

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461229

研究課題名(和文) クロト蛋白の腎保護効果についての検討

研究課題名(英文) Research on renoprotective effects by klotho protein

研究代表者

竹中 恒夫 (Takenaka, Tsuneo)

国際医療福祉大学・臨床医学研究センター・教授

研究者番号：90179656

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)：色々な側面からクロト蛋白の腎保護効果を検討した。アドリアマイシン腎症では、クロト蛋白はWntシグナルを阻害することで腎内アンジオテンシン、血圧、蛋白尿を低下させた。またクロト蛋白はIGF受容体を阻害しSODを誘導することで酸化ストレスを軽減させた。更にクロト蛋白はTGF $\beta$ のシグナルも阻害して上皮間質遷移や線維化を抑制した。腎硬化症では、クロト蛋白は腎内アンジオテンシンと血圧を低下させ、髄質の線維化を抑制した。更に生理学的見地から、クロト蛋白が副甲状腺ホルモン受容体と相互作用を来し、そのシグナル伝達を阻害することでビタミンDの活性化を抑制することを示した。

研究成果の概要(英文)：Renoprotective actions of exogenous klotho protein supplementation were examined in adriamycin nephropathy, nephrosclerosis models. In adriamycin nephropathy, exogenous klotho protein supplementation inhibits Wnt signaling to reduce renal angiotensin II concentration, blood pressure and proteinuria. In addition, klotho protein suppressed TGF $\beta$  signaling to decline epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. In early phase of nephrosclerosis model, klotho protein decreased renal angiotensin II concentration, blood pressure and medullary fibrosis. Klotho protein also inhibited Akt-mTOR pathway to ameliorate renal hypertrophy. In adduatin, klotho protein interacted with parathyroid hormone (PTH) receptor to inhibit its binding to PTH itself. FGF23 increased renal klotho expression, serum and urinary klotho levels. These data suggest that FGF23 transduces its signal to reduce vitamin D activation via klotho.

研究分野：腎臓病学

キーワード：クロト

### 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。

(2) 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。腎臓は水、電解質代謝だけでなく蛋白やプロスタグランジン等を分泌し、生体の恒常性に寄与している。腎臓由来のホルモンとしては、レニンやエリスロポイエチンが挙げられるが、クロト蛋白も遠隔臓器に作用する蛋白である。実際、分泌型クロトは全身的に働きSODやカタラーゼといった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。

(3) そして、クロト蛋白はWNTやTGFβの受容体と相互作用することが最近明らかとなった。更に、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) 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。

(2) 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。我々は分泌型クロト蛋白の補充がアドリアマイシン腎症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) 分泌型クロト蛋白がWNTのシグナルを阻害して糸球体病変を改善したという仮説を検証するため、*in vivo*と*in vitro*の実験を行った。WNTは腎発生に重要な役割を果たす。*In vivo*の検討では、WNTシグナルの阻害薬を用いた。アドリアマイシン投与したラットを4群に分け、生食を投与する群、クロト蛋白を投与する群(30μg/kg/day)、WNTのシグナル阻害薬TDZD-8の投与を開始する群、TDZD-8とクロト蛋白の両方を投与する群を作成した。クロト蛋白がWNT阻害に比較して

相乗又は相加効果を呈するかを、糸球体病変の改善効果について評価した。

(2) 腎機能や蛋白尿、クロト、ビタミンD、PTHなどの生理的な指標は勿論だが、特にネフリについてimmunohistochemistry(IHC)で検討を行った。更に、細かな機序としてWNTの測定、特にクロト蛋白で阻害されるWNT1,3,4,5aをRT-PCRで評価した。WNT1については抗体が入手可能であり、western blot(WB)やIHCも行った。更に、WNT下流のカテニンやGSK-3、Snailの遺伝子発現についてもRT-PCRやWB、IHCで検討した。

(3) 間質病変については上皮間葉遷移の関与を検討した。上記の4群の間質・尿細管組織についてWNT、カテニン、Snailに加えTGFなど発現をRT-PCRやWB、IHCで検討した。更に上皮間葉遷移についてはSnailだけでなくSMAやTwistを指標として評価を行った。線維化については、TGFと分泌型クロト蛋白の関係に重点を置き研究した。フィブリオネクチン等の発現を上記4群でRT-PCRやWB、IHCで行った。クロト蛋白はTGFシグナルを抑制するが、TDZD-8には認められない。測定したTGFと線維化マーカーの間での相関を検討し、分泌型クロト蛋白使用群でのみTGFの上昇に比して線維化反応が抑制されるという仮説を検証した。

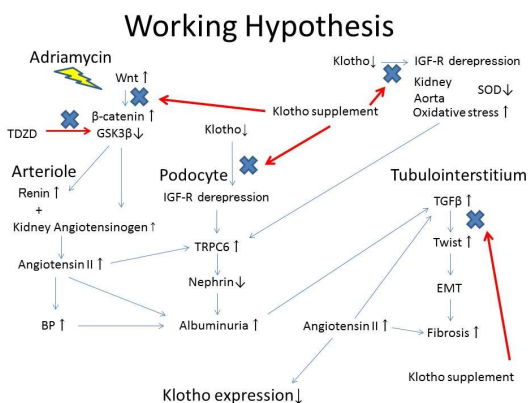
(4) 我々はクロト蛋白がビタミンDの活性化を障害することを報告した。この知見はクロト蛋白が骨軟化症などを惹起する可能性があることを示唆しており、クロト蛋白のビタミンD活性化抑制を詳細に検討した。上述のように、分泌型クロト蛋白は色々な蛋白と干渉しWNTやTGF受容体には抑制作用を及ぼす。同様にクロト蛋白がPTH受容体と結合し抑制作用を発揮することが考えられた。まず、*invitro*の無細胞系でPTH受容体とクロト蛋白を共存させ、両者が結合するか否かをPTH受容体に対する抗体とprotein Gをコートしたビーズを用いて検討した。また、培養尿細管細胞を用いて、IP3の産生に対する効果を観察した。*In vivo*の系ではPTHを投与時に見られる活性型ビタミンDの上昇や尿中cAMPの上昇に対する分泌型クロト蛋白の効果を検討した。

(5) 腎硬化症に対する分泌型クロト蛋白の影響を検討した。対象としては、悪性高血圧のモデルであるSHR-SPラットの片腎摘+加塩食を用いた。これを2群に分け、対照液を投与する群、クロト蛋白を投与する群(30μg/kg/day)を作成した。クロト蛋白の投与量については、アドリアマイシン腎症と同等とする。糸球体病変や間質病変、腎線維化の発生機序について生理学、病理学、分子生物学的な手法を用いて精査した。

#### 4. 研究成果

(1) クロト蛋白は、腎臓病の悪化に寄与している TGF 受容体や Wnt と結合して、各々のシグナル伝達を阻害する。慢性腎臓病では腎臓や循環血液中のクロト蛋白は減少している。外因性のクロト蛋白補充が腎保護効果をもたらすかをアドリマイシン腎症で検討した。ラットにアドリマイシン (5 mg/kg) を静注した後 3 群に分けた: 第 1 群には生食を、第 2 群にはクロト蛋白 (10 μg/kg/day) を、第 3 群にはクロト蛋白と 4-benzyl-2-methyl-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione (0.33 mg/Kg/day, TDZD) を投与した。アドリマイシンを投与しない群を対照群とした。アドリマイシンは血清クロト蛋白濃度を低下させ、クロトと E-cadherin の腎臓での発現を減少させた。アドリマイシンは腎臓での Wnt、TGF、アンジオテニンノーゲンの発現を亢進させ、腎内  $\beta$ -catenin とアンジオテニン II の濃度を上昇させた。クロト蛋白補充は、アドリマイシンによる  $\beta$ -catenin とアンジオテニン II の上昇を抑制したが Wnt 発現は亢進したままであった。クロト蛋白と TDZD の同時投与は、クロトによる腎臓での  $\beta$ -catenin とアンジオテニン II の蛋白量の低下を逆転させた。また、クロト蛋白と TDZD の同時投与では、TGF とアンジオテニンノーゲンに対するクロトの改善効果にも抑制が見られたが、E-cadherin は抑制されたままであった。今回の結果は Wnt がアドリマイシン腎症の成立に関与していることを示した。更にクロト蛋白補充は Wnt シグナルを阻害して、腎内アンジオテニン II を低下させた。また、クロト蛋白は TGF and WNT のシグナル伝達を阻害することで上皮間葉遷移を抑制することが示唆された (図 1)。

図 1



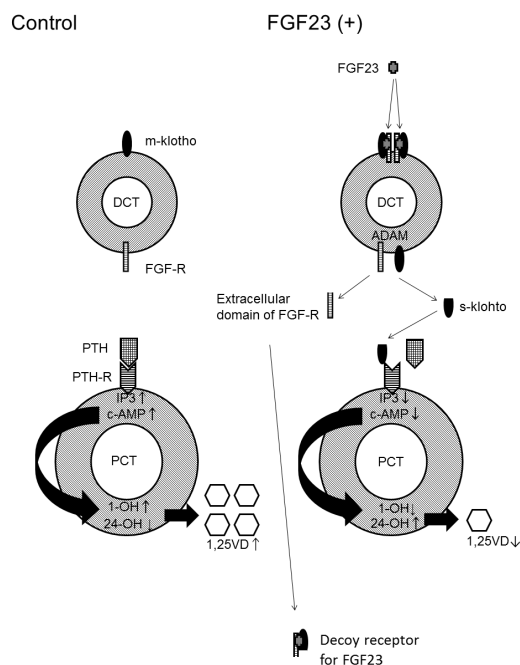
(2) クロト蛋白は腎内レニン-アンジオテニン系と相互作用する。しかし、クロト蛋白補充が高血圧性腎障害に、どのような影響を与えるかは十分に検討されていない。片腎摘を行った高血圧自然発症ラットを 2 群に分け、一群にはクロト蛋白の補充を行い、他群は対照として生食を用いた。4 週後にラッ

トから腎臓を摘出した。また、免疫沈降法を用いてクロト蛋白とアンジオテニン 1 型受容体の相互作用を検討した。外因性のクロト蛋白補充は腎のクロト発現、血中クロト濃度、尿中クロト排泄を上昇させ、血圧と酸化ストレスを抑制した。しかし、クロト蛋白補充はクレアチニンクリアランスには有意な影響を与えなかった。クロト補充は腎の TGF 発現と SMA 蛋白量を低下させたが、Wnt や Snail レベルには影響しなかった。更にクロト蛋白補充は腎での Akt リン酸化を抑制し、mTOR 蛋白を低下させ腎重量を減少させた。また、クロト蛋白補充は腎内アンジオテニン II 濃度、アンジオテニンノーゲン発現を減弱させ、HIF-1 蛋白を減少させ、髄質の fibronectin を低下させた。クロト蛋白はアンジオテニン 1 型受容体と相互作用を来し、その内在化に影響を与えた。今回の結果は、クロト蛋白がアンジオテニン 1 型受容体と結合して、その内在化に影響を与えることで腎内レニン-アンジオテニン系に抑制的に働くことを示した。また、クロト補充は Akt-mTOR 系を抑制して腎肥大を減弱することを示唆した。更に、クロト蛋白補充は HIF-1 経路を阻害して髄質の線維化を低下させることを明らかとした。

(3) 最近、リン利尿因子として認識された fibroblast growth factor (FGF) 23 はビタミン D の活性化を阻害するが、その詳細な機序は明らかにされていない。ヒトでは FGF23 はクロトの発現している遠位尿細管に作用するが、ビタミン D の活性化は近位尿細管で行われる。クロトは遠位尿細管に発現していて、酵素的に膜近辺で分解され、分泌型クロトは腎間質を経て循環血液中に放出される。FGF23 の投与は腎での膜型クロトと血中のクロト蛋白を共に上昇させた。ビタミン D 活性化酵素である 25-hydroxy-vitamin D 1-hydroxylase (1-OH) の発現は近位尿細管において副甲状腺ホルモン (PTH) でコントロールされている。クロト蛋白は多くの膜蛋白と結合して、その生理活性を調節することが知られている。免疫沈降法、細胞培養、in vivo の動物実験などの方法で PTH 受容体とクロト蛋白の相互作用について検討した。免疫沈降法ではヒトクロト蛋白がヒト PTH 受容体と結合して、PTH 受容体に対するヒト PTH の結合を阻害することを初めて示した。更に、ヒト近位尿細管細胞を用いた検討ではヒトクロト蛋白は、PTH によるイノシトール 3 リン酸の生成を抑制することを証明した。これに加えて、in vivo の動物実験では PTH による尿中 cyclic AMP の上昇と血中 1,25-dihydroxy-vitamin D (1,25VD) の増加は、両者ともにヒトクロト蛋白で抑制された。また、ヒトクロト蛋白は PTH による 1-OH 発現の亢進を細胞培養でも動物実験でも抑制した。これらの結果は、遊離クロト蛋白が FGF23 による 1,25VD 合成抑制のメディエータ

一であることを示唆した(図2)

図2



## 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 22 件)

Takenaka T, Watanabe Y, Inoue T, Miyazaki T, Suzuki H. Fibroblast growth factor 23 enhances renal klotho abundance. *Pflugers Arch.* 2013 Jul;465(7):935-43.

Takenaka T, Okayama M, Kojima E, Nodaira Y, Arai J, Uchida K, Kikuta T, Sueyoshi K, Hoshi H, Watanabe Y, Takane H, Suzuki H. Aliskiren reduces morning blood pressure in hypertensive patients with diabetic nephropathy on hemodialysis. *Clin Exp Hypertens.* 2013;35(4):244-9.

Ishii N, Carmines PK, Yokoba M, Imaizumi H, Ichikawa T, Ikenagasa H, Koderia Y, Oh-Ishi M, Aoki Y, Maeda T, Takenaka T, Katagiri M. Angiotensin-converting enzyme inhibition curbs tyrosine nitration of mitochondrial proteins in the renal cortex during the early stage of diabetes mellitus in rats. *Clin Sci (Lond).* 2013 Apr;124(8):543-52.

Takenaka T, Takane H, Kikuta T, Watanabe Y, Suzuki H. Statin improves flow-mediated vasodilation in chronic kidney diseases. *Int J Hypertens.* 2013;2013:876865.

Suzuki H, Dogi M, Takenaka T. Various approaches for vascular health in elderly women. *Clin Exp Hypertens.* 2013;35(4):295-9.

Takenaka T, Ohno Y, Suzuki H. Clinical science of calcium channel blocker to inhibit hypertensive vascular injury. *Curr Hypertens Rev.* 2013 Aug;9(3):193-201.

Takenaka T, Sueyoshi K, Arai J, Watanabe Y, Takane H, Ohno Y, Suzuki H. Calcium channel blockers suppress daily variations of blood pressure in hypertensive patients with end-stage renal diseases. *Clin Exp Hypertens.* 2014;36(2):78-82.

Suzuki H, Inoue T, Dogi M, Kikuta T, Takenaka T, Okada H. Role of Pulse Wave Velocity in Patients with Chronic Kidney Disease Stages 3-5 on Long-Term Follow-Up. *Pulse (Basel).* 2014 May;2(1-4):1-10.

Takenaka T, Inoue T, Ohno Y, Miyazaki T, Nishiyama A, Ishii N, Suzuki H. Calcitriol supplementation improves endothelium-dependent vasodilation in rat hypertensive renal injury. *Kidney Blood Press Res.* 2014;39(1):17-27.

Suzuki H, Inoue T, Dogi M, Kikuta T, Takenaka T, Okada H. Decline of Renal Function and Progression of Left Ventricular Hypertrophy Are Independently Determined in Chronic Kidney Disease Stages 3-5. *Pulse (Basel).* 2014 May;2(1-4):29-37.

Inoue T, Umezawa A, Takenaka T, Suzuki H, Okada H. The contribution of epithelial-mesenchymal transition to renal fibrosis differs among kidney disease models. *Kidney Int.* 2015 Jan;87(1):233-8.

Suzuki H, Hoshi H, Inoue T, Kikuta T, Takane H, Takenaka T, Watanabe Y, Okada H, Kimura Y. Long-term survival benefits of combined hemodialysis and peritoneal dialysis. *Adv Perit Dial.* 2014;30:31-5.

Inoue T, Kusano T, Tomori K, Nakamoto H, Suzuki H, Okada H. Effects of cell-type-specific expression of a pan-caspase inhibitor on renal fibrogenesis. *Clin Exp Nephrol.* 2015 Jun;19(3):350-8

Ohno Y, Shibazaki S, Araki R, Miyazaki T, Sato M, Takahashi S, Suwa E, Takenaka T, Suzuki H. Lifestyle Modifications Versus Antihypertensive Medications in Reducing Cardiovascular Events in an Aging Society: A Success Rate-oriented Simulation. Intern Med. 2016;55(16):2185-95.

Takenaka T, Yamanaka T, Yoshida M, Suzuki H. Unexpected action of lanthanum carbonate. Osteoporos Int. 2015 Sep;26(9):2385-6.

Ohno Y, Miyazaki T, Sato M, Araki R, Takahashi S, Takenaka T, Suzuki H, Shibazaki S. Lifestyle modifications supported by regional health nurses lowered insulin resistance, oxidative stress and central blood pressure in subjects with metabolic syndrome. Obes Res Clin Pract. 2015 Nov-Dec;9(6):584-91.

Takenaka T, Inoue T, Watanabe Y. How the kidney hyperfiltrates in diabetes: From molecules to hemodynamics. World J Diabetes. 2015 May 15;6(4):576-82.

Takenaka T, Inoue T, Miyazaki T, Nishiyama A, Ishii N, Hayashi M, Suzuki H. Antialbuminuric actions of calcilytics in the remnant kidney. Am J Physiol Renal Physiol. 2015 Aug 1;309(3):F216-26.

Kato-Okada S, Suzuki H, Inoue T, Kikuta T, Okada H. Successful prednisolone therapy in elderly patients with severe forms of henoch-schönlein purpura nephritis. Jpn Clin Med. 2015 Apr 6;6:5-7.

Ohno Y, Kanno Y, Takenaka T. Central blood pressure and chronic kidney disease. World J Nephrol. 2016 Jan 6;5(1):90-100.

Ito Y, Inoue T, Okada H. Successful Treatment of C1q Nephropathy by Low-Density Lipoprotein Apheresis. Ther Apher Dial. 2016 Oct;20(5):530-531.

Takenaka T, Inoue T, Miyazaki T, Hayashi M, Suzuki H. Xeno-Klotho Inhibits Parathyroid Hormone Signaling. J Bone Miner Res. 2016 Feb;31(2):455-62.

〔学会発表〕(計 12 件)

竹中恒夫、井上勉、大野洋一、宮崎孝、西山成、石井直仁、鈴木洋通 糖尿病性腎症における腎自動能異常機序についての検討 日本腎臓学会、東京国際フォーラム、東京、2013/5/11

竹中恒夫、高根裕史、末吉慶多、渡辺祐輔、鈴木洋通 高血圧を伴った糖尿病性腎症を基礎疾患とする維持透析患者でアリスキレンは早期血圧を低下させる 高血圧フォーラム、J Pタワーホール、東京、2013/05/26

竹中恒夫、末吉慶多、渡辺祐輔、高根裕史、鈴木洋通 維持血液透析患者においてカルシウム拮抗薬は血圧変動を減弱する 日本透析医学会 福岡国際会議場 福岡 2013/6/21

Takenaka T, Inoue T, Watanabe Y, Miyazaki T, Suzuki H. Erythropoietin enhances 25-hydroxy-vitamin D in rats with reduced renal mass. アメリカ腎臓学会 Georgia World Congress Center アトランタ / ジョージア州 2013/11/08

竹中恒夫, 鈴木洋通, 島田和幸 Arterial reflection and pulse pressure in chronic kidney disease. 日本循環器学会 東京国際フォーラム 東京 2014/03/23

竹中恒夫 新しいガイドラインを健診に生かす: 高血圧と慢性腎臓病. 日本総合健診学会 ホテルニューオータニ 東京 2014/2/1

Takenaka T, Inoue T, Miyazaki T, Suzuki H, Hayashi M. Klotho attenuates parathyroid hormone signaling. ヨーロッパ腎臓学会 ロンドン / E x C e l 英国 5/29/2015

竹中恒夫、山中朱美、吉田雅彦、鈴木洋通 炭酸ランタンと副甲状腺ホルモン 日本透析医学会学術大会 パシフィコ横浜 神奈川 6/27/2015

竹中恒夫、鈴木洋通 家庭血圧と resistive index の関係 日本腎臓学会総会 名古屋国際会議場 愛知・名古屋 6/6/2015

Takenaka T, Inoue T, Miyazaki T, Hayashi M, Suzuki H. Klotho Suppresses Renal Angiotensin by Inhibiting Wnt Signaling in Adriamycin Nephropathy ヨーロッパ腎臓学会 Austria Center Vienna オーストリア、ウィーン 2016/5/20

竹中恒夫、岸本美也子 ナトリウム依存性グルコーストランスポータ阻害薬の糖尿病性腎症に対する効果 日本高血圧学会 仙台国際センター 仙台 / 宮城 2016/10/1

Eguchi K, Takenaka T, Shimada K. Central blood pressure predicts incident cardiovascular events in treated hypertensives. 日本循環器学会 金沢都ホテル 金沢 / 石川 2017/3/18

〔図書〕(計 1 件)

Takenaka T. Calcium channel blockers in the treatment of hypertension: Pathophysiology and pharmacotherapy of cardiovascular disease

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：カルシミメティクスを有効成分として含む klotho または FGF23 に関する疾患の予防または治療薬

発明者：竹中恒夫

権利者：学校法人埼玉医科大学・キリンファーマ株式会社

種類：特願

番号：229880

出願年月日：2008/9/8

国内外の別：国内

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

国際医療福祉大学 臨床医学研究センター  
教授

竹中 恒夫 (Takenaka Tsuneo)

研究者番号：90179656

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

埼玉医科大学 社会医学 助教

宮崎 孝 (Miyazaki Takshi)

研究者番号：30265417

埼玉医科大学 腎臓内科 准教授

井上 勉 (Inoue Tsutomu)

研究者番号：30406475

(4)研究協力者

( )