

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

## 慢性腎臓病患者の予後改善に関する基礎及び臨床的研究

研究代表者 竹中 恒夫(埼玉医科大学 医学部 腎臓内科)

研究分担者 井上 勉<sup>1)</sup>, 加藤 信孝<sup>1)</sup>, 高根 裕史<sup>1)</sup>, 宮崎 孝<sup>2)</sup>

### 緒言

21世紀に入り、人口の高齢化、肥満や糖尿病の増加に伴い、心疾患や脳血管障害に加え、終末臓器である慢性腎臓病の患者数が急増してきている。幸いなことに慢性腎臓病が進行し末期腎不全となっても、腎機能を代替する透析療法があり生命は保たれるが、多額の医療費が必要となる。日本透析医学会の統計によれば、わが国の透析患者数は25万人を超え、年間の医療費は1兆5000万円に及び、社会的な問題となっている。また、慢性腎臓病の患者が動脈硬化症に基づく心血管病を合併しやすいことも周知の事実である。しかし、上記の金額は血液浄化に必要な費用だけであって、透析患者や保存期の慢性腎臓病患者が心筋梗塞や脳血管障害等を併発した際の医療費は含まれていない。欧米を中心とした先進国でも人口の高齢化や肥満の増加は進んでいる。最近、WHOが危機感を憶えたためか、慢性腎臓病は心血管病のリスクであり、タンパク尿でさえも心筋梗塞の既往を同程度の心血管死に対するリスクであるという勧告を示したのは記憶に新しい。また、WHOは肥満や糖尿病の急増を受けて、以前より問題とされてきた低栄養に伴う疾患よりも過栄養に基づく疾患を重要視するようにパラダイムシフトを行った。特に日本人を含めたアジア人は欧米人と比べて、平均して糸球体濾過率が低く慢性腎臓病に罹患しやすい傾向がある。どのような治療が腎障害の進行をより効果的に遅延させ、腎疾患患者の心血管病の発症を予防するかを明らかにすることは倫理的のみならず医療経済的にも重要な問題である。

腎臓は水、電解質代謝だけでなくホルモン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に加え、クロトが考えられている。クロトは最近同定された腎の遠位尿細管と脳の脈絡叢、副甲状腺に発現している

蛋白である。クロトは特に尿細管に強く発現しており、Transient receptor potential V5を活性化しカルシウム代謝に関与するとともに、Fibroblast growth factor-23 (FGF23) 受容体の形成を促しリン代謝にも関与している。クロトは細胞を一回貫通する130 kdの蛋白であるが、細胞内ドメインは10アミノ酸と短く、また細胞外ドメインは弱いベータ・グルコシダーゼ活性を持っており、また、膜直上付近で切断され分泌される。最近はこの分泌されたクロトはホルモンとして作用し、superoxide dismutaseやカタラーゼといった活性酸素を分解する酵素を誘導することが示唆されている。また、クロトは内皮細胞の延命し、一酸化窒素等の産生を亢進させる。予想されるように腎臓でのクロトの発現は慢性腎疾患患者で低下している。また、クロトを過剰発現した動物では腎障害の進行が遅延することが判明している。動脈硬化の治療として脂質異常を正常化することは勿論であるが、一酸化窒素系の活性化等により酸化ストレスを軽減することも慢性腎臓病に頻繁に認められる大血管障害を抑制するためには肝要であろう。クロトの遺伝子を挿入突然変異により破壊したマウスは、動脈硬化や骨粗鬆症などの老化徴候を示す。クロト機能の温存は腎障害の治療のみならず、老化の予防につながるものと思われる。

### 方法

クロトの精製と結合実験：ヒト- $\alpha$ クロト1のcDNA (OriGene Technologies) をCHO細胞 (TET-ON CHO-K1 Cell Line) でTrans IT-CHO Transfection Reagentを用いて過剰発現させる。培養上清中に出てきた分泌型のクロト蛋白をQ-Sepharose FF, ConA-Sepharose 4B, DEAE-Sepharose FFを順次使用して単離抽出した。この蛋白を用いてクロトの組織結合実験を行った。

クロトの発現の調節因子：クロト発現の生理的な調節因子を解明するため、腎機能正常な動物(ウイスターラット, 雄, 8週令)を用いて、FGF23 (10 micro-g/Kg),

1) 埼玉医科大学 医学部 腎臓内科

2) 埼玉医科大学 地域医学・医療センター

ビタミンD (1 micro-g/Kg), parathyroid hormone (PTH, 10 micro-g/Kg) を投与して3時間後に過剰の麻酔薬を使用して屠殺し, 腎臓でのクロト発現への影響を観察した. 本来, 培養細胞を使用した実験を考慮したが, クロトをstableに発現している細胞株がなく *in vivo* の研究を行った. クロトの蛋白レベルをウエスタンブロットでモノクロナル抗体を用いて検出し,  $\beta$ アクチンで補正した値を用いた.

病態モデルでのクロト: 片腎臓を摘出した脳卒中易発症性自然高血圧ラットに高塩食を負荷する高血圧性腎硬化症のモデルを用いて, 一群にはビタミンDを投与し (30 ng/Kg, 浸透圧ポンプを使用), 他群をコントロールとして溶媒のみを12週間投与し, 2群間で腎でのクロト, 血管内皮機能 (アセチルコリンによる降圧の程度), 腎機能, 腎組織等を検討した.

## 結果

1 Lの培養上清液から約1  $\mu$ gのクロトの抽出が可能であった. 合成したクロトの腎組織への結合反応は良好で, 特に内皮細胞に結合することが判明した.

腎機能正常のウイスターラットを用いた検討では PTH (約3倍), FGF23 (約10倍) とビタミンD (約4倍) の投与は腎臓でのクロト発現を3時間で増加させた (図1). また, PTHは同時点で測定した FGF23 (312  $\pm$  23 vs 170  $\pm$  15 pg/ml,  $p < 0.05$ ) を増加させたが, ビタミンDは変化を与えなかった (210  $\pm$  20 pg/ml). よって, PTHによるクロトの亢進作用は FGF23 に依存する

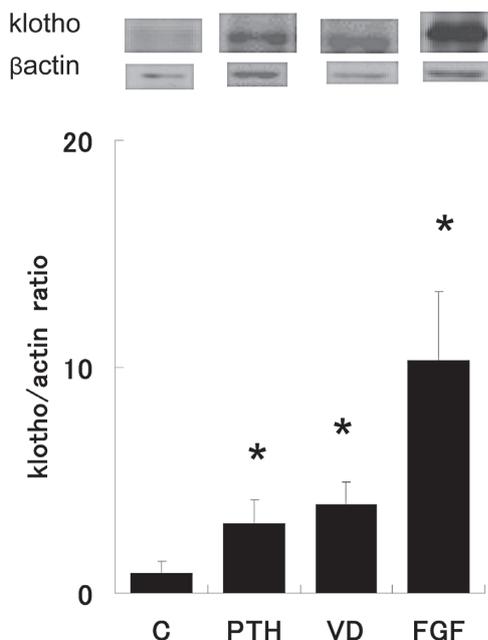


図1. Effects of fibroblast growth factor-23 (FGF23), parathyroid hormone (PTH) and vitamin D (VD) on renal klotho expression. \* indicates significant difference from the control.

と思われるが, ビタミンDは FGF23 とは独立にクロト発現に正の影響を与えられたと考えられた. なお, これらのシグナル伝達経路については現在も解析中である.

病態モデルである自然高血圧発症ラットを用いた検討では, ビタミンD投与群に比べてコントロール群でクロト発現は障害されていた (図2). コントロール群に比べてビタミンD群では蛋白尿やクレアチニンクリアランスには変化なかったが, ビタミンD群で腎繊維化は抑制され, 8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  の排泄も半減した. アセチルコリンに対する反応もビタミンD群で改善が認められた (表1).

## 考案

分泌型クロト蛋白は合成可能であったが, 当初考えていたよりも分離が困難であることが判明し, RIAに用いるには収量が不十分であった. クロトは非常に凝集しやすく, このために困難があると考えられ, 今後臨床応用を考慮した際に PEG化等の改善を要する点と考えられた. 大量にクロトを合成し, 測定や慢性実験に使用する予定であったが, 今回は量的にも困難であり, 組織染色にのみ使用した.

FGF23は遠位尿細管に存在する膜型クロトと共に FGF受容体に結合して, シグナル伝達を行い, 近位尿細管のリン再吸収を阻害してリン利尿を起こすとされている. 今回の検討でも, FGF23投与によりリン排泄の増加を認めた. しかし, FGF23自体のクロト発現に対する影響は未だ検討されていない. また, 遠位尿細管から近位尿細管へのシグナル伝達物質については不明である. 黒尾らは分泌型クロトの投与がリン利尿をきたすことを示した. このことから, FGF23と結合したクロトが, 細胞膜上で分離され近位尿細管へのシグナルとして働く可能性が考えられている. 今回の

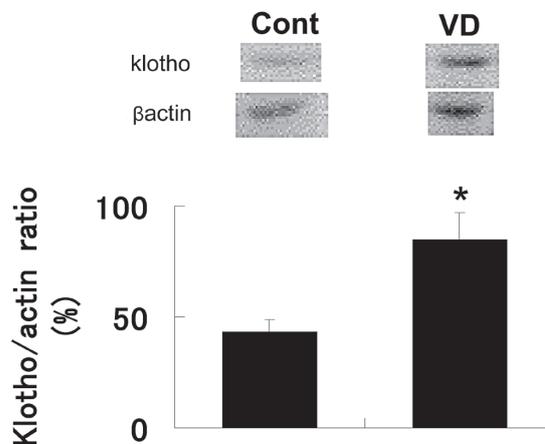


図2. Long-term effects of vitamin D (VD) on renal klotho expression in uni-nephrectomized stroke-prone spontaneously hypertensive rats. \* indicates significant difference from the control.

検討でFGF23が膜型クロト発現を増加させる点は、近位尿細管へのシグナル伝達に必要なクロトを供給するという観点から考えると上記の仮説を支持するものと思われる。しかし、合成したクロト蛋白が近位尿細管に結合する所見は得られておらず、今後さらに検討を重ねる必要がある。

今回の検討での新しい発見はビタミンDがクロトを温存する効果があることであろう。正常腎機能の動物では活性型ビタミンD投与3時間後には膜型クロト発現が増加していた。ビタミンDは慢性腎臓病患者でその活性化に障害があることが知られている。そのため、慢性腎臓病では活性型ビタミンDの低下が早期から認められ、その補充が生命予後を改善する可能性が示唆されている。クロトを過剰発現させると生命予後を改善し、腎障害も遅延させることが知られている。ビタミンDは骨だけでなく細胞増殖の調整など多岐にわたる生理活性を有している。今回の検討からは、ビタミンDがクロト発現を介して慢性腎臓病患者の予後改善に寄与している可能性が示唆された。

分泌型のクロトは、superoxide dismutaseを活性化したり、幹細胞を温存するなどのクロトの抗加齢効果に関与していると考えられている。今回の検討でも、酸化ストレスの指標である8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$ の産生がクロトを温存することで低下した。慢性腎臓病患者では高リン血症が一つの予後規定因子とされている。腎障害により低下したクロト発現が高リン血症を来し、同時に酸化ストレスを亢進させ動脈硬化

の進展を寛容していることが考えられる。大阪大学のグループは培養血管内皮細胞を用いてクロトがeNOSの発現を増すことを示した。今回の検討で、我々はクロトが内皮細胞に結合することを示した。また、eNOSについては解析中であるが、アセチルコリンに投与による降圧反応がクロトを温存した群で増加していた。これらの所見から、分泌型クロトが内皮細胞に働き、一酸化窒素の産生を亢進させ、アセチルコリンによる内皮依存性血管拡張に伴う降圧を増強したものと考えられた。

## 研究成果リスト

### 論文

- Takashi MIYAZAKI, Tsuneo TAKENAKA, Tsutomu INOUE, Makiko SATO, Yuka EIKI, Makoto NODERA, Mayuko HANYU, Yoichi OHNO, Satomi SHIBAZAKI and Hiromichi SUZUKI Zinc Deficiency may Accelerate Aging by Inhibiting Klotho mRNA Expression. Trace Nutrients Research 2009;26:74-8.
- Tsuneo Takenaka, Hitoshi Hoshi, Nobutaka Kato, Kazuyuki Kobayashi, Hiroshi Takane, Junko Shoda, Hiromichi Suzuki Cardio-ankle vascular index to screen cardiovascular diseases in patients with end-stage renal diseases J Atheroscler Thromb. 2008;15:339-44.
- 竹中恒夫, 佐藤貴彦, 井上勉, 渡辺裕輔, 菅野義彦, 大野洋一, 鈴木洋通 腎老化におけるklothoの役割を知る Journal of Angiotensin Research 2009;6(4):263-7.

### 学会報告

- Tsuneo Takenaka, Tsutomu Inoue, Yoichi Ohno, Takashi Miyazaki, Hiromichi Suzuki. Dual actions of fibroblast growth factor-23 on renal klotho expression 第42回アメリカ腎臓学会(サンディエゴ)にて口演
- Tsuneo Takenaka, Tsutomu Inoue, Hirokazu Okada, Takashi Miyazaki, Hiromichi Suzuki. Decreased klotho expression in early aldosterone-induced hypertension 第42回アメリカ腎臓学会(サンディエゴ)にて口演

### 特許出願

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

出願人名義；学校法人 埼玉医科大学／キリンファーマ株式会社

発明者；竹中恒夫

出願番号；特願2008-229880

表 1. Comparison between groups

	Control	Vitamin D
Body Weight (g)	365 $\pm$ 15	360 $\pm$ 16
Systolic blood pressure (mmHg)	224 $\pm$ 7	218 $\pm$ 8
Creatinine clearance (ml/min)	1.6 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.2
Albuminuria (mg/gCr)	148 $\pm$ 20	122 $\pm$ 15
8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$ excretion (ng/day)	15 $\pm$ 2	8 $\pm$ 1 *
Response to Ach (Changes in mean blood pressure (%))		
Ach 0.3 micro-g	-8 $\pm$ 3	-11 $\pm$ 4
Ach 1 micro-g	-15 $\pm$ 6	-38 $\pm$ 11 *
Ach 3 micro-g	-43 $\pm$ 14	-50 $\pm$ 13

\* indicates significant difference between groups.