

令和元年6月5日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09625

研究課題名(和文) クロト蛋白による腎保護効果についての検討

研究課題名(英文) Reserch on renal protective effects by klotho protein

研究代表者

竹中 恒夫 (Takenaka, Tsuneo)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：90179656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：片腎摘したsp-SHRにおいて外因性クロト蛋白補充がAkt-mTOR signalingを正常化させ腎肥大を抑制し糸球体濾過率の自動能を回復した。クロト補充が、HIF-1経路を抑制し髄質の線維化を改善することで、圧ナトリウム利尿を亢進させ血圧を低下させた。db/dbマウスにおいて外因性クロト蛋白補充が腎内レニン-アンジオテンシン系を抑制し、血圧とアルブミン尿を低下させた。クロト蛋白がIGFのシグナル伝達を阻害してSOD発現を誘導し酸化ストレスを低下させ、Akt-mTORシグナル伝達を抑制し腎肥大を阻害した。クロト補充がTGF- β やTNFのシグナル伝達を抑制し、腎線維化を阻害する事をしめした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病で腎のクロト発現やクロトの血中濃度は低下している。外因性クロト蛋白補充は、高血圧性腎硬化症のモデルや糖尿病性腎臓病のモデルで腎保護効果を発揮することを示し、臨床応用に向けた基礎データを提供した。今後はクロト蛋白補充の適応範囲を明らかとするため、また、副作用の有無を検討するための研究を計画している。

研究成果の概要(英文)：Klotho binds with the AT1 receptors to suppress angiotensin signal transduction, participating in inactivating renal RAS. Exogenous klotho supplementation represses Akt-mTOR signaling to reduce renal hypertrophy and restore the autoregulatory ability of GFR in uninephrectomized sp-SHRs. Klotho supplementation inhibits HIF-1 pathway and medullary fibrosis, contributing to enhancements of pressure-natriuresis and reduction in blood pressure. Klotho supplementation reduces blood pressure and albuminuria along with ameliorating renal RAS activation in db/db mice. Klotho inhibits IGF signalling, induces SOD expression to reduce oxidative stress, and suppresses Akt-mTOR signalling to inhibit abnormal kidney growth. Klotho inhibits TGF- β and TNF signalling, resulting in a decline in renal fibrosis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：klotho

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 膜型クロトは細胞膜を一回貫通する 130kD の蛋白で、腎の遠位尿細管と脳の脈絡叢や副甲状腺に発現している。Transient receptor potential vanilloid (TRPV)5 を活性化しカルシウム代謝に関与するとともに、fibroblast growth factor (FGF)23 受容体の一部を形成しリン代謝にも関与している。クロトの細胞内ドメインはアミノ酸 10 残基ほどで、細胞膜直上付近を酵素的に切断され分泌される。分泌型クロト蛋白は遠隔臓器に作用する蛋白である。

(2) 実際、クロト蛋白は transforming growth factor (TGF) の受容体と相互作用することが最近明らかとなった。分泌型クロトは全身的に働き superoxide dismutase (SOD)等の活性酸素分解酵素群を誘導することが示唆されている。また、クロト蛋白は内皮細胞の寿命を延命し、一酸化窒素等の産生を亢進させる。そして、遠位尿細管から分泌されたクロト蛋白は尿中にも認められ、尿細管内腔より作用して近位尿細管でのリンの再吸収抑制を来すと考えられる。

2. 研究の目的

(1) 慢性腎臓病では腎クロト発現、血中クロト濃度ともに低下している。クロト遺伝子を過剰発現させることで、免疫複合体などによって惹起される腎障害が、尿細管病変だけでなく糸球体病変を含めて軽減される。しかし、クロト遺伝子過剰発現による腎保護効果が膜型クロト蛋白によるか分泌型クロト蛋白に依存するかは詳細には検討されていない。また、ヒトに対する遺伝子操作は倫理的な壁が高い。

(2) 我々は分泌型クロト蛋白の補充が慢性腎臓病モデルにおいて線維化などの尿細管間質病変だけでなく蛋白尿や糸球体組織病変についても抑制効果を示すことを報告した。分泌型クロト蛋白を外因性に投与することで得られる腎保護作用について詳細な機序を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

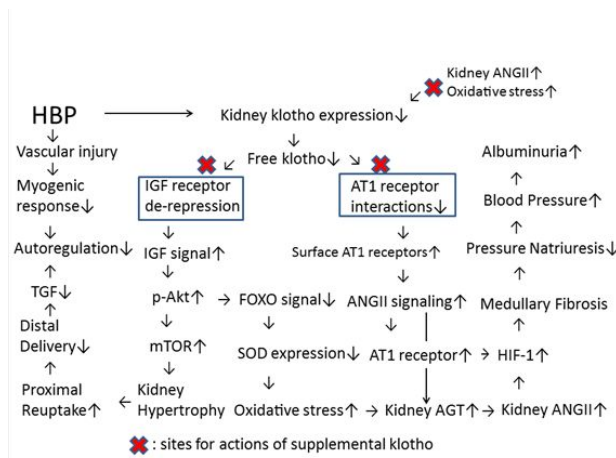
(1) クロトを安定的に発現している細胞系がないため、また進行性腎臓病に対するクロト蛋白補充の効果を検証するため、動物実験を行った。対象としては高血圧性腎硬化症のモデルとして脳卒中易発症型自然発症高血圧ラット (sp-SHR)、2 型糖尿病性腎臓病のモデルとして db/db マウス、多発性嚢胞腎 (PKD) のモデルとして DBA/2-pcy マウスを使用した。合成したクロト蛋白を各々のモデル動物に皮下注射し補充を行い、腎保護効果について検討した。

(2) 動物実験だけでは詰め切れない、クロト蛋白の腎保護効果の機序については、相補的に in vitro の研究を行った。まずは免疫沈降法を用いて、1 型アンジオテンシン受容体とクロト蛋白の相互作用について検討した。また、human kidney (HK)-2 細胞を用いて酸化ストレスに対する反応にクロト蛋白が影響するか等を検討した。

4. 研究成果

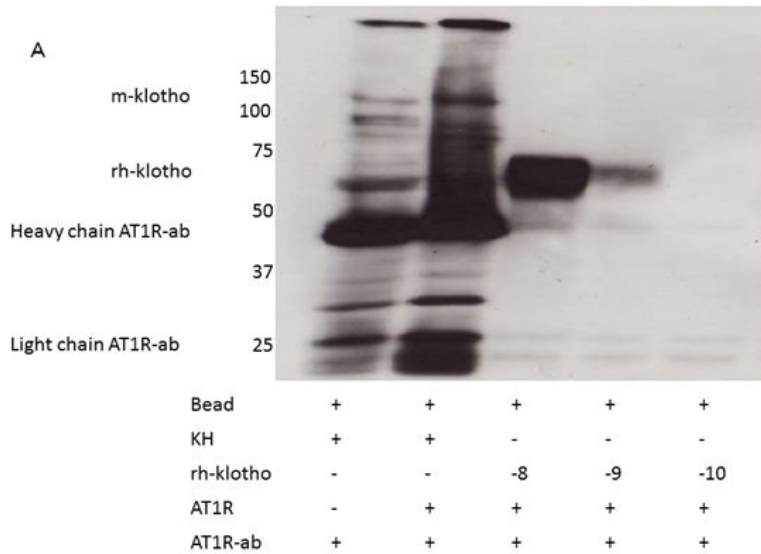
(1) 外因性クロト蛋白補充は、片腎摘した sp-SHR の血圧、腎内アンジオテンシン I I 濃度、アンジオテンシノーゲン発現、hypoxia-inducible factor (HIF)-1 蛋白量と髄質で fibronectin を低下させた。また、外因性クロト蛋白補充は内因性の腎クロト発現を増し、血中および尿中のクロト蛋白を増加させた。また、クロト蛋白補充は腎重量、Akt と mTOR のリン酸化を低下させた。更にクロト蛋白補充はリチウムクリアランスを増加させ糸球体濾過率の自動能を回復し、圧ナトリウム利尿も改善させた。これらの結果は、片腎摘した sp-SHR において外因性クロト蛋白補充が Akt-mTOR signaling を正常化させ腎肥大を抑制し糸球体濾過率の自動能を回復したことを示した。また、クロト補充が、HIF-1 経路を抑制し髄質の線維化を改善することで、圧ナトリウム利尿を亢進させ血圧を低下させたことを示唆した (図 1)。

図 1 : 高血圧性腎硬化症におけるクロト蛋白の保護効果と作用機序



(2) クロト蛋白は1型アンジオテンシン受容体(AT1R)と結合し(図2)HK-2細胞表面上のAT1Rを低下させて、アンジオテンシンIIによるイノシトール3リン酸産生を抑制することを示した。

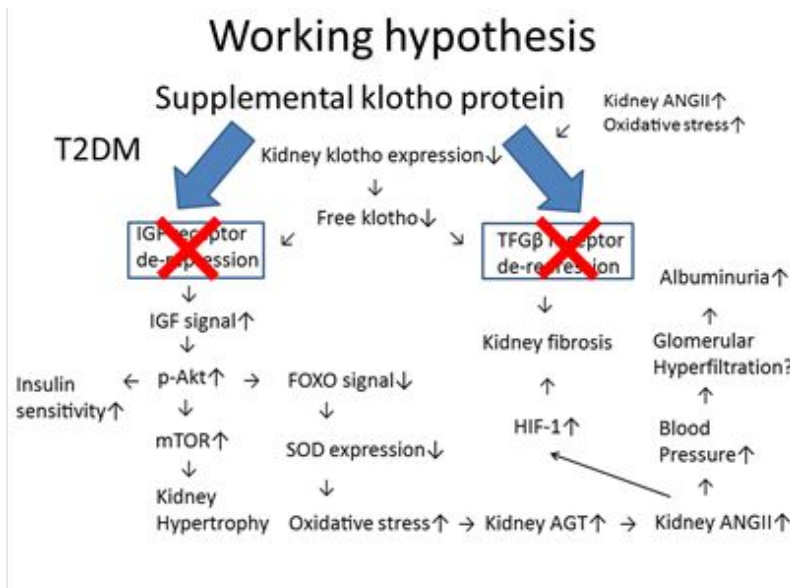
図2: クロト蛋白とAT1Rの相互作用



(3) HK-2細胞でアンジオテンシンIIはアンジオテニンノーゲン発現を亢進させるが、クロト蛋白はこの反応を抑制した。これらの結果は、クロト蛋白がAT1Rと結合してアンジオテニンIIのシグナル伝達を阻害することで腎内レニン-アンジオテニン系を抑制することを示唆した。

(4) 外因性クロト蛋白補充は、db/dbマウスにおいて腎重量、収縮期血圧、アルブミン尿排泄、糸球体濾過率、8-epi-prostaglandin F2 排泄を低下させたが、体重や血糖には影響しなかった。クロト補充はdb/dbマウスでは腎内アンジオテニンII濃度と腎アンジオテニンノーゲン発現を抑制したが、正常マウスでは変化を与えなかった。クロト蛋白補充はdb/dbマウスにおいて腎でのSODと内因性クロト発現を亢進させた。クロト補充はdb/dbマウスの腎でHIF-1やAktとmTORリン酸化を低下させた。また、クロト蛋白補充は腎でのTGF- β やtumour necrosis factor (TNF)、フィブロネクチンの発現を抑制した。これらの結果は、db/dbマウスにおいて外因性クロト蛋白補充が腎内レニン-アンジオテニン系を抑制し、血圧とアルブミン尿を低下させる事をしました。更に、これらの結果は、クロト蛋白がinsulin-like growth factor (IGF)のシグナル伝達を阻害してSOD発現を誘導し酸化ストレスを低下させる一方、Akt-mTORシグナル伝達を抑制して糖尿病性腎肥大を阻害したことを示唆した。また、我々の結果は、クロト補充がTGF- β やTNFのシグナル伝達を抑制し、腎線維化を阻害する事をしめた(図3)。

図3: 2型糖尿病性腎症におけるクロト蛋白の保護効果と作用機序



(5) 過酸化水素に HK-2 細胞を暴露すると、時間経過とともにアンジオテンシノーゲン発現が増加したが、クロト蛋白はこのアンジオテンシノーゲン発現の誘導を抑制した。同様の傾向は TNF 発現についても認められた。過酸化水素に HK-2 細胞を暴露すると、時間経過とともに TNF 発現が増加したが、クロト蛋白はこの TNF 発現誘導を阻害した。更に、HK-2 細胞を IGF に暴露すると SOD 発現が低下したが、クロト蛋白は、この SOD 発現低下に拮抗作用を示した。

(6) 外因性のクロト蛋白補充は PKD マウスにおいて、腎重量、嚢胞領域、収縮期血圧、腎アンジオテンシン II 濃度、8-epi-prostaglandin F₂ 排泄を低下させた。外因性クロト蛋白補充は糸球体濾過率、腎と大動脈の SOD 発現、腎での内因性クロト蛋白発現を上昇させた。クロト蛋白補充は腎での TGF- β と collagen I 発現を低下させ、Twist 蛋白量や Akt と mTOR のリン酸化も減少させた。病理学的検索では、PKD マウスでクロト蛋白は fibrosis index と Smad の核内染色を減少させた。これらの結果は、PKD マウスへのクロト蛋白補充が腎内レニン-アンジオテンシン系を阻害して血圧を低下させることを示した。また、我々の結果は、クロト蛋白が Akt/mTOR のシグナル伝達を鎮静化し、嚢胞拡大を抑制したことを示唆した。更に、今回の結果は、クロト蛋白が上皮間葉遷移を抑制する事で腎線維化を阻害する事をしめした。

(7) IGF1 で HK-2 細胞のメチオニン取り込みは亢進するが、クロト蛋白はこの反応を抑制した。しかし、イルベサルタンの有無では変化が無く、クロト蛋白の IGF1 シグナル伝達に対する作用はアンジオテンシンとは独立していると考えられた。さらに、TGF- β で HK-2 細胞の E-cadherin 発現は低下するが、クロト蛋白はこの反応を殆ど消失させた。イルベサルタンの有無では変化が無く、クロト蛋白の TGF- β シグナル伝達に対する作用はアンジオテンシンとは無関係と考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

Takekawa T, Kobori H, Miyazaki T, Suzuki H, Nishiyama A, Ishii N, Yamashita M, Hayashi M. Klotho protein supplementation reduces blood pressure and renal hypertrophy in db/db mice, a model of type 2 diabetes. *Acta Physiol (Oxf)*. 2019 Feb;225(2):e13190.

Ohno Y, Takekawa T, Suzuki H. Inferred systolic blood pressure levels to switch from lifestyle modifications to antihypertensive medications: a success-rate oriented simulation. *Clin Exp Hypertens*. 2018 Nov 22;1-7.

Takekawa T, Inoue T, Miyazaki T, Kobori H, Nishiyama A, Ishii N, Hayashi M, Suzuki H. Klotho Ameliorates Medullary Fibrosis and Pressure Natriuresis in Hypertensive Rat Kidneys. *Hypertension*. 2018 Nov;72(5):1151-1159

Eguchi K, Miyashita H, Takekawa T, Tabara Y, Tomiyama H, Dohi Y, Hashimoto J, Ohkubo T, Ohta Y, Hirooka Y, Kohara K, Ito S, Kawano Y, Sunagawa K, Suzuki H, Imai Y, Kario K, Takazawa K, Yamashina A, Shimada K; ABC-J II Investigator Group. High central blood pressure is associated with incident cardiovascular events in treated hypertensives: the ABC-J II Study. *Hypertens Res*. 2018 Nov;41(11):947-956

Takekawa T, Kawai Y, Amano T. Immune checkpoint therapy in proteinuric kidney disease. *Eur J Cancer*. 2018 May;95:120-122.

Takekawa T, Suzuki H, Eguchi K, Miyashita H, Shimada K; ABC-J II study group. Elevated pulse amplification in hypertensive patients with advanced kidney disease. *Hypertens Res*. 2018 Apr;41(4):299-307.

Kurosaki Y, Imoto A, Kawakami F, Yokoba M, Takekawa T, Ichikawa T, Katagiri M, Ishii N. Oxidative stress increases megalin expression in the renal proximal tubules during the normoalbuminuric stage of diabetes mellitus. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018 Mar 1;314(3):F462-F470.

Takekawa T, Ohno Y, Suzuki H. Impacts of sodium-glucose co-transporter type 2 inhibitors on central blood pressure. *Diab Vasc Dis Res*. 2018 Mar;15(2):154-157

Ohno Y, Kanno Y, Takekawa T. Letter regarding "Estimated aortic blood pressure based on radial artery tonometry underestimates directly measured aortic blood pressure in patients with advancing chronic kidney disease staging and increasing arterial stiffness". *Kidney Int*. 2017 Mar;91(3):757

Takekawa T, Kishimoto M, Ohta M, Tomonaga O, Suzuki H. Sodium-glucose co-transporter type 2 inhibitors reduce evening home blood pressure in type 2 diabetes with nephropathy. *Diab Vasc Dis Res*. 2017 May;14(3):258-261.

Takekawa T, Inoue T, Miyazaki T, Kobori H, Nishiyama A, Ishii N, Hayashi M, Suzuki H. Klotho suppresses the renin-angiotensin system in adriamycin nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2017 May 1;32(5):791-800.

Ohno Y, Kanno Y, Takekawa T. Central blood pressure and chronic kidney disease. *World J Nephrol*. 2016 Jan 6;5(1):90-100.

Takenaka T, Ohno Y, Suzuki H. Kidney resistive index relates to variations of home blood pressure in chronic kidney diseases. Clin Exp Hypertens. 2016;38(8):751-756.
Ohno Y, Shibasaki S, Araki R, Miyazaki T, Sato M, Takahashi S, Suwa E, Takenaka T, Suzuki H. Lifestyle Modifications Versus Antihypertensive Medications in Reducing Cardiovascular Events in an Aging Society: A Success Rate-oriented Simulation. Intern Med. 2016;55(16):2185-95.
Takenaka T, Inoue T, Miyazaki T, Hayashi M, Suzuki H. Xenon-Klotho Inhibits Parathyroid Hormone Signaling. J Bone Miner Res. 2016 Feb;31(2):455-62.

[学会発表](計 17 件)

2018年8月25日 第58回日本臨床化学会年次学術集会 腎症発症前の糖尿病ラットにおけるミトコンドリアタンパク質の尿中排泄について 小島 肇, 池永 秀樹, 小寺 義男, 井本 明美, 黒崎 祥史, 土筆 智晶, 小幡 進, 鈴木 英明, 横場 正典, 市川 尊文, 竹中 恒夫, 片桐 真人, 石井 直仁 愛知県/名古屋市 名古屋国際会議場
2018年8月26日 第58回日本臨床化学会年次学術集会 腎症発症前の糖尿病ラットにおけるミトコンドリアタンパク質の尿中排泄について 小島 肇, 池永 秀樹, 小寺 義男, 井本 明美, 黒崎 祥史, 土筆 智晶, 小幡 進, 鈴木 英明, 横場 正典, 市川 尊文, 竹中 恒夫, 片桐 真人, 石井 直仁 愛知県/名古屋市 名古屋国際会議場
2018年6月8日 第61回日本腎臓学会学術集会 遺伝的高血圧動物においてクロト蛋白補充は髄質線維化を抑制し圧利尿を改善する 竹中 恒夫, 小堀 弘幸, 井上 勉, 宮崎 孝, 鈴木 洋通, 西山 成, 石井 直仁, 林 松彦 新潟/新潟 朱雀メッセ
2018年5月19日 第7回臨床高血圧フォーラム 遺伝的高血圧モデルでクロト蛋白補充は髄質の線維化と圧利尿を改善する 竹中 恒夫, 小堀 浩幸, 井上 勉, 宮崎 孝, 鈴木 洋通, 西山 成, 石井 直仁, 林 松彦 京都/京都 みやこめっせ
2018年9月15日 第41回日本高血圧学会総会 2型ナトリウム依存性グルコーストランスporter阻害薬の中心血圧に対する効果 竹中恒夫, 大野洋一, 鈴木洋通 旭川/北海道 旭川市民文化会館
2018年6月10日 28th European meeting on hypertension and cardiovascular protection Klotho supplementation attenuates blood pressure and cyst growth in mouse polycystic kidney disease T. Takenaka, H. Kobori, T. Miyazaki, H. Suzuki, A. Nishiyama, N. Ishii, M. Hayashi. Barcelona/Spain Fira Gran Via - Hall 8.
竹中恒夫, 井上勉, 宮崎孝, 西山成, 石井直仁, 小堀浩幸, 鈴木洋通, 林松彦 クロト蛋白補充はアドリアマイシン腎症においてレニン-アンジオテンシン系を抑制する 第60回日本腎臓学会学術総会 仙台国際センター 仙台 2017/5/27
Kurosaki Y, Imoto A, Yokoba M, Takenaka T, Katagiri M, Ichikawa T, Ishii N. Oxidative stress increases megalin expression through PI3K/AKT signaling in renal proximal tubular cells. 54th ERA-EDTA congress, North Congress Center Madrid 6/5/2017
Takenaka T, Kobori H, Inoue T, Miyazaki T, Suzuki H, Nishiyama A, Ishii N, Hayashi M. Klotho ameliorates medullary fibrosis and pressure natriuresis in hypertensive rat kidneys. AHA Council on Hypertension 2017 Scientific Sessions Hyatt Regency San Francisco 2017/9/15
市岡匡睦, 井本明美, 黒崎祥史, 土筆智晶, 横場正典, 小寺義男, 池永秀樹, 竹中恒夫, 市川尊文, 片桐真人, 石井直仁 腎症発症前の糖尿病ラット腎皮質におけるオートファジーに対する酸化ストレスの影響 第57回日本臨床化学会年次学術集会 北海道大学 クラーク会館 札幌 2017/10/7
井本明美, 黒崎祥史, Wolf Alexander M, 横場正典, 竹中恒夫, 片桐真人, 石井直仁 近位尿細管上皮細胞においてグルコースおよびアルブミン負荷がミトコンドリア機能低下を誘発する 第57回日本臨床化学会年次学術集会 北海道大学 クラーク会館 札幌 2017/10/7
Takenaka T, Suzuki H, Eguchi K, Miyashita H and Shimada K. Elevated pulse amplification in advanced kidney diseases American Society of Nephrology Kidney Week 2017 Ernest N. Morial Convention Center New Orleans 2017/11/4
Takenaka T, Inoue T, Miyazaki T, Hayashi M, Suzuki H. Klotho Suppresses Renal Angiotensin by Inhibiting Wnt Signaling in Adriamycin Nephropathy. ヨーロッパ腎臓学会 Austria Center Vienna オーストリア, ウィーン 2016/5/20
竹中恒夫, 井上勉, 宮崎孝, 林松彦, 鈴木洋通 クロトは副甲状腺ホルモンの伝達を阻害する日本腎臓学会 パシフィコ横浜 神奈川/横浜 2016/6/18
竹中恒夫 International Symposium: What does FGF23 do on hemodialysis patients? 日本透析医学会 大阪国際会議場 大阪/大阪 2016/6/11
竹中恒夫, 岸本美也子 ナトリウム依存性グルコーストランスporter阻害薬の糖尿病性腎症に対する効果 日本高血圧学会 仙台国際センター 仙台/宮城 2016/10/1
Eguchi K, Takenaka T, Shimada K. Central blood pressure predicts incident

cardiovascular events in treated hypertensives. 日本循環器学会 金沢都ホテル 金
沢 / 石川 2017/3/18

〔図書〕(計 2 件)

竹中恒夫 やさしい臨床医学テキスト(第4版) 腎泌尿器生殖器 246-263 分担 薬事
日報社 2018

Takenaka T Pathophysiology and pharmacotherapy of cardiovascular disease Calcium
channel blockers in the treatment of hypertension 807-822 Springer 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称:カルシミメティクスを有効成分として含む klotho または FGF23 に関する疾患の予防また
は治療薬

発明者:竹中恒夫

権利者:学校法人埼玉医科大学・キリンファーマ株式会社

種類:特願

番号:229880

出願年:2008

国内外の別:国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名:西山 成、小堀 弘幸、宮崎 孝、井上 勉、石井 直仁、林 松彦、鈴木
洋通

ローマ字氏名:Akira Nishiyama, Hiroyuki Kobori, Takeshi Miyazaki, Tsutomu Inoue, Naohito
Ishii, Matsuhiko Hayashi, Hiromichi Suzuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。