

平成 29 年 5 月 3 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461243

研究課題名(和文)CKD進行、重症化過程および早期介入の標的分子としてのKlothoの意義

研究課題名(英文)Significance of Klotho as a target molecule for CKD progression, severe process and early intervention

研究代表者

土谷 健 (TSUCHIYA, KEN)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：00246472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)が進行・悪化するのには、もともとの病気に関らず腎臓の実質部分の萎縮・線維化が重要な意義を持つと推定されている。従来、腎障害では、蛋白質制限食が指示されるが、この蛋白質のリン成分が組織障害性に働くと推測される。このリンを調節するKlotho蛋白質が腎臓に発見され、その働き低下が腎障害をさらに悪化させ、今後治療対象となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is estimated that fibrosis in renal tubules / interstitia is important for progression and severity of chronic kidney disease (CKD) irrespective of the causative disease. Conventionally, in renal impairment, a protein restricted diet is indicated, but it is presumed that the phosphorus component of this protein acts in tissue disorder. Klotho protein that regulates this phosphorus was discovered, and the decline in its work further exacerbates renal impairment, suggesting the possibility of being treated in the future.

研究分野：腎臓内科

キーワード：慢性腎臓病 Klotho リン 線維化

## 1. 研究開始当初の背景

Klotho は、そのノックアウトマウスで短命、動脈石灰化、肺気腫、骨粗鬆症、高リン血症などのヒトの老化、慢性腎臓病 (CKD)、ことに透析患者と類似の表現型を示す。膜型、分泌型の二つの存在様式があり、膜型は FGF23 レセプターのコファクターとしての機能が、分泌型はカルシウムチャンネル TRPV5 への作用が指摘され、カルシウム、リン代謝、PTH、活性型ビタミン D の調節作用が明らかにされつつある。さらに最近では、Klotho family として位置付けられるようになり、homology の高い  $\beta$  Klotho が同定され、FGF19/21 との関わりにより肝、膵、脂肪組織などのネットワークにおける糖、エネルギー代謝調整因子としての作用が指摘され(参考 1)、それは CKD における全身的な代謝障害の病態も明らかにする可能性も秘めている。

一方、CKD が病態的な疾患概念として提唱されてからすでに 10 年以上が過ぎ、様々な領域に浸透し、かつ単に末期腎不全・透析への進行・進展にのみ焦点をあてるのではなく、CKD が全身臓器、特に循環・血管障害の合併、重症化に関与する病態生理であることが注目され研究されている。CKD の進展・増悪には、原因疾患に関らず、尿細管・間質部の虚血、酸化ストレス、microinflammation の惹起など、一連の病態生理から最終的に線維化が進行するとされている。この common pathway では、尿細管機能や間質部の障害による水・電解質、代謝異常、貧血などの生体の恒常性維持の慢性的な破綻が、全身的な臓器障害、循環・血管系の硬化、石灰化などを引き起こし、心腎連関などと総称される、いわゆる CKD の全体的な病態像を形成していると考えられる。

Klotho も尿細管に発現する分子であり、かつその分泌型が遠隔臓器への生理作用も報告されている。また、さまざまな生理的 potentiality を有しており、さらに FGF23-Klotho 共作用の存在は、CKD の中心的な病態であるリン代謝障害でも重要な役割を担う可能性が高い。これまでの研究で、Klotho の個々の制御や作用につき報告してきたが、今回は CKD 経過の全体像の中での Klotho 分子に着目した。研究者らは Klotho が CKD の common pathway においてより本質的な役割を演じ、CKD の stage 早期から発現

が低下し、組織障害とは悪循環を形成し、さらにリン代謝障害とあいまって CKD の病態を形成するとの仮説を立てた。また、FGF23 の血中レベルが臨床的に応用されているように、Klotho の発現レベルの変化は biomarker としての意味を持つ可能性があり、臨床応用も期待される。

## 2. 研究の目的

CKD の進行・重症化には、原因疾患に関らず尿細管・間質における線維化が重要な意義を持つと推定されている。Klotho 発現の低下はこの線維化過程と悪循環を形成し、さらにリン制御因子としての特異性が全身的な合併症を惹起する可能性が示唆されている。本研究では Klotho の、この common pathway での病態生理と早期介入、治療応用への標的分子としての意義を検討することが目的である。

## 3. 研究の方法

CKD の進展・重症化過程における Klotho の病態生理学的意義と、早期介入およびその進展阻止に関わる治療応用の可能性を検討する。研究目的に記述した、以下 2 つの目的、(1) Common pathway に関する Klotho の病態生理、意義ならびにシグナル・細胞生物学的作用の検討

(2) Functional biomarker としての Klotho の意義づけ

についてそれぞれ検討した。

### (1) について

CKD の病態が想定されるモデル動物で Klotho の発現、機能、時間的推移を検討する。腎虚血マウスでは酸化、炎症ストレスが持続すると推定され、さらに間欠的 AKI(急性腎障害)モデルでは繰り返される間質部への負荷が、実際の CKD の進展過程の病態と類似すると考えられる。これらで Klotho の作用発現に関する signal transduction を検討した。

### (2) について

慢性化モデルでの発現、働きを検討し、その間にサロゲートマーカーとしての可能性を検証した。Klotho が CKD 病期の早期から変化をきたし、病態に関与するならば、その動態を把握することは臨床でも有用な情報で、CKD のサロゲートマーカーになりうる。

## 4. 研究成果

(1) Common pathway に関する Klotho の病態生

理、意義ならびにシグナル・細胞生物学的作用虚血もしくは虚血を反復して繰り返して CKD を進展させるモデル:

臨床上的 CKD では、しばしば反復される小ストレスが CKD を増悪させているとする指摘がある。これらの CKD マウスで Klotho 発現の経時的な変化を観察した。Klotho(+/-) マウスでは線維化が亢進することを観察したが、障害の慢性化モデルでは Klotho の発現がさらに低下し、この線維化がより惹起される可能性が認められた。

Klotho の細胞内シグナルおよび CKD モデルにおける線維化制御機構の解明:

本項目では、Klotho の関連シグナルに関しても検討した。TGF- $\beta$  関連遺伝子の変化を確認したが、FGF23 の受容体としての作用では、ERK のシグナル系が、アポトーシス関連のシグナル PI3-K pathway、insulin/IGF-1 signaling の関りを認めた。線維化では、Wnt/ $\beta$  catenin の系の関りが確認されたが、線維芽細胞の培養細胞を用いた migration scratch assay を用いて検討では、Klotho 抑制 (siRNA) では明らかに線維化が亢進していた。

(2) Functional biomarker としての Klotho の意義

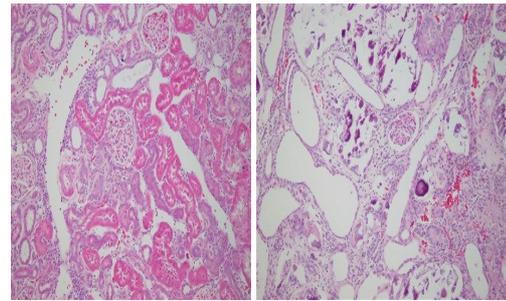
CKD は臨床的には eGFR と蛋白尿によって stage 分類とハザードマップが示されているが、その進行に関しては血清クレアチンを基盤とした eGFR が主体となっている。その限界点はかなり進展した状況での指標に過ぎない点であり、CKD 診療において、進行、悪化の biomarker の不在は大きな問題点であった。そうした中で FGF23 の腎機能障害時の上昇が報告され、しかも CKD stage 早期からの上昇があり、初めての biomarker として注目されたが、今回は Klotho を機能的な surrogatemarker として位置付けを試みた。

臨床的な意義の高い、リン負荷と Klotho 発現、腎組織障害を検討した。Klotho の発現にはリンと FGF23 が大きな調節因子であり、それぞれを制御して CKD の進行過程における発現の変化を観察した。さらに FGF23 が Klotho 発現に影響するとする報告もあり(参考 2)、CKD モデルマウスでリン負荷の影響を観察した。

虚血モデルマウスでリン負荷量を段階的に調節した。リン摂取量が増加すると、間質

部を中心とした組織障害が増悪した。こうした事象はリン自体の組織障害の可能性があり、臨床的に蛋白制限の持つ意義を示唆していた(図)。

図 CKD マウス



通常食 高リン食(2.5%)

(図の説明)虚血腎モデルで高リン食は尿管・間質の荒廃の程度が強い

さらに、最近、急性腎障害(いわゆる AKI) と CKD とは統合された病態の相互移行が成立するという病態概念が提示されている。研究者らは、Klotho 発現が半減した (haploinsufficiency)(*kl-/+*)マウスで、通常の虚血再灌流モデルとされる腎動脈 clump 手技で、20 分間虚血の短時間処置を週 1 回、3 週間継続することで、腎機能、組織障害を検討した。*(kl-/+)*マウスで明らかに重症化し、腎組織障害スコア(ATN score)が有意に高値であり、線維化指標の $\alpha$ SMA 染色が著明であった。今後は、虚血の頻度、時間などの条件設定を行うことで、特に腎不全が自然に進行していくモデル形成ができる可能性があり、今後の検討課題とした。

本研究の特徴は、Klotho を CKD の進展・重症化過程における重要因子として位置づけ、その病態生理を明らかにし、また臨床的な biomarker として検討するトランスレーショナル研究である点である。研究者らは、腎組織での Klotho 発現の低下が CKD における早期事象であると想定しており、こうした病態モデル動物で検討した。リンの潜在的な代謝障害も早期から生じている可能性が高く、臨床的にも保存期からのリン吸着剤の投与が実際に施行され始めている。その病態への関与、投与開始時期など不明な点が多く、今回の動物実験では有用な情報を供与できるものと推定している。

従来、CKD の研究は、IgA 腎症、糖尿病性腎症などの原疾患により発症、進展する病歴史が中心であったが、非特異的な様々な重症

度の腎障害が繰り返されることにより、修復が十分でなく、自発的な悪循環が成立して進行し、CKDに至り、また、もしCKDが先行、存在するならば、その進展、増悪に至る事象が推定されている。今後高齢化社会を見据えて、ますます高齢でのCKDの発生、進展、患者数の増加を示唆していると考えられる。その発生の機序を検討し、対応を考慮しないとCKD患者の増加、末期腎不全、透析の発生に抑制がかからない状況となる。実際に実臨床では、原因不明なCKDは、例えば造影剤、NSAIDsなどの薬剤使用、心不全、心血管系の手術、カテーテル検査などを誘因として、しばしまられるものである。

Klotho発現の低下は、より繰り返される腎障害によるCKDの成立、進展に關与する可能性を示唆している。Klotho蛋白は、FGF23と共役したリン排泄を主要な作用としながら、遊離Klothoの存在や抗アポトーシス、TGFβの抑制作用などの生理活性を有することから、研究者は、保存期CKDにおける重要なkey moleculeであると考えた。

参考 1. Kuro-o M. Klotho and Klotho. *Adv Exp Med Biol.* 2012;728:25-40. doi: 10.1007/978-1-4614-0887-1\_2.

参考 2. Takenaka T, et al. Fibroblast growth factor 23 enhances renal klotho abundance. *Pflugers Arch.* 2013;465:935-43. doi: 10.1007/s00424-013-1226-z.

## 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)

Akiyama K, Mochizuki T, Kataoka H, Tsuchiya K, Nitta K. Fibroblast growth factor 23 and soluble Klotho in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 査読有 2016 Jul 23. doi: 10.1111/nep.12862.

Nishida M, Ando M, Iwamoto Y, Tsuchiya K, Nitta K. New insight into atherosclerosis in hemodialysis patients: Overexpression of scavenger receptor and macrophage colony-stimulating factor genes. *Nephron Extra* 査読有 2016;6:22-30

Tsuchiya K, Nagano N, Nitta K.

Klotho/FGF23 Axis in CKD. *Contrib Nephrol.* 査読有 2015;185:56-65. doi: 10.1159/000380970.

Tsuchiya M, Misaka R, Nitta K, Tsuchiya K. Transcriptional factors, Mafs and their roles in glucose/energy metabolism. *World J Diabetes.* 査読有 6:175-183, 2015.

Asamiya Y, Yajima A, Shimizu S, Otsubo S, Tsuchiya K, Nitta K. Associations between the levels of sclerostin, phosphate, and fibroblast growth factor-23 and treatment with vitamin D in hemodialysis patients with low intact PTH level. *Osteoporos Int.* 査読有 2015 26(3):1017-28. doi: 10.1007/s00198-014-2934-8.

[学会発表](計3件)

Tsuchiya K, Sugiura H, et al.: Klotho deficiency is results and causes of susceptibility to mild aAKI in CKD. 53<sup>rd</sup> Congress ERA-EDTA 2016/5/21-24, Vienna (Austria)

Tsuchiya K, Sugiura H, et al.: Klotho deficiency is results and causes of susceptibility to mild aAKI in CKD. ASN 2015, 2015/11/7, San Diego (USA)

Tsuchiya K. Pre-dialysis to dialysis pathophysiology of Klotho, P, Potassium. 8<sup>th</sup> International society of hemodialysis シンポジウム 2014/9/12 ~ 14 上海(中国)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 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

土谷 健 (TSUCHIYA Ken)

東京女子医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00246472

(2)研究分担者

土谷 まり子 (TSUCHIYA Mariko)  
東京女子医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：00266826

(3)研究分担者

浅宮 有香里 (ASAMIYA Yukari)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40596566