

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461226

研究課題名(和文)系球体腎炎に対する可溶性 α -Klotho蛋白の新規治療薬としての有用性の検討研究課題名(英文) Analysis of the effect of α -Klotho protein on the progressions of glomerulonephritis

研究代表者

中谷 公彦 (Nakatani, Kimihiko)

奈良県立医科大学・医学部・その他

研究者番号：80398445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病症例の腎生検検体を用いた研究および巣状系球体硬化症モデルマウスを用いた研究で、腎臓での α -Klotho (KL) 発現低下が、KLによる腎尿細管上皮細胞の形質転化の抑制効果が減じることで、腎間質線維化病変の進行に關与する可能性が示唆された。しかし、系球体硬化病変の進行には腎臓でのKL発現低下は有意な影響は及ぼさないと考えられた。一方で、ループス腎炎モデルマウスを用いた実験では、腎臓でのKL発現低下は系球体腎炎の進行に有意な影響を及ぼさないと考えられた。これらことは、KL蛋白は、腎間質線維化の進行を抑制する可能性があるが、系球体病変の進行には有意な抑制作用を有しない可能性を意味する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed the decrease of α -Klotho(KL) expression in the kidney was associated with the progression of renal interstitial fibrosis in CKD patients and mouse model of focal segmental glomerulosclerosis(FSGS), via reduced effect on epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells by KL. However, the decrease of renal KL expression did not significantly affect the progression of glomerulosclerosis in CKD patients and FSGS model mice. In addition, we revealed the decrease of renal KL expression did not significantly affect the progression of glomerulonephritis in lupus model mice. In summary, KL may have a suppressive effect on renal interstitial fibrosis, but not on glomerulosclerosis and glomerulonephritis.

研究分野：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード： α -Klotho FSP-1 慢性腎臓病 巣状系球体硬化症 ループス腎炎

1. 研究開始当初の背景

α -Klotho 蛋白は、腎臓遠位曲尿細管、副甲状腺上皮小体、脳脈絡膜に発現する I 型膜蛋白であり、カルシウム代謝の中心的な制御分子であることが最近の研究により明らかとされてきた。一方、 α -Klotho 蛋白は膜貫通ドメイン近傍で切断され、可溶性蛋白として血液中や髄液中、尿中に存在していることが明らかとされ、可溶性 α -Klotho 蛋白は、ミネラル代謝の制御をはじめ Wnt 活性の抑制、insulin growth factor-1 様の機能、脂肪細胞分化の促進など分泌ホルモンとして様々な生理機能を有すると考えられている。また、この可溶性 α -Klotho 蛋白濃度が ELISA 法で測定することが可能となり、慢性腎臓病でのその動態が明らかにされつつある。

Fibroblast specific protein 1(FSP1)は線維芽細胞特異的に発現する分子であり、線維芽細胞の形態維持や運動能に関与している。われわれは、腎間質線維化の進展に尿細管上皮細胞の FSP1 陽性線維芽細胞への形質変異が重要な役割を果たすことを明らかにした。最近になり、われわれは糸球体疾患において、糸球体障害・糸球体硬化の進展とともに、ポドサイトに FSP1 の発現亢進が認められることを報告している。

われわれは、ヒト腎生検標本を用いた予備的検討において、1) 腎臓病早期より α -Klotho 発現量は有意に低下すること、2) 腎臓での α -Klotho 発現量と血中可溶性 α -Klotho 濃度は有意な正の相関を示すこと、3) 腎臓での α -Klotho 発現量は腎間質線維化の程度と有意な負の相関を示すこと、4) 糸球体内 FSP1 陽性ポドサイト数および間質内 FSP1 陽性細胞数が多い症例では、腎臓での α -Klotho 発現が低下していることを確認した。

以上のことから、腎臓病では早期より腎臓での α -Klotho 発現が低下、それに伴い血中可溶性 α -Klotho 濃度が低下し、これらがポドサイトや尿細管上皮細胞に FSP1 発現を誘導、

亢進させ、糸球体硬化や腎間質線維化の発症・進展に繋がる可能性が高いと考えた。そこで、可溶性 α -Klotho 蛋白が低酸素などの各種腎臓障害による尿細管上皮細胞およびポドサイトの線維芽細胞様への形質変異 (FSP1 を発現する) を抑制しているのではないかという作業仮説のもと、ヒト慢性腎臓病 (CKD) 検体および実験腎炎モデルマウスを用いて本研究を展開し、 α -Klotho 蛋白の新規治療薬としての可能性を模索する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、慢性腎臓病 (CKD) の進展に対する α -Klotho 蛋白の意義を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1. 臨床サンプルを用いた検討

当施設および協力施設で腎生検を施行した慢性腎臓病 (CKD) 例 (150 例) を対象として、腎臓での膜型 α -Klotho 発現量および血中可溶性 α -Klotho 量を測定し、糸球体 FSP1 陽性ポドサイト数および腎間質内 FSP1 陽性細胞数との相互関係を明らかにした。さらに、病理組織学的因子 (糸球体硬化率や間質線維化率など) および臨床パラメーター (腎機能や蛋白尿など) との関連についても検討した。

なお、今回の臨床的研究の実施については、奈良県立医科大学臨床研究審査委員会の承諾を得ている。さらに、奈良県立医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究委員会の審査を受け、許可されている。

2. モデルマウスを用いた検討

α -Klotho 遺伝子 Hetero-type マウス (klotho+/-) および Wild-type マウス (klotho+/+) に各種腎炎モデルを作成し、糸球体 FSP1 ポドサイト

数および腎間質内FSP1陽性細胞数を測定，系球体硬化率や間質線維化率を評価した．

4．研究成果

【ヒト CKD 例での腎臓の膜型 α -Klotho 蛋白および血中分泌型 α -Klotho 蛋白と腎系球体 FSP1 陽性ポドサイト数および間質内 FSP1 陽性細胞数との関係】

CKD 例では，eGFR 低下に伴い，有意に膜型 α -Klotho 発現量および血中分泌型 α -Klotho 濃度は低下，間質内 FSP1 陽性細胞数は有意に上昇した．また，腎系球体硬化率の増加に伴い FSP1 陽性ポドサイト数は増加した．膜型 α -Klotho 発現量と間質内 FSP1 陽性細胞数は有意な負の相関関係を示したが，血中分泌型 α -Klotho 濃度とは負の相関関係を示す傾向にあったが，有意なものではなかった．また，腎生検連続切片を用いた免疫染色法では，膜型 α -Klotho 発現の低下した尿細管上皮細胞の周辺に FSP1 陽性細胞が多く存在する傾向にあり，尿細管上皮より分泌された α -Klotho 蛋白が paracrine 的に作用し，腎間質の FSP1 陽性細胞の出現に参与している可能性が示唆された．また，FSP1 陽性ポドサイト数と血中分泌型 α -Klotho 濃度には，負の相関関係を示す傾向であったが，有意なものではなかった．

【系球体腎炎モデルマウスでの腎臓の膜型 α -Klotho 蛋白と腎系球体 FSP1 陽性ポドサイト数および間質内 FSP1 陽性細胞数との関係】 Balb/c マウスを用いて，アドリアマイシン腎症(ADR 腎症)を作成し(n=8)，腎組織障害の程度と腎臓での膜型 α -Klotho 蛋白発現と腎系球体 FSP1 陽性ポドサイト数および間質内 FSP1 陽性細胞数との関係について検討した．系球体硬化率と FSP1 陽性ポドサイト数とは有意な正の相関関係を示した．一方で，腎間質線維化率と間質内 FSP1 陽性細胞数とは有意な正の相関関係を，膜型 α -Klotho 発現量とは有意な負の相関関係を示した．また，間質内

FSP1 陽性細胞数は膜型 α -Klotho 発現量の低下の伴い有意に増加していた．腎連続切片を用いた免疫染色法で，膜型 α -Klotho 発現の低下した尿細管上皮細胞の周辺に FSP1 陽性細胞が多く存在する傾向にあり，ヒト腎生検標本を用いた検討と同様であった．そこで，Balb/c klotho+/(n=8) および Balb/c klotho+/+(n=8)マウスを作成し，ADR 腎症を惹起し，腎障害の病理組織学的検討を行った．系球体硬化率および腎間質線維化の程度は，wild-type に比して Balb/c klotho+/-で増悪傾向を示したものの，有意な差ではなかった．また，wild-type に比して Balb/c klotho+/-マウスで，FSP1 陽性ポドサイト数および間質内 FSP1 陽性細胞数が増加傾向ではあったが，有意な差は得られなかった． α -Klotho 発現量が半減していることが，ADR 腎症の増悪に影響をおよぼすことが示唆された．

つぎに， α -Klotho 遺伝子 Hetero-type マウス(klotho+/-)を SCID マウスに Backcross 交配(10代)を行い，SCID klotho+/- マウスおよび SCID klotho+/+を作成した．SCID klotho-/-マウスの作成を試みたが作成できなかった．そこで2種類のマウスにループス腎炎モデルマウス MRL/lpr より樹立した腎炎原性抗体産生ハイブリドーマを腹腔内投与し，管内増殖型腎炎ループス腎炎を誘導し，経時的に腎病変の発症・進展を病理組織学的に，腎系球体 FSP1 陽性ポドサイト数および間質内 FSP1 陽性細胞数を解析した．SCID klotho+/(n=8)は SCID klotho +/(n=8)に比べ腎臓における α -Klotho mRNA 発現が半量程度であることを確認した．SCID klotho+/-および SCIDklotho+/+のいずれも，管内増殖病変の進行に伴い FSP1 陽性ポドサイト数は有意に増加した．また，系球体内 CD68 陽性細胞数と FSP1 陽性ポドサイト数は有意な正の相関関係を示した．しかし，SCID klotho+/-と SCID klotho+/+で管内増殖病変の進行度や FSP1 陽性ポドサイト数に有意な差は認められなかった．一方，間質の

線維化は惹起されず，また間質内 FSP1 陽性細胞はほとんど同定できなかった．

以上のことから，ループス腎炎原性抗体により惹起される実験ループス腎炎の発症・進展に，腎臓での α -Klotho 発現量は有意な影響を及ぼさず，また糸球体内への炎症細胞浸潤や FSP1 陽性ポドサイトの誘導に対しても有意な影響を及ぼさなかった．実験ループス腎炎の発症・進展に腎臓局所の α -Klotho 発現量は有意な影響を及ぼさない可能性が示唆された．

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 21 件)

Imamaki H, Ishii A, Yokoi H, Kasahara M, Kuwabara T, Mori KP, Kato Y, Kuwahara T, Satoh M, Nakatani K, Saito Y, Tomosugi N, Sugawara A, Nakao K, Mukoyama M, Yanagita M, Mori K.

Low Serum Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin Level as a Marker of Malnutrition in Maintenance Hemodialysis Patients.

PLoS One. 査読有 10(7):e0132539 , 2015

Kimura N, Kimura H, Takahashi N, Hamada T, Maegawa H, Mori M, Imamura Y, Kusaka Y, Yoshida H, Iwano M.

Renal resistive index correlates with peritubular capillary loss and arteriosclerosis in biopsy tissues from patients with chronic kidney disease.

Clin Exp Nephrol. 査読有 19(6):1114-9 , 2015

Matsui M, Uemura S, Takeda Y, Samejima K, Matsumoto T, Hasegawa A, Tsushima H, Hoshino E, Ueda T, Morimoto K, Okamoto K, Okada S, Onoue K, Okayama S, Kawata H, Kawakami R, Maruyama N, Akai Y, Iwano M, Shiiki H, Saito Y; NARA-CKD Investigators.

Placental Growth Factor as a Predictor of Cardiovascular Events in Patients with CKD

from the NARA-CKD Study.

J Am Soc Nephrol. 査読有 26(11):2871-81 , 2015

Sakan H, Nakatani K, Asai O, Imura A, Tanaka T, Yoshimoto S, Iwamoto N, Kurumatani N, Iwano M, Nabeshima Y, Konishi N, Saito Y.

Reduced renal α -Klotho expression in CKD patients and its effect on renal phosphate handling and vitamin D metabolism.

PLoS One. 査読有 9(1):e86301 , 2014

Nakatani K, Asai O, Sakan H, Yoshimoto S, Terada M, Nose M, Iwano M, Konishi N.

Association between E-selectin expression and histopathological modification of glomerular lesions by non-nephritogenic IgM antibodies in experimental lupus nephritis.

Mod Rheumatol. 査読有 24(5):808-15 , 2014

Matsui M, Takeda Y, Uemura S, Matsumoto T, Seno A, Onoue K, Tsushima H, Morimoto K, Soeda T, Okayama S, Somekawa S, Samejima K, Kawata H, Kawakami R, Nakatani K, Iwano M, Saito Y.

Suppressed soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production aggravates atherosclerosis in chronic kidney disease.

Kidney Int. 査読有 85(2):393-403 , 2014

Nakatani K, Yoshimoto S, Asai O, Sakan H, Terada M, Saito Y, Nose M, Iwano M, Konishi N.

Enhanced expression of the soluble form of E-selectin attenuates progression of lupus nephritis and vasculitis in MRL/lpr mice.

Immun Inflamm Dis. 査読有 1(1):37-46 , 2013

〔学会発表〕(計 13 件)

中谷公彦，他．ループス腎炎での非腎炎原性抗体による糸球体病変の remodelling における E-selectin の意義 第 56 回日本腎臓学会 学術総会 2014 年 7 月 6 日 横浜

中谷公彦，他．早期 CKD からの腎臓の α -Klotho 低下は血中 FGF23 上昇の有意な規定因子ではない 第 59 回日本透析医学会学術

集会 2014年6月12日 神戸

浅井 修, 中谷公彦, 他. 管内増殖型ルー
プス腎炎における TLR7 陽性細胞の意義 第
58 回日本リウマチ学会総会 2014年4月26
日 東京

中谷公彦, 他. 尿中カルシウム排泄におけ
る腎臓での α -Klotho 蛋白の役割 第56回日
本腎臓学会学術総会 2013年5月11日 東
京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし.

6. 研究組織

(1)研究代表者

中谷 公彦 (NAKATANI KIMIHIKO)
奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 80398445

(2)研究分担者

岩野 正之 (IWANO MASAYUKI)
福井大学・医学部・教授
研究者番号: 20275324

(3)連携研究者

研究者番号: