

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08641

研究課題名(和文) クロト蛋白補充による腎保護についての研究

研究課題名(英文) Research on renal protection by klotho protein supplementation

研究代表者

竹中 恒夫 (Takenaka, Tsuneo)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：90179656

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)：クロト蛋白補充は、HIGAマウスにおいて収縮期血圧、アルブミン尿、イソプロスタノール排泄、糸球体ろ過率、腎アンジオテンシン濃度、腎でのアンジオテンシノーゲン発現を低下させた。また、クロト蛋白補充は、腎のsuperoxide dismutaseとクロト発現を上昇させた。腎垂全摘ラットにおいて、クロト蛋白補充は収縮期血圧、アルブミン尿、FGF23、血清リン濃度、腎アンジオテンシン濃度、腎の線維化や腎におけるコラーゲンとTGFの発現を低下させた。また、クロト蛋白補充は糸球体ろ過率、リン排泄率や腎におけるsuperoxide dismutase、クロト、BMP7の発現を亢進させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgA腎症も全ての腎疾患の最終像である進行性腎疾患も現在まで有効な治療法が確立していない疾患群で、透析導入も高率であり、unmet needが高い。今回の結果は、IgA腎症モデルマウスと進行性腎疾患モデルである腎垂全摘ラットでクロト蛋白補充の有用性を示した。

安全性について更に検討する必要があるが、これらの研究は、将来の臨床研究に向けて基礎的なデータを提供できたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Supplementation of exogenous klotho protein reduced systolic blood pressure, albuminuria, 8-epi-prostaglandin F2 excretion, glomerular filtration rate, renal angiotensin II concentration, and angiotensinogen expression in HIGA mice ( $p<0.05$  for all). Additionally, it enhanced renal expression of superoxide dismutase and renal klotho itself ( $p<0.05$  for all). Klotho protein supplementation decreased albuminuria, systolic blood pressure, fibroblast growth factor 23 and serum phosphate levels, renal angiotensin II concentration, fibrosis index, renal expressions of collagen I and transforming growth factor ( $p<0.05$  for all). Klotho supplementation enhanced fractional excretion of phosphate, glomerular filtration rate, renal expressions of klotho, superoxide dismutase and bone morphogenetic protein 7 ( $p<0.05$  for all).

研究分野：腎臓内科学

キーワード：クロト

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) クロトは最近クローニングされた蛋白で、腎の遠位尿細管と脳の脈絡叢や副甲状腺に発現している。TRPV5 を活性化しカルシウム代謝に関与するとともに、FGF23 受容体の一部を形成しリン代謝にも関与している。クロトは膜型細胞を一回貫通する 130kd の蛋白であるが、細胞内ドメインはアミノ酸 10 残基ほどで、細胞膜直上付近を ADAM で切断され分泌される。クロト蛋白も遠隔臓器に作用する蛋白である。

(2) 実際、クロト蛋白は WNT や TGF の受容体と相互作用することが最近明らかとなった。分泌型クロトは全身的に働き superoxide dismutase (SOD) などの活性酸素分解酵素群を誘導することが示唆されている。また、クロト蛋白は内皮細胞の寿命を延命し、一酸化窒素等の産生を亢進させる。そして、遠位尿細管から分泌されたクロト蛋白は尿中にも認められ、尿細管内腔より作用して近位尿細管でのリンの再吸収抑制を来すと考えられる。

### 2. 研究の目的

(1) 慢性腎臓病では腎クロト発現、血中クロト濃度ともに低下している。クロト遺伝子を過剰発現させることで、免疫複合体などによって惹起される腎障害が、尿細管病変だけでなく糸球体病変を含めて軽減される。しかし、クロト遺伝子過剰発現による腎保護効果が膜型クロト蛋白によるか分泌型クロト蛋白に依存するかは詳細には検討されていない。また、ヒトに対する遺伝子操作は倫理的な壁が高い。

(2) 我々は分泌型クロト蛋白の補充が慢性腎臓病モデルにおいて線維化などの尿細管間質病変だけでなく蛋白尿や糸球体組織病変についても抑制効果を示すことを報告した。分泌型クロト蛋白を外因性に投与することで得られる腎保護作用について詳細な機序を明らかとすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

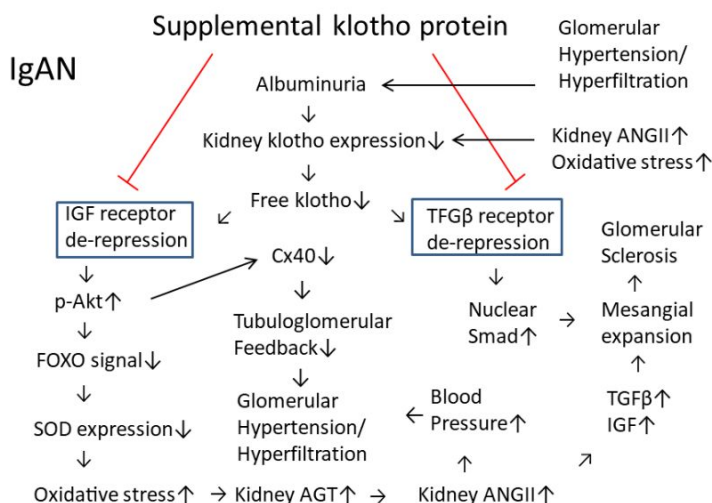
(1) クロトを安定的に発現している細胞系が殆ど無いため、また腎臓病の進行に対するクロト蛋白補充の効果を検証するため、動物実験を行った。対象としては IgA 腎症のモデルとして HIGA mice、進行性腎疾患のモデルとして腎下垂全摘ラットを使用した。合成したクロト蛋白を各々のモデル動物に皮下注射し補充を行い、腎保護効果について検討した。

(2) 動物実験だけでは詰め切れない、クロト蛋白の腎保護効果の機序については、相補的に *in vitro* の研究を行った。まずは、メサンギウム細胞における IGF によるコネキシン 40 発現に対するクロト蛋白の影響を、また、ヒト胎児腎細胞における fibroblast growth factor (FGF)23 による bone morphogenetic protein 7 (BMP7) 発現に対するクロト蛋白の影響を検討した。

### 4. 研究成果

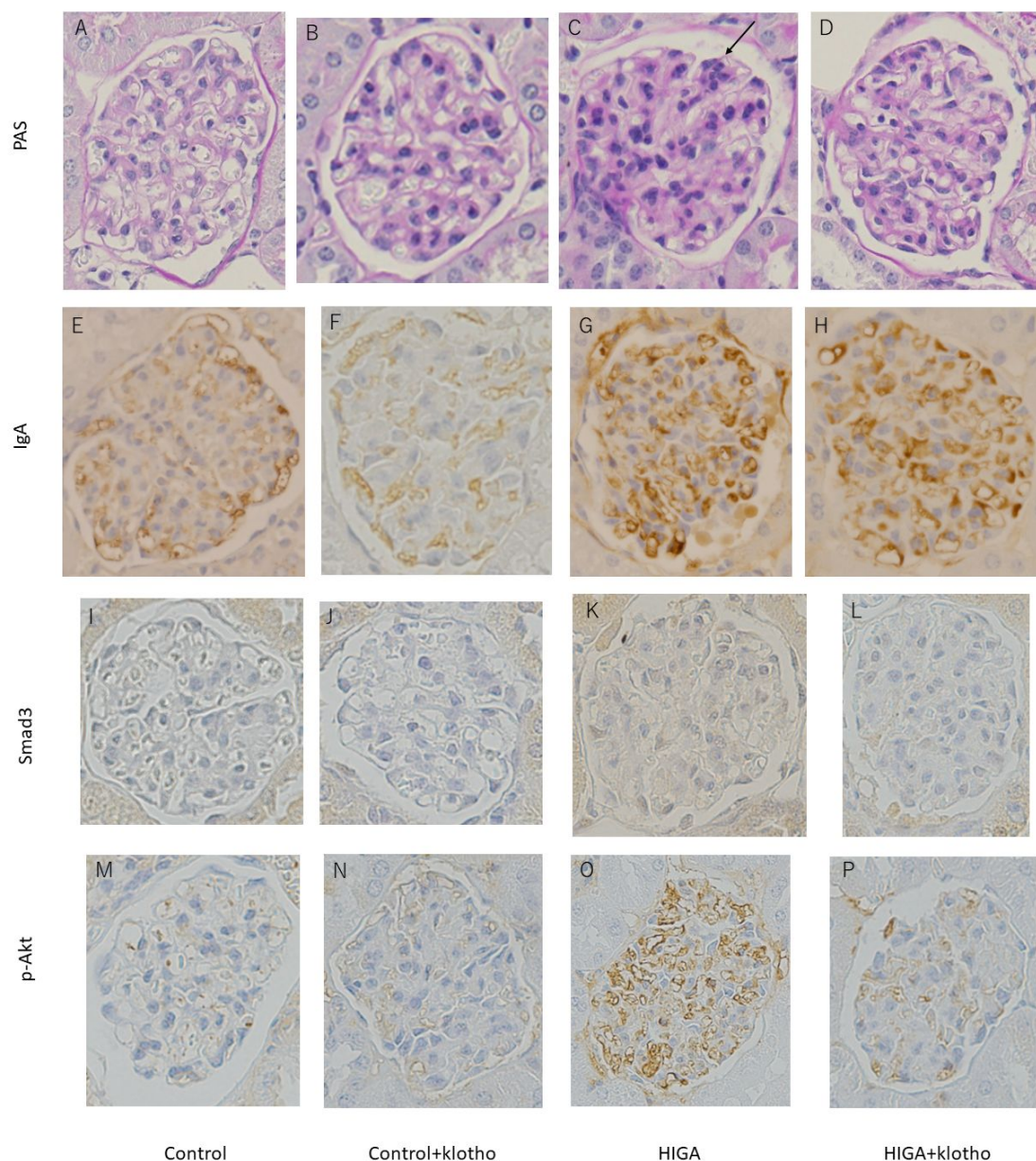
(1) クロト蛋白補充は、HIGA マウスにおいて収縮期血圧、アルブミン尿、8-epi-prostaglandin F2 排泄、糸球体ろ過率、腎アンジオテンシン濃度、腎でのアンジオテンシノーゲン発現を低下させた。また、クロト蛋白補充は、腎の SOD とクロト発現を上昇させた。レーザーを用いたマイクロダイセクション法を用いた検討で、クロト蛋白補充は HIGA マウスの糸球体での TGF $\beta$ 、フィブロネクチン、IGF の発現を抑制し、コネキシン 40 の発現を亢進させた。

図 1 : IgA 腎症におけるクロト蛋白の保護効果と作用機序



これらの結果は、クロト蛋白補充がレニン-アンジオテンシン系を不活性化し、HIGA マウスの血圧を低下させたことを示した。また、クロト補充は IGF シグナルを抑制し、HIGA マウスにおいて糸球体のコネクシン40の減弱に拮抗することで抗アルブミン尿効果を発揮している事を支持した。更に、クロト蛋白補充は、TGF シグナルを阻害することでHIGA マウスの糸球体におけるメサンギウムの拡大を阻止している事が示唆された。

図2：IgA腎症におけるクロト蛋白の糸球体への効果



(2) 培養ヒトメサンギウム細胞において TGF はフィブロネクチンの発現を増加させた。クロト蛋白の投与で TGF によるフィブロネクチン発現の亢進は阻害された。また、IGF はメサンギウム細胞におけるコネクシン40の発現を低下させた。クロト蛋白の投与は IGF によるコネクシン40発現の低下に拮抗した。

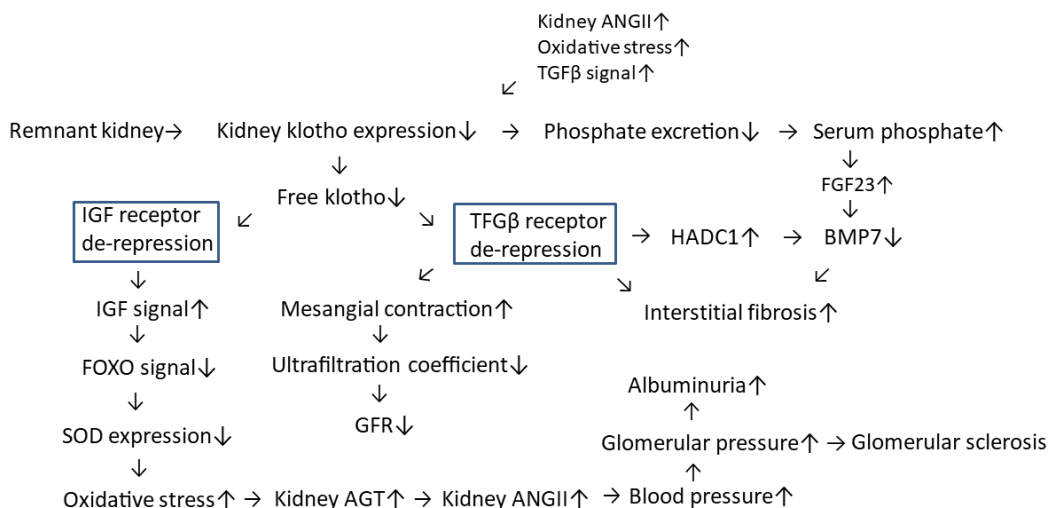
(3) 免疫沈降法を用いた検討では、クロト蛋白はトランスフェリン受容体に有意な結合を示さず、HIGA マウスにおいてクロト蛋白補充が糸球体への IgA 沈着に変化を与えないという所見を支持した。

(4) 腎垂全摘ラットにおいて、クロト蛋白補充は収縮期血圧、アルブミン尿、FGF23、血清リン濃度、腎アンジオテンシン濃度、腎の線維化や腎におけるコラーゲンと TGF の発現を低下させた。また、クロト蛋白補充は糸球体ろ過率、リン排泄率や腎における SOD、クロト、BMP7 の発現を亢進させた。



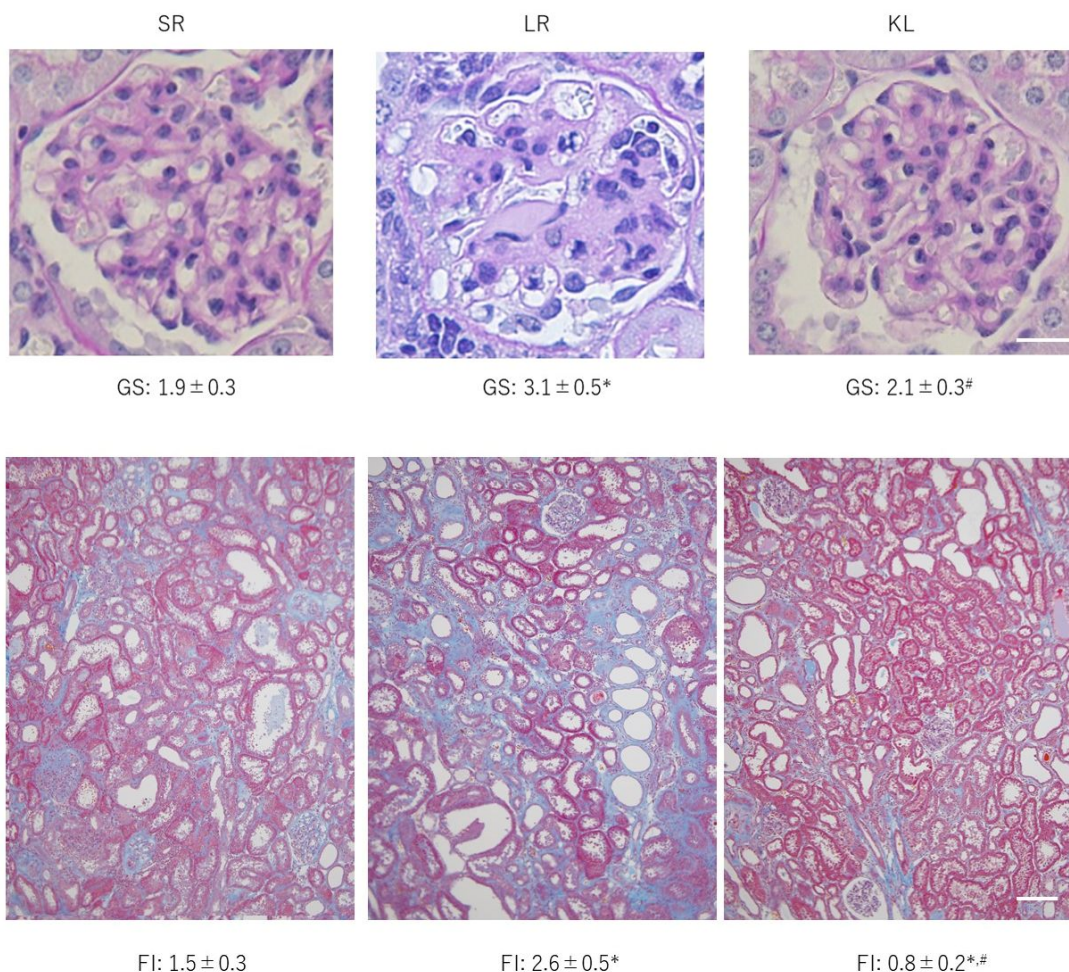
図 3 : 腎亜全摘ラットにおけるクロト蛋白の保護効果と作用機序

## Working hypothesis



これらの結果は、クロト蛋白補充が腎亜全摘ラットにおいて腎内レニン-アンジオテンシン系を不活性化し、血圧とアルブミン尿を低下させることを示した。また、外因性のクロト蛋白補充は、腎亜全摘ラットにおいて内因性の腎クロト発現を上昇させ、リン排泄を亢進させることで血清リン濃度と FGF23 濃度を低下させることを支持した。さらに、今回の結果は、クロト蛋白補充が腎の BMP7 発現を改善するとともに、腎亜全摘ラットの腎機能障害と腎線維化を改善することを示唆した。

図 4 : 腎亜全摘ラットにおけるクロト蛋白の糸球体病理と腎線維化に対する効果



( 5 ) 培養ヒト胎児腎細胞は BMP 7 を発現している。ヒト胎児腎細胞の内因性クロト蛋白を siRNA

で減弱させると BMP7 発現は低下した。また、TGF $\beta$  はヒト胎児腎細胞の BMP7 発現を低下させ、クロトはこの TGF $\beta$  の作用に拮抗した。更に、ヒト胎児腎細胞において FGF23 は濃度依存的に BMP7 の発現を低下させるが、この反応は内因性クロトに依存していた。

(6)免疫沈降法を用いた検討では、クロト蛋白は transient receptor potential channel (TRPC) 6 と有意な結合を示さず、腎不全全摘ラットで見られたクロト蛋白による GFR の改善は、TRPC6 とは独立にクロトが TGF $\beta$  のメサンギウム収縮作用に拮抗し、ultrafiltration coefficient を増加させることで、GFR 改善をもたらしている事が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takenaka T, Ohno Y, Eguchi K, Miyashita H, Suzuki H, Shimada K.	4. 巻 31(1)
2. 論文標題 Central and brachial pulse pressure predicts cardiovascular and renal events in treated hypertensive patients.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Press.	6. 最初と最後の頁 64-70.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08037051.2022.2062295	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 Kurosaki Y, Imoto A, Kawakami F, Ouchi M, Morita A, Yokoba M, Takenaka T, Ichikawa T, Katagiri M, Nielsen R, Ishii N.	4. 巻 477(3)
2. 論文標題 In vitro study on effect of bardoxolone methyl on cisplatin-induced cellular senescence in human proximal tubular cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Cell Biochem.	6. 最初と最後の頁 689-699.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-021-04295-y	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 Takenaka T, Hasan A, Marumo T, Kobori H, Inoue T, Miyazaki T, Suzuki H, Nishiyama A, Ishii N, Hayashi M.	4. 巻 39(8)
2. 論文標題 Klotho supplementation attenuates blood pressure and albuminuria in murine model of IgA nephropathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Hypertens.	6. 最初と最後の頁 1567-1576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HJH.0000000000002845.	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 Takenaka Tsuneo, Nagano Mayuko, Yamashita Koji, Kikuchi Kiyoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Flaxseed oil stimulates gynecomastia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Case Reports	6. 最初と最後の頁 e237948 ~ e237948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bcr-2020-237948	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 Takenaka Tsuneo, Kobori Hiroyuki, Inoue Tsutomu, Miyazaki Takashi, Suzuki Hiromichi, Nishiyama Akira, Ishii Naohito, Hayashi Matsuhiko	4. 巻 318
2. 論文標題 Klotho supplementation ameliorates blood pressure and renal function in DBA/2-psy mice, a model of polycystic kidney disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F557 ~ F564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00299.2019	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 Takenaka Tsuneo, Zeniya Mikio, Miura Soichiro, Amano Takahiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Symptomatic hyponatremia: a rare but reversible adverse reaction of lubiprostone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Case Reports	6. 最初と最後の頁 e232438 ~ e232438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bcr-2019-232438	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 Takenaka Tsuneo, Miura Soichiro, Kitajima Masaki	4. 巻 26
2. 論文標題 The management of polycystic liver disease by tolvaptan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Molecular Hepatology	6. 最初と最後の頁 70 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3350/cmh.2019.0026	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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Tsuneo Takenaka, Arif Hasan, Takeshi Marumo, Tsutomu Inoue, Takashi Miyazaki, Hiromichi Suzuki, Yoshifumi Kurosaki, Naohito Ishii, Akira Nishiyama, Matsuhiko Hayashi
2. 発表標題 KLOTLO SUPPLEMENTATION REVERSES RENAL DYSFUNCTION AND INTERSTITIAL FIBROSIS IN REMNANT KIDNEY
3. 学会等名 ERA-EDTA Congress (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹中 恒夫, 丸茂 丈史, Hasan Arif
2. 発表標題 クロトが骨形成蛋白質7の発現に与える影響
3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsuneo Takenaka, Yoichi Ohno, Kazuo Eguchi, Hiroshi Miyashita, Hiromichi Suzuki, Kazuyuki Shimada
2. 発表標題 Central and brachial pulse pressure predicts cardiovascular and renal events in treated hypertensive patients.
3. 学会等名 EUROPEAN MEETING ON HYPERTENSION AND CARDIOVASCULAR PROTECTION (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中澤 亜衣, 荒井 孝子, 武田 英孝, 東野 定律, 竹中 恒夫, 池田 俊也, 青萩 陽子, 天野 隆弘
2. 発表標題 人間ドックデータにおけるeGFRの短期的変化に影響する因子の検討
3. 学会等名 日本人間ドック学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsuneo Takenaka, Yishifumi Kurosaki, Naohito Ishii, Tsutomu Inoue, Akira Nishiyama
2. 発表標題 Klotho deficiency induces regulatory T cells in murine lupus nephritis.
3. 学会等名 Kidney Week 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 竹中 恒夫、大野 洋一、江口 和男、宮下 洋、鈴木 洋通、島田 和幸
2. 発表標題 中心脈圧は心血管イベントの、上腕血圧は腎イベントの予見に優れる
3. 学会等名 臨床高血圧フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹中 恒夫、井上 勉、西山 成、石井 直仁、林 松彦
2. 発表標題 クロト蛋白補充は腎垂全摘モデルにおける腎障害を抑制する
3. 学会等名 日本腎臓学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒井 孝子、武田 英孝、東野 定律、Babayev Tamerlan、竹中 恒夫、池田 俊也、青萩 陽子、天野 隆弘
2. 発表標題 ドック健診の健常者データから分析したeGFR低下に関わる因子
3. 学会等名 人間ドック学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ishii N, Carmines PK, Kurosaki Y, Imoto A, Ikenaga H, Yokoba M, Ichikawa T, Takenaka T, Katagiri M.
2. 発表標題 Mitophagy-related renal and proximal tubular protention during the microalbuminuric stage of diabetes mellitus
3. 学会等名 Kidney Week 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒崎 祥史、井本 明美、森田 亜州華、大内 基司、川上 文貴、市川 尊文、横場 正典、片桐 真人、竹中 恒夫、石井 直仁
2. 発表標題 近位尿細管における脂肪酸結合アルブミン負荷は過剰な細胞増殖を介して細胞老化を促進する
3. 学会等名 日本臨床化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹中 恒夫、小堀 浩幸、井上 勉、宮崎 孝、鈴木 洋通、西山 成、石井 直仁、林 松彦
2. 発表標題 クロト補充は多発性嚢胞腎モデルで血圧と腎機能を改善する
3. 学会等名 日本腎臓学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kurosaki Y, Ikarashi F, Imoto A, Kawakami F, Yokoba M, Takenaka T, Katagiri M, Ichikawa T, Nielsen R, Ishii N
2. 発表標題 Effect of regulated intramembrane proteolysis on megalin expression during oxidative stress exposure
3. 学会等名 ERA-EDTA (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ishii N, Carmines PK, Kurosaki Y, Imoto A, Ikenaga H, Yokoba M, Ichikawa T, Takenaka T, Katagiri M.
2. 発表標題 Mitochondrial Quality Control Mechanisms in Renal Cortex During the Normoalbuminuric Stage of Diabetes Mellitus.
3. 学会等名 Kidney Week 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Furukawa Y, Kodama K, Ohto M, Takeda H, Kayashima Y, Takenaka T, Kawai Y, Zeniya M, Yamanaka H, Amano T.
2. 発表標題 Findings showed by chest CT examination under the spread of COVID-19.
3. 学会等名 第27回国際健診学会・第4回国際人間ドック会議 合同会議（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 竹中 恒夫	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ライフメディコム	5. 総ページ数 6
3. 書名 カレントセラピー	

1. 著者名 竹中 恒夫	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 2
3. 書名 日本医事新報	

1. 著者名 竹中 恒夫	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エルアイシー	5. 総ページ数 411
3. 書名 循環器疾患 モデル動物の作製と利用	

〔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	アリフ・ウル ハサン (Hasan Arif) (00570368)	国際医療福祉大学・医学部・助教  (32206)	
研究分担者	西山 成 (Nishiyama Akira) (10325334)	香川大学・医学部・教授  (16201)	
研究分担者	宮崎 孝 (Miyazaki Takashi) (30265417)	埼玉医科大学・医学部・講師  (32409)	
研究分担者	丸茂 丈史 (Marumo Takeshi) (70265817)	国際医療福祉大学・医学部・教授  (32206)	
研究分担者	石井 直仁 (Ishii Naohito) (80212819)	北里大学・医療衛生学部・教授  (32607)	
研究分担者	宮崎 利明 (Miyazaki Toshiaki) (50589075)	埼玉医科大学・医学部・助教  (32409)	

## 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
---------	---------