

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591204

研究課題名(和文) Klothoを標的分子とした腎疾患の治療戦略

研究課題名(英文) Treating strategie for CKD with Klotho as a targetting molecule

研究代表者

土谷 健 (TSUCHIYA, KEN)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00246472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：早期老化モデルとして報告されたKlotho欠損マウスが、慢性腎臓病(CKD)に酷似した病態を引き起こすことで注目され、その後、Klothoがリン利尿ホルモン(FGF23)の受容体であることが解明されリン代謝に重要な意義を持つ。この研究計画で、われわれは、Klothoの生物学的な働きと抗繊維化作用、臨床上でのヒトでの測定などに重点をおいた研究を行った。実際にCKDではKlothoの腎での発現が抑制され、さらに腎の繊維化は障害の基本的病態であるが、Klothoの低下がそれを促進させ、悪循環を形成することが判明した。CKDの治療戦略上Klothoは重要な標的物質になるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Defects in Klotho gene expression in mice result in a syndrome resembling human aging that resembling with pathophysiology of chronic kidney disease (CKD). It has been clarified that membrane Klotho functions as a co-receptor for fibroblast growth factor 23 (FGF23) that regulate phosphate metabolism. Renal expression of the Klotho gene is markedly suppressed in CKD. Since renal fibrosis is a major risk factor for progression of CKD, renal interstitial fibrosis and Klotho expression should be correlated with each other. In this project, we explored the role and biological properties of Klotho, and especially focused on the phosphate metabolism, anti-fibrotic mechanism and clinical relevance of Klotho by measuring serum Klotho level in CKD. A reduction of Klotho expression aggravates renal interstitial fibrosis and that fibrosis-related factors regulate Klotho expression, making a vicious spiral in CKD. Thus, Klotho molecule is a targeting molecule in therapeutic strategy in CKD.

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：CKD klotho リン 繊維化

1. 研究開始当初の背景

日本国民の5人に1人は慢性腎臓病 (CKD) を患っている。CKDは進行すると透析療法が必要となり、医療費圧迫の原因にもなっている。高齢化社会の進展に伴って患者数は更に増えると予想されており、CKDが国民病として位置づけられるようになった。CKD患者では心血管系合併症を合併してくるため、CKD進展阻止・心血管系合併症抑制は医学上の最優先課題のひとつと認識されている。

早期老化モデルとして報告された *Klotho* 欠損マウスが (Nature 1997)、CKDに酷似した病態 (高リン血症、動脈硬化、骨粗鬆症、短命など) を引き起こすことで注目され、その後、*Klotho* がリン利尿ホルモン (FGF23) の受容体であることが解明された。すなわち、*Klotho* が欠損するとリンが尿中に排泄されずに体内に蓄積し、上述の如く様々な病態を引き起こす。*Klotho* 欠損マウスは低リン食にて症状が改善するが、CKD患者でも低リン食やリン吸着剤は心血管系病変の改善に有効である。こうしてCKDの病態生理における *Klotho* の意義が大きく close up されている。

さらに、*Klotho* を FGF23 の受容体構造蛋白としての位置づけのみでは、さまざまな *Klotho* 欠損の病態生理の説明が可能ではないと考えられる。分泌型蛋白があること、遠隔臓器での病態形成など、*Klotho* 蛋白のさまざまな潜在性を示唆している。研究者グループは、当初より *Klotho* は、抗酸化作用を持つために老化を遅延させると仮説をたて研究を開始し、その抗酸化、抗アポトーシス、抗繊維化作用について報告した (土谷, 東部腎臓学会シンポジウム 2010)。このため、今回の研究計画では、*Klotho* のリン代謝の構造蛋白としてではなく、その応用による腎障害進展抑制のメカニズム、臨床応用を目的としたトランスレーショナルリサーチを主題とする。

2. 研究の目的

老化因子として注目された *Klotho* 蛋白は、その腎での発現がリン利尿ホルモンの受容体としての働きをすることが明らかにされた。本研究では、*Klotho* のリン代謝ならびにその潜在的な生理活性に注目し、腎疾患における *Klotho* の病態生理を明らかにし、治療に応用する標的分子として検討することが目的である。

3. 研究の方法

(1) 方法の概要

Klotho 蛋白のCKDにおける臨床的応用を目指したトランスレーショナルリサーチである。以下3つの目的、1) 腎のリン輸送体と *Klotho* の関わり 2) *Klotho* を up regulate する因子の検討 3) 血中 *Klotho* レベル測定法の開発 を研究代表者、分担者による遂行する。リン代謝に関しては代表的にリン輸送体と *Klotho* との関わりを遺伝子制御モデルで

検討する。また、*Klotho* 発現が外因的に刺激できる手段があれば、臨床的に応用な可能性がある。*Klotho* の測定は、本研究グループの所属施設の TOF MAS 装置を用いて行う。

CKDを中心とした腎疾患において、リンの代謝は単に大血管の石灰化などのみでなく、他の合併症やその進行自体にも関わりをもつことが指摘され注目されている。食事中的リンは主に小腸膜のリン輸送担体 (Npt2b) を介して吸収されるので、理論的には、Npt2bを抑制すればリン吸収が抑制され、*Klotho* 欠損マウスの症状やCKDの進行および合併症の発生が抑制されると考えられるが、Npt2b阻害薬は未だ開発途上である。このため、Npt2b抑制がCKDの新しい治療法となり得るか否かを動物実験で検討する。

Klotho の発現に関わる因子については、まだ情報が不足している。腎疾患の進展状況では、*Klotho* の発現が低下することは今までの報告からも明らかであるが、upregulateする状況、外因因子は不明な点が多い。臨床では、造血ホルモン・エリスロポエチンやビタミンDアナログなどの腎保護効果が応用されている。さらに、*Klotho* 蛋白に、膜型とともに分泌型が存在するが、特にその分泌型の作用機序については、受容体、細胞内シグナルの解明が必要である。また、*Klotho* の持つ生物学的活性も抗酸化作用、抗アポトーシス作用、抗繊維化作用などにつき検討する。

Klotho 蛋白の大きな疑問点として、いまだに血中レベルの測定が容易でないことが挙げられる。すでに幾つかの試みがなされているが、当施設では飛行時間型質量分析法 (TOF MS) が利用可能なため、今回の研究計画に取り入れた。Ligand である FGF23 が測定可能であり、CKD では早期から高度に上昇することが明らかにされている。こうした背景では、やはり血中レベルの測定が可能になればさまざまな病態の解明に重要な情報をもたらすと考えられる。

(2) 具体的な手法

腎のリン輸送体と *Klotho* の関わり

ここでは、Npt2b 抑制がCKDの新しい治療法となり得るか否かを動物実験で検討することにある。Npt2b 阻害薬がCKDの画期的な新薬となり得ることを示唆することになり、より強力で安全なNpt2b 阻害薬の開発、臨床試験に向けて更なる研究を刺激することが期待される。*Klotho* 欠損マウス、*Npt2b* 欠損マウス、および Npt2b 阻害状態 (ここでは siRNA) を用いて、*Klotho* 欠損マウスの *Npt2b* 遺伝子を破壊することで (具体的には *Klotho* $-/-$ マウスと *Npt2b* $-/-$ マウスとの掛け合わせ)、高リン血症、動脈硬化、骨粗鬆症、短命などの症状が改善するか検討する。

Npt2b 欠損マウスに実験的にCKDを発症させ (腎炎惹起モデルを検討している)、CKDの進行や合併症の発生が野生型マウスに比して抑制されているか否かを検討する。野生型マウスに実験的にCKDを発症させ、

Npt2bsiRNA が Klotho の発現や網羅的遺伝子発現の検索による影響しうる遺伝子群を検討する。

Klotho を up regulate する因子の検討
外因因子で、Klotho 発現に影響を与えうる因子の検討

Klotho 蛋白が腎障害時に好ましい働きをすることは明らかであり、その発現を増加することができる因子を検討する。

すでに、実験レベルでは心筋梗塞モデルで、外因性エリスロポエチンの投与が壊死領域の縮小効果がみられたことが報告されており、例えば AKI モデル(虚血モデル)での腎機能改善、Klotho 発現への効果を検討する。

また、CKD での効果が注目される Vitamin D analog を長期投与し、生存率の延長効果、klotho ヘテロノックアウトマウスでの影響、それぞれでの腎機能の変化、動脈硬化の変化などを検討する。腎障害モデルとしては、アドリアマイシン腎症 片側尿管結紮 (UUO) で、具体的には経時的に血液・尿所見 (UN、クレアチニン、カルシウム、リン、鉄など)、腎組織変化、腎組織中の Klotho・Klotho 関連遺伝子発現 (mRNA: Real-Time PCR で検討、蛋白: Western blott 法、免疫組織染色で検討) を検討する。

Klotho の細胞内シグナルおよび CKD モデルにおける繊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する。すでに mIMCD3 cell, HK cell などで、Klotho の抗酸化、抗アポトーシス効果については報告した。さらに関連遺伝師の変化とともに、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。

マウス集合管細胞 (mIMCD3 Cell) に TGF- β 1 receptor 阻害薬 (ALK5 阻害薬) で前処理し、その後、TGF- β (10 ng/ml) を処理。Klotho, α -SMA, E-cadherin mRNA 発現をそれぞれ real-time quantitative PCR を用いて測定。ラット腎線維芽細胞 (NRK49F Cell) を recombinant Klotho protein で処理し、 α -SMA, E-cadherin, TIMP1, TIMP3 PAI1 発現をそれぞれ real-time quantitative PCR を用いて測定。

すでに 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 を候補因子として推定。特に PI3-K pathway は、insulin/IGF-1 signaling が関わっていると推定している。

血中 Klotho レベル測定法の開発

いまだに血中レベルの測定が容易でないことは、Klotho 蛋白の抗原性に起因するとされている。商業的に免疫生物会社 (IBL) よりヒトの血中レベルの測定キットが提供されているが、このアッセイ結果との比較を行いながら確認することができる。すでに測定の試みが各施設でなされているが、今回、本研究施設の TOF MS 装置を用いて測定を試みる。Klotho 蛋白の同定には、粒子に付着した抗 Klotho 抗

体を用いる。SELDI-TOF MAS を用いる (当共同研究施設内設置)。i) Protein chip を選定する (現時点ではまだ確定できていない)。

ii) Array は Ciphergen ProteinChip Reader で行う。iii) イオン化後に TOF で分子量測定を行う。iv) 分子量のサイズマーカには、膜蛋白および分泌型の両者を用いてサイズの決定を行い同定する。

4. 研究成果

老化因子として注目された Klotho 蛋白は、その腎での発現がリン利尿ホルモンの受容体としての働きをすることが明らかにされた。本研究では、Klotho のリン代謝ならびにその潜在的な生理活性に注目し、腎疾患における Klotho の病態生理を明らかにし、治療に応用する標的分子として検討することが目的である。

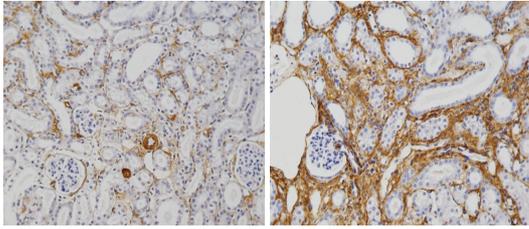
(1) 腎のリン輸送体と Klotho の関わり

腎のリン輸送体と Klotho の関わりについては、そのノックアウトマウスが取得できずに、この企画の進展が遅れた。候補としては、Klotho 欠損マウス、Npt2b 欠損マウス、および Npt2b 阻害状態 (ここでは siRNA) が挙げられたが、最終的には、Klotho 欠損マウスを用いて、Npt2b 遺伝子破壊を siRNA により導入した。Npt2b siRNA の作用が確認され、腎での Npt2b 発現を 30% 以下に抑制することが可能であった。高リン血症、動脈硬化、骨粗鬆症、短命などの症状が改善するか検討したが、siRNA による発現抑制が短期であり、長期の慢性的な影響を観察するモデルとしては適さなかった。研究最終年度には、本モデルで結果を観察したが、今後の展開を踏まえて、当初の計画通り輸送体の遺伝子改変動物のリストアップ、適性の検討も並行して行った。

(2) Klotho の生理活性および発現促進

外因因子で、Klotho 発現に影響を与えうる因子の検討: 造血因子エリスロポエチンは Klotho mRNA を誘導することが判明し、特に heat shock protein 70 を介した組織保護、抗酸化作用を報告したが、逆に、虚血、angiotensin II は Klotho 発現を抑制することが判明した。

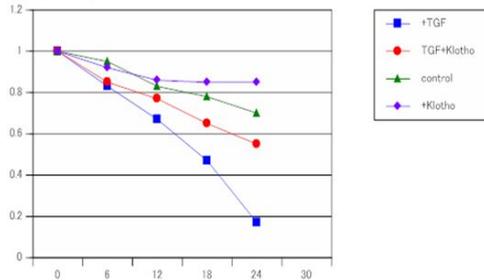
Klotho の関連シグナル、抗線維化作用に関しての検討: ラット腎線維芽細胞 (NRK49F Cell) を recombinant Klotho protein で処理し、線維化マーカーを測定。各種の線維化マーカーの発現を Klotho 蛋白が抑制することを確認した。さらに Klotho と主要な線維化因子である TGF β は相互の発現に抑制的に働くことが判明した。こうした事実は、CKD の病態生理において Klotho の発現が低下することが、リンの滞留と FGF23 の分泌刺激に関与し、さらに間質の線維化の成立に悪循環として関与していることを示唆している。この内容は Am J Physiol Renal Physiol 誌に掲載した。



マウスの尿管結紮モデル:腎の alpha-SMA 染色

慢性線維化のモデルで、Klotho の発現が半分低下したマウス(klotho ヘテロノックアウトマウス)では線維化がより顕著である(右図)

さらに抗線維化の作用については、Wound healing scratch assay による Klotho 蛋白の作用を定量化することができた。scratch 後の細胞被覆領域の回復を測定することで、増殖、線維化の程度を定量化できた。Klotho 蛋白の添加により抑制的に作用することが観察された。この assay 系を用いるとさまざまな物質の Klotho に及ぼす作用を定量的に判定することが可能であり、実際に TGF β の影響を可視的に、また数値的に判定することができた。



縦軸に剥離面積、横軸が時間

Klotho の添加により剥離面積の消褪が抑制され、線維芽細胞の増殖が制御されていることが示唆される

(3)血中 Klotho レベル測定法の開発

商業的に免疫生物会社 (IBL) よりヒトの血中レベルの測定キットが提供されているが、このアッセイを用いて、ヒトおよびマウスでの Klotho の血中レベルの測定を行った。その結果と組織での蛋白発現を Western blotting により対比した。血中 Klotho レベル測定は引き続き enzyme assay のデータの検証を続けつつ、当院に設置されている SELITOF MS 装置を用いて測定を試みた。CKD 各腎機能での測定、また多発性のう胞腎患者での測定をおこなっている。CKD 動物モデルでは Klotho の発現が腎組織および血中レベルで低下する傾向が認められた。

Klotho 蛋白は、骨に由来する FGF23 と共役して、腎でのリン利尿をもたらすことが明らかにされた。Klotho のリン代謝ならびにその潜在的な生理活性に注目し、腎疾患における Klotho の病態生理を明らかにし、治療に応用する標的分子として検討した。

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 4 件)

Shiohira S, Yoshida T, Sugiura H, Nishida M, Nitta K, Tsuchiya K. Sphingosine-1-phosphate acts as a key molecule in the direct mediation of renal fibrosis. *Physiological Reports* 査読有 DOI: 10.1002/phy2.172. 2013

Okano K, Hibi A, Yiyaoaka T, Inoue T, Sugimoto H, Tsuchiya K, Akiba T, Nitta K. Inhibitory effects of the transcription factor Ets-1 on the expression of type I collagen in TGF- β 1-stimulated renal epithelial cells. *Mol Cell Biochem* 査読有 369:247-254, 2012. doi:10.1007/s11010-012-1388-6.

Sugiura H, Yoshida T, Shiohira S, Kohei J, Mitobe M, Kurosu H, Kuro-o M, Nitta K, Tsuchiya K. Reduced Klotho expression level in kidney aggravates renal interstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 査読有 302:F1252-F1264, 2012. doi: 10.1152/ajprenal.00294.2011.

Tsuchiya M, Tsuchiya K, Yasuda K, Fujita K, Takinishi A, Furukawa M, Nitta K, Maeda A. MafA is a key molecule in glucose and energy balance in the central nervous system and peripheral organs. *Int J Biomed Sci* 査読有 7: 19-26, 2011.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3614815/>

〔学会発表〕(計 12 件)

Tsuchiya M, Misaka R, Nitta K, Tsuchiya K. Klotho is involved in the differentiation and establishment of cell integrity of pancreatic/adipose cell in coordination with transcriptional factor, mafA. *American Diabetes Association* 6/21 2013 San Diego, USA

Tsuchiya K, Shiohira S, Nishida M, Okano K, Sugiura H, Nitta K, *Biological properties of klotho in the anti-fibrotic process and establishment of cell integrity in coordination with cell signaling pathway /translocation of membrane transporters* *American Society of Nephrology* 11/8 2013 Atlanta, USA

潮平俊治、芳田 工、公平順子、杉浦秀和、新田孝作、土谷 健. siRNA とスクラッチアッセイによる

Sphingosine-1-phosphate receptor 3 と腎臓線維化の解明 日本腎臓学会学術総会 5/10 2013 東京

土谷 健、杉浦秀和、潮平俊治、公平順子、鈴木美貴、望月俊雄、新田孝作 Scratch assay を用いた Klotho の抗線維化作用の検討 日本腎臓学会学術総会 5/10 2013 東京

Tsuchiya K, Sugiura H, Yosida T, Shiohira S, Nitta K. Assessment of anti-fibrotic effects of klotho with a high-throughput cell migration assay using scratch wound healing. American Society of Nephrology 11/1 2012 San Diego USA

Shiohira S, Yoshida T, Kohei J, Sugiura H, Nitta K, Tsuchiya K. Sphingosine 1-phosphate/sphingosine 1-phosphate receptor 3, potential mediators of renal fibrosis, are assessed by siRNA and scratch assay. American Society of Nephrology 11/1 2012 San Diego USA

潮平俊治、芳田 工、公平順子、杉浦秀和、三戸部倫大、新田孝作、土谷 健. Sphingosine-1-phosphate レセプター3 は腎臓に繊維化に重要である 日本腎臓学会学術総会 6/1 2012 横浜

杉浦秀和、芳田 工、公平順子、三戸部倫大、潮平俊治、土谷 健、新田孝作. Klotho 発現と腎線維化、TGF beta との関連 日本腎臓学会学術総会 6/1 2012 横浜

Sugiura H, Yoshida T, Kohei J, Shiohira S, Mitobe M, Tsuchiya K, Nitta K. Reduced Klotho expression level in kidney aggravates renal interstitial fibrosis American Society of Nephrology 11/8 2011 Philadelphia USA

Shiohira S, Yoshida T, Kohei J, Sugiura H, Mitobe M, Nitta K, Tsuchiya K, S1PR3 is pivotal factor in fibrosis in the kidney American Society of Nephrology 11/8 2011 Philadelphia USA

杉浦秀和、芳田 工、三戸部倫大、潮平俊治、土谷 健、新田孝作 Klotho 発現と腎線維化、TGF beta との関連 日本腎臓学会学術総会 6/15 2011 横浜

潮平俊治、芳田 工、公平順子、杉浦秀和、三戸部倫大、土谷 健、新田孝作 Sphingosine-1-phosphate は腎臓の線維化を直接的・間接的に促進する因子のひとつである 日本腎臓学会学術総会 6/15 2011 横浜

研究者番号：00246472

(3) 連携研究者

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

潮平 俊治 (SHIOHIRA Shunji)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：00529232

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・准教授