

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590968
 研究課題名（和文）腎不全病態形成上の klotho の意義の解明と
 治療応用の可能性の検討
 研究課題名（英文）The role of klotho in progression of renal insufficiency
 and the possibility of the treatment application of klotho
 研究代表者
 佐藤 稔 (SATO MINORU)
 川崎医科大学・医学部・講師
 研究者番号：70449891

研究成果の概要：腎不全の病態進行とともに Klotho 遺伝子発現、Klotho 蛋白発現が低下していることを明らかとした。また、Klotho 蛋白の過剰発現により酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害を低減し、アポトーシスによる尿細管細胞脱落を抑制し、腎保護的に働くことを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎機能低下による慢性腎不全の主たる病態は、尿毒症性毒素の蓄積、体液恒常性の破綻、およびエリスロポエチン等の腎由来内因性物質の減少ないし欠乏が挙げられる。

Klotho 遺伝子は分子量約 130kD の一回膜貫通蛋白をコードしており、細胞外ドメインと細胞内ドメインを併せ持つ。この遺伝子を欠損するマウスは寿命が 8-10 週と短く、中膜石灰化、内膜肥厚を特徴とする動脈硬化、皮膚の萎縮、成長障害などの表現形質は末期腎不全の病態とも重複している。さらに Klotho 遺伝子は、主として遠位尿細管で発現しており、腎障害進展に伴いその発現減少が報告されている。これらのことより Klotho 蛋白の減少

が腎不全の病態形成に重要な役割を果たしていることが推測される。

(2) Klotho 遺伝子は血管新生、酸化ストレス調節とも関係していることが示されており、腎障害の進展そのものにも関与している可能性がある。Klotho 蛋白の腎障害に対する臓器保護作用を検討した研究では、アンジオテンシン II 投与による腎障害モデルや虚血再灌流モデルにアデノウイルスを用いて Klotho 遺伝子導入することで、組織障害が軽減されることが示されている。

2. 研究の目的

腎不全の病態形成における Klotho 蛋白の果たす役割を明らかにすること、および

Klotho 蛋白が腎疾患治療に有用か否かの検討を *in vivo*、*in vitro* の両面から行うことを本研究の目的とする。

(1) 慢性腎機能障害に伴う、Klotho 遺伝子・Klotho 蛋白発現量の検証

野生型マウスを用い、5/6 腎摘モデルおよびアデニン誘発腎不全モデルを作成し、Klotho 遺伝子発現・Klotho 蛋白発現の変化を検証する。

(2) Klotho 蛋白過剰発現による腎不全病変への影響の検討

Klotho 蛋白の腎保護作用を検討するため、Klotho 遺伝子過剰発現マウスに各種慢性腎不全モデルを作成する。また、Klotho 遺伝子過剰発現マウスと ICGN マウスを交配し、Klotho 遺伝子過剰発現の ICGN マウスを作成し、Klotho 蛋白発現増加が腎障害・腎不全病態形成へ及ぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) 慢性腎機能障害に伴う、Klotho 遺伝子・Klotho 蛋白発現量の検証

C57BL/6 マウスを用い、5/6 腎摘モデルおよび、アデニン誘発腎不全モデル (0.75% アデニン含有食餌摂取により作成) を作成する。5/6 腎摘モデルは 12 週後に、アデニン誘発腎不全モデルは 3 週後に腎臓を摘出し、Western blot 法にて Klotho 蛋白発現を、quantitative Real-time PCR 法にて Klotho 遺伝子発現を検証する。ICGN マウスは ICR マウスを比較対照群とし、10 週、20 週、30 週、40 週時点で経時的に腎臓を摘出する。腎不全に至る病理組織学的変化 (糸球体障害、尿細管障害)、生理学的指標 (蛋白尿・アルブミン尿量、血清クレアチニン値、血清尿素窒素値) を評価し、Klotho 蛋白発現、ならびに *klotho* 遺伝子発現の変化を検証する。

(2) Klotho 蛋白過剰発現による腎不全病変への影響の検討

Klotho 遺伝子過剰発現マウスと ICGN マウスを交配し、Klotho 遺伝子過剰発現の ICGN マウスを作成する。Litter mate の ICGN マウス、Klotho 遺伝子過剰発現マウスを対照群として、40 週間飼育し、腎臓を摘出する。生存率、糸球体・尿細管間質の病理組織学的変化 (PAS 染色)、ミトコンドリア障害 (電子顕微鏡像、生体チトクローム c 活性染色)、活性酸素産生 (ジハイドロエチジウム染色)、酸化ストレス (4-ヒドロキシ-2-ノネナル染色)、尿中 8-ヒドロキシデオキシグアノシン排泄) アポトーシス (TUNEL 染色、Bax 遺伝子発現) の評価を行う。

4. 研究成果

(1) 慢性腎機能障害に伴う *klotho* 遺伝子・Klotho 蛋白発現量の変化

①5/6 腎摘モデル

5/6 腎摘後 12 週間で血清クレアチニン値、血清尿素窒素値は有意に増加していた (クレアチニン; 0.09 mg/dl vs 0.28 mg/dl, 尿素窒素; 16 mg/dl vs 48 mg/dl)。尿蛋白も正常マウスに比較し、有意に増加していた (1.5 mg/g クレアチニン)。腎組織は糸球体硬化、尿細管萎縮などの腎不全に特徴的な組織を呈していた。このとき、Klotho 蛋白発現は正常マウスに比較し、約 20% に低下していた。Real-time PCR で測定した mRNA 発現も同様に約 20% に低下していた (図 1)。

②アデニン誘発腎不全モデル

0.75% アデニン含有食餌摂取後 3 週間で血清クレアチニン値、血清尿素窒素値は有意に増加していた (クレアチニン; 0.25 mg/dl, 尿素窒素; 49 mg/dl)。尿蛋白も正常マウスに比較し、有意に増加していた (1.5 mg/g クレアチニン)。腎組織は尿細管腔への硝子化円柱の蓄積、尿細管萎縮、炎症性細胞浸潤などの間質性腎障害に由来する慢性腎不全に特徴的な組織を呈した。このとき、Klotho 蛋白発現は正常マウスに比較し、約 10% に低下していた。Real-time PCR で測定した mRNA 発現も同様に約 15% に低下していた (図 1)。

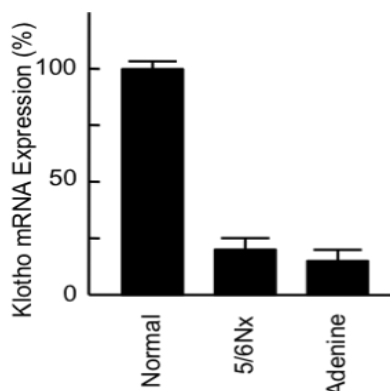


図 1. 腎不全病態における *klotho* mRNA 発現の変化

③ICGN マウス

ICR マウスでは 40 週まで血清クレアチニン値の上昇は認めなかった。ICGN マウスは 10 週、20 週、30 週、40 週と加齢に伴い、血清クレアチニン値は上昇していった (10 週; 0.09 mg/dl, 20 週 0.15 mg/dl, 30 週 0.19 mg/dl, 40 週 0.29 mg/dl)。病理学的にも、30 週時点で糸球体硬化、尿細管萎縮、間質線維化などを呈していた。Klotho 蛋白発現は正常マウスに比較し、約 30 週時点で約 20% に低下していた。mRNA 発現も同様に週齢と共に低下していた (図 2)。

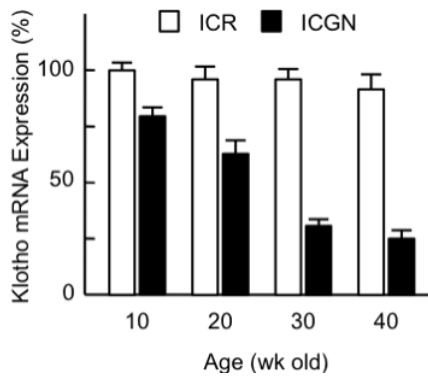


図2. ICGN マウスの klotho mRNA 発現変化

(2) Klotho 蛋白過剰発現による腎不全病変への影響の検討

①腎機能変化

40 週齢 ICGN マウスの血清尿素窒素値は ICR マウスに比較し、有意に増加していた (ICGN; 63.4 mg/dl, ICR; 25.3 mg/dl)。蛋白尿も ICGN マウスでは増加していた (ICGN; 52.6 mg/day, ICR; 5.3 mg/day)。これに比較して Klotho 遺伝子を過剰発現した ICGN マウスでは、尿素窒素値 (34.3 mg/dl)、尿中蛋白排泄量 (22.5 mg/day) は有意に低下していた。

②生存率

40 週までに ICGN 群では、28 匹中 16 匹が死亡した。一方、Klotho 過剰発現 ICGN 群では、28 匹中 8 匹が死亡した。生存率は ICGN 群で 30%だったが、Klotho 過剰発現 ICGN 群では 70%に改善していた (図 3)。

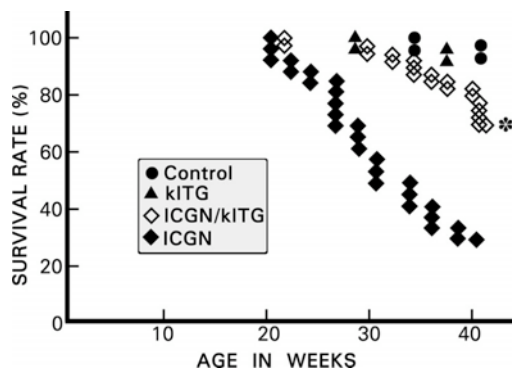


図3. 生存曲線

③組織学的変化

40 週齢時点で正常マウス (図 4 A)、Klotho 過剰発現マウス (図 4 B) とともに糸球体、間質へ組織学的異常を認めなかった。ICGN マウスでは糸球体のメサンギウム細胞増殖、基質増加を認め、間質の尿細管萎縮、炎症細胞浸潤、間質線維化を認めた (図 4C)。これらはいずれも Klotho 過剰発現 ICGN マウスでは軽減していた (図 4D)。

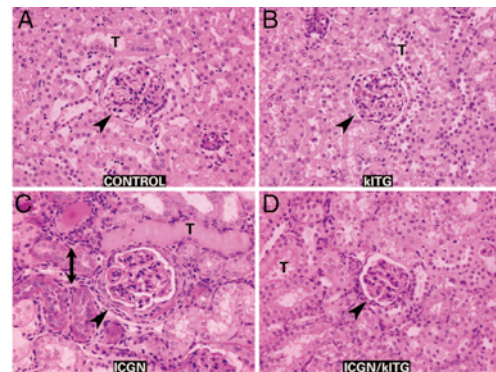


図4. 腎組織像 (PAS 染色)

④ミトコンドリア形態変化・機能変化

尿細管のミトコンドリア電子顕微鏡像では ICGN 群のミトコンドリアはクリステは保たれているものの (図 5A 矢印)、小型化していた。Klotho 過剰発現 ICGN 群のミトコンドリアは大きさが正常に保たれていた (図 5B)。

ミトコンドリア機能の一つであるチトクローム c oxidase activity は正常マウス (図 4C)、Klotho 過剰発現マウス (図 5D) に比較し、ICGN マウスでは有意に低下していた (図 5E)。Klotho 過剰発現 ICGN マウスでは、この活性が改善していた (図 5F)。陽性面積を定量したところ、ICGN マウスでは ICR マウスの約 30%に低下していたが、Klotho 過剰発現 ICGN マウスでは 80%に改善していた (図 5G)。

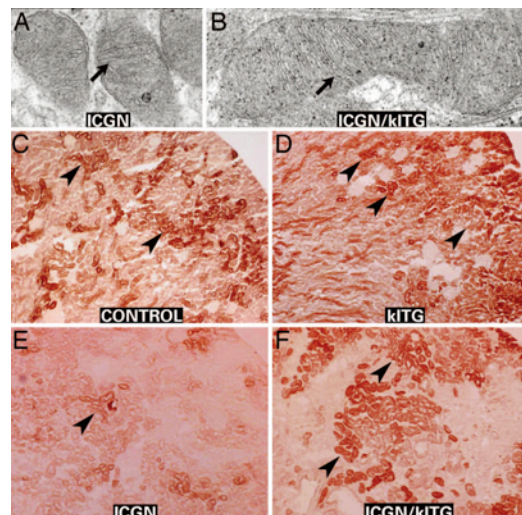


図5. ミトコンドリアの形態と機能

⑤活性酸素産生・酸化ストレス・組織アポトーシス

組織活性酸素産生はジハイドロエチジウム染色にて定量した。ICGN マウス腎尿細管では強い活性酸素産生が認められた (図 6A) が、Klotho 過剰発現 ICGN マウスでは低下していた (図 6B)。

過酸化脂質である 4-ヒドロキシ-2-ノネナールの免疫染色でも同様に。ICGN マウス腎尿細管では染色が認められた (図 6C) が、Klotho 過剰発現 ICGN マウスでは低下していた (図 6D)。DNA の酸化ストレスマーカーである 8-ヒドロキシデオキシグアノシンの尿中排泄量は、ICGN マウスでは ICR マウスと比較し有意に増加していたが、Klotho 過剰発現 ICGN マウスでは ICR マウスと同レベルまで減少していた。

組織中のアポトーシスは TUNEL 染色にて検討した。TUNEL 陽性細胞は ICGN マウスで有意に増加しており、Klotho 過剰発現 ICGN マウスでは増加が認められなかった (図 6F)。また、Bax 遺伝子発現は ICGN マウスで ICR マウスと比較し、1.6 倍増加していたが、Klotho 過剰発現 ICGN マウスでは ICR マウスと同レベルに低下していた。

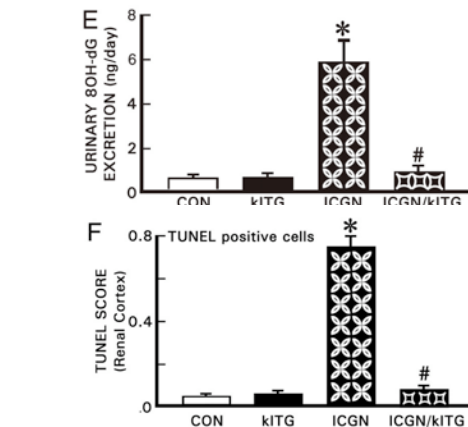
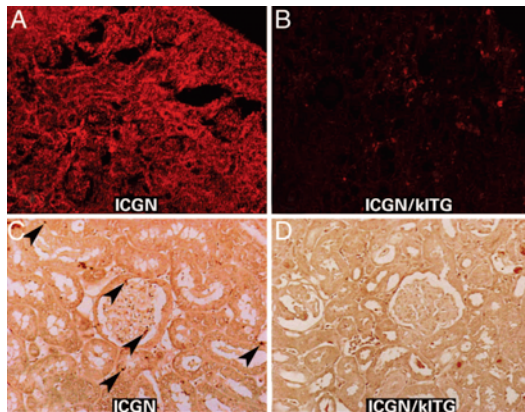


図 6. 活性酸素産生・酸化ストレス・組織アポトーシス

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Haruna Y, Kashihara N, Satoh M, et al. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. Proc Natl Acad Sci USA. 104;2331-2336, 2007. 査読有.
- ② 佐藤稔, 柏原直樹. 腎の老化と RAS. Angiotensin Research. 5;37-41, 2008. 査読無.

[図書] (計 3 件)

- ① 春名克祐, 佐藤稔, 富田奈留也, 柏原直樹. Annual Review 2007 腎臓, Basic Nephrology. 進行性腎障害における klotho 遺伝子の関与. 中外医学社, 24-28, 2007.
- ② 柏原直樹, 佐藤稔, 駒井則夫, 富田奈留也. Life Style Medicine, アンチエイジングに迫る, 慢性腎臓病からアンチエイジングを探る. 先端医学社, 1:54-60, 2007.
- ③ 柏原直樹, 佐藤稔. 医学のあゆみ, 尿細管間質障害, 老化と尿細管間質障害-klotho 蛋白の関与. 医歯薬出版, 225:311-315, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 稔 (SATO MINORU)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70449891

(2) 研究分担者

守田 吉孝 (MORITA YOSHITAKA)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50346441

(3) 連携研究者

なし