

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09733

研究課題名(和文)リン制御因子KLOTHO発現機構を基軸とした慢性腎臓病誘発分子基盤解明と創薬研究

研究課題名(英文)Research for expression mechanism of klotho in CKD model mice

研究代表者

黒須 洋(Kurosu, Hiroshi)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40468690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病の発症に関連する腎臓におけるKlotho遺伝子の発現制御に関して、マウスへの高リン食負荷が腎臓でのKlothoの発現量をmRNAならびにタンパク質レベルで減弱させることを見出した。また、雌雄マウス間で高リン食負荷の作用が異なることに着目し、近位尿細管由来の培養細胞において性ホルモンがKlotho遺伝子の発現を上昇させること、さらには骨粗鬆症治療薬であるビスホスホネート製剤がKlothoの発現量を蛋白質レベルで上昇させることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の遂行により生体物質である性ホルモンと骨粗鬆症地治療薬であるビスホスホネート製剤に腎臓でのKlotho発現誘導活性を見出した。性ホルモンは慢性腎臓病患者において血中濃度が低下しているホルモンであり、慢性腎臓病発症の一因となるKlothoの発現低下が性ホルモン濃度の低下により誘発する可能性と性ホルモンの補充により抑制できる可能性が示された。またビスホスホネート製剤の作用に関しては、骨粗鬆症だけでなく慢性腎臓病への適応拡張につながる研究の橋渡しとなる根拠を見出せた。

研究成果の概要(英文)：Excessive intake of phosphate has been known to induce renal tubular damage and interstitial inflammation, leading to acute kidney injury or chronic kidney disease in rodents and humans. It has been known that Klotho-FGF23 endocrine system regulates homeostasis of phosphate in our body. It has been reported that and decreasing of the expression level of Klotho, which is mainly expressing in the kidney, is observed in the early stage of CKD. However, mechanism of regulation of Klotho expression remains unclear. In this research, we have found three new knowledge. 1) Renal Klotho expression is reduced in the mice fed 2.0% inorganic phosphate for 4 weeks. 2) Klotho expression is increasing in HKC-8 cells by the treatment of Sex steroid hormones. 3) Bisphosphonates, drug for treatment of osteoporosis also increase expression level of Klotho in HK-2 cells.

研究分野：リン代謝

キーワード：Klotho 無機リン酸 ビスホスホネート リン酸カルシウム

## 1. 研究開始当初の背景

生体は、血中リン濃度の恒常性を腸管吸収、骨からの動員、そして腎排泄によって適切に維持している。近年、この恒常性を保つ上で最も重要な腎排泄に負荷を与える過剰なリン摂取が、慢性腎臓病(chronic kidney disease: CKD)の発症および進行に関連することが示されている。

このCKDを代表とする様々なリン代謝疾患の研究は、動物へのPTHなどのリン制御因子の投与やリン・カルシウムなどの摂食負荷、あるいは、リン代謝異常を示す疾患モデル動物やリン代謝調節に関連する遺伝子欠損マウスを用いての個体レベルの解析が主流である。これらの場合、生体内では、血中リン濃度の異常を改善し恒常性を保とうとする二次的代償機構が発動するため、疾患全体の症状を捉えた解析は可能であるが、その直接の原因となる制御機構の破綻だけを浮き彫りにし分子レベルで解析を行うことは困難となる。

我々は、腎臓でのKlotho蛋白質(以下、Klotho)の発現が著しく減弱することで高リン血症を含む多様な老化様表現型を呈するKlothoマウスを報告[Nature 390: 45 (1997)]、このマウスの性状を解析する中で、Klothoがリン利尿因子、FGF23の受容体として機能することを示し、世界に先駆けて生体のリン恒常性維持機構に関する新たな機序を解明した[J. Biol. Chem. 281: 6120 (2006)]。さらに、この発見を発展させ、腎臓でのKlotho発現低下によるリン排泄負荷の増大がCKDの発症だけでなく進行原因の一つとなることを示している[Nat. Rev. Nephrol. 9: 650 (2013) [Review]]。しかしながら、このCKD誘発の主因の1つと考えられる尿細管でのKlotho発現低下の分子メカニズムは不明であり、その発現制御分子基盤の解明は、生理学的観点だけでなく、CKDの発症と重篤化を予防・治療する手法を開発するという医学・薬学的観点からも重要な研究課題と考えられる。

## 2. 研究の目的

私たちが解明したKlotho-FGF23システムが生体のリン恒常性維持機構に重要であることは周知の事実である。このシステムの破綻は慢性腎臓病(CKD)の発症と重篤化に深く関与しているが、その主因となる腎臓特異的なKlotho発現減弱誘導機構は解明されていない。本研究では、Klotho発現制御機構を基軸にCKD誘発分子基盤の解明と、その分子基盤を標的とした創薬開発を目的に、1) CKD発症時の腎臓を模倣した遺伝子発現変動をRNA Sequence解析用いて分析、2) RNA Sequence解析の結果に基づきKlotho発現変動に影響を与える候補分子(化合物あるいはホルモン)を推察し、それらの候補化合物が細胞レベルでKlotho発現機構に影響を与えるか否かを、とりわけ未解明であるKlothoプロモーター領域への作用に焦点を置き評価、3) 腎疾患モデル動物として高リン食負荷を与えたマウスの腎臓を用いてKlotho発現制御分子基盤の正当性と見出した化合物の有用性に関連づけた戦略的検証を行う。一連の研究により、CKDの発症機序を標的とした疾患予防・治療分子標的薬開発の橋渡しとなる有用化合物を見出すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 個体レベルからのアプローチ

個体レベルにおいてKlothoタンパク質の発現誘導を調整する因子の候補を見出すために、Klothoタンパク質の発現制御に影響することが知られている無機リン酸を食餌に添加して与えたマウスの腎臓における遺伝子発現変動をRNA Sequenceにより解析した。

### (2) 細胞レベルからのアプローチ

#### ステロイドホルモン作用の検証

RNA Sequence解析の結果、高リン食負荷を与えた腎臓では性ホルモンと副腎皮質ホルモンによって制御されるいくつかの遺伝子の発現に変化が生じることが明らかになった。この結果を受け、ヒト近位尿細管由来の培養細胞、HK-2細胞ならびにHKC-8細胞に性ホルモン(テストステロン、5 $\alpha$ ジヒドロテストステロン、エストロゲン、プロゲステロン)と副腎皮質ホルモン(コルチコイド類)を添加しKlotho遺伝子の発現変動を解析した。

#### 低分子化合物のスクリーニング

高リン食負荷により腎臓での Klotho 発現が減弱することから、ビスホスホネート製剤を含む血中リン濃度に影響を与えるいくつかの低分子化合物に関して、ヒト近位尿細管由来の培養細胞、HK-2 細胞ならびに HKC-8 細胞での Klotho 遺伝子の発現変動を解析した。

#### (3) 腎臓での Klotho プロモーター領域へのビスホスホネート製剤の作用

高リン食負荷を与えたマウスの腎臓での Klotho 発現の減弱に対するビスホスホネート製剤の効果は Klotho プロモーター領域へのエピジェネティック修飾の変動を指標に解析し評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 個体レベルからのアプローチ

個体レベルにおいて Klotho タンパク質の発現誘導を調整する因子の候補を見出すために、Klotho タンパク質の発現制御に影響することが知られている無機リン酸を食餌に添加して与え、腎臓における遺伝子発現変動を RNA Sequence により解析した。

その結果、12 週齢より無機リン酸を 4 週間与えた雄マウスでは、従来の報告どおり腎臓での Klotho の発現が、mRNA レベルで 50%、タンパク質レベルではおよそ 80%の減少することが認められた。またこのとき、性ホルモンと副腎皮質ホルモンによって制御されるいくつかの遺伝子の発現が強く影響を受けていることが明らかとなった。さらに、12 週齢雌マウスへの 4 週間のリン負荷は、雄マウスよりも低含有量のリン負荷により顕著に Klotho 発現量の減少が誘導されることが明らかになった。このことから高リン負荷に対する腎臓での Klotho 発現制御への感受性が性差によって異なることが明らかになった。

#### (2) 細胞レベルからのアプローチ

##### ステロイドホルモン作用の検証

無機リン酸を 4 週間与えたマウスでは性ホルモンと副腎皮質ホルモンによって制御されるいくつかの遺伝子の発現が強く影響を受けていること、さらには高リン負荷による腎臓での Klotho の発現減弱の程度に性差が認められるという結果を受け、ヒト近位尿細管由来の 2 種類の培養細胞 HK-2 細胞ならびに HKC-8 細胞に性ホルモン(テストステロン、5 $\alpha$ ジヒドロテストステロン、エストロゲン、プロゲステロン)と副腎皮質ホルモン(コルチコイド類)を添加し内在性 Klotho の発現量の変動活性を検討したところ、HKC-8 細胞に高濃度のテストステロンを添加したときのみ、およそ 2 倍程度の Klotho mRNA の発現量が増加することを見出した。

#### 低分子化合物のスクリーニング

研究計画に従い Klotho の発現レベルに影響をおよぼす低分子化合物のスクリーニングを行い、骨粗しょう症治療薬であるビスホスホネート製剤がタンパク質レベルでの発現増強を伴う Klotho 遺伝子の発現誘導活性をもつことを新たに見出した。さらに複数のタイプがあるこの製剤の Klotho 発現誘導活性の比較を行ったところ、その作用はアレンドロネート、ネリドロネート、エチドロネートの順に強いことが明らかになった。

#### (3) 腎臓での Klotho プロモーター領域へのビスホスホネート製剤の作用

マウスに高リン食負荷を与えたとき、リン排泄の亢進が認められる腎臓では Klotho の発現レベルが低下するが、この Klotho 発現抑制をアレンドロネートの投与は抑制した。個体に投与されたとき腎排泄されるビスホスホネート製剤はリン酸カルシウム結晶に結合することが知られており、高リン食負荷により過剰なリンの腎排泄が起きる状況において尿細管中で形成されるリン酸カルシウムの結晶化を抑制することで Klotho の発現抑制を抑える可能性が推察された。また、高リン食負荷により誘導される Klotho プロモーター領域のエピジェネティック修飾の変動がビスホスホネート製剤投与により部分的に抑制されていることから、高リンに曝されることにより起きる Klotho プロモーター領域へのエピジェネティック修飾の変動が腎臓での Klotho 発現の減弱につながる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kozawa S, Ueda R, Urayama K, Sagawa F, Endo S, Shiizaki K, Kurosu H, Maria de Almeida G, Hasan SM, Nakazato K, Ozaki S, Yamashita Y, Kuro-O M, Sato TN.	4. 巻 2
2. 論文標題 The Body-wide Transcriptome Landscape of Disease Models.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 238-268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2018.03.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miura Y, Iwazu Y, Shiizaki K, Akimoto T, Kotani K, Kurabayashi M, Kurosu H, Kuro-o M	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification and quantification of plasma calciprotein particles with distinct physical properties in patients with chronic kidney disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 1256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-19677-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakano T, Shiizaki K, Miura Y, Matsui M, Kosaki K, Mori S, Yamagata K, Maeda S, Kishi T, Usui N, Yoshida M, Onaka T, Mizukami H, Kaneda R, Karasawa K, Nitta K, Kurosu H, Kuro-O M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Increased fibroblast growth factor-21 in chronic kidney disease is a trade-off between survival benefit and blood pressure dysregulation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 19247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-55643-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒須 洋
2. 発表標題 Klothoマウス
3. 学会等名 第18回日本抗加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒須 洋
2. 発表標題 リン代謝疾患に起因するPhosphatopathy発現機序の解析
3. 学会等名 脳心血管抗加齢研究会2019・日本抗加齢協会第4回学術フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒須 洋
2. 発表標題 リン代謝制御とエンドクラインFGF
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔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
連携研究者	黒尾 誠  (Kuroo Makoto)  (10716864)	自治医科大学・医学部・教授    (32202)	