

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590920

研究課題名（和文） Klotho 蛋白による腹膜機能保護作用のメカニズム解析

研究課題名（英文） Investigation of klotho protein on protective role of peritoneal membrane

研究代表者

佐々木 環 (SASAKI TAMAKI)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：30187124

研究成果の概要（和文）：CAPD療法において腹膜は生体不適合性の透析液に曝露され、中皮細胞の露出から最終的には組織線維症に至り、限外濾過の不全が引き起される。中皮細胞形質変換（Epithelial-to-Mesenchymal Transition：EMT）は線維化初期過程において重要な役割を果たし、この腹膜線維化にはWntシグナル活性化が関与する。Klotho蛋白はWntシグナル活性化を抑制し、中皮細胞形質変換、線維化を抑制し腹膜の保護作用を示す。

研究成果の概要（英文）：The one of obstacles to successful long-term PD is peritoneal fibrosis in peritoneal membrane after exposure to non-physiologic dialysis solutions. Studies have demonstrated that peritoneal mesothelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) after expose to injury. EMT is the important role of the initial peritoneal fibrosis. The induction of EMT is associated with activation of Wnt-dependent beta-catenin signaling and the secreted klotho protein can regulate Wnt signaling. Overexpression of Klotho protein protects the peritoneal membrane through attenuation of Wnt-signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：人工透析学

1. 研究開始当初の背景

腹膜中皮細胞の線維化は、腹膜機能低下の規定因子である。中皮細胞の線維形質性

形質への形質変換（EMT）は、腹膜線維化初期過程において重要な役割を演じており、

EMTにはWntシグナル活性化が関与している。抗老化蛋白であるklothoはWnt活性抑制作用を有することから、「Klotho蛋白は腹膜線維化過程において、Wnt-signal系抑制によりEMTを抑制し、線維化抑制に働き腹膜保護作用を発揮する」との仮説をたてた。

2. 研究の目的

(1) 腹膜線維化過程における、Wntシグナルの関与の有無を検討する。

(2) Klotho蛋白発現量増加による、腹膜線維化への影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) Wntシグナル制御下に β -galactosidase遺伝子を発現するreporter miceを使用し、腹膜を剥皮することで腹膜線維化モデル(PF群)を作成し、Sham operation (SHAM群)を対照群として1, 2週間後の変化を検討した。

(2) Human elongation factor-1aプロモーターを用いklotho蛋白を全身性に過剰発現させたTransgenic mice (KlothoTG)と、比較にWild type (WT)を使用し、腹膜を剥皮することで腹膜線維化モデル(PF群)を作成し、Sham operation (SHAM群)を対照群として、2週間後の変化を検討した。

4. 研究成果

(1)-① 腹膜線維化モデルにおける腹膜組織変化の評価

Masson染色で、SHAM群では一層に存在する腹膜中皮が、PF群では腹膜剥皮により1週間後、2週間後で段階的に線維化を形成している(図1)。



図1: SHAM群に比較してPF群ではMasson染色で線維化過程の進行が確認される。

(1)-② 腹膜中皮組織における線維化マーカーの継時的変化の評価

リアルタイムPCRで、profibroticなマーカーである α SMA, FN1のmRNAレベルを確認した。PF群では、腹膜剥皮後1週間後に発現が増大していた。さらに、Wntシグナル関連マーカーである、cmyc, WISP1のmRNAレベルも確認した。PF群では、腹膜剥皮後1週間後に発現が増大していた(図2)。

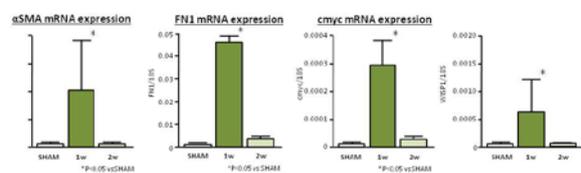


図2: PF群において作成1週間後にprofibroticなマーカーである α SMA, FN1, myc, WISP1のmRNAレベルの上昇を確認した。

(1)-③ 腹膜中皮組織における β -galactosidase活性の評価

Wntシグナル制御下にある β -galactosidase活性をX-GAL染色で確認した。PF群では、1週間後の再生腹膜中皮で染色を認めており、Wntシグナル活性化が示唆された(図3)。

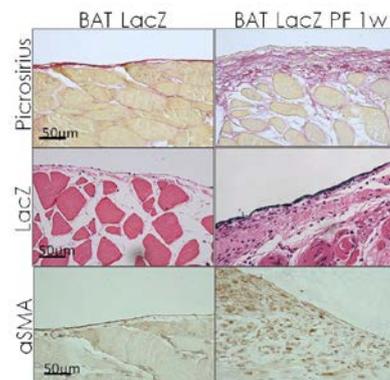


図3: PF群で β -galactosidase活性を確認され、Wntシグナル活性化が示唆された。

(1)-④ 腹膜中皮組織における Wnt シグナル関連蛋白の評価

Wnt 関連蛋白である α SMA を免疫染色で確認した。PF 群では、1 週間後の染色性の増大を認めていた。さらに、Wnt シグナルの重要な構成因子である β catenin の蛋白量を WB で確認した。1 週間後に増加を認めていた (図 4)。

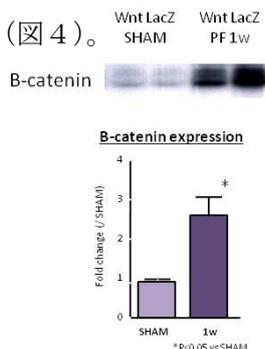


図 4 : Wnt シグナルの重要な構成因子である β catenin の蛋白量を WB で確認した。

(2)-① Klotho 蛋白発現量増加による腹膜組織変化の影響の評価

Massin 染色で、SHAM 群では一層に存在する腹膜中皮が、WT PF 群では腹膜剥皮により 2 週間後で線維化を形成している。Klotho TG PF 群では腹膜剥皮による腹膜線維化が抑制されていた。

(2)-② Klotho 蛋白発現量増加による Wnt 関連蛋白への影響の評価

Wnt 関連蛋白である α SMA を免疫染色で確認した。WT PF 群では、1 週間後の染色性の増大を認めていた。Klotho TG PF 群では、染色性の増大は抑制されていた (図 5)。

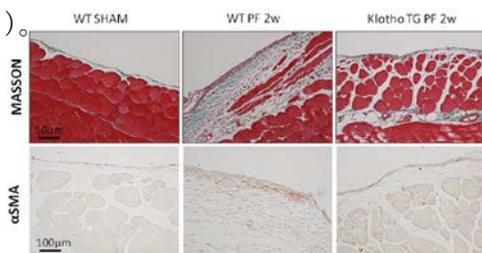


図 5 Wnt 関連蛋白である α SMA を免疫染色で確

認し、WT PF 群では増大を認め Klotho TG PF 群では、染色性の増大は抑制された。

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 9 件)

- ① 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.* 83(4):662-73,2013 査読有り doi: 10.1038/ki.2012.475.
- ② 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.* 303 (12) F1641-51,2012 査読有り doi: 10.1152/ajprenal.00460.2012
- ③ 佐々木環. Klotho 蛋白による腹膜機能保護作用のメカニズム解析. 査読なし 川崎医学会誌 38(2):S52 2012
- ④ 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.* 93(3):334-43, 2012 査読有り doi: 10.1038/labinvest.2012.171.
- ⑤ Yorimitsu D, Satoh M, Koremoto M, Haruna Y, Nagasu H, Kuwabara A, Sasaki T, Kashihara N. Establishment of a blood purification system for renal failure rats using

- small-size dialyzer membranes. *Ther Apher Dial.* 16(6):566-72, 2012 査読有り doi: 10.1111/j.1744-9987.2012.01091.x.
- ⑥ Kidokoro K, Satoh M, Nagasu H, Sakuta T, Kuwabara A, Yorimitsu D, Nishi Y, Tomita N, Sasaki T, Kashihara N. Tacrolimus Induces Glomerular Injury via Endothelial Dysfunction Caused by Reactive Oxygen Species and Inflammatory Change. *Kidney Blood Press Res.* 35(6):549-57, 2012 査読有り doi: 10.1159/000339494.
- ⑦ 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.* 35(3):348-55, 2012 査読有り doi: 10.1038/hr.2011.184.
- ⑧ Nagasu H, Satoh M, Kidokoro K, Nishi Y, Channon KM, Sasaki T, Kashihara N. Endothelial dysfunction promotes the transition from compensatory renal hypertrophy to kidney injury after unilateral nephrectomy in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 302(11):F1402-8, 2012 査読有り doi: 10.1152/ajprenal.00459.2011.
- ⑨ Nagasu H, Satoh M, Kuwabara A, Yorimitsu D, Kidokoro K, Nishi Y, Tomita N, Sasaki T, Kashihara N. Overexpression of klotho protein modulates uninephrectomy-induced compensatory renal hypertrophy by suppressing IGF-I signals. *Biochem Biophys Res Commun.* 407(1):39-43, 2011 査読有り doi:10.1016/j.bbrc.2011.02.089
- [学会発表] (計 7 件)
- ① Satoh M, Kidokoro K, Nagasu H, Ihoriya C, Nishi Y, Kadoya H, Sasaki T, Kashihara N. Klotho Attenuates Inflammation of Adipose Tissue and Development of Insulin Resistance in High-Fat Induced Obese Mice. *Kidney Week 2012, November 2, 2012. San Diego, USA*
- ② 西佑子、佐藤稔、藤本壮八、佐々木環、柏原直樹. 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 2012 年 6 月 24 日 札幌市
- ③ 佐藤稔、佐々木環、柏原直樹. 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 2012 年 6 月 24 日 横浜市
- ④ 佐藤稔、佐々木環、柏原直樹. Klotho 蛋白導入による腎繊維化抑制効果の検討. 第 55 回日本腎臓学会学術総会 2012 年 6 月 2 日 横浜市
- ⑤ 佐藤稔、佐々木環、柏原直樹. 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 2012 年 6 月 24 日 横浜市
- ⑥ 西佑子、佐藤稔、藤本壮八、佐々木環、柏原直樹. 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 2012 年 6 月 2 日 横浜市
- ⑦ Satoh M, Nagasu H, Kidokoro K, Nishi Y, Ihoriya C, Kadoya H, Sasaki T, Kashihara N. Klotho Protein

Reduces Mouse Renal Fibrosis after
Unilateral Ureteral Obstruction
through Inhibition of Wnt Signaling.
49th ERA-EDTA Congress, May 26,
2012 ,Paris,France

- ⑧ 春名克祐、佐藤稔、長洲一、城所研
吾、西佑子、庵谷千恵子、富田奈留
也、佐々木環、柏原直樹. Klotho 蛋
白の高糖濃度による近医尿管上皮細
胞障害防御機構の解明. 第 54 回日本
腎臓学会学術総会 2011年6月15日 横
浜市

〔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

<http://www.kawasaki-jinzo.net/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 環 (SASAKI TAMAKI)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：30187124

(2) 研究分担者

佐藤 稔 (SATO MINORU)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：70449891

藤本 壮八 (SATO MINORU)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：00319948