

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591208

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症病態形成におけるクロトー遺伝子の抗アポトーシス機序の解明

研究課題名(英文) Cytoprotective actions of Klotho in oxidative damages of proximal tubular epithelial cells caused by high glucose

研究代表者

春名 克祐 (Yoshisuke, Haruna)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：40341094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：自然発症インスリン分泌不全型糖尿病モデルであるAkitaマウス(Akita)とKlotho(KL)過剰発現マウス(KLTG)を交配し実験に用いた。20週齢でのアルブミン尿、腎組織、腎カルパイン活性を比較検討した。Akitaは20週齢で有意なアルブミン尿が出現した。Akita/KLTG群では有意に抑制された。糸球体内PAS陽性面積もAkita/KLTG群ではAkita群に比較し有意に抑制された。KLはカルパイン活性化を抑制し、糖尿病によるアルブミン尿を抑制する。Recombinant分泌型KLが使用可能であれば、糖尿病性腎症治療に対してKL補充療法が有効と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We used Klotho overexpressing mice and Akita mice(a spontaneous insulin secretion deficiency diabetes model) in this experiment were. At 20 weeks of age, we compared albuminuria renal tissue, kidney calpain activity. Albuminuria appeared at 20 weeks of age Akita mice, but it was significantly inhibited by Klotho overexpression. Glomerular injury was significantly suppressed compared to Akita mouse. Klotho inhibits the calpain activation, and inhibits albuminuria by diabetes. Klotho replacement therapy is effective against diabetic nephropathy treatment.

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

*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 (Kuro-o M, et al. Nature. 390:45-51, 1997)。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。申請者は抗老化遺伝子とされる *klotho* 遺伝子について、その発見・発表時より慢性腎疾患との関連に着目しており、上記の Klotho 蛋白の様々な臓器保護作用の報告をふまえ、申請研究課題への着想へと繋がった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病性腎症の病態形成における Klotho 蛋白の役割を明らかにし腎症の新規治療法立案に資することにある。

### 3. 研究の方法

1. 糖尿病性腎症進行に伴う、*klotho* 遺伝子・Klotho 蛋白発現量の検証 (春名・柏原) 使用動物; C57BL/6 マウス (日本チャールズリバーより購入予定) を用いる。  
モデルおよび検討時期; STZ 投与により 1 型糖尿病モデルを作成する (AMDCC. J Am Soc Nephrol. 16(1):27-45, 2005)。24 週後に Sacrifice を行い腎臓を摘出し、以下の検討を行う。  
検討項目; 糖尿病性腎症に至る病理組織学的変化を検討する。糸球体障害は PAS 染色で、糸球体硬化度を算出する。尿細管障害は Masson 染色を用い、画像解析ソフト Win-roof を用い算出する。また生理学的指標 (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) を用い、機能的な腎障害の進行をを評価する。Western blot 法にて Klotho 蛋白発現を、Northern blot 法にて *klotho* 遺伝子発現を検証する。

研究体制; 動物実験は申請者である春名を中心に研究協力者 (大学院生) の長洲、城所の協力の下行う。研究データの解析は研究分担者である柏原が行う。

2. Klotho 蛋白発現低下による糖尿病性腎症進展への影響の検討 (春名・佐藤・柏原) 使用動物; *klotho* 遺伝子ヘテロ欠損マウス (日本 SLC より購入予定) および対照群として C57BL/6 マウス (日本チャールズリバーより購入予定) を用いる。

モデルおよび検討時期; 上記 1 と同様の方法で作成する。

検討項目; (a) 病理組織学的変化、腎機能変化の検討; 上記 1 と同法で蛋白尿・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する。(b) 腎組織酸化的障害の検討; 腎組織酸化的障害の評価は、尿中 8-hydroxy-deoxyguanosine を ELISA 法にて測定するとともに、抗 4-Hydroxy-2-noneal 抗体を用いて、免疫組織化学的に検出する。腎における活性酸素産生は共焦点レーザー顕微鏡を用いて検出する。4μM に薄切した凍結切片に、活性酸素の蛍光指示薬 dihydroethidium を反応させ、検出する (Haruna Y, et al Proc Natl Acad Sci U S A. 104(7):2331-6. 2007)。また、活性酸素消去系の EC-SOD、Mn-SOD、Cu/Zn-SOD について Western blot 法と Real-time PCR 法を用いてその発現量の変化を検討する。(c) ミトコンドリア障害の評価; Cytochrome c oxidase 活性染色 (Takaki A, et al. Ann N Y Acad Sci. 1011:332-8, 2004) によりミトコンドリア機能を評価する。また Long-PCR 法によりミトコンドリア DNA 障害の検出 (Mansouri A, et al. Gastroenterology. 117:181-90, 1999)

を行い、Western blot 法にてミトコンドリア融合・分裂蛋白の評価 (Mfn1, Mfn2 および Drp1, Fis1) さらに電子顕微鏡によるミトコンドリア形態変化の観察にてミトコンドリア障害の評価を行う。(d)アポトーシスの評価; TUNEL 法と Western blot 法 (Bcl-2, Bax) にて行う。

研究体制; 動物実験は申請者である春名を中心に研究分担者である佐藤並びに研究協力者(大学院生)の長洲、城所の協力の下行う。研究データの解析は研究分担者である柏原が行う。

### 3. Klotho 蛋白過剰発現による糖尿病性腎症進展への影響の検討 (春名・柏原)

#### (1) KL-TG マウスを用いた検討

使用動物およびモデルおよび検討時期;

KL-TG マウス (京都大学大学院、鍋島陽一先生、テキサス大、黒尾誠先生より供与) および C57BL/6 マウス (対照群) を使用する。上記 1 と同様の方法で 1 型糖尿病モデルを作成し、24 週後に腎臓を摘出し各検討を行う。

検討項目; 病理組織学的変化、腎機能、活性酸素産生、ミトコンドリア障害、アポトーシスなど上記 2. と同様の評価を行う。

### 4. 研究成果

当初の予定では、C57BL/6 マウス(日本チャールズリバーより購入)を用い、ストレプトゾトシン誘導 1 型糖尿病モデルマウスを作製し、検証する予定であった。このモデルは糖尿病病態解析に広く用いられている疾患モデルであり、我々の施設でもこれまでに数回の使用経験があり、作成条件は確立されていた。しかしながら予定飼育期間を過ぎても腎障害が発症しないという、想定外の問題点が発症した。その為、自然発症 1 型糖尿病モデルである AKITA マウスを用い再度検証を行うこととした。1, 糖尿病性腎症進行に伴う、klotho 遺伝子・Klotho 蛋白発現量の検証、2, Klotho 蛋白過剰発現による糖尿

病性腎症進展への影響の検討、を行った。1, 糖尿病性腎症進行に伴う、klotho 遺伝子・Klotho 蛋白発現量の検証では 30 週齢の AKITA マウスを Sacrifice し腎臓を摘出し、各検討を行う。検討項目は、(a)病理組織学的変化(b)腎組織酸化的障害の検討(c)ミトコンドリア障害の評価(d)アポトーシスの評価ならびにアポトーシス誘導因子としてのカルパイン活性の評価である。さらにアルブミン尿の改善のメカニズムとして、当初尿細管細胞の保護作用として考えていた現象が糸球体内皮細胞で生じていると考えられた。その為、高血糖に伴う内皮機能障害の改善によるアルブミン尿抑制メカニズムに着眼し、COS7 細胞に分泌型 Klotho 発現プラスミドを遺伝子導入した。ヒト糸球体内皮細胞 (hG EnC) を分泌型 Klotho 蛋白存在下もしくは非存在下で 30 mM D-Glucose 刺激を行い。細胞のカルパイン活性を測定し、比較検討した。以上の修正を加え、(1) hGEnC の高糖濃度刺激は、カルパイン活性を上昇させた。Klotho 蛋白上清添加によりこの活性上昇は抑制された。(2) Akita 糖尿病マウスは 20 週齢で WT に比較し、有意なアルブミン尿が出現した。Akita/Klotho TG 群では有意に抑制された。糸球体内 PAS 陽性面積も Akita/Klotho TG 群では Akita 群に比較し有意に抑制された

### 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 5 件)

1, Kidokoro K, Satoh M, Channon KM, Yada T, Sasaki T, Kashihara N. Maintenance of Endothelial Guanosine Triphosphate Cyclohydrolase I Ameliorates Diabetic Nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2013;24(7):1139-50. (査読あり)

2, Nishi Y, Satoh M, Nagasu H, Kadoya H, Ihoriya C, Kidokoro K, Sasaki T, Kashihara N. Selective estrogen receptor modulation attenuates proteinuria-induced renal tubular damage by modulating mitochondrial oxidative status. *Kidney Int.* 2013;83(4):662-73. (査読あり)

3, Satoh M, Kidokoro K, Ozeki M, Nagasu H, Nishi Y, Ihoriya C, Fujimoto S, Sasaki T, Kashihara N. Angiostatin production increases in response to decreased nitric oxide in aging rat kidney. *Lab Invest.* 2013;93(3):334-43. (査読あり)

4, Nagasu H, Satoh M, Fujimoto S, Tomita N, Sasaki T, Kashihara N. Azelnidipine attenuates glomerular damage in Dahl salt-sensitive rats by suppressing sympathetic nerve activity. *Hypertens Res.* 2012;35(3):348-55. (査読あり)

5, Satoh M, Nagasu H, Morita Y, Yamaguchi TP, Kanwar YS, Kashihara N. Klotho protects against mouse renal fibrosis by inhibiting Wnt signaling. *Am J Physiol Renal Physiol.* Am J Physiol Renal Physiol. 2012 Dec 15;303(12):F1641-51. (査読あり)

[学会発表](計 17 件)

1, Nuclear factor erythroid 2-like factor 2 activation by rosuvastatin reduces albuminuria in Akita diabetic mice. *IVBM2014/The 18th International Vascular Biology Meeting*  
Minoru Satoh, Chieko Ihoriya, Norio Komai, Tamaki Sasaki, Naoki Kashihara 2014/04/15  
京都市 みやこめっせ

2, Klotho 蛋白のカルパイン活性抑制作用による糖尿病性腎症アルブミン尿抑制効果第 25 回日本糖尿病性腎症研究会  
角谷裕之、佐藤 稔、春名克祐、庵谷千恵子、板野精之、佐々木環、柏原直樹 2013/12/08  
東京都文京区 東京ガーデンパレス

3, Rosuvastatin Activates Transcription Factor Nrf2 through p21cip1 Expression and Prevents Albuminuria through Preservation of Glomerular Endothelial Integrity in AKITA Diabetic Mice. *ASN 2013*  
Ihoriya C, Satoh M, Sasaki T, Kashihara N 2013/11/9  
Atlanta Georgia World Congress Center

4, 腎繊維化における Klotho の役割  
第 43 回日本腎臓学会西部学術大会  
佐藤稔、柏原直樹 2013/10/11  
松山市 松山全日空ホテル

5, Klotho 蛋白はカルパイン活性化を抑制し、糖尿病によるアルブミン尿を抑制する  
第 28 回日本糖尿病合併症学会  
角谷裕之、佐藤 稔、春名克祐、城所研吾、庵谷千恵子、板野精之、佐々木環、柏原直樹  
2013/09/14  
北海道 旭川グランドホテル

6, Klotho 蛋白による脂肪炎症改善およびインスリン抵抗性改善効果の検討  
第 56 回日本腎臓学会学術総会  
佐藤 稔、城所研吾、西 佑子、庵谷千恵子、角谷裕之、駒井則夫、佐々木環、柏原直樹  
2013/5/12  
東京 東京国際フォーラム

7, Klotho Protein Ameliorates Peritoneal Fibrosis Through The Regulation of Wnt/ -Catenin Signaling.

ISN World Congress of Nephrology 2013  
Nishi Y, Satoh M, Itano Y, Sasaki T,  
Kashihara N 2013/06/01  
Hong Kong Convention and  
Exhibition Centre

8, Klotho 蛋白は高脂肪食による脂肪炎症を  
抑制し、インスリン抵抗性を改善する  
第 16 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会  
佐藤稔、城所研吾、西佑子、庵谷千恵子、角  
谷裕之、柏原直樹 2012/11/23  
東京都 東京大学

9, Rosuvastatin Activates Transcription  
Factor Nrf2 and Protects Prevents  
Albuminuria through Preservation of the  
Glomerular Endothelial Integrity in Akita  
Diabetic Mice. ASN Kidney Week 2012  
Chieko Ihoriya,Minoru Satoh, Tamaki  
Sasaki,Naoki Kashihara 2012/11/3  
San Diego, USA

10, Tissue and Development of Insulin  
Resistance in High-Fat Induced Obese Mice.  
ASN Kidney Week 2012  
Minoru Satoh, Kengo Kidokoro, Hajime  
Nagasu, Chieko Ihoriya, Yuko  
Nishi, Hiroyuki Kadoya, Tamaki  
Sasaki, Naoki Kashihara 2012/11/2  
San Diego, USA

11, Klotho attenuates inflammation of  
adipose tissue and development of insulin  
resistance in high-fat induced obese mice.  
第 44 回日本動脈硬化学会総会・学術集会  
Minoru Satoh, kengo Kidokoro, Hajime Nagasu,  
Chieko Ihoriya, Yuko Nishi, Hiroyuki  
Kadoya, Tamaki Sasaki, Naoki Kashihara  
2012/7/20  
福岡市 ヒルトン福岡シーホーク

12, Klotho 蛋白の Wnt シグナル抑制による抗  
繊維化効果

第 12 回日本抗加齢医学会総会  
佐藤稔、佐々木環、柏原直樹  
2012/6/24  
横浜市 パシフィコ横浜

13, Klotho 蛋白による腹膜保護作用の検討  
第 57 回日本透析医学会学術集会  
西佑子、佐藤稔、藤本壮八、佐々木環、柏原  
直樹 2012/6/24  
札幌市 京王プラザホテル札幌

14, Klotho 蛋白による Wnt シグナル制御を介  
した腹膜保護作用の検討  
第 55 回日本腎臓学会学術総会  
西佑子、佐藤稔、藤本 壮八、佐々木 環、  
柏原 直樹 2012/6/2  
横浜市 パシフィコ横浜

15, Klotho 蛋白導入による腎線維化抑制効果  
の検討  
第 55 回日本腎臓学会学術総会  
佐藤 稔、佐々木 環、柏原 直樹 2012/6/2  
横浜市 パシフィコ横浜

16, Klotho Protein Reduces Mouse Renal  
Fibrosis after Unilateral Ureteral  
Obstruction through Inhibition of Wnt  
Signaling.

49th ERA-EDTA Congress  
Minoru Satoh, Hajime Nagasu, kengo  
Kidokoro, Yuko Nishi, Chieko Ihoriya,  
Hiroyuki Kadoya, Tamaki Sasaki, Naoki  
Kashihara 2012/5/26  
Paris, France (Le Palais des Congres de  
Paris)

17, Mouse Renal Fibrosis after Unilateral  
Ureteral Obstruction Is Reduced by Klotho

Protein Overexpression through Wnt  
Signaling Inhibition  
American Society of Nephrology Kidney Week  
2011

Minoru Satoh, Tamaki Sasaki, Naoki  
Kashihara

Philadelphia USA                      2011/11/10

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

春名 克祐(Yoshisuke Haruna)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 40341094

### (2)研究分担者

佐藤 稔(Minoru Satoh)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 70449891

柏原 直樹(Naoki Kashihara)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 10233701

### (3)連携研究者