

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08674

研究課題名（和文）メガリンを基盤とする -klotho、FGF23による新規リン代謝調節機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of a novel phosphate metabolism regulatory mechanism based on megalin involving a-klotho and FGF23

研究代表者

桑原 頌治（Kawahara, Shoji）

滋賀県立大学・人間文化学部・准教授

研究者番号：70645209

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：世界的に慢性腎臓病の患者数は増加している。慢性腎臓病による腎機能低下に伴い、代替療法が必要となり、血液透析が我が国では多くを占めている。血液透析により、健康寿命の短縮やQOL低下そして医療費の増大などが明らかにされており、腎臓の代替療法が必要にならないようにする、すなわち腎臓機能の低下抑制が喫緊の課題となっている。透析を行っている慢性腎臓病患者の寿命を短縮する大きな要因の一つが血中リン濃度高値に伴う新血管疾患であるが、血中リン濃度の制御機構にはいまだに不明な点も多い。本研究では、腎臓における新たなリン代謝調節機構の可能性を示し、新規治療法の開発基盤となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中リン濃度の上昇はリン利尿因子の増加を引き起こし、尿中にリンを積極的に排泄することで血中濃度を下げることがある。強力なリン利尿効果を持つ線維芽細胞増殖因子23（FGF23）が同定されており、これも尿中リン排泄を促進する。しかしFGF23はその差要点である受容体が主に腎臓の遠位尿細管に局在しており、主要なリン輸送体は近位尿細管に発現するというある種の矛盾があった。またFGF23の共受容体として必要である老化関連因子 -klothoも主に遠位尿細管に発現している。本研究では近位尿細管のメガリンを介するFGF23や -klotho作用の可能性を示したものであり、新規治療戦略の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：The global prevalence of chronic kidney disease (CKD) is on the rise. As kidney function declines due to CKD, alternative therapies become necessary, with hemodialysis being the predominant method in Japan. It has been shown that hemodialysis leads to a shortened healthy lifespan, decreased QOL, and increased medical costs. Therefore, it is an urgent task to prevent the need for renal replacement therapies by curbing the decline in kidney function. One of the major factors shortening the lifespan of CKD patients undergoing dialysis is cardiovascular disease associated with high blood phosphate levels. However, many aspects of the regulatory mechanisms of blood phosphate levels remain unclear. This study aims to demonstrate a novel phosphate metabolism regulatory mechanism in the kidneys, which is expected to provide a foundation for the development of new therapies.

研究分野：腎臓、臨床栄養、栄養代謝

キーワード：メガリン 慢性腎臓病 リン代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病患者は腎機能低下に伴い、高リン血症を呈する。この高リン血症は生命予後を規定する因子の一つである。全身のリン代謝は主に腎臓が司るが、その調節機構には不明な点が多い。それゆえ、高リン血症の抜本的な治療法は確立されていない。腎臓の主要なリン輸送体(NaPi2a)を調整する重要なリン利尿因子として、繊維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) や老化関連因子 -klotho が同定されている。また -klotho が FGF23 の共受容体として関与することも示されている。しかし  $\alpha$ -klotho や FGF23 受容体は遠位尿細管に発現しており、どのように近位尿細管のリン輸送体を調節するか詳細は不明である。

一方、メガリンは腎近位尿細管の管腔側膜に発現し、糸球体を濾過する様々なタンパク質や薬剤の再吸収や代謝、細胞内情報伝達に与関するエンドサイトーシス受容体である。研究代表者はこれまでにメガリンが腎障害性物質の「入り口」として機能する分子であることや、状況に応じた適切なメガリンの抑制もしくは阻害が腎保護に有用であることを報告した (J Am Soc Nephrol. 2016, 2017)。またメガリンとリガンドの結合を検討する過程において、-klotho がメガリンと結合する可能性を発見していた。

さらにメガリンは NaPi2a の機能制御に関与することも報告されている (Bachmann S, et al. J Am Soc Nephrol 2004)。

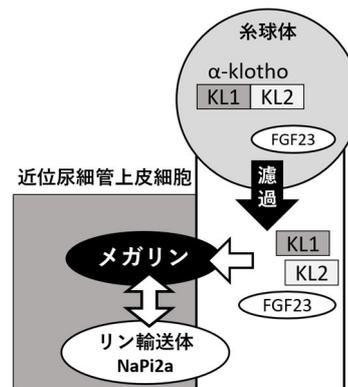


図1. メガリンを基盤とするリン代謝調節仮説  
KL1・KL2断片、FGF23がメガリンを介してリン輸送体機能を調節する。

### 2. 研究の目的

前述の背景より、本研究では腎近位尿細管におけるリン代謝調節として、メガリン/NaPi2a/ -klotho/FGF23 の相互作用に基づく未知のリン代謝機序が存在し、それを解明することで新規治療法開発の手掛かりが得られるのではないかと、ということ検討することとした。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞外全長型の -klotho が血中あるいは糸球体濾過の過程で断片化される可能性の検討  
人工的に合成した組み換え体の細胞外領域全長の -klotho を精製する。さらにこれを蛍光物質で標識し、腎臓特異的なメガリン欠損マウスに投与する。投与したメガリン欠損マウスの血液と尿を回収し、-klotho の検出を蛍光標識および抗 -klotho 抗体で行い、検出されるサイズにより切断・断片化される可能性を検討する。なお、メガリン欠損マウスの尿は糸球体濾過後の原尿中 -klotho の状態を反映すると考えられる。

(2) -klotho が腎近位尿細管細胞におけるリン輸送に与える影響の検討

ラット近位尿細管由来培養細胞 (IRPTC) はメガリンと NaPi2a を発現している。しかし FGF23 受容体は発現していないので FGF23 受容体を遺伝子導入する。その細胞にリコンビナント -klotho (細胞外全長型、KL1 断片のみ、KL2 断片のみ、KL1 断片と KL2 断片)、および FGF23 を添加し、リン ( $^{32}\text{P}$ ) の細胞取り込みを評価する。KL1 断片のみ、あるいは KL2 断片のみではなく、KL1 断片と KL2 断片を併せて添加することにより、細胞のリン取り込みが抑制されるか検討する。その際、FGF23 の添加もリン取り込みの抑制に必須であるか確認する。さらにメガリン発現を特異的 siRNA 導入によりノックダウンし、リン取り込みの評価を行う。すなわち -klotho-FGF23 系によるリン調整機能にメガリンが関係するのか検討する。

(3) メガリン/NaPi2a/ -klotho/FGF23 の複合体形成の検討

FGF23 受容体遺伝子導入 IRPTC を用いて、リコンビナント KL1・KL2 断片および FGF23 を添加した際のメガリン/NaPi2a/ -klotho/FGF23 の複合体の形成を免疫沈降法によって解析する。細胞のリン吸収はメガリンによるリン輸送体の細胞内取り込みによって抑制されることから、-klotho、FGF23、メガリンの相互作用の結果、メガリンと NaPi2a の結合が増強され、NaPi2a の細胞内取り込みが促進される(すなわち細胞のリン取り込みは減少する)可能性を検討する。

(4) メガリン/NaPi2a/ -klotho/FGF23 の総合結合性の詳細な検討

-klotho、FGF23、FGF23 受容体の結合様式については、X線結晶構造解析の結果が報告されている (Chen G, et al. Nature 2018)。その結果から、-klotho の KL2 ドメインが FGF23 受容体と結合し、さらに FGF23 が FGF23 受容体と KL1・KL2 ドメインをつなぎ止めるように結合するモデルが提唱されている。前述のように、我々は既に -klotho の KL1・KL2 断片各々がメガリ

ンと結合する可能性を見だしている。そこで KL1・KL2 断片はメガリンの異なる部位に結合するのか、水晶発振子マイクロバランス法を用いて、競合阻害実験を行う。さらに現在我々は、AMED「創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業」の一環として、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)から支援を受け、クライオ電子顕微鏡を用いたメガリンの構造解析を進めているところであり、それを応用した複合体の結合様式の解析を行う。

#### 4. 研究成果

老化関連因子  $\alpha$ -klotho が腎近位尿細管でメガリンと結合することを証明した。ほぼ完全に近位尿細管のメガリンが欠損するマウスの尿中に、 $\alpha$ -klotho は検出されたが、コントロールマウスの尿中には検出されなかった。また血中ではコントロール、メガリン欠損マウスの両者で細胞外領域の全長型と考えられるサイズの  $\alpha$ -klotho が検出されている。一方、メガリン欠損マウスの尿中で検出された  $\alpha$ -klotho のサイズは明らかに血中の  $\alpha$ -klotho より小さく、KL1 および KL2 に切断された形状である可能性がそのサイズから示唆された。検出抗体を KL1 領域および KL2 領域のいずれを利用して同じ結果が得られており、このことから  $\alpha$ -klotho が糸球体濾過の過程ないし濾過後に切断されている可能性があること明らかにした。さらに、切断された  $\alpha$ -klotho が尿中で検出される現象がマウス特有であるか検証する目的で、メガリン発現の減少する疾患である Dent's 病患者の尿検体を用いたところ、同様の結果が得られている。

この  $\alpha$ -klotho が血中もしくは尿中で切断される詳細を検討する目的で、組み換え体  $\alpha$ -klotho の蛍光物質による標識を行い、体内のどこで切断されるか検討することとした。しかしながらこの試みは失敗に終わる結果となった。合成した組み換え体  $\alpha$ -klotho は細胞外領域の全長型を用い、蛍光標識した。原因は不明であるが、(1) 蛍光物質が結合しない(ないし極めて効率が悪い)、(2) 標識処理操作の組み換え体  $\alpha$ -klotho が種々のサイズに切断されてしまう、という結果となった。特に(2)の対処が困難であったため、この検討は中止せざるを得なかった。ただし、この結果から細胞外領域の全長型  $\alpha$ -klotho が切断を受けやすい可能性が示唆された。なお、蛍光標識の操作中は温度変化も極めて限定的であること、タンパク質分解酵素は反応系に存在しないこと、この2点より、酵素と熱の可能性は否定されている。

メガリン欠損マウスの尿中に KL1 および KL2 に切断されたと推察される形状の  $\alpha$ -klotho が検出されたことから、これらがメガリンのリガンドとして直接結合するか、水晶発振子マイクロバランス法(QCM)により検討した。一般にメガリンとリガンドの結合は環境中のカルシウムイオンの存在が必要とされている。図3に示すように、メガリンと KL1 と KL2 領域の  $\alpha$ -klotho がカルシウム依存的に結合することを示した。なお、データは載せていないが、カルシウム非存在条件下ではこの結合がほとんど認められないことも明らかにしている。これらの結果より、血中の  $\alpha$ -klotho が循環中ないし糸球体濾過の過程で KL1 と KL2 に切断され、近位尿細管のメガリンと結合する、ということが示された。

そこで、実際にこの KL1 と KL2 が切断された形状でリン代謝調節に寄与するのか検討した。 $\alpha$ -klotho の完全欠損マウスに各種形態の  $\alpha$ -klotho を投与して、尿中リン排泄に与える影響を調べた。なお用いた  $\alpha$ -klotho の完全欠損マウスは早期からの老化症状をしめし、尿中リン排泄ができないため高リン血症を呈するマウスである。図4に示すように、細胞外領域の全長型の投与により尿中リン排泄の顕著な上昇をしめし、本研究で合成した  $\alpha$ -klotho が生理活性を持つことを証明している。一方、KL1 および KL2 それぞれの単独投与では、いずれも尿中リン排泄の増加は認められず、生理作用を発揮しないことが明らかとなった。しかしながら、細胞外領域全量型が体内で切断された状態と同様と考えられる、KL1 と KL2 の

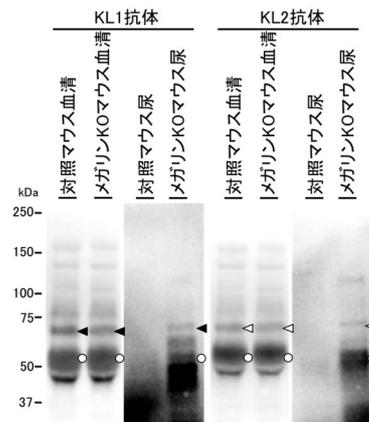


図2. 血中・尿中 $\alpha$ -klothoウエスタンブロット (▲KL1、△KL2、○アルブミンの交差反応)

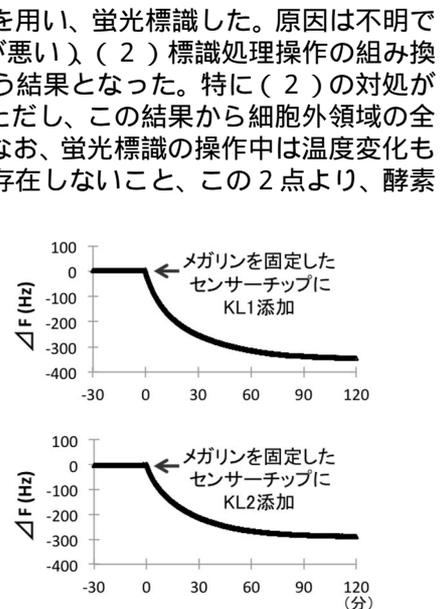


図3. メガリンと $\alpha$ -klotho断片の結合検討 (水晶発振子マイクロバランス法)

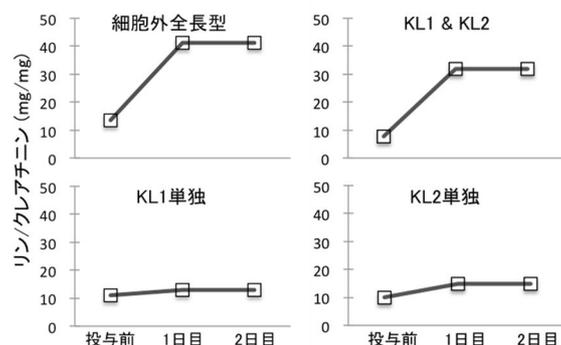


図4.  $\alpha$ -klotho KOマウスに $\alpha$ -klothoを投与した際の尿中リン排泄変化

同時投与では、ほぼ細胞外領域全量型と同程度の尿中リン排泄増加が認められた。この結果から、少なくとも尿中リン排泄増加のためには、KL1 領域型と KL2 領域型の両者が存在している必要があることが示された。

そこで腎近位尿細管細胞を用いて、免疫沈降法によるメガリン/NaPi2a/ -klotho /FGF23 の複合体形成を検討することとした。特に KL1 ないし KL2 型の -klotho および FGF23 の有無による、メガリン - NaPi2a 結合への影響を検討した。残念ながらこの検討は十分な成果を出すことができなかった。メガリン - NaPi2a 結合は認められるが、各種 -klotho 存在（もしくは非存在）条件による結合の増強結果が一貫していなかった。また FGF23 の有無による結果もばらついており、さらなる追加実験が必要である可能性がある。本研究ではメガリン/NaPi2a/ -klotho /FGF23 の複合体を仮説として検討したが、さらに検討すべき条件が存在している可能性を示唆する結果となった。

最後に、腎臓特異的メガリン欠損マウスの尿中リン排泄への影響を検討した。本研究ではリン利尿因子である -klotho がメガリンに結合してその効果を発揮する機序の一端を証明した。そのため、メガリン欠損マウスではリン代謝に影響が起きている可能性が高い。通常飼育条件下ではその影響が認められない可能性があるため、リン負荷として高リン食負荷を行ったところ、摂食量など均一化をしなかったため個体差があるが、メガリン欠損マウスではリン代謝負荷時に尿中リン排泄が増加されにくい可能性を明らかにした。

以上より、腎近位尿細管において -klotho がメガリンと結合するところでリン代謝に関与している可能性を本研究では明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 桑原頌治
2. 発表標題 CPPによる腎機能低下の早期発見
3. 学会等名 第9回日本腎栄養代謝研究会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑原頌治
2. 発表標題 CPPによる腎機能低下の早期発見
3. 学会等名 日本病態栄養学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 桑原頌治
2. 発表標題 CPP測定系の樹立：腎機能低下の早期発見
3. 学会等名 第18回 日本栄養改善学会 近畿支部学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桑原頌治
2. 発表標題 CPP測定系の樹立：腎機能低下の早期発見
3. 学会等名 第59回 日本栄養食糧学会 近畿支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shoji Kuwahara, Michihiro Hosojima, Hideyuki Kabasawa, Sawako Tatsumi, Akihiko Saito
2. 発表標題 Interaction of megalin with -klotho, a senescence-related hormone, for the regulation of urinary phosphate excretion
3. 学会等名 Kidney Health In Aging and Aged Societies: JSN/ERA Symposium in Collaboration with JSDT (国際学会)
4. 発表年 2024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
研究分担者	斎藤 亮彦  (Saito Akihiko)  (80293207)	新潟大学・医歯学総合研究科・特任教授    (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関