

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16686

研究課題名(和文)塩分負荷と免疫システムをつなぐマクロファージにおけるWNKシグナルの機能探究

研究課題名(英文) Investigation of a novel function of WNK signal in macrophage

研究代表者

新井 洋平 (Arai, Yohei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：40824339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：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が、塩分排泄を担う中心的分子の一つであるWNKキナーゼ(With-no-lysine kinase)が生体において免疫機構をどのように制御するのかわかりませんでした。本研究では、マクロファージにおいてWNK1がLPS刺激で誘導されること、生体においてWNK1の抑制によりLPS誘導性の炎症性サイトカイン分泌が亢進すること、マクロファージにおけるWNK1-TAK1シグナル伝達経路がLPS誘導性の炎症性サイトカイン産生においてnegative feedback機構として働く新たな分子機構であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体の防御機構として働く炎症シグナルが何らかの原因で亢進してサイトカインが過剰に産生されると、致死的なサイトカインストームという病態が引き起こされるが、この病態に対する根本的な治療法は確立されていない。本研究は、WNKキナーゼという新たな視点からWNK1-TAK1シグナル伝達経路が、生体においてもLPS誘導性の炎症シグナルのnegative feedback機構として働く新たな分子機構であることを明らかにした。今後さらなる研究によってWNK1-TAK1シグナル伝達経路をターゲットとした新たな治療戦略を提案することを目指していきたい。

研究成果の概要(英文)：With-no-lysine kinase (WNK) plays important roles in regulating electrolyte homeostasis, cell signaling, survival, and proliferation. It has been recently demonstrated that WNK1 modifies the function of immune cells. Here we clarified that in macrophages, WNK1 has suppressive effects on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses via TGF- β -activated kinase 1 (TAK1)-mediated activation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. Moreover, we found that WNK1 heterozygous mice produced excessive proinflammatory cytokines in an experimental LPS-induced sepsis model. These results suggest that WNK1 acts as a physiologic immune modulator via interactions with TAK1. WNK1-TAK1 signaling pathway may be a therapeutic target against the cytokine storm caused by sepsis.

研究分野：腎臓内科学、免疫学、分子細胞生物学

キーワード：WNK マクロファージ サイトカイン 敗血症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫とは、生体に病原体などの異質なものが侵入したり、癌などの異常なものが発生した際に、それを排除することで生体の恒常性を維持する防御機構である。免疫機構には、マクロファージをはじめとする様々な免疫細胞が関わっており、サイトカインと総称される生理活性蛋白質が細胞間の情報を伝達し、免疫細胞の活性化および不活化を制御し、免疫機能のバランスを保っている。しかし何らかの原因でこのバランスが崩れて、炎症シグナルが亢進しサイトカインが過剰に産生されて、致死的な病態が誘導された状態をサイトカインストームと呼び、その病態の予防および制御は重要な課題とされているが、根本的な治療法は確立されていない。

セリン/スレオニンキナーゼである WNK キナーゼ (With-no-lysine kinase) は、遺伝性の塩分感受性高血圧症を呈する偽性低アルドステロン症 型の原因遺伝子として同定され、主に腎臓の尿細管において塩分排泄を制御する分子機構の一つとして知られてきた (Cell Metab 2007, Cell Rep 2013)。しかし最近になって、この分子機構は、高血圧症 (J Am Soc Nephrol 2015) のみならず、肥満症 (EBioMedicine 2017) やサルコペニア (Sci Rep 2018) など様々な全身性疾患にも関わることが明らかとなり、新たな創薬のターゲットとして注目されている。

一方で、塩分摂取が生体の免疫応答にも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 (Nature 2013)。WNK キナーゼは、その制御機構の中心的分子の一つであることが示唆されたが (Nat Immunol 2016)、生体において WNK キナーゼが免疫機構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。

2. 研究の目的

本研究は、マクロファージにおけるリポ多糖 (LPS) 誘導性の炎症シグナル制御を介した WNK キナーゼの免疫調節機構を解明することを目的とする。WNK キナーゼという新たな視点で免疫調節機構を解明することによって、炎症シグナルが過剰に活性化して巻き起こるサイトカインストームに対する新規治療法の開発につながることを期待される。

3. 研究の方法

(1) マクロファージにおける WNK キナーゼの発現と LPS 刺激への反応性の確認

マクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞およびマウス腹腔マクロファージを用いて、WNK キナーゼがマクロファージに発現すること、また WNK キナーゼの発現が LPS 刺激に対してどのように変化するかを確認する。

(2) WNK の抑制による炎症シグナルの変化を検証

WNK キナーゼに対する shRNA およびノックアウトマウスを用いて、(1) において発現を確認した WNK キナーゼを抑制した際に、LPS 刺激で誘導される炎症性サイトカインと活性化マーカーがどのように変化するかを検証する。

(3) WNK ノックアウトマウスを用いた生体での炎症シグナルの解析

WNK キナーゼのノックアウトマウスでは、マウス敗血症モデルにおける血漿中のサイトカイン分泌がどのように変化するかを解析する。

(4) WNK を介する炎症シグナル制御の分子機構の解明

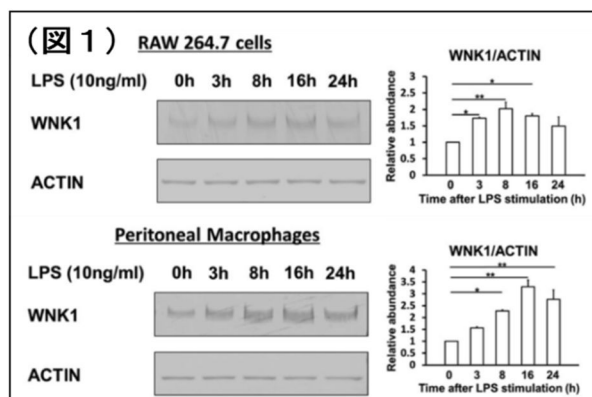
マクロファージにおける WNK キナーゼを介した LPS 誘導性炎症シグナルの制御機構を、炎症シグナルの主要な構成分子の動態およびその阻害薬を用いた実験系で明らかにする。

4. 研究成果

(1) WNK1 はマクロファージに発現し、LPS 刺激に反応して蛋白量が増加する

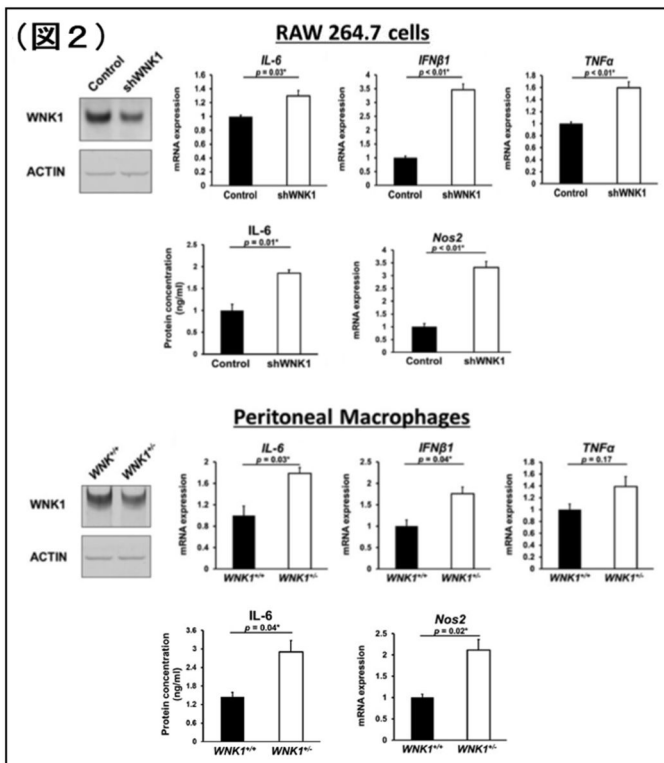
RAW264.7 細胞と腹腔マクロファージではともに、WNK1 の蛋白レベルでの発現が確認でき、LPS 刺激に伴い WNK1 の蛋白量自体が増加することが確認された (図 1)。したがって、マクロファージにおける LPS 誘導性の免疫応答には、WNK1 が関与する可能性が示唆された。

また WNK pathway の下流の構成分子として、OSR1/SPAK と SLC12A2 の蛋白レベルでの発現を認め、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。



(2) WNK1 の抑制で LPS 誘導性のサイトカイン分泌およびマクロファージの活性化が増強する

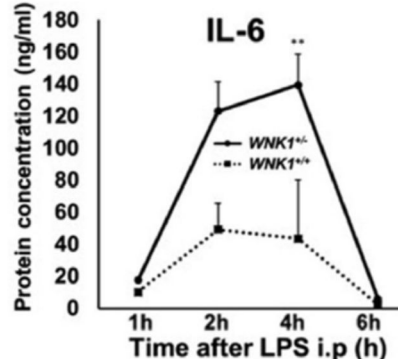
shRNA にて RAW264.7 細胞の WNK1 の蛋白発現量を抑制すると、LPS 誘導性炎症性サイトカインと 型インターフェロンの産生および分泌が増加し、活性化マーカーである Nos2 の発現が増加した。また同様に野生型と比較し WNK1 ヘテロノックアウトマウスから採取した腹腔マクロファージでは、LPS 誘導性の炎症性サイトカインと 型インターフェロンの分泌が増加して、Nos2 の発現も増加した(図 2)。以上から、WNK1 はマクロファージにおける LPS 誘導性サイトカイン分泌および活性化を抑制している可能性が示唆された。



(3) WNK1^{+/-} マウスでは、LPS 腹腔内投与後の血漿 IL-6 濃度が増加する

マウス敗血症モデルにて、野生型と比較して、WNK1 ヘテロノックアウトマウスでは LPS 腹腔内投与後の血漿サイトカイン濃度が増加した(図 3)。以上から、WNK1 の活性化によって、サイトカインストームの病態を是正できる可能性が示唆された。

(図 3)

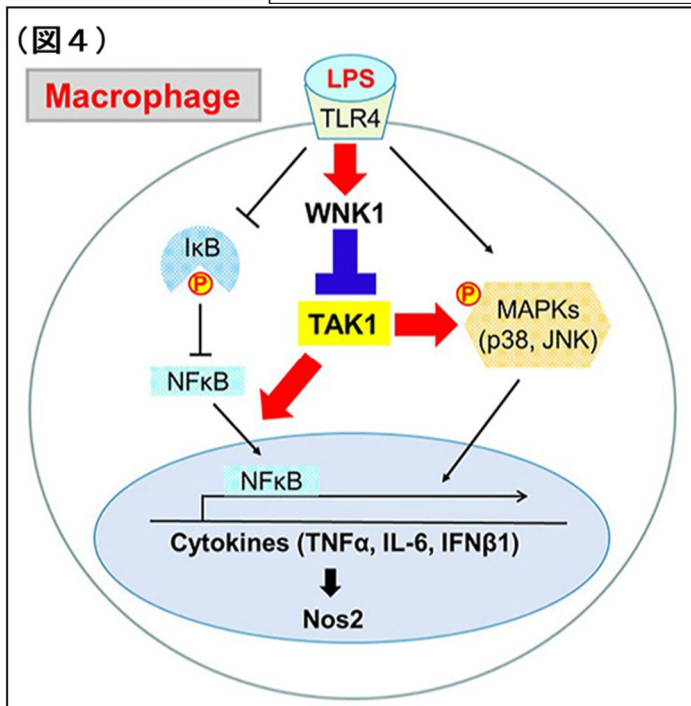


(4) WNK1-TAK1 シグナル伝達経路が、マクロファージの LPS 誘導性の免疫応答を調節する

shRNA にて WNK1 の発現量を抑制した RAW264.7 細胞では、LPS 誘導性の炎症シグナルを担う TAK1 TGFβ-activated kinase 1 (TAK1) の蛋白量が増加した。さらに TAK1 の下流に位置する Nuclear factor kappa B (NFκB) の核内移行や Mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化が増加した。TAK1 阻害薬によって、WNK1 の抑制により引き起こされる NFκB の核内移行や MAPK の活性化および炎症性サイトカイン産生の増強作用はキャンセルされた。

以上の結果から、本研究では、LPS により誘導される WNK1 が TAK1 を抑制することで、マクロファージの LPS 誘導性の炎症性サイトカインの産生とマクロファージの活性化を抑制することを示した(図 4)。この WNK1-TAK1 シグナル伝達系は、マクロファージにおいて LPS 刺激に伴う炎症シグナルの negative feedback 機構として働いており、サイトカインストームを制御する新たな治療の標的となる可能性がある。

(図 4)



サイトカインストームは、様々な炎症性疾患に伴って引き起こされる致死的な病態の一つである。これまでに根本的な治療はなく、今後のさらなる研究によって、WNK1-TAK1 シグナルをターゲットとした新規の治療戦略を提案することを目指していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Arai Yohei, Asano Kenichi, Mandai Shintaro, Ando Fumiaki, Susa Koichiro, Mori Takayasu, Nomura Naohiro, Rai Tatemitsu, Tanaka Masato, Uchida Shinichi, Sohara Eisei	4. 巻 533
2. 論文標題 WNK1-TAK1 signaling suppresses lipopolysaccharide-induced cytokine production and classical activation in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1290 ~ 1297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.10.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------