

## PHD 阻害薬/低酸素による WNK シグナル制御を介した塩分出納機構の解明

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** 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出納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。

一方で、WNK シグナルが亢進する病態から WNK シグナルの制御メカニズムも明らかとなってきた。例えば、カルシニューリン阻害薬(タクロリムス, シクロスポリン)はその副作用として高血圧, 高カリウム血症といった偽性低アルドステロン症の特徴を呈するが、この現象から脱リン酸化酵素による WNK シグナル, NCC の活性化機構が明らかとなった。このような背景を踏まえ、今回我々は新しい塩分感受性制御の生理機構として、低酸素状態で活性化する HIF (hypoxia inducible factor) の安定化薬である PHD (prolyl hydroxylase) 阻害薬に注目した。PHD 阻害薬 roxadustat の臨床試験では高血圧, 高カリウム血症, 代謝性アシドーシスの副作用発生が、PHD 阻害薬投与群で有意に多かったことが報告され、まさに PHAI の臨床症状と同様の症状が PHD 阻害薬投与患者に起きることがわかった。しかし、この病態に WNK シグナルが関わるかどうか、関わるとすれば PHD 阻害薬が、また HIF が、直接 WNK シグナルの活性化を起こすかどうかについては不明である。

今回我々はマウスおよび腎臓遠位尿細管上皮培養細胞を用いて PHD 阻害薬と WNK シグナルの関係について検討した。まず 8 週齢の C57BL/6J オスマウスに PHD 阻害薬の一つである roxadustat 10 mg/kg/day を連日 5 日間腹腔内投与し腎臓内の WNK シグナル構成蛋白の発現をウェスタンブロッティング法で確認した。その結果 roxadustat 投与によって WNK1, WNK4 蛋白の発現が増加し、それに伴い SPAK のリン酸化 (pSPAK) が増加していることを確認した。一方で NCC のリン酸化にはばらつきがあり両群で有意な差は認められなかった。次に我々は WNK1, WNK4 の蛋白発現のメカニズムを明らかにするため腎全体での転写発現について評価を行った。その結果 WNK1, WNK4 共に roxadustat 投与群で転写発現が増加していることがわかった。一方 WNK の分解系で負の制御因子である KLHL3-CUL3 E3 リガーゼ複合体の蛋白発現には群間で差を認めなかった。次に、マウス腎臓で見られた WNK 蛋白発現増加が PHD 阻害薬の直接作用かどうか、また、PHD 阻害薬の主な作用点は HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  の発現増加にあることから、これらの転写因子によって WNK1, WNK4 の転写が制御されているかを評価するため、まず培養細胞で PHD 阻害薬が WNK 蛋白発現を増加させるかを確認した。しかしながら、遠位尿細管培養細胞 (mpkDCT cell) を filter 上で培養し、3 日間 roxadustat を負荷したが WNK 蛋白発現は増加しなかった。10  $\mu$ M や 50  $\mu$ M という一般的な負荷量でも actin 蛋白発現の低下が見られ、同細胞

が薬剤への感受性が高く細胞障害のため評価が困難になっていると考えられた。また培養細胞系で可能な投与期間では変化が見られなかった可能性もあると考えられた。通常マウスに roxadustat を 5 日間投与した実験では WNK1/WNK4-SPAK の亢進は見られたものの、NCC のリン酸化についてはばらつきが大きく亢進が確認できなかったことから、我々は次に高塩食負荷下で roxadustat が WNK シグナルを亢進させるかを C57BL6 マウスを用いて評価した。上述のように通常マウスでは WNK シグナルは高塩食で抑制を受けるが、WNK シグナルの過剰亢進による塩分感受性高血圧の病態では高塩食下でも WNK シグナルが抑制を受けないことが知られている。つまり高塩食負荷は通常マウスの WNK シグナルを抑制するため群間の差が比較しやすくなることを予想したが、高塩食摂取マウスでは予想に反して通常マウスで見られたような WNK-SPAK シグナルの亢進は消失していた。我々は、高塩負荷による WNK シグナルの抑制が、PHD 阻害薬による WNK シグナルの活性化を上回った可能性があると考え、臨床試験での roxadustat の投与は我々のマウス実験と比較して長期に投与した結果であることも踏まえ、Roxadustat の投与期間をより長期にするなどさらなる条件検討が必要と考えている。

今回我々はマウスへの 5 日間 roxadustat 投与によって WNK-SPAK シグナルが亢進することを発見した。特に転写による WNK 蛋白の制御はこれまで報告のない新しいメカニズムである。また、PHD 阻害薬投与は組織低酸素を模倣した薬剤であり、糖尿病性腎症、高血圧性腎症、多発性嚢胞腎などの CKD でも、腎組織の低酸素状態や、HIF の活性化が報告されていることから、低酸素によって惹起される WNK シグナルの亢進が、これらの病態における塩分感受性高血圧発症に関わっている可能性がある。しかしながら PHD 阻害薬による WNK-SPAK シグナルの亢進は培養細胞系や高塩食摂取下では確認できないなど安定した結果が得られなかった。今後は投与期間など投与条件を検討すると共に、すでに PHD 阻害薬は臨床応用されている薬剤であることから以前我々が確立した尿中エクソソームによる WNK シグナルの活性評価法を用いてヒトでの PHD 阻害薬と WNK シグナル活性の関連についても評価したい。

## 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臨床上重要である<sup>1)</sup>。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

かにしてきた。近年、塩分感受性調節機構として腎臓尿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)<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>やカリウム摂取不足<sup>4)</sup>、慢性腎臓病(CKD)<sup>5)</sup>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

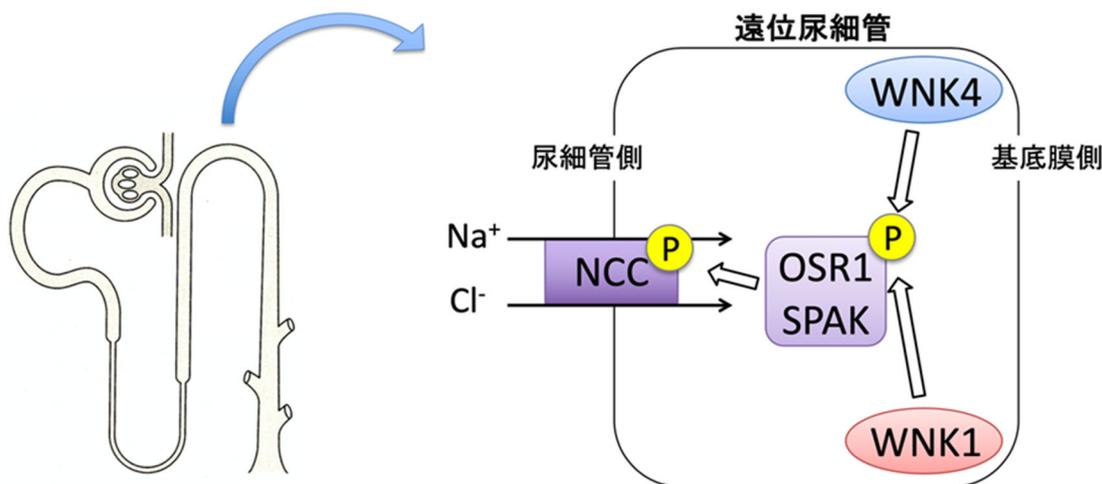


図: WNK-OSR1/SPAK-NCC シグナルによる Na 再吸収調節機構

する病態に関わることを明らかにしてきた。

一方で、WNK シグナルが亢進する病態から WNK シグナルの制御メカニズムも明らかとなってきた。例えば、カルシニューリン阻害薬(タクロリムス, シクロスポリン)はその副作用として高血圧, 高カリウム血症といった偽性低アルドステロン症の特徴を呈するが, この現象から脱リン酸化酵素による WNK シグナル, NCC の活性化機構が明らかとなった<sup>6,7)</sup>。このような背景を踏まえ, 今回我々は新しい塩分感受性制御の生理機構として, 低酸素状態で活性化する HIF (hypoxia inducible factor) の安定化薬である PHD (prolyl hydroxylase) 阻害薬に注目した。2019 年度のノーベル医学生理学賞を「細胞の低酸素応答の仕組みの発見」すなわち「HIF とその制御機構の発見」が受賞したことが示す通り, この系は科学的に極めて重要であり, さらに, HIF の PHD 阻害薬は低酸素状態を模倣し HIF を活性化させることで腎性貧血治療薬として実用化され, 臨床的にも重要な課題となって来ている。非常に興味深いことに, PHD 阻害薬 roxadustat の臨床試験では高血圧, 高カリウム血症, 代謝性アシドーシスの副作用発生が, PHD 阻害薬投与群で有意に多かったことが報告され<sup>8)</sup>, まさに PHAII の臨床症状と同様の症状が PHD 阻害薬投与患者に起きることがわかった。しかし, この病態に WNK シグナルが関わるかどうか, 関わりとすれば PHD 阻害薬が, また HIF が, 直接 WNK シグナルの活性化を起こすかどうかについては不明である。今回我々はマウスや腎遠位尿細管上

皮培養細胞を用いて PHD 阻害薬と WNK シグナルの関係について検討した。

## 2. 研究方法と結果

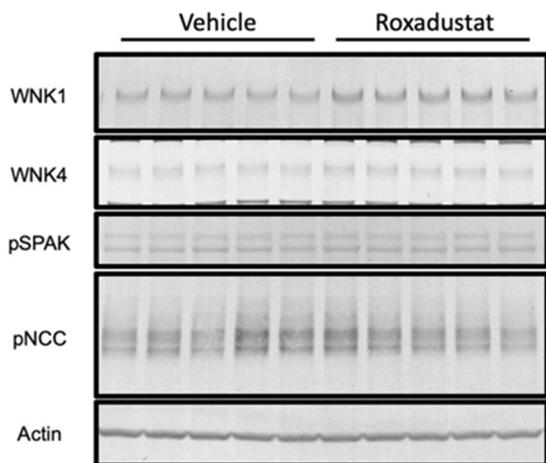
PHD 阻害薬の投与は腎において WNK1, WNK4 シグナルの蛋白発現を増加させた(Figure 1)

我々はまず 8 週齢の C57BL/6/J オスマウスに PHD 阻害薬の一つである roxadustat 10 mg/kg/day を連日 5 日間腹腔内投与し腎臓内の WNK シグナル構成蛋白の発現をウェスタンブロッティング法で確認した。その結果 roxadustat 投与によって WNK1, WNK4 蛋白の発現が増加し, それに伴い SPAK のリン酸化 (pSPAK) が増加していることを確認した(Figure 1a)。一方で NCC のリン酸化にはばらつきがあり両群で有意な差は認められず, 臨床試験でヒトで認められたような高 K 血症やアシドーシスについても認めなかった(Figure 1b)。

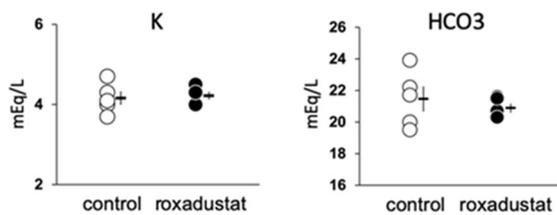
PHD 阻害薬による WNK 蛋白発現増加は分解系の変化によるものではなかった(Figure 2)

WNK1, WNK4 蛋白はいずれも KLCH3-CUL3 E3 リガーゼ複合体による分解によってその量が生理的に制御されていることが知られている<sup>2)</sup>。我々は先程のマウスの腎臓において CUL3, KLHL3 の蛋白発現を評価したが, 両者に有意な差は認めず, roxadustat による WNK 蛋白発現の増加は分解低下が原因の可能性は低いと考えられた。

a)



b)



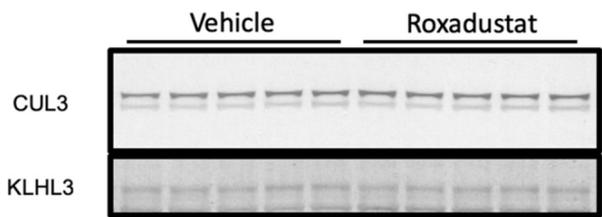
**Figure 1:** Roxadustat 投与マウスの腎では WNK1/SNK4-SPAK シグナルが亢進していた

PHD 阻害薬は WNK1, WNK4 転写発現を増加させた (Figure 3)

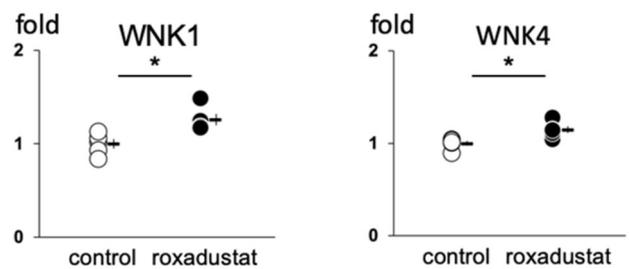
前述のように roxadustat による WNK1, WNK4 蛋白の増加は分解系による制御ではなかったことから、次に我々は両蛋白の腎全体での転写発現について評価を行った。その結果 WNK1, WNK4 共に転写レベルで発現が増加していることがわかった。PHD 阻害薬による間接作用の可能性を考慮する必要はあるものの、薬剤の主な作用点が転写因子である HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  の発現増加にあることから、これらの転写因子によって WNK1, WNK4 の転写が制御されている可能性を示唆するものと考えられた。

塩分出納に関わるその他のナトリウム輸送体は PHD 阻害薬の有無で変化がなかった (Figure 4)

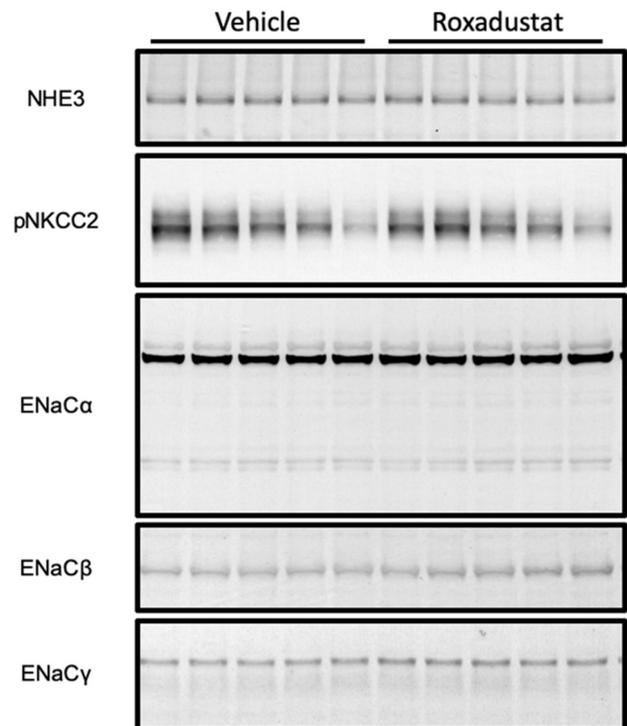
我々は roxadustat が NCC 以外の腎ナトリウム輸送体の機能変化を介して間接的に WNK シグナルを活性化させた可能性も考慮したが、上皮性ナトリウムチャンネル (ENaC) を含めたその他の主要ナトリウム輸送体の発現量は roxadustat の投与の有無で変化がないことを確認した。



**Figure 2:** Roxadustat 投与マウスの腎では CUL3, KLHL3 蛋白発現に変化はなかった



**Figure 3:** Roxadustat 投与マウスの腎では WNK1, WNK4 の転写発現が増加していた (actin 補正データ)



**Figure 4:** 主要ナトリウム輸送体の発現量は roxadustat の有無で変化がなかった

遠位尿細管培養細胞では PHD 阻害薬は WNK 蛋白発現を増加させなかった(Figure 5)

マウス腎臓で見られた WNK 蛋白発現増加が PHD 阻害薬の直接作用かどうか、また、上述のように薬剤の主な作用点は HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  の発現増加にあることから、これらの転写因子によって WNK1, WNK4 の転写が制御されているかを評価するため、まず培養細胞で PHD 阻害薬が WNK 蛋白発現を増加させるかを確認した。しかしながら、遠位尿細管培養細胞 (mpkDCT cell) を filter 上で培養し、3 日間 roxadustat を負荷したが WNK 蛋白発現は増加しなかった。10  $\mu$ M や 50  $\mu$ M という一般的な負荷量でも actin 蛋白発現の低下が見られ、同細胞が薬剤への感受性が高く細胞障害のため評価が困難になっていると考えられた。また培養細胞系で可能な投与期間では変化が見られなかった可能性もあると考えられた。

高塩食負荷マウスにおいて PHD 阻害薬は WNK シグナルを亢進させなかった(Figure 6)

通常マウスに roxadustat を 5 日間投与した実験(Figure 1)では WNK1/WNK4-SPAK の亢進は見られたものの、NCC のリン酸化についてはばらつきが大きく亢進が確認できなかった。

一般的に WNK シグナルは高塩食で抑制を受けるが、WNK シグナルの過剰亢進による塩分感受性高血圧の病態では高塩食下でも WNK シグナルが抑制を受けず NCC からの過剰なナトリウム再吸収が維持されることで高血圧を発症する。つまり高塩食負荷は①通常マウスの WNK シグナルを抑制するため群間の差が比較しやすくなる、②より臨床に近い環境での WNK シグナルの評価が可能になるという点で有用である。このことから、我々は 5 日間事前に 8% NaCl 食事を摂取させたマウスに、5 日間高塩食摂取を継続しながら roxadustat (10 mg/kg/day, 腹腔内投与) の投与を行い WNK シグナルを評価した。

しかしながら、高塩食摂取マウスでは予想に反して通常マウスで見られたような WNK-SPAK シグナルの亢進は消失していた。我々は、高塩負荷による WNK シグナルの抑制が、PHD 阻害薬による WNK シグナルの活性化を上回った可能性があると考え、臨床試験での roxadustat の投与は我々のマウス実験と比較して長期に投与した結果であることも踏まえ、Roxadustat の投与期間をより長期にするなどさらなる条件検討が必要と考えている。またマウス、ヒト

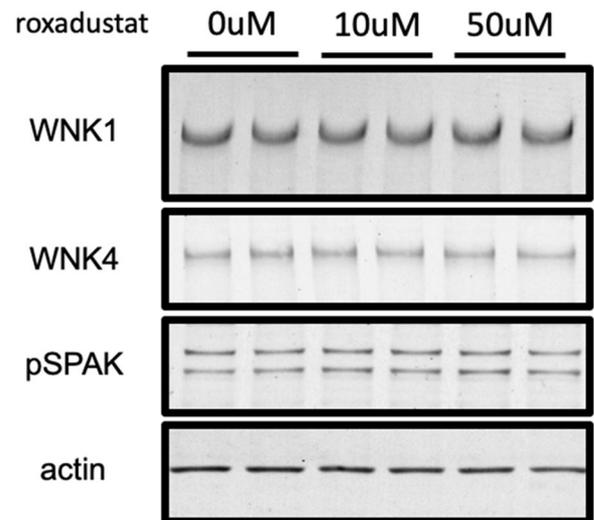


Figure 5: 培養細胞系では roxadustat の投与は WNK 蛋白を増加させなかった (mpkDCT cell, filter 培養, roxadustat 3 日間負荷)

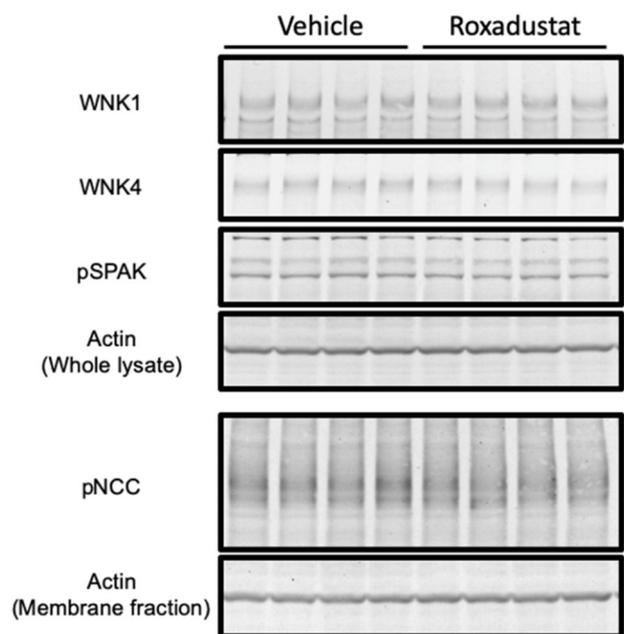


Figure 6: 高塩食負荷マウスでは PHD 阻害薬は WNK シグナルを亢進させなかった

で病態が異なる可能性もあり、PHD 阻害薬内服者の WNK シグナル活性を尿中エクソソームで評価するなどヒトでの評価の今後検討が必要と考えられた。

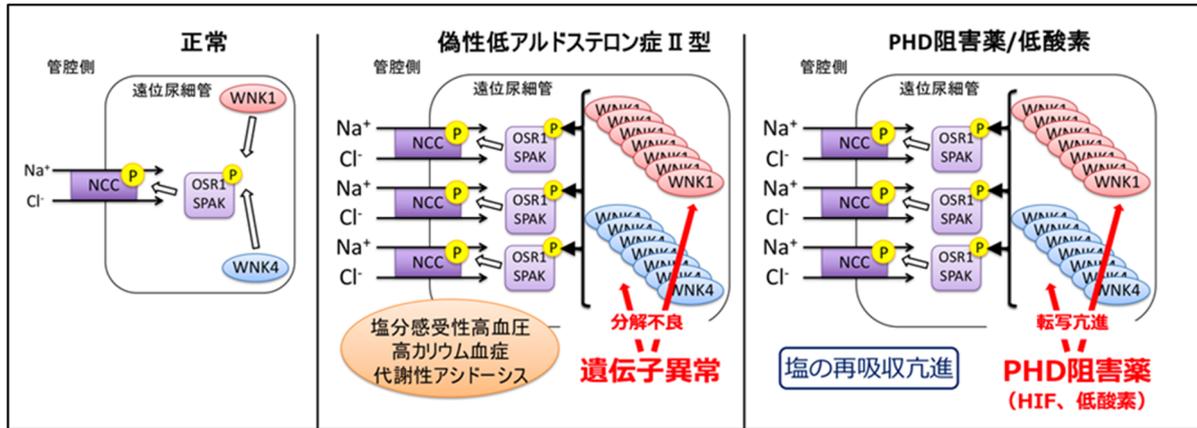


Figure 7: PHAII や PHD 阻害薬/低酸素がもたらす WNK シグナル亢進による塩分再吸収亢進

### 3. 考察と今後の課題

今回我々はマウスへの 5 日間 roxadustat 投与によって WNK-SPAK シグナルが亢進することを発見した。特に転写による WNK 蛋白の制御はこれまで報告のない新しいメカニズムである。また、PHD 阻害薬投与は組織低酸素を模倣した薬剤であり、糖尿病性腎症、高血圧性腎症、多発性嚢胞腎などの CKD でも、腎組織の低酸素状態や、HIF の活性化が報告されていることから、低酸素によって惹起される WNK シグナルの亢進が、これらの病態における塩分感受性高血圧発症に関わっている可能性がある (Figure 7)。

しかしながら PHD 阻害薬による WNK-SPAK シグナルの亢進は培養細胞系や高塩食摂取下では確認できないなど安定した結果が得られなかった。今後は投与期間など投与条件を検討すると共に、すでに PHD 阻害薬は臨床応用されている薬剤であることから以前我々が確立した尿中エクソソームによる WNK シグナルの活性評価法を用いてヒトでの PHD 阻害薬と WNK シグナル活性の関連についても評価したい。

### 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) 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. (2020) Renal TNF $\alpha$  activates the WNK phosphorylation cascade and contributes to salt-sensitive hypertension in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 97(4):713-727.
- 6) Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, Fürstenberg A, Yang CL, Roeschel T, Paliege A, Howie AJ, Conley J, Bachmann S, Unwin RJ, Ellison DH. (2011) The calcineurin inhibitor tacrolimus activates the renal sodium chloride cotransporter to cause hypertension. *Nat Med.* 2;17(10):1304-9
- 7) Shoda W, Nomura N, Ando F, Mori Y, Mori T, Sohara E, Rai T, Uchida S. (2017) Calcineurin inhibitors block sodium-chloride cotransporter dephosphorylation in

- response to high potassium intake. *Kidney Int.* 91(2):402-411.
- 8) Chen N, Hao C, Peng X, Lin H, Yin A, Hao L, Tao Y, Liang X, Liu Z, Xing C, Chen J, Luo L, Zuo L, Liao Y, Liu BC, Leong R, Wang C, Liu C, Neff T, Szczech L, Yu KP. (2019) Roxadustat for Anemia in Patients with Kidney Disease Not Receiving Dialysis. *N Engl J Med.* 12;381(11):1001-1010.
- 9) Isobe K, Mori T, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Kumagai N, Kamada F, Morimoto T, Hayashi M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. (2013) Development of enzyme-linked immunosorbent assays for urinary thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter measurement. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1;305(9):F1374-81.

## Possible Mechanism of WNK Signal Activation by PHD Inhibitor/Hypoxia

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 a rare monogenic disease (pseudohypoaldosteronism type II (PHAII)) but also for salt-sensitive hypertension associated with several (patho-)physiological conditions such as low-potassium diet and metabolic syndrome. Through the investigation of the molecular mechanism of these (patho-)physiological conditions, several regulatory factors of WNK signaling have been discovered.

Prolyl hydroxylase (PHD) inhibitors are recently approved therapy for renal anemia. Their function relies on the stabilization of hypoxia inducible factor (HIF) which plays an important role in response to tissue hypoxia. Interestingly, clinical study that proved the efficacy of PHD inhibitors reported that they observed hypertension, hyperkalemia and acidosis as side effects which are common manifestations of PHAII. However, the relationship between PHD inhibitor/tissue hypoxia and WNK signaling has not been assessed. Therefore, in this study, we assessed the effect of PHD inhibitor on WNK signaling in mice and cultured renal tubule epithelial cells to explore the potential role of HIF and tissue hypoxia as a regulator of WNK signaling.

First, we administered PHD inhibitor roxadustat (10mg/kg/day) to 8 week old male C57BL6/J mice for five days. Protein abundance of WNK1, WNK4 and phosphorylation of SPAK was increased in roxadustat treated mice, but phosphorylation of NCC was not different between two groups. We next assessed the mechanism of increased protein abundance of WNK1 and WNK4 and found that they were increased at the transcriptional level. To investigate the detailed mechanism of transcriptional activation of WNKs, cultured distal convoluted renal epithelial cells (mpkDCT cells) were treated with roxadustat. However, treated cells did not exhibit WNK-SPAK signaling activation. This is at least in part due to cell toxicity caused by roxadustat. As normal mice did not manifest increased phosphorylation of NCC in response to roxadustat treatment, we also assessed the effect of roxadustat on WNK signaling in mice fed with high salt diet that normally emphasizes the difference of WNK signaling activity between normal and salt-sensitive hypertensive states. However, on the contrary, mice fed with high salt diet did not manifest activation of WNK signaling in response to roxadustat. Based on the fact that patients in clinical trial were on PHD inhibitor at least several weeks until they develop hypertension, hyperkalemia and metabolic acidosis, we are currently extending the treatment period to see the long term effect of roxadustat on WNK signaling.

Altogether, we have shown that PHD inhibitor stimulates the transcription of WNK1 and WNK4 and increases the phosphorylation of SPAK accordingly. This phenomenon is interesting especially because transcriptional

regulation of WNK signaling has not been reported before. Moreover, as there are many renal conditions that are associated with both salt-sensitive hypertension and tissue hypoxia, WNK signaling activation by PHD inhibitors has potential implications for the mechanism of salt sensitive hypertension in these conditions. However, further research is still needed to optimize the *in vivo* and *in vitro* condition to conclude the effect of PHD inhibitors on WNK signaling. Urinary exosome based assessment of WNK signaling in human patients on PHD inhibitors that we previously established is also planned.