による表現型がキャンセルされる。

### 3. 5 マクロファージにおける WNK1 とサイトカイン分泌をつなぐシグナル伝達系の解明

すでに申請者は RAW264.7 細胞と腹腔マクロファージにおいて、shRNA とノックアウトマウスを用いた WNK1 の発現を抑制する実験系を樹立し、マクロファージの WNK1 を抑制すると炎症性サイトカインの産生が亢進し活性化することを明らかにしている。この現象の詳細な分子メカニズムを解明するために、以下のことを明らかとしようと考えた。

我々は特にサイトカイン分泌に関わる TGF-β-activated kinase1 (TAK1)活性がマクロファージ内で WNK1 発現量によって制御されていることをつかんだ。(図 8)

### 3. 6 塩分負荷による WNK1 を介したマクロファージのサイトカイン産生分泌制御機構の解明

我々はマクロファージに高 NaCl 刺激を行うと、腎臓と同じように WNK1 の蛋白量が減少するという結果を得た。このことは、塩分摂取過多はマクロファージのサイトカイン産生を亢進し、逆に塩分制限は改善する可能性を示唆しており、過去の臨床的知見と合致する。WNK1 は塩とマクロファージの古典的活性化をつなぐ新たな制御因子である可能性がある。以上から、マクロファージにおける WNK1 の機能とその分子機構を解明することは、過剰な炎症性サイトカインの産生に関わる病態の新規治療法の開発につながる可能性が高い。

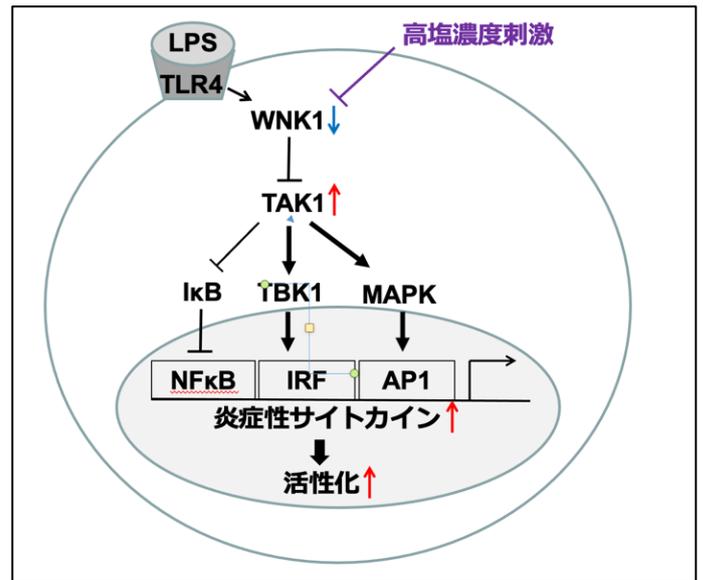


図 9

### 4. 考察および今後の課題

今回我々は WNK1 が LPS 刺激によるマクロファージのサイトカイン産生分泌を抑制し、WNK1 の下流に TAK1 があること、塩分負荷で WNK1 が抑制されることを明らかにした(図 9)。近年になって免疫系における塩分調節機構の役割についての研究が進んでいる。これをさらに追求して、マウスを用いた疾患モデルで検証している点が本研究の大きな特色である。具体的には、LPS 腹腔内投与モデルにて検証しており、LPS を産生するグラム陰性桿菌の感染症に起因するサイトカインストームの病態における新たな治療戦略につながると考えられる。またこれまで申請者が所属してきた東京医科歯科大学腎臓内科学教室が世界をリードしてきた WNK pathway に関する豊富な知見と研究リソースを活かして研究をおこなっていく。

### 6. 文献

1. Arai Y, Asano K, Mandai S, Ando F, Susa K, Mori T, Nomura N, Rai T, Tanaka M, Uchida S, Sohara E. WNK1-TAK1 signaling suppresses lipopolysaccharide-induced cytokine production and classical activation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Dec 17;533(4):1290-1297.

## Elucidation of Cytokine Secretion Regulatory Mechanism from Macrophages by Salt Loading through WNK Signal

Eisei Sohara

Tokyo Medical and Dental University, Department of Nephrology

### Summary

With-no-lysine kinase (WNK) plays important roles in regulating electrolyte homeostasis, cell signaling, survival, and proliferation. It has been recently demonstrated that WNK1, a member of the WNK family, modifies the function of immune cells. Here we report that in macrophages, WNK1 has suppressive effects on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses via TGF $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1)-mediated activation of nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway.

We investigated the effect of lipopolysaccharide (LPS; 10 ng/ml) stimulation on WNK1 expression in RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line, and peritoneal macrophages (pM $\Phi$ ). Then, we evaluated the effect of WNK1 silencing on LPS-induced cytokine production using small hairpin RNA (shRNA) and WNK1 $^{+/-}$  mice.

We found that WNK1 heterozygous (WNK1 $^{+/-}$ ) mice produced excessive proinflammatory cytokines in an experimental LPS-induced sepsis model, and peritoneal macrophages isolated from WNK1 $^{+/-}$  mice produced higher levels of LPS-induced cytokines and NOS2 expression as canonical proinflammatory M1 macrophage markers. We confirmed that small hairpin RNA (shRNA)-mediated knockdown of WNK1 activated LPS-induced cytokine production and NOS2 expression in RAW 264.7 macrophages. Moreover, we demonstrated that WNK1 knockdown increased the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and activated the p38 and Jun N-terminal kinase (JNK) MAPK signaling pathway and that a TAK1 inhibitor diminished these effects of WNK1 knockdown.

WNK1 has multiple essential physiological functions in diverse tissues. Mutations in the gene encoding WNK1 were first identified by positional cloning causing familial hyperkalemic hypertension, and a major focus to dissect its functions has been in the context of renal regulation of ion transport. In extrarenal tissues, recent studies have revealed that WNK1 is ubiquitously expressed and regulates fundamental cellular functions, including cell differentiation and development. However, the definite physiological roles of WNK1 have remained largely unknown because homozygous WNK1 deletion is embryonically lethal. This study is the first to clarify that WNK1 suppresses LPS-induced proinflammatory cytokine production and classical activation using pM $\Phi$  isolated from WNK1 $^{+/-}$  mice. Moreover, we showed that WNK1 $^{+/-}$  mice produced excessive proinflammatory cytokines in an experimental LPS-induced sepsis model *in vivo*.

Our study suggests that WNK1 acts as a physiologic immune modulator via interactions with TAK1. WNK1 may be a therapeutic target against the cytokine storm caused by sepsis.