

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：35303  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21591046  
 研究課題名（和文） 抗老化遺伝子 klotho の Wnt シグナル抑制を介した  
 腎線維化抑制機構の解明  
 研究課題名（英文） Anti-fibrotic effects of klotho  
 through the inhibition of Wnt signaling  
 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（和文）：腎臓は線維化して次第に腎不全に進行していく。腎臓から分泌されている Klotho 蛋白は線維化を促進させる Wnt シグナルを抑制することで線維化、腎不全への進行を抑制する。加齢とともに腎臓だけでなく組織の線維化は進行し、臓器機能低下につながるが、Klotho は腎臓のみならず、全身の線維化を抑制し、抗老化に働いている可能性がある。腎臓の働きを守ることは老化の予防につながるのである。

研究成果の概要（英文）：The kidney increases fibrotic changes with aging and gradually progresses to chronic renal failure. The Klotho protein secreted by kidney attenuates fibrosis, progress to renal dysfunction by inhibiting Wnt signal promoting fibrosis. Organ fibrotic changes progresses as well as kidney with aging and leads to organ functional decline with aging. But Klotho may restrain fibrosis of not only the kidney but also the other organs and may work for anti-aging. To keep the renal function normally may lead to the prevention of the aging.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
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

腎臓では加齢に伴った腎機能低下が、腎硬化症および分子生物学的変化を伴って認められる。近年の人口高齢化に伴い、このような腎硬化症患者は増加の一途をたどっており、高齢者の透析患者増加が医療経済面からも深刻な課題となりつつある。さらに軽微な腎障害や検尿異常で定義づけられる慢性腎臓病 CKD が、強力な心血管病 CVD の危険因子であることが判明している。本邦では一般住

民の約 10% が CKD に該当し、高齢化が CKD 増加に寄与していることが明らかとなった。高齢者の QOL を維持し健康加齢を達成するためには、加齢による腎機能低下のメカニズムを明らかにし、CVD 及び慢性腎不全の予防及び治療戦略を立案することが重要となる。加齢に伴う進行性腎障害の責任病変の主体は腎臓尿細管間質の線維化である。腎臓尿細管間質の線維化は腎不全への Final common pathway であり、線維化進行抑制は腎機能の

保護につながるものである。加齢による組織線維化は腎臓のみならず、様々な臓器において認められる。高齢マウスの骨格筋では筋肉の一部が繊維組織に置き換わっている。高齢マウスでは、骨格筋が筋原性形質から線維形成性形質への形質変換が生じ、線維組織への変換が生じている。Brackらは、この転換がWntシグナル伝達経路の活性化と関連しており、Wnt阻害剤によって抑制されること、ならびにWnt受容体であるFrizzled蛋白質ファミリーに結合する高齢マウス血清成分が、Wntシグナル伝達亢進の原因と考えられることを明らかとした。この結果は、加齢に伴う組織線維化の増加において、Wntシグナル伝達経路が重要な役割を果たしている可能性を示している。腎臓線維化モデルである尿管結紮モデルを用いた実験では、Wntは腎臓線維化過程においても活性化することが報告されている。一方、Liuらは、挿入突然変異によって早期老化症状を呈するマウス系統であるKlotho変異マウスを用い、抗老化蛋白であるKlothoがWntと直接結合してWnt活性を抑制することを報告した。Klotho変異マウスでは、Klotho蛋白減少のため、Wntのシグナルが増強し、細胞レベルでSenescenceが促進され、組織では線維化や皮膚の肥厚が生じることを明らかとした。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。この遺伝子の変異マウスは寿命が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. 研究の目的

我々は「Klotho蛋白は腎臓線維化過程において、Wnt-signal系抑制によりEMTを抑制し、線維化抑制に働き、腎保護作用を発揮する」との仮説を立てるに至った。EMTは尿管結紮初期過程において必須であり、線維化抑制の機序を考える上で検討する必要があると考えた。本仮説検証のため、具体的には以下の項目の解明を目的に本研究を行った。

(1) 間質線維化とWntシグナルの連関の検討：尿管結紮過程において、Wntシグナル活性化が如何に変化しているかを検討した。

(2) Klotho蛋白発現量低下による尿管結紮過程での影響の検討：Klothoヘテロ変異マウスを用い、Klotho蛋白発現量が尿管結紮過程へ及ぼす影響を検討した。同時にWntシグナル活

性化に、Klotho蛋白発現量が影響を与えているのかを検討した。

(3) Klotho蛋白発現量増加による尿管結紮過程での影響の検討：Klotho過剰発現マウスを用い、Klotho蛋白発現量が尿管結紮過程へ及ぼす影響を検討した。またin vivoでマウスへKlotho発現plasmidの遺伝子導入を行い、Klotho過剰発現によりWnt活性化シグナル抑制、尿管結紮抑制が生じるのかを検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 尿管内Wntシグナル活性化部位を特定するために、WntレポーターマウスであるBAT LacZ miceとKlotho過剰発現マウス(KLTG)を掛け合わせたマウスを用い、尿管結紮モデルである尿管結紮モデル(UUO)を作成した。作成後1週、2週後にSacrificeを行い、以下の検討を行った。Wntシグナル活性化の検討はWestern blotting法にてbeta-catenin発現量を検討した。尿管内Wntシグナル活性化部位を特定するために、マウスの尿管組織はLacZ染色、およびLacZ活性測定を行った。Masson染色、Realtime PCR (CTGF、TGF-beta、type III collagen)にて線維化の検討を行った。

(2) Klothoヘテロマウス(KL-hetero)にUUO手術を施行し、14日後に屠殺し組織を検討した。KL-heteroにはKlotho発現plasmidの尿管内遺伝子導入を行い、尿管結紮過程での影響を検討した。Masson染色、CTGF、TGF-beta、type III collagen発現にて線維化の検討を行った。Wnt-signalはWnt-inducible geneのT cell factor 1、c-myc、WNT1-inducible signaling protein 1、fibronectin発現、及びbeta-catenin、fibronectinのWestern blot解析にて検討した。

## 4. 研究成果

(1) UUO後、野生型マウス(WT)では、尿管結紮でWnt/beta-catenin活性化(LacZ染色陽性)が増加した(図1)。beta-Galactosidase活性で測定したWnt活性も増加し、beta-catenin発現量も増加していた(図2)。

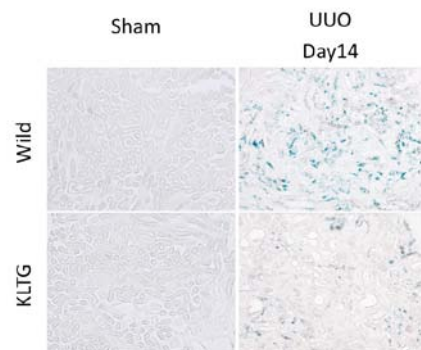


図1. 尿管結紮過程での尿管 Wnt 活性化部位

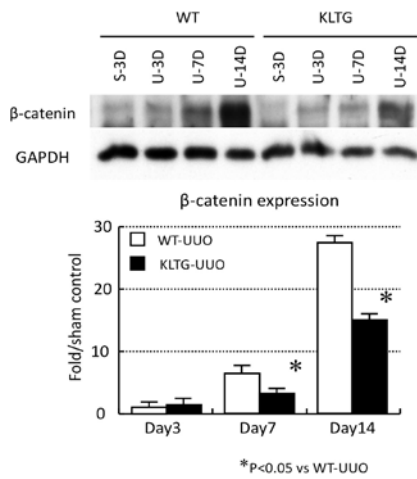


図 2. 尿管結紮後の beta-catenin 発現量

腎重量/体重比は UUO14 日後で Wild-UUO に比較し、KL-TG-UUO で有意に低下が抑制されていた。線維化部位は Wild-UUO に比較し、KL-TG-UUO で有意に低下していた (図 3)。

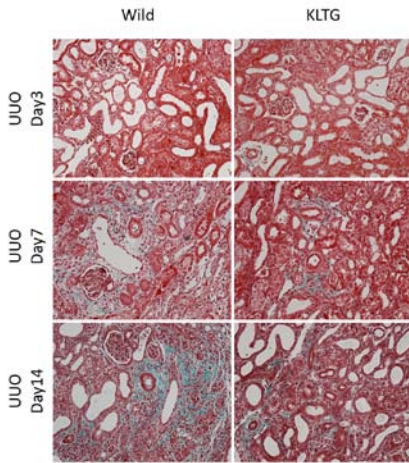


図 3. 尿管結紮後の組織線維化

Masson 染色での線維化面積定量、TGF-beta、type III collagen、CTGF の mRNA 発現のいずれも KL-TG-UUO で有意に抑制されていた (図 4)。

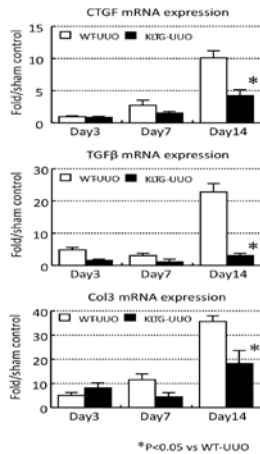


図 4. 尿管結紮後の線維化関連遺伝子発現

alpha-SMA、Vimentin 陽性面積、蛋白発現ともに KL-TG-UUO で有意に抑制されていた。Wnt-signal、Wnt-inducible gene の mRNA 発現ともに、KL-TG-UUO で有意に抑制されていた。

(2) 腎重量/体重比は UUO14 日後で Wild-UUO に比較し、KL-hetero-UUO で有意に低下していた。Masson 染色での線維化も KL-hetero-UUO で有意に低下していた (図 5)。

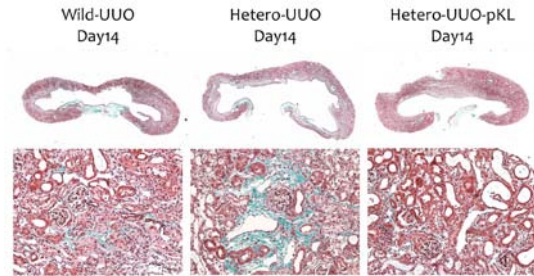


図 5. Klotho ヘテロマウス尿管結紮後の組織線維化と Klotho 外因性投与の効果

Beta-catenin 発現量も増加していた。TGF-beta、type III collagen、CTGF の mRNA 発現のいずれも KL-hetero-UUO で有意に増加していた。Wnt-signal、Wnt-inducible gene の mRNA 発現ともに、KL-hetero-UUO で有意に増加していた (図 6)。

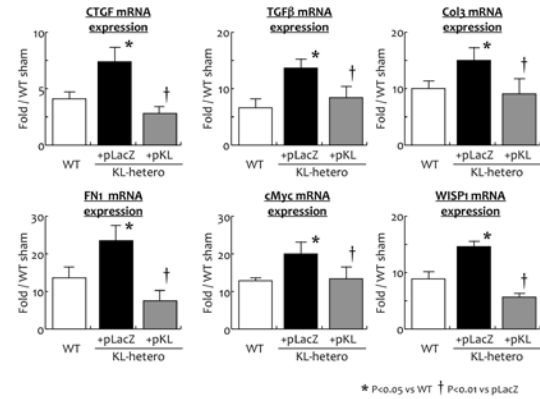


図 6. Klotho ヘテロマウス尿管結紮後の遺伝子発現変化と Klotho 外因性投与の効果

Klotho 発現 plasmid 遺伝子導入により、これらの変化は抑制されていた (図 5、図 6)。

本研究の結果を図にまとめる (図 7)。Wnt 刺激により活性化された beta-catenin は各種の線維化関連遺伝子を活性化し、腎線維化を促進させる。Klotho 蛋白はこの活性化を抑制することで線維化を抑制する。Klotho 蛋白にはこの Wnt 抑制機序以外にも TGF-beta 受容体と TGF-beta の結合を阻害する働きがあるこ

とも報告されており、両者の効果により線維化を抑制しているのであろうと考えられる。

Klotho 蛋白は腎線維化過程において、Wnt-signal 系抑制により線維化を抑制し腎保護作用を發揮することが明らかとなった。

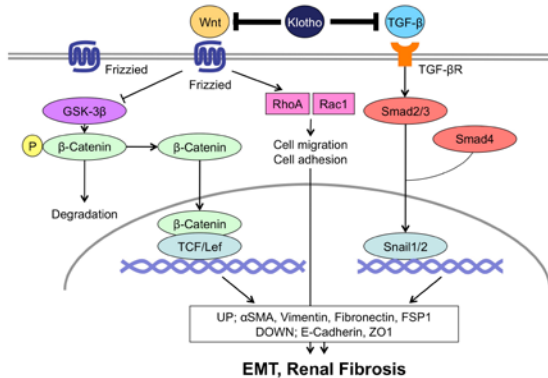


図 7. Klotho 蛋白による腎線維化抑制機序

## 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 3 件)

- (1) Klotho と Wnt シグナリング. 佐藤稔、柏原直樹. 腎と透析. 72(3); 325-329, 2012.
- (2) 腎老化とバイオマーカー. 佐藤稔、柏原直樹. Anti-aging Science. 3(2); 170-174, 2011.
- (3) Overexpression of klotho protein modulates uninephrectomy-induced compensatory renal hypertrophy by suppressing IGF-I signals. Nagasu H, Satoh M, Kuwabara A, Yorimitsu D, Kidokoro K, Nishi Y, Tomita N, Sasaki T, Kashihara N. Biochemical and biophysical research communications. 407(1); 39-43, 2011.

[学会発表] (計 7 件)

- (1) Satoh M, et al. 2011.11.10 American Society of Nephrology Kidney Week 2011 (Philadelphia, USA). Mouse renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction is reduced by Klotho protein overexpression through Wnt signaling inhibition.
- (2) 柏原直樹. 2010.9.25 第 40 回日本腎臓学会 東部学術大会シンポジウム (栃木) 慢性腎臓病と Klotho -腎性老化仮説-
- (3) 佐藤稔、他. 2010.6.17 第 53 回日本腎臓学会学術総会 (神戸). Klotho 過剰発現マウスは Wnt シグナル抑制により尿管結紮による腎線維化が減弱する.
- (4) 佐藤稔. 2010.6.17 第 53 回日本腎臓学会学術総会ワークショップ (神戸). Wnt/beta-catenin/TCF シグナルと腎線維化.
- (5) Satoh M, et al. 2010.4.17 ISN-Nexus

Symposium 2010 (Kyoto, Japan). Klotho overexpression attenuates renal fibrosis after unilateral obstruction by Wnt signaling inhibition.

(6) Satoh M, et al. 2010.4.1 The 14th Scientific Session of the Society of Cardiovascular Endocrinology and Metabolism (Nara, Japan).

Renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction was reduced by over expression of klotho via Wnt signaling inhibition.

(7) Satoh M, et al. 2009.10.29 American Society of Nephrology Kidney Week 2009 (San Diego, USA). Alpha-klotho attenuates renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction through inhibition of Wnt signaling.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]  
なし

[その他]  
なし

## 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

柏原 直樹 (KASHIHARA NAOKI)  
川崎医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10233701  
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