

令和 2 年 4 月 20 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09714

研究課題名(和文) 繰り返し、軽度の腎障害の集積によるCKDの発症、重症化の機序の解明と治療介入

研究課題名(英文) Elucidation and therapeutic intervention of the mechanism of CKD onset and aggravation due to repeated and accumulated mild renal damages

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)の本質的な病態は、腎尿細管機能・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によるとされ、最近、CKDの発症・進展・重症化には、種々の程度の頻回な腎障害(AKI: acute kidney injuryを含む)が集積することにより生じるとされている。研究者らは従来からリン制御因子で、かつ抗加齢、抗線維化などの生理活性を持つKlotho蛋白に注目し、CKDの病態生理に大きく関するとの仮説を立ててきた。実験モデルとして、同蛋白の低発現マウスで、頻回・低侵襲の障害でCKDを発症・進展するモデルを開発し、様々な疾患増悪因子の意義を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病(CKD)の本質的な病態は、腎尿細管機能・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、特に循環・血管系の動脈硬化病変、石灰化などを引き起こし、心腎連関などと総称される、全体的な病態像を形成すると考えられている。最近、CKDの発症・進展・重症化には、種々の程度の頻回な腎障害(AKI: acute kidney injuryを含む)が集積することにより生じることが注目されている。それは、特定の原因疾患によらず、CKDが発症もしくは増悪する可能性を示唆し、特に高齢化社会では末期腎不全・透析の患者が増加する結果となる。

研究成果の概要(英文)：The essential pathological condition of chronic kidney disease (CKD) is assumed to be due to a chronic failure of maintaining homeostasis of the body such as water / electrolyte, metabolic abnormality, anemia due to renal tubular function / interstitial region disorder. It is proposed that the onset, progression, and aggravation of CKD are caused by the accumulation of various degrees of frequent renal injury (including AKI: acute kidney injury). Researchers have traditionally focused on the Klotho protein, which is a phosphorus regulator and has physiological activities such as anti-aging and anti-fibrosis, and has hypothesized that it is greatly involved in the pathophysiology of CKD. As an experimental model, we established a model in which CKD develops and progress in mice with low expression of the klotho with frequent and minimally invasive disorders, and examined the significance of various disease exacerbating factors.

研究分野：腎臓内科

キーワード：Klotho 慢性腎臓病 リン 急性腎障害

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)の本質的な病態は、腎尿細管機能・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、特に循環・血管系の動脈硬化病変、石灰化などを引き起こし、心腎連関などと総称される、全体的な病態像を形成すると考えられている。さらに、重要な仮説は、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。つまり、非特異的な様々な重症度の腎実質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。しかしながら、通常状態の腎において、単純な障害の繰り返しのみで、こうした障害の連鎖が発生するとは考えにくく、なんらかの付帯状況があると推察することが重要と考えられる。

研究者らは、かねてより腎尿細管に発現する Klotho 蛋白の関与を指摘してきた。Klotho 蛋白は早老起因蛋白として報告され、その過剰発現による寿命延長、抗酸化ストレス、IGF-シグナルの制御などの生理活性が報告されている。さらに尿細管に発現する Klotho 蛋白は骨由来の FGF23 と axis を形成して、生体におけるリン排泄の主要な役割を演じていることが明らかにされた。こうした背景をもとに、研究者らは、Klotho 蛋白の CKD の stage 早期から発現の低下を観察し、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つて CKD の病態を形成すると報告した(Am J Physiol Renal Physiol.2012)。このことは、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、進展に関与する可能性を示唆している。

本研究では、CKD の病態生理で中心的役割を果たす、間質・尿細管障害の進展、重症化の機序と、研究者らの仮説である、Klotho 蛋白がいかに関与し、かつ腎においてリンの大量輸送を担う役割を持つが故に、改めてリンの組織障害性、リン管理が意義を持つかなど臨床的な意義を含めて検証する。

### 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、軽度の腎障害の繰り返しが CKD の発生・進展に関する機序を解明し、その機序にいたる要件を検討し、さらに治療的戦略を模索することで、原疾患ではなく、非特異的な CKD の進行に対する手段を見出すことにあり、以下に具体的目的を掲げる。

- 1) 繰り返しの軽度腎障害がCKDの発症、増悪にいたる動物モデルの確立
- 2) CKD発症、進展に関わるCommon pathwayのシグナル・細胞生物学的機序の検討
- 3) 障害の進行、程度などを把握するモニター因子の同定、動態検討、また、治療介入が有効な因子、条件の把握、検討

具体的には軽度の腎虚血障害を定期的に繰り返すモデルで、すでに検討を進めている。Klotho蛋白が半減したマウス(Haploinsufficiency)では重症化することが判明しており、さらに慢性化する条件、他の種類の腎障害を検討する予定である。

CKDの慢性化、重症化の過程で変化する遺伝子、蛋白発現情報を検討し、関連する因子の検討を行う。手法的には従来の網羅的遺伝子解析、線維化関連シグナルの検討を、3)の手法も交えて組織、分離培養細胞などで行う。

腎間質部の組織、細胞環境の変化をモニターできる因子を検討する。最終的には間質の線維化の抑制を齎すことが目標であるが、取り掛かりとしては、Klotho の発現に影響を与える条件、リン制限などの食事、抗酸化剤などの効果を検討する。

### 3. 研究の方法

- 1) 繰り返しの軽度腎障害がCKDの発症、増悪にいたる動物モデルの確立

虚血モデルマウスでの検討：すでに研究者らは、Klotho 発現が半減した(haploinsufficiency)(*kl*<sup>-/+</sup>)マウスで、通常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、組織障害を検討している(2015 ASN abstract, 2016 EDTA abstract)。

Klotho 発現量の調節：Klotho の腎組織発現量は CKD の stage 進行とともに低下すると指摘されており、さらにその発現低下が組織の脆弱性を増加することを研究者らは報告した。*(kl*<sup>-/+</sup>)マウスは基本モデルであるが、遺伝子操作手技である siRNA を用いて Klotho mRNA 発現を *in vivo* レベルで調節、その影響を検討する。これには研究者らが確立している hydrodynamic method で対応する。さらに条件を変化させるため、食事リン摂取量の調節、リン吸着剤投与モデルでの対応を試みる。

- 2) CKD 発症、進展に関わる Common pathway のシグナル・細胞生物学的機序の検討

低障害の腎障害が繰り返される過程で、腎組織の環境が如何に変化するかを検討する。AKI では reactive oxygen species(ROS)により誘導される酸化ストレスは組織障害の中心的役割を担っており、間質や微小循環の障害をきたし、さらにそれが虚血からさらなる ROS の発生を惹起する悪循環が生じる。線維化、アポトーシス、自然免疫(Toll-like receptor)など多岐にわたる領域因子が推定される。この過程で重症化、遷延する細胞生物学的因子を検討する。

Klothoの関連シグナル：すでにTGF- $\beta$ 関連遺伝子の変化を報告したが、急性期の細胞内シグナルと慢性期の組織線維化への関与を検討する。FGF23の受容体としての作用では、ERKのシグナル系が指摘されているが、アポトーシス関連のシグナルとしては、現在、Bcl-xl、PI3Kを候補因子として考えている。特にPI3-K pathwayは、insulin/IGF-1 signalingが関わっていると推定して

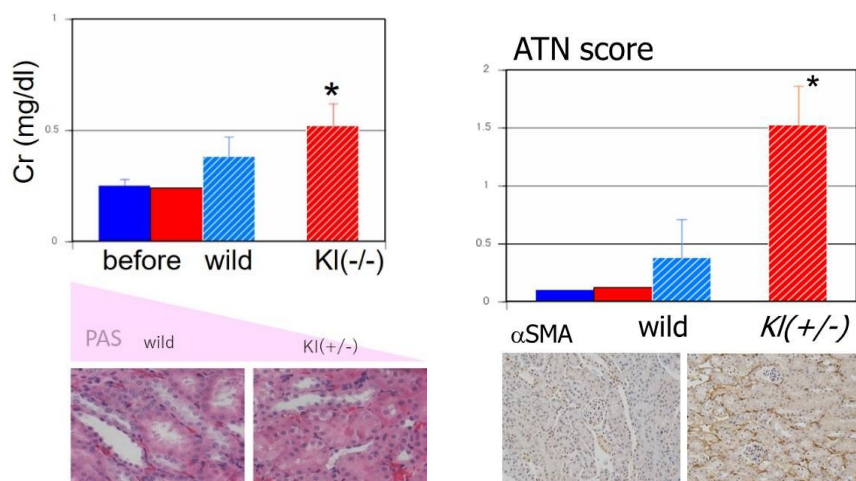
いる。

migration scratch assay: 繊維化では、関連する遺伝子のスクリーニングを培養細胞の migration scratch assay を用いて検討する。損傷組織は、血管新生因子による血管新生の増加、細胞増殖および細胞外マトリックスの増加、壊死組織破壊のための炎症免疫細胞による浸潤など、様々な工程が進行するため、いわゆる創傷治癒アッセイを用いて検討する。

#### 4. 研究成果

##### 1) 虚血モデルマウスでの検討

Klotho 発現が半減した、(kl<sup>-/+</sup>)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、組織障害の増悪を確認した。(kl<sup>-/+</sup>)マウスで明らかに重症化し、図に示すように腎組織障害スコア(ATN score)が有意に高値であり、線維化指標のαSMA 染色が著明であった。



##### 2) リン負荷の影響

Klotho 発現の低下した CKD モデルでは線維化が加速することに着目し、低侵襲ながら頻回な腎障害により、Klotho 低発現マウスで CKD が重症化、進行性であることが明らかなり、病態モデル動物として応用することが可能になった。

このモデルで、リン負荷を行うことにより、FGF23 が腎実質に誘導されることが判明した。CKD では腎実質に FGF23 が誘導されることは、リン排泄もしくは、腎実質の障害と FGF23 が関連することが示唆された。(Sugiura H, Tsuchiya K et al. Fibroblast growth factor 23 is upregulated in the kidney in a chronic kidney disease rat model. PLoS One. 2018)

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。これは障害の繰り返しが CKD に進展する可能性が高いことがほぼ認知された状況である。また、腎間質部、尿細管障害の障害進行の過程については、Yanagita M らは繰り返しの尿細管障害の重要性を指摘、さらに間質のエリスロポエチン産生細胞に着目し、その繊維芽細胞への transformation と可逆的な変化による治療戦略を報告している(Nephron 2016, J Am Soc Nephrol. 2016 など)。一方、Klotho の役割は FGF23 との共作用も含めてさまざまな可能性が指摘されている。また、FGF23 自体もその生理作用、毒性の報告があり(Marathi A et al. JASN 2018)、単純にリンの利尿因子としての認識では済まなくなっている。

本研究では、生体に不可欠なリン代謝の担い手である Klotho 蛋白に着目し、その発現の変化が、CKD の増悪、重症化に深く関する事実を報告した。その病態モデルともいえる実験動物の系が確立でき、今後、CKD の病態の解明とその介入に対する情報を供与できると考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Yajima A, Tsuchiya K, Burr DB, Wallace JM, Damrath JD, Inaba M, Tominaga Y, Satoh S, Nakayama T, Tanizawa T, Ogawa H, Ito A, Nitta K.	4. 巻 3
2. 論文標題 The Importance of Biologically Active Vitamin D for Mineralization by Osteocytes After Parathyroidectomy for Renal Hyperparathyroidism.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JBMR Plus.	6. 最初と最後の頁 e10234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm4.10234.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nitta K, Ogawa T, Hanafusa N, Tsuchiya K.	4. 巻 198
2. 論文標題 Recent Advances in the Management of Vascular Calcification in Patients with End-Stage Renal Disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Contrib Nephrol.	6. 最初と最後の頁 62-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000496532.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sato M, Kataoka H, Ushio Y, Manabe S, Watanabe S, Akihisa T, Makabe S, Yoshida R, Iwasa N, Mitobe M, Hanafusa N, Tsuchiya K, Nitta K, Mochizuki T.	4. 巻 7
2. 論文標題 High Serum Phosphate Level as a Risk Factor to Determine Renal Prognosis in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: A Retrospective Study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicines (Basel).	6. 最初と最後の頁 E13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/medicines7030013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakurai S, Hanafusa N, Nomura T, Tsuchiya K, Nitta K, Nangaku M.	4. 巻 47
2. 論文標題 Strategies for the Super-Aged Dialysis Population: Survival Benefits or Alternative Goals?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Purif.	6. 最初と最後の頁 Suppl 2:95-105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000496660	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukada M, Miwa N, Hanafusa N, Tanaka N, Tsuchiya K, Nitta K.	4. 巻 47
2. 論文標題 Aortic Arch Calcification and Bone-Associated Molecules in Peritoneal Dialysis Patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Purif	6. 最初と最後の頁 Suppl 2:81-87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000496657	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugiura H, Matsushita A, Futaya M, Teraoka A, Akiyama KI, Usui N, Nagano N, Nitta K, Tsuchiya K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Fibroblast growth factor 23 is upregulated in the kidney in a chronic kidney disease rat model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0191706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yajima A, Tsuchiya K, Burr DB, Minner DE, Condon KW, Miller CA, Satoh S, Inaba M, Nakayama T, Tanizawa T, Ito A, Nitta K.	4. 巻 113
2. 論文標題 Osteocytic perilacunar/canalicular turnover in hemodialysis patients with high and low serum PTH levels.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 68-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2018.05.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yajima A, Tsuchiya K, Bonewald LF, Inaba M, Tominaga Y, Tanizawa T, Ito A, Nitta K.	4. 巻 29
2. 論文標題 Case report: Electron microscopic evaluation of bone from a patient treated with cinacalcet hydrochloride, maxacalcitol, and alfacalcidol for hyperparathyroid bone disease with secondary hyperparathyroidism.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Osteoporos Int.	6. 最初と最後の頁 1203-1209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00198-018-4402-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nitta K, Hanafusa N, Okazaki M, Komatsu M, Kawaguchi H, Tsuchiya K	4. 巻 43
2. 論文標題 Association Between Risk Factors Including Bone-Derived Biomarkers and Aortic Arch Calcification in Maintenance Hemodialysis Patients.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Kidney Blood Press Res	6. 最初と最後の頁 1554-1562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000494441	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nitta K, Yajima A, Tsuchiya K.	4. 巻 56
2. 論文標題 Management of Osteoporosis in Chronic Kidney Disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 3271-3276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.8618-16.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama K, Mochizuki T, Kataoka H, Tsuchiya K, Nitta K.	4. 巻 22
2. 論文標題 Fibroblast growth factor 23 and soluble Klotho in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nephrology (Carlton).	6. 最初と最後の頁 843-858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nep.12862	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Tsuchiya K, Sugiura H, Hanafusa N, Tsukada M, Nitta K
2. 発表標題 Additional damage by phosphorus loading accelerates the progression of CKD model by the accumulation of minor kidney injury in Klotho deficit mice
3. 学会等名 ERA-ETDA ブタベストハンガリー (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuchiya K, Sugiura H, Nishida M, Nitta K
2. 発表標題 MODULATION OF KLOTHO/FGF23 EXPRESSION LEVEL BY PHOSPHORUS LOADING IN THE MOUSE MODEL MIMICKING TO INTEGRATED AKI TO CKD SYNDROME
3. 学会等名 ERA EDTA (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuchiya K, Sugiura H, Nishida M, Nitta K
2. 発表標題 Phosphorus is an exacerbation factor in the progression of CKD model by the accumulation of small kidney injury in Klotho deficit mice.
3. 学会等名 American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yajima A, Tsuchiya K, Nitta K
2. 発表標題 Osteocytic Perilacunar/Canalicular Turnover in Dialysis Patients with High and Low Serum PTH Levels
3. 学会等名 American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉浦秀和, 常住淳, 土谷健, 新田孝作, 柳沢裕美
2. 発表標題 腎繊維化モデルにおける fibulin-7 の発現変化
3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----