

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08613

研究課題名（和文）FGF23-Klotho系をターゲットとした腎臓病の新規治療薬の開発

研究課題名（英文）Novel therapeutic agents for kidney disease targeting the FGF23-Klotho system

研究代表者

岩津 好隆（Iwazu, Yoshitaka）

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40424014

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：急性腎障害および慢性腎臓病では腎Klotho蛋白発現低下が腎障害に関与している。本研究では、FGF（Fibroblast Growth Factor）23が腎Klotho蛋白発現低下を介して、腎障害の発症・進展に関与するか、FGF23阻害ペプチド（N）を用いて検証した。急性腎障害モデルでは、N予防投与により、虚血再灌流24時間後において、腎Klotho蛋白発現低下が抑制され、腎障害は有意に改善した。Klotho欠損マウスでは腎障害を改善せず、腎保護作用は腎Klotho蛋白発現維持が関与していた。慢性腎臓病モデルにミニポンプを使用してNを投与したが、腎障害の有意な改善は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AKIにおける血清FGF23上昇はその発症に対して独立した危険因子である。我々は、FGF23を阻害するN投与がAKIモデルにおいて腎障害を軽減することをはじめて明らかにし、FGF23がAKIの病態に関与していることを示した。重症AKIモデルではFGF23投与により腎障害を軽減することが最近報告され、重症AKIではFGF23が保護的に働き、特に回復期の48時間後に有意差を認めることからAKIからの回復を促進している可能性が考えられる。AKIの病期（急性期なのか回復期なのか）や重症度に応じて、AKIにおいてFGF23が果たす役割が異なる可能性があり、臨床応用に向けて今後さらなる研究が必要である。

研究成果の概要（英文）：In acute kidney injury (AKI) and chronic kidney disease (CKD), reduced renal Klotho protein expression was contributed to renal injury. In this study, we investigated whether FGF (Fibroblast Growth Factor) 23 is involved in the development and progression of renal injury via the decreased renal Klotho protein expression by the administration of novel agent, FGF23 inhibitory peptide (N) for AKI or CKD model. In AKI model, the treatment with N suppressed the down-regulation of renal Klotho protein and significantly improved renal injury at 24 h post ischemia-reperfusion; Klotho-deficient mice did not improve renal injury by the administration of N, and thus the inhibition of FGF23 by N could ameliorate the kidney injury via the maintenance of renal Klotho protein expression. In CKD model (high phosphate diet-fed mice), the continuous administration of N using a minipump in CKD model did not significantly improve renal injury including fibrosis and calcification.

研究分野：腎臓病

キーワード：FGF23 急性腎障害 Klotho 慢性腎臓病

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化、CKD 患者の増加や医療技術の進歩などにより、敗血症などの重症例や侵襲的で高度な治療後などに急性腎障害 (acute kidney injury: AKI) を発症する頻度が急増している。その一方で、AKI に対する有効な治療や予防法は確立しておらず、一旦、AKI を発症した場合の腎予後だけでなく生命予後が著しく悪化することが明らかとなっている[1]。従って、高リスク症例の AKI 発症予防や発症後の治療法を確立することは治療戦略上重要となる。

慢性腎臓病(chronic kidney disease:CKD)にともなう骨ミネラル代謝異常 (CKD-MBD:mineral and bone disorder) は、腎予後や生命予後に直接影響を与える因子として確立している。FGF (Fibroblast Growth Factor) 23 は、CKD 保存期における心血管病発症、腎予後や生命予後を予測する中心的な指標である。AKI 症例における血清 FGF23 上昇は、重症患者などの腎代替療法を必要とする AKI 発症や死亡を予測する独立した指標であり、AKI 発症後の高い血清 FGF23 濃度が、その後の末期腎不全および総死亡に対して独立した危険因子となる[2]。

FGF23 の受容体は FGF1c 受容体と klotho 蛋白 (以降 Klotho 蛋白) の複合体である。Klotho 蛋白は主に腎臓に発現しており、急性・慢性を含めた様々な腎疾患モデルにおいて腎臓での Klotho 発現が低下する。近年、ヘテロ欠損マウスでは腎障害が増悪し、逆に *klotho* トランスジェニックマウスや Klotho 蛋白投与などで腎障害が軽減するという Klotho の腎保護作用についての報告が多数認められるようになってきている[3]。その一方で、Klotho の発現はさまざまな刺激によって容易に低下するため、その発現をいかに保持するかが重要な課題である。

FGF23 は、腎臓での Klotho の発現を強力に抑制するが、AKI および CKD で認められる FGF23 上昇が腎臓の klotho 発現低下に関与するのか、また、Klotho 低下を介して腎障害発症・進展に関与しているかどうかについて明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

(1)AKI および CKD で認められる FGF23 上昇つまり過剰な FGF23 の腎臓 klotho 発現への関与  
(2)過剰な FGF23 による Klotho 低下を介した腎障害発症・進展への関与  
について、FGF23 阻害薬作用をもつ FGF23 阻害ペプチド ( N) を用いて明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1)予備実験

C57BL/6J マウスを用いて AKI モデル (虚血再灌流: IR, Ischemia Reperfusion) を作成し、IR 直前から 12 時間ごとに N または vehicle を腹腔内投与する。IR 後 6、12、24、48 時間後にそれぞれ検体 (採血および腎臓) を採取し、血清クレアチニン(Cr)を測定し、腎臓における Klotho の発現を Western blot 法および real time PCR 法で評価した。

### (2)AKI 発症予防効果への Klotho の関与

FGF23 阻害ペプチドによる腎障害予防効果に腎臓での Klotho 蛋白発現維持が関与しているか

どうか明らかにするため、Klotho 欠損マウスを用いて AKI モデル (IR) を作成し、予備実験同様のプロトコールで N を投与し、IR 後 24 時間の血清 Cr を測定した。

Klotho 欠損マウスは体重が増加せず短命であるため、低リン食を用いてレスキューした。

(3)AKI に対する治療効果

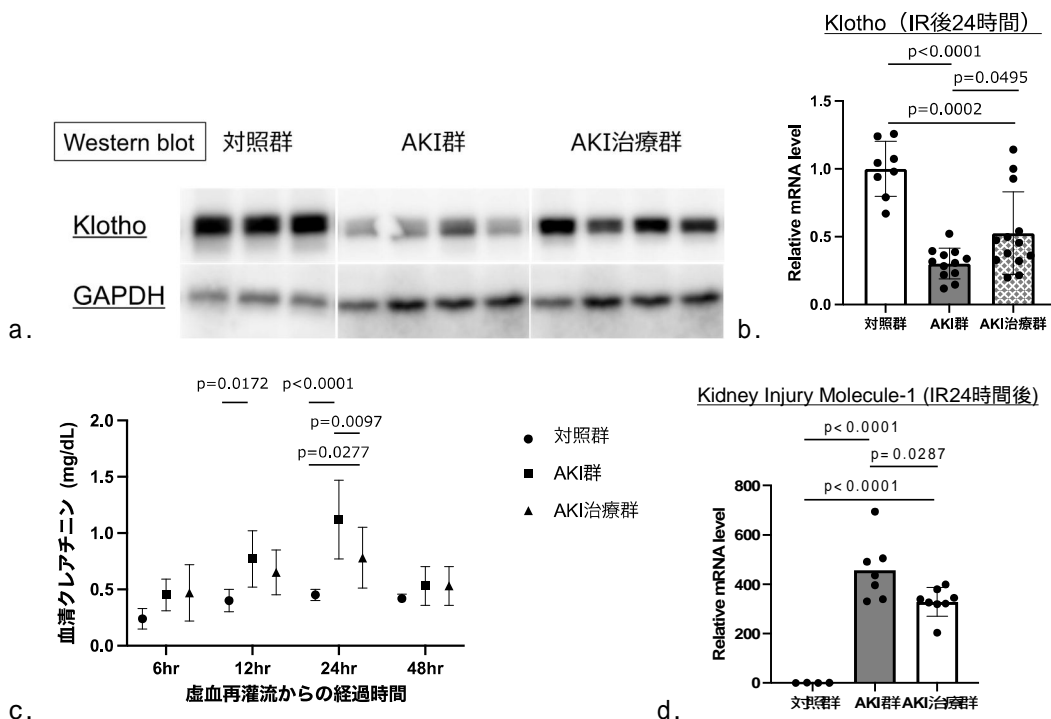
AKI 発症後の N 投与に治療効果があるか検証するため、AKI 発症後つまり IR 後 12 時間のみ N または vehicle を腹腔内投与し、IR 後 24 時間の血清 Cr を測定した。

(4)CKD に対する治療効果

CKD モデルとして 12 週齢 C57BL/6J マウスに 4 週間 2.0%無機リン含有飼料 (高リン食) を負荷し、血清 FGF23 が増加し、腎石灰化および尿細管間質線維化が生じた時点つまり CKD に移行した時点から、N (1 µg/日、2 µg/日) または vehicle を充填したミニポンプを腹腔内に埋め込み、4 週間持続投与した。終了時点で採血および腎臓を採取し、血清 Cr 測定および腎線維化を評価するために Sirius Red 染色および腎石灰化を評価するため Von Kossa 染色を行った。

4. 研究の成果

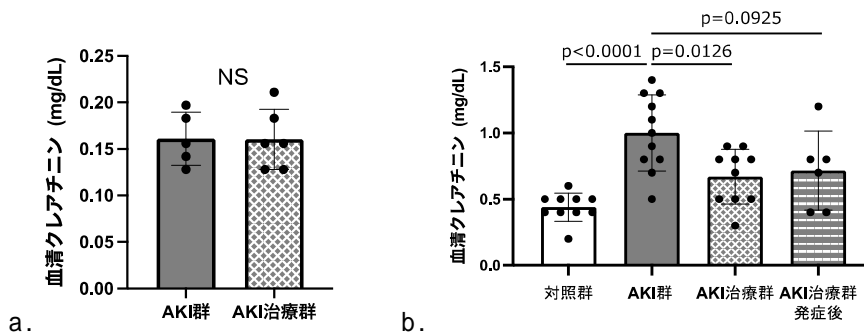
(1)予備実験の結果



IR24 時間後において、N 投与群 (AKI 治療群: ▲) は vehicle 投与群 (AKI 群: ■) と比べて腎臓の klotho 蛋白 (上図 a) と mRNA (上図 b) 発現低下が抑制され、腎障害は有意に改善した (上図 c, d)。N 予防投与の単独効果を反映する IR6 および 12 時間後では、N 予防投与により IR6 時間後で vehicle を投与した群と比べて腎障害の程度に差を認めず、12 時間後で腎障害の程度がやや軽減したが有意差を認めなかった (上図 c)。

(2) AKI 発症予防効果への Klotho の関与

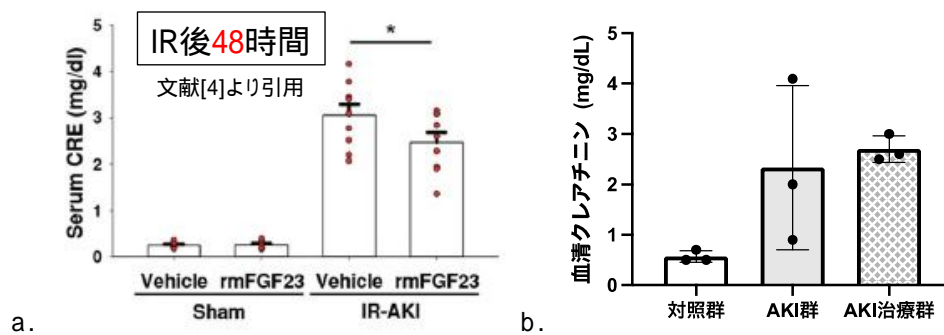
予備実験において、*Klotho* 欠損マウスは 15g 未満では麻酔に耐えられないため、本実験では 8 週齢で 15g 以上かつ継続的に体重増加している *Klotho* 欠損マウスを用いて実験を行った。実験時の *Klotho* 欠損マウスの体重は、AKI 群で  $17.8 \pm 0.7g$ 、AKI 治療群で  $18.2g \pm 1.4g$  と有意差を認めなかった。N 投与 (AKI 治療群) は、IR24 時間後において、vehicle 投与 (AKI 群) と比べて、腎障害 (下図 a) を改善しなかった。したがって、FGF23 阻害ペプチドによる FGF23 阻害による腎保護作用は、腎臓での *Klotho* 蛋白発現維持が関与していると考えられた。



(3) AKI に対する治療効果

N 発症後 (IR12 時間後) 投与 (AKI 治療群発症後) により、IR24 時間後において、N 予防および発症後投与群 (AKI 治療群) と比べて、血清 Cr 値は有意差を認めなかった。ただ、発症後投与群 (AKI 治療群発症後) は vehicle 投与群 (AKI 群) と比べると低下傾向は認めるものの、有意差を認めなかった (上図 b)。AKI 発症後の N 投与のみでも効果を認める可能性がある。

(4) 研究機関中に発表された論文との比較 (考察)

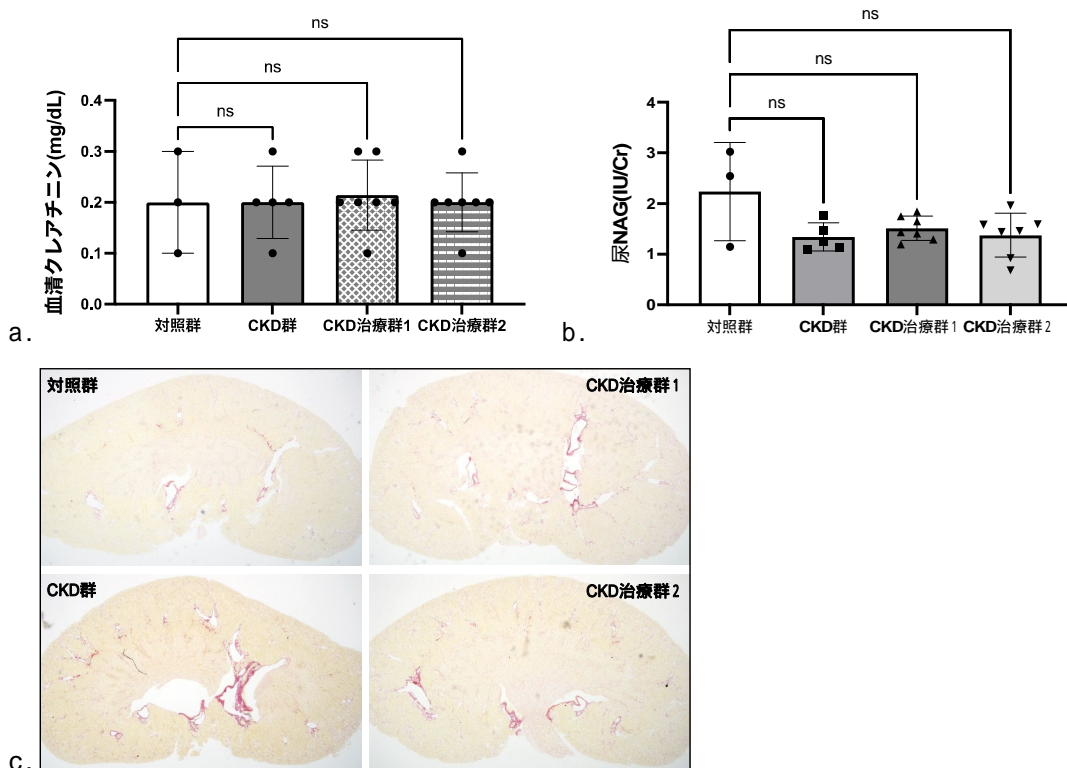


同じ IR-AKI モデルマウスにおいて FGF23 投与が急性腎障害を軽減させるという我々とは反対の結果が報告された [4]。IR 後 48 時間後に FGF23 投与群で血清 Cr が vehicle 群より有意に低下している (上図 a) が、我々の使用したモデルでは 48 時間後には対照群とほぼ同じレベルに低下している [(1) 図 c]。つまり、かなり重症度の高い IR-AKI モデルにおいて FGF23 の効果を認めているため、虚血時間を調整し、重症度の高い IR-AKI モデルにおいて N の効果を確認した。その結果、IR24 時間後において AKI 治療群は AKI 群と比べて、血清 Cr 濃度に差を認めなかった

(上図 b)。つまり、重症 IR-AKI モデルでは FGF23 が保護的に働き、特に回復期の 48 時間後に有意差を認めることから AKI からの回復を促進している可能性が考えられる。AKI の病期(急性期なのか回復期なのか)や重症度に応じて、AKI において FGF23 が果たす役割が異なる可能性があり、さらなる検討が必要と考えられた。

(5) CKD に対する治療効果

FGF23 阻害ペプチド投与 (1 μg/日 : CKD 治療群 1、2 μg/日 : CKD 治療群 2) により、vehicle 投与群 (CKD 群) と比べて、血清 Cr 濃度 (下図 a)、尿中尿細管障害マーカー (下図 b) および腎尿細管間質線維化 (下図 c : 赤い部分=線維化) および石灰化には有意な差を認めなかった。



< 引用文献 >

[1] Waikar SS, Liu KD, Chertow GM: The incidence and prognostic significance of acute kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007; 16: 227-236.

[2] Christov M, Neyra JA, Gupta S, et al. Fibroblast Growth Factor 23 and Klotho in AKI. *Semin Nephrol.* 2019;39:57-75.

[3] Erben RG. -Klotho's effects on mineral homeostasis are fibroblast growth factor-23 dependent. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2018;27:229-235.

[4] Chang HM, Peng KY, Chan CK, et al. FGF23 ameliorates ischemia-reperfusion induced acute kidney injury via modulation of endothelial progenitor cells: targeting SDF-1/CXCR4 signaling. *Cell Death Dis.* 2021;12(5):409.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Shiizaki Kazuhiro, Tsubouchi Asako, Miura Yutaka, Seo Kinya, Kuchimaru Takahiro, Hayashi Hirosaka, Iwazu Yoshitaka, Kurosu Hiroshi, Kuro-o Makoto, et al	4. 巻 131
2. 論文標題 Calcium phosphate microcrystals in the renal tubular fluid accelerate chronic kidney disease progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 e145693
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI145693	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 -

1. 著者名 Mukai Hideyuki, Miura Yutaka, Kotani Kazuhiko, Kotoda Atsushi, Kurosu Hiroshi, Yamada Toshiyuki, Kuro-o Makoto, Iwazu Yoshitaka	4. 巻 12
2. 論文標題 The effects for inflammatory responses by CPP with different colloidal properties in hemodialysis patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21856
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-26166-2	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 向井 秀幸, 岩津 好隆, 椎崎 和弘, 三浦 裕, 林 宏栄, 黒須 洋, 黒尾 誠
2. 発表標題 尿細管リン排泄と尿細管間質線維化の関係
3. 学会等名 日本腎臓学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩津 好隆, 黒尾 誠, 三浦 裕, 小藤田 篤, 小谷 和彦, 長田 太助, 山田 俊幸
2. 発表標題 維持血液透析における血漿Calciprotein particleへの影響因子
3. 学会等名 第61回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 椎崎和弘, 岩津好隆, 黒尾 誠
2. 発表標題 スクロオキシ水酸化鉄によるリン制限はKlotho遺伝子欠損マウスの骨ミネラル代謝異常を改善する.
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩津 好隆, 黒須 洋, 山田 俊幸, 黒尾 誠
2. 発表標題 急性腎障害(虚血再灌流)モデルにおいてFGF23阻害ペプチド投与は腎障害を軽減する.
3. 学会等名 第69回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2022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
研究 分担者	黒尾 誠  (Kuro-o Makoto)  (10716864)	自治医科大学・医学部・教授   (32202)	
研究 分担者	黒須 洋  (Kurosu Hiroshi)  (40468690)	自治医科大学・医学部・准教授   (32202)	

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
---------	---------