

表 題 腎臓における Klotho 遺伝子発現の酸化ストレスに
対する生理的効果に関する研究

論文の区分 論文博士

著 者 名 木村 貴明

所 属 済生会宇都宮病院 泌尿器科

2018 年 10 月 15 日申請の学位論文

紹介教員 地域医療学系専攻 腎尿路疾患学 腎臓外科学
職名・氏名 教授 八木澤 隆

目次

1. はじめに	
1-1. 背景	3
1-2. 研究の目的	6
2. 対象と方法	
2-1. 生体腎移植ドナー	6
2-2. 動物実験	7
2-3. 定量的リアルタイム PCR	7
2-4. Western blotting	10
2-5. 統計学的解析	10
3. 結果	
3-1. 生体腎移植ドナーの背景	11
3-2. ドナー腎臓での Klotho 遺伝子発現量は p53 および抗酸化ストレス関連 遺伝子発現量と相関する	13
3-3. Klotho 遺伝子は腎臓で p53 および抗酸化ストレス関連遺伝子の発現を 促進する	17
3-4. Klotho 遺伝子発現の欠乏は腎臓での酸化ストレスを亢進させる ...	19
4. 考察	21
5. おわりに	23
6. 引用文献	24

1. はじめに

1-1. 研究の背景

Klotho は老化抑制遺伝子として広く知られており、主に腎臓、副甲状腺、脳の脈絡叢に発現している。Klotho 遺伝子の発現が欠乏した Klotho マウスは、動脈硬化、肺気腫、骨密度低下、認知症といった老化様症状を呈し短命である(12)。一方、Klotho 遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスは野生型マウスより長生きすることも確認されている(14)。Klotho 遺伝子の発現調節の機序として、promoter 領域の特定の部分のメチル化が関与していることが *in vivo* でも明らかにされ(4)、さらに尿毒素、ビタミン D、レニン-アンギオテンシン-アルドステロン系、peroxisome proliferator-activated receptor- γ やスタチンなどもこれを介して Klotho 遺伝子の発現を調節することが示されている(11, 27)。

Klotho 蛋白は、1 回膜貫通型の I 型膜たんぱく質（膜型 Klotho）で、その細胞外ドメインは、膜表面で disintegrin and metalloprotease (ADAM) 10 や 17、beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) などにより切断を受け、グルコシダーゼ様酵素活性を有する分泌型 Klotho として血液、尿、脳脊髄液などの細胞外液中に分泌される(11)。分泌型 Klotho は、液性因子 insulin/insulin-like growth factor (IGF) -1(14) や Wnt、Transforming growth factor (TGF) - β 1 シグナルの抑制(5, 11)、酸化ストレスの軽減、イオンチャネルやトランスポーターへの作用(25)などの多様な生理活性が報告されており、おもに臓器保護や老化様変化の抑制に関与していると考えられている。分泌型 Klotho の主要な由来臓器は腎と考えられており(1, 20)、加齢、糖尿病や慢性糸球体腎炎などの慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease: CKD)の進行で減少する(26)。また、血液中の分泌型 Klotho 低値は、CKD 患者では腎予後不良であり(2, 6)、透析患者でも生命予後不良であることが報告されている(17)。しかし、末期腎不全患者でも一定の値が保たれていることなどから(2)、その由来などについては明らかにされていない(図 1A)。

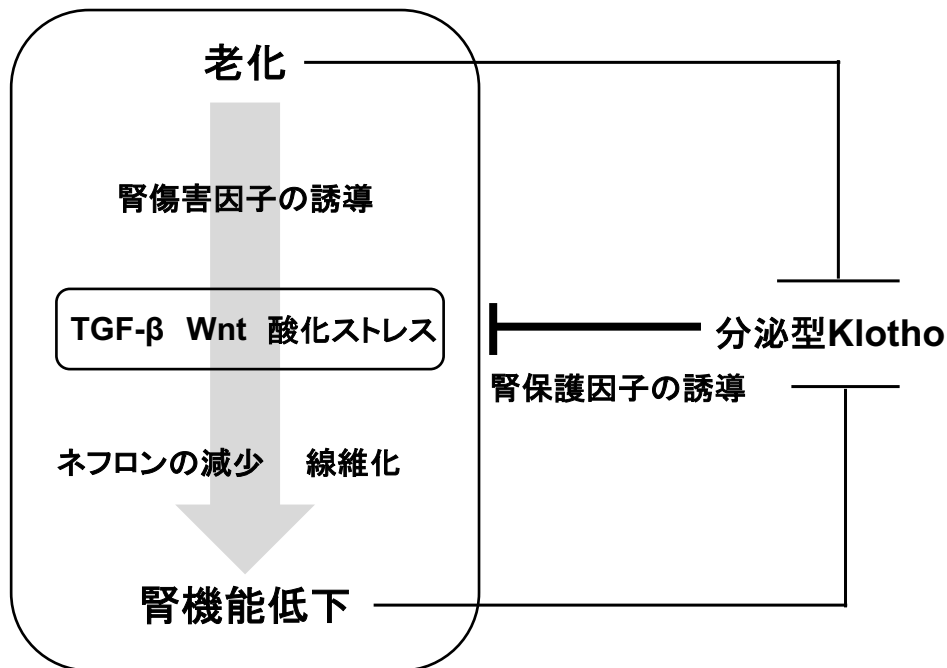


図1A: 分泌型Klothoによる老化からの腎保護作用

一方、膜型KlothoはFibroblast growth factor receptor (FGFR)のFGFR1c、FGFR3c、FGFR4と複合体を形成し、これらFGFRのco-receptorとしてFGF23のシグナルを標的細胞内に伝達し、FGF receptor substrate-2 α (FRS2 α)やmitogen-activated protein (MAP) kinases (ERK1/2)活性化して、生理作用を発揮する。主な生理作用は、腎臓におけるⅡa、Ⅱc型ナトリウム依存性リン酸共輸送担体 (Na-dependent phosphate co-transporter type Ⅱa: NaPi-Ⅱa、および type Ⅱc: Napi-Ⅱc)の抑制による尿中リン排泄の促進(8, 11, 13)と、Cyp27b1遺伝子発現の抑制やCyp24遺伝子発現の刺激による活性型ビタミンDの抑制である(図1B)。その他の臓器に発現しているKlothoの生理作用は明らかになっていない。

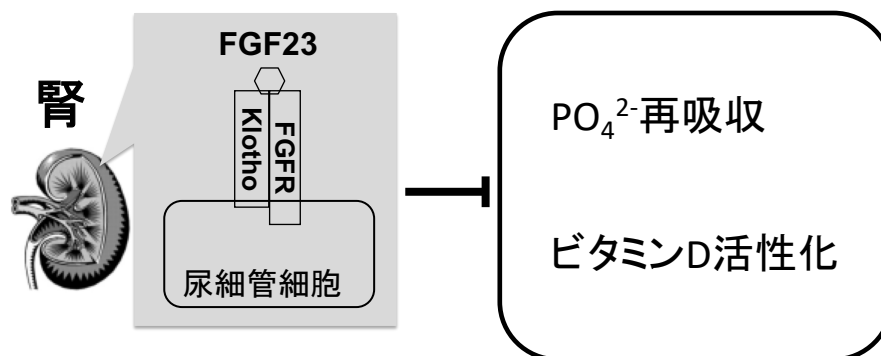


図1B: 膜型Klothoの生理作用

膜型KlothoはFGF受容体と共受容体を形成し、FGF23が作用すると、尿細管でリン再吸収とビタミンDの活性化を抑制する。

腎臓には、加齢とともに、腎機能低下だけでなく、糸球体硬化や間質の線維化などの形態的变化も現れる(9, 18)。このような腎臓の加齢性変化に酸化ストレスが関与している(23)。Klothoによる抗酸化作用の機序として、IGF-1 シグナル伝達系を抑制し、forkhead 転写因子活性化を介する superoxide dismutase (SOD)の増加が報告されている(25)。また、Klotho 遺伝子の導入がネフローゼ症候群のモデルマウスの腎臓における酸化ストレスを改善したり(10)、酸化ストレスが Klotho の発現を減少させることも報告されている(21)。

多機能を有する腫瘍抑制遺伝子の p53 は DNA 傷害、低酸素、酸化ストレスなどのさまざまな細胞傷害により刺激される。活性化した p53 は標的遺伝子の p53 応答エレメントに結合し、その遺伝子発現量を調整する。主な生物学的機能は、細胞周期の停止、DNA 修復、アポトーシス、および細胞性ストレスからの保護のためのオートファジー代謝などである。また、p53 の標的遺伝子に抗酸化ストレス遺伝子が含まれていることも知られている(7)。

このように、さまざまな基礎的研究の進歩により、腎臓の老化や細胞傷害の分子メカニズムが明らかになりつつあり、これに酸化ストレス、老化抑制遺伝子 Klotho、調整分子の p53 などが関与し、これらがクロストークしている可能性が示唆されるようになった。

1-2. 研究の目的

腎臓の老化や細胞傷害に老化抑制遺伝子 Klotho が関与していることが明らかになりつつあるが、ヒト腎臓での効果に関する知見は乏しい。そのため、ヒト腎臓における Klotho の生理学的作用の解明が、老化や CKD などによる腎臓の細胞・組織傷害に関する臨床的進歩のために必要であると考えられる。しかし、ヒト検体による検討が困難なため、明らかになっていない。本研究では、腎臓移植ドナーの腎提供時に臨床検査目的で採取された生検組織を用いて、Klotho 遺伝子と抗酸化ストレス遺伝子や細胞・組織傷害に関連する p53 遺伝子の発現量、腎機能や年齢、生化学的検査、病理組織学的所見との関連を検討し、Klotho 遺伝子の発現と関連する所見を示した。さらに、Klotho 遺伝子過剰発現マウスや Klotho 遺伝子欠損マウスを用いて、これらが Klotho 遺伝子発現の効果であることを基礎的検討でも明らかにした。

2. 対象と方法

2-1. 生体腎移植ドナー

2015 年 9 月から 2016 年 12 月までに、自治医科大学附属病院で後腹膜鏡視下ドナー腎採取術により腎提供した腎移植ドナー 44 例を対象とした。これらドナーは、本邦の生体腎移植ドナーガイドラインに則して選定されている。選定基準としては、70 歳未満、血圧 140/90 mmHg、body mass index (BMI) $\leq 30 \text{ kg/m}^2$ 、クレアチニークリアランス $>80 \text{ ml/min/1.73m}^2$ 、蛋白尿 $< 150 \text{ mg/day}$ 、糖尿病の既往なしである。ただし、9 例は 70 歳以上あるいは降圧薬を内服しているマージナルドナーであった。なお、クレアチニークリアランスは 24 時間蓄尿を用いて測定し、estimated glomerular filtration ratio (eGFR) は日本腎臓学会の推算式にて算出した(15)。

摘出した腎臓を速やかに 3 分間のユーロコリンズ液による灌流にて脱血し、0 時間生検として腎上極から 5mm の楔状の組織を採取した。摘出から灌流までの時間（温阻血時間）は平均 2 分 34 秒であった。採取した組織の一部は 10 %ホルマリン液で固定し、他方は -80°C で冷凍保存をした。組織学的評価として、PAM-Masson 染色した組織標本にて糸球体硬化数と間質線維化

と尿細管萎縮の割合を検討した。

本研究はヘルシンキ宣言に準拠し、自治医科大学の倫理委員会の承認を経て実施した(承認番号: 遺 16 - 20)。

2-2. 動物実験

8 週齢の Klotho 過剰発現マウス (EF mKL46、n = 8) (14) と野生型マウス (C57BL/6J、n = 9) および Klotho 欠損マウス (kl/kl、n = 6) (12) と野生型 littermates マウス (n = 6) を使用した。マウスは、動物実験研究機関の動物実験管理ガイドラインに則って飼育した。実験期間中、自由に飲水でき、通常食にて飼育した。

高容量の Avertin および失血によりマウスを安楽死させた後、腎サンプルを採取し、分析までは-80 °C で保存した。すべての動物実験は、動物実験研究機関の倫理委員会の承認を得て施行した。

2-3. 定量的リアルタイム PCR

高純度 RNA 単離キット (Roche Applied Science、Penzberg、Germany) を用いて全 RNA を単離した。全 RNA (0.5 μ g) を ReverTra Ace qPCR RT Kit (FSQ-301、Toyobo Co. Ltd.、Osaka、Japan) を用いて cDNA に逆転写した。遺伝子特異的プライマー表 1 と SYBR Green PCR Master Mix (QPS-201、Toyobo) を用いて、LightCycler 408 (Roche Applied Science) 配列検出システムによる RT-PCR により、標的遺伝子発現の定量を行った。なお、Klotho 遺伝子欠損マウスに関する検討は、Invitrogen SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA に逆転写し、Applied Biosystems Prism 7900HT より標的遺伝子発現の定量を行った (5)。

表 1: 定量的リアルタイム PCR に使用したプライマー

Human Primers		
Klotho	forward	GCCCACATACTGGATGGTATCAA
	reverse	ACTGCACTCAGTACACACGGTGA
Cyclophilin	forward	TGCCATCGCCAAGGAGTAG
	reverse	TGCACAGACGGTCACTCAAA
p53	forward	CAGTCTACCTCCCGCCATAA
	reverse	TCTGAGTCAGGCCCTTCTGT
Catalase	forward	CGTGCTGAATGAGGAACAGA
	reverse	AGTCAGGGTGGACCTCAGTG
SOD1	forward	GGCAAAGGTGGAATGAAGA
	reverse	ACCACAAGCCAAACGACTTC
SOD2	forward	GGGTTGGCTTGGTTTCAATA
	reverse	CTGATTTGGACAAGCAGCAA
PRDX3	forward	TGGACACCGGATTCTCCTAC
	reverse	CTCTTTGGAAGCAGCTGGAC
GPX1	forward	CCAAGCTCATCACCTGGTCT
	reverse	AGGCTCGATGTCAATGGTCT
Mouse Primers		
Klotho	forward	AATTATGTGAATGAGGCTCTGAAAG
	reverse	TACGCAAAGTAGCCACAAAGG
Cyclophilin		

p53	forward	TGGAGAGCACCAAGACAGACA
	reverse	TGCCGGAGTCGACAATGAT
Catalase	forward	GCCAAGTCTGTTATGTGCAC
	reverse	GCTGTGACTTCTTGTAGATG
SOD1	forward	CCGAGTCTCTCCATCAGGTTT
	reverse	CTCATGTGCCGGTGACCAT
SOD2	forward	GCCCGGCGGATGAAGA
	reverse	CGTCCTTTCCAGCAGTCACA
SOD3	forward	CTCTGGCCAAGGGAGATGTT
	reverse	GTCCCCCACCATTGAACTTC
PRDX3	forward	CAGACAAAGGAGCGCAAGAAG
	reverse	TGAGGCTTAAGTGGTCTTGCA
GPX1	forward	TGGATTCCCCTTCAGTCATCT
	reverse	TGGCCCAAACCACCATTC
	forward	CGGTTTCCCGTGCAATC
	reverse	GAGGGAATTCAGAATCTCTTCAT

2-4. Western blotting

マウスの腎臓からのタンパク質抽出およびwestern blotting分析は以前の報告と同様に施行した(5)。一次抗体として、nitrotyrosine (Santa Cruz Biotechnology Inc.、Dallas,Tx) および GAPDH (Abcam Inc.、Cambridge、UK) を使用した。

2-5. 統計学的解析

正規分布のデータは標準偏差と平均で表記した。遺伝子発現量を含む非正規分布データは、中央値と四分位値で表記した。正規分布のデータ解析はスチューデントの t 検定を使用した。相関関係はピアソン相関分析を用いて評価した。重回帰分析を行い、Klotho 遺伝子の発現量と臨床データや他の遺伝子発現量の関係性を評価した。 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。透析解析には JMP ソフトウェアパッケージ バージョン 9 を使用した (SAS Institute、Cary、NC)。

3. 結果

3-1. 生体腎移植ドナーの背景

生体腎移植ドナー44 例の背景を表 2 に示す。平均年齢は 57.3 ± 9.3 歳、53 %が男性であった。平均体重は 61.1 ± 10.8 kg、平均 BMI は 23.1 ± 2.9 kg/m² であった。腎摘出時の平均腎重量は 167.4 ± 44.6 g、24 時間蓄尿での平均クレアチニークリアランスは 107.2 ± 17.9 ml/min/1.73m²、平均 eGFR は 74.4 ± 12.3 ml/min/1.73m² であった。24 時間蓄尿による平均カルシウム排泄率は 1.1 ± 0.5 %、平均リン排泄率は 12.9 ± 4.2 %であった。組織学的評価として、平均糸球体硬化は 12.2 ± 14.0 %、平均間質線維化および尿細管萎縮は 12.9 ± 4.2 %であった。Klotho 遺伝子の発現に影響することが報告されている薬剤として、アンギオテンシン受容体阻害薬は 16%、アンギオテンシン変換酵素阻害薬は 9%、スタチンは 2%のドナーが服用していた。

表 2: ドナー背景

N = 44	
年齢 (歳)	57.3 ± 9.3
性別, no. (%)	
男性	23 (53)
女性	21 (47)
体重 (kg)	61.1 ± 10.8
BMI (kg/m ²)	23.1 ± 2.9
腎重量 (g)	167.4 ± 44.6
検査データ	
CCr (mL/min./1.73m ²)	107.2 ± 17.9
eGFR (mL/min./1.73m ²)	74.4 ± 12.3
FECa (%)	1.1 ± 0.5
FEP (%)	12.9 ± 4.2
Serum Calcium (mg/dl)	9.5 ± 0.3
Serum Phosphate (mg/dl)	3.5 ± 0.6
組織学的評価	
GS (%)	12.2 ± 14.0
IFTA (%)	6.5 ± 3.0
内服薬	
ARBs / ACEIs, no. (%)	7 (16)
CCBs, no. (%)	4 (9)
Statin, no. (%)	1 (2)

BMI: Body mass index、FECa: fractional excretion of calcium、FEP: fraction excretion of phosphate、CCr: creatinine clearance、GS: glomerulosclerosis、IFTA: interstitial fibrosis tubular atrophy、ARBs: angiotensin receptor blockers、ACEIs: angiotensin converting enzyme inhibitors、CCBs: calcium channel blockers

3-2. ドナー腎臓での Klotho 遺伝子発現量は p53 および抗酸化ストレス関連遺伝子発現量と相関する

Cyclophilin mRNA に対する Klotho、p53、catalase、SOD1、SOD2、peroxiredoxin3 (PRDX3)、glutathione peroxidase 1 (GPX1) mRNA の発現量を図 2 に示す。すべての遺伝子の発現量は 1.5 倍の範囲内であった。Klotho mRNA の発現量は年齢、腎機能、糸球体硬化度や間質線維化および尿細管萎縮、血清カルシウム、血清リン、尿中カルシウム排泄率、尿中リン排泄率との有意な相関を認めなかったが(図 3、表 3)、p53、catalase、SOD1、SOD2、PRDX3、GPX1 mRNA 発現量と有意な相関関係を認めた(図 2)。重回帰分析でも Klotho mRNA の発現量は、これらすべての遺伝子の発現量の独立した予測因子であった(表 3)。

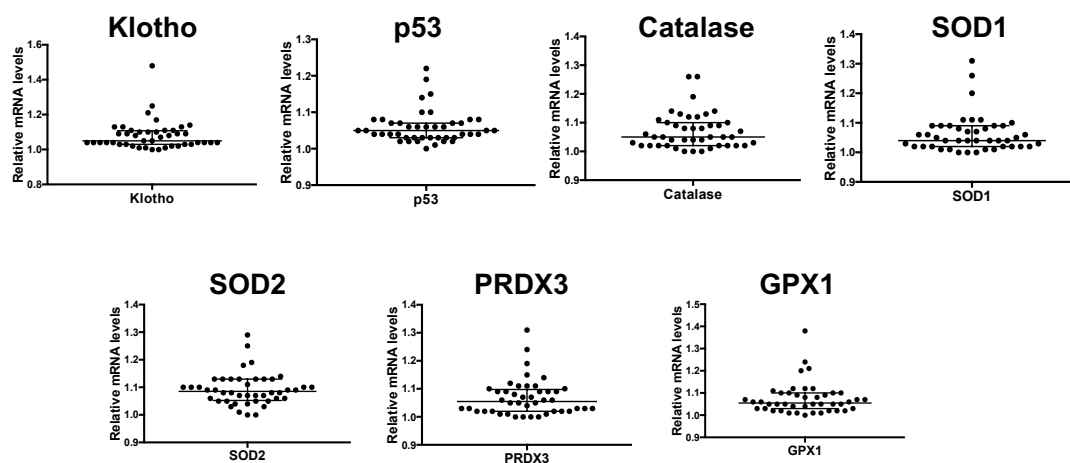


図 2: Klotho, p53, 抗酸化ストレス酵素遺伝子の相対発現量
すべての遺伝子相対発現量は1.5倍の範囲内であった。

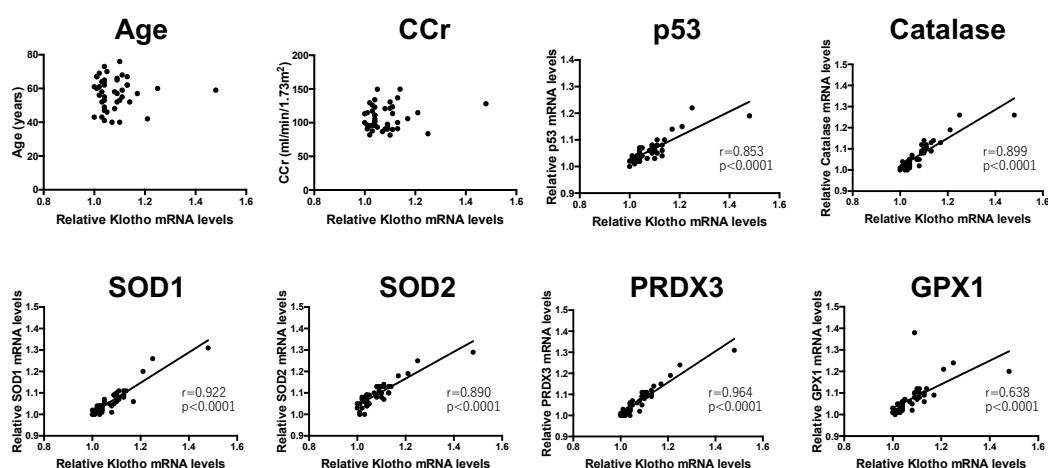


図 3: Klotho mRNAの相対発現量と年齢、腎機能、p53抗酸化ストレス酵素mRNAの相対発現量との相関関係
Klothoとp53、抗酸化ストレス酵素mRNAに相関関係を認めた。

表 3: Klotho、 p21、 p53、 Catalase、 SOD1、 SOD2、 PRDX3、 GPX1 mRNA 発現量と臨床的所見の関係

	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	r	P	β	P
Klotho mRNA				R ²
Age	-0.02	0.93	-0.0016	0.94
CCr	0.14	0.35	0.0004	0.71
eGFR	0.10	0.50	-0.001	0.61
BMI	0.12	0.45	-0.002	0.76
KW	0.17	0.27	0.0005	0.36
Calcium	0.28	0.07	0.06	0.15
Phosphate	0.05	0.74	-0.03	0.45
FECa	0.13	0.41	0.03	0.47
FEP	-0.07	0.64	-0.007	0.34
GS	0.11	0.48	0.0008	0.55
IFTA	0.004	0.98	-0.003	0.61
p53 mRNA				0.76
Klotho mRNA	0.85	<0.0001	0.44	<0.0001
Age	-0.05	0.74	-0.0007	0.88
CCr	0.13	0.29	0.0001	0.62
KW	0.07	0.66	-0.0000002	0.11
GS	0.16	0.30	0.0005	0.11
IFTA	-0.13	0.42	-0.003	0.09
Catalase mRNA				0.82
Klotho mRNA	0.90	<0.0001	0.67	<0.0001
Age	-0.02	0.91	0.000009	0.87
CCr	0.13	0.38	0.0002	0.51
KW	0.10	0.51	-0.0001	0.37
GS	0.10	0.54	0.000008	0.82
IFTA	0.02	0.92	0.0009	0.63
SOD1 mRNA				0.87
Klotho mRNA	0.92	<0.0001	0.72	<0.0001

Age	-0.05	0.77	-0.0002	0.66
CCr	0.08	0.61	-0.00001	0.97
KW	0.04	0.80	-0.0002	0.13
GS	0.12	0.46	0.000007	0.83
IFTA	-0.04	0.79	-0.0000007	0.99
SOD2 mRNA				0.82
Klotho mRNA	0.89	<0.0001	0.63	<0.0001
Age	-0.08	0.61	-0.0003	0.47
CCr	0.04	0.79	-0.0001	0.47
KW	0.003	0.99	-0.0001	0.32
GS	0.14	0.40	0.0002	0.51
IFTA	-0.08	0.59	-0.001	0.51
PRDX3 mRNA				0.91
Klotho mRNA	0.95	<0.0001	0.73	<0.0001
Age	-0.004	0.98	0.00001	0.78
CCr	0.13	0.41	0.0001	0.58
KW	0.12	0.43	-0.000007	0.42
GS	0.13	0.40	0.0002	0.30
IFTA	0.01	0.93	0.0002	0.86
GPX1 mRNA				0.75
Klotho mRNA	0.64	<0.0001	0.53	<0.0001
Age	-0.15	0.32	-0.0005	0.31
CCr	0.004	0.98	0.0002	0.46
KW	-0.05	0.75	-0.0002	0.24
GS	0.19	0.23	0.0006	0.15
IFTA	-0.07	0.63	-0.0002	0.92

CCr: Creatinine clearance; KW: Kidney weight; FECa: fractional excretion of calcium; FEP: fraction excretion of phosphate; GS: glomerulosclerosis; IFTA: interstitial fibrosis tubular atrophy

3-3. Klotho 遺伝子は腎臓で p53 および抗酸化ストレス関連遺伝子の発現を促進する

Klotho 過剰発現マウスである EF mKL46 マウスでの Klotho mRNA の発現量は野生型マウスと比較して 1.5 倍程度だが有意に高値であり、p53、catalase、SOD1、SOD2、SOD3、PRDX3、GPX1 mRNA の発現量が、いずれも野生型マウスと比較して有意に高値であった (図 4A)。一方、Klotho 欠損マウスでは、Klotho mRNA の発現量は検出感度以下であり、p53、SOD1、SOD2、SOD3 mRNA の発現量が野生型マウスと比較して有意に低値であった (図 4B)。

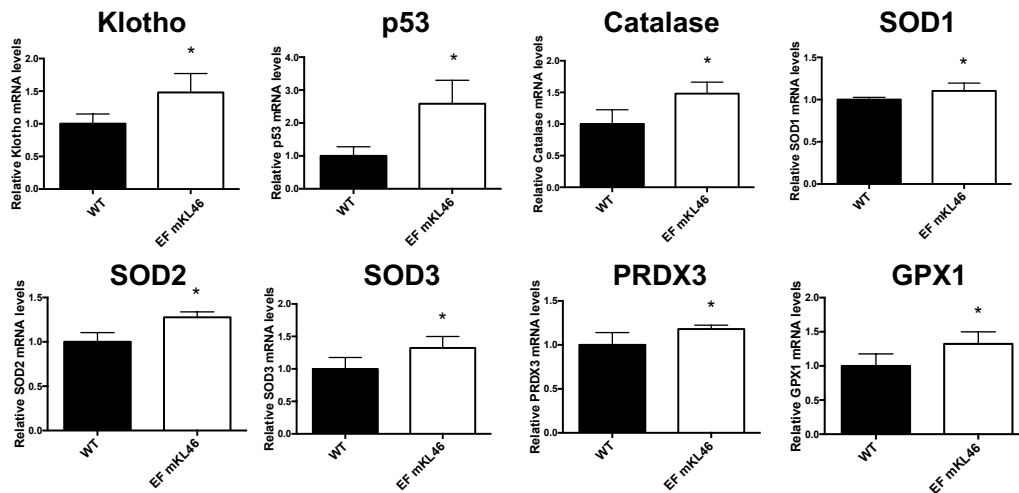


図 4A: Klotho過剰発現マウスのKlotho、p53、抗酸化ストレス遺伝子の発現量

Klotho過剰発現マウス(n = 8)では、p53、SOD1、SOD2、SOD3、PRDX3、GPX1遺伝子発現量が野生型マウス(n = 9)より有意に高かった。*: $p < 0.05$

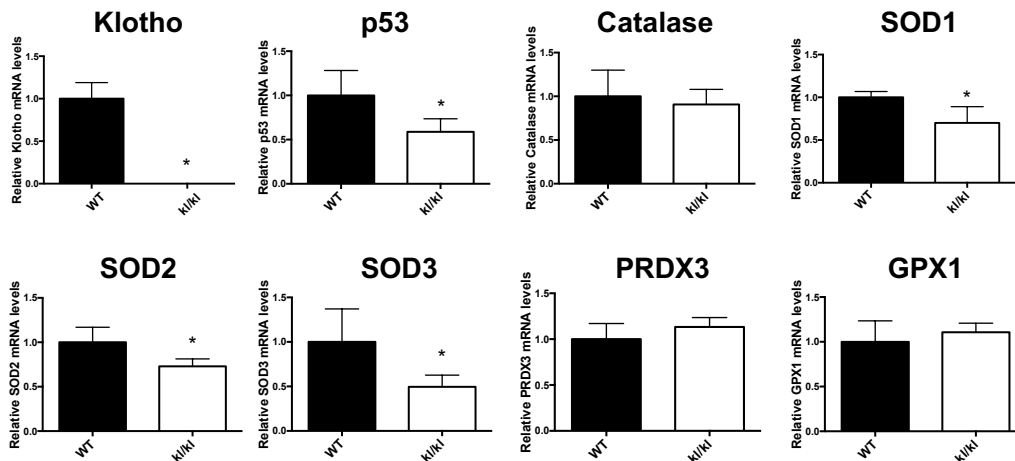


図 4B: Klotho欠損マウスのKlotho、p53、抗酸化ストレス遺伝子の発現量

Klotho欠損マウス(n = 6)では野生型マウス(n = 6)より、p53、SOD1、SOD2、SOD3の発現量が有意に低かった。*: $p < 0.05$

3-4. Klotho 遺伝子発現の欠乏は腎臓での酸化ストレスを亢進させる

様々な分子サイズのnitrotyrosine陽性蛋白がKlotho欠損マウスの腎臓で確認された。最も強いのは約50kDであり、50kD未満のnitrotyrosine陽性蛋白も多数検出された（図 5B）。しかし、EF mKL46 マウスと野生型マウスでは nitrotyrosine 陽性蛋白の発現量の違いを確認できなかった（図 5A）。

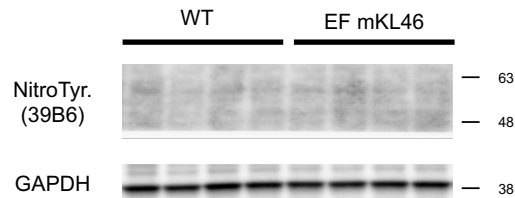


図 5A: Klotho過剰発現マウス (EF mKL46) 腎臓での nitrotyrosine (Nitro Tyr.)のWestern blotting
 Klotho過剰発現マウス(n = 8)と野生型マウス (n = 9)で nitrotyrosine陽性蛋白発現量に有意な差異を確認出来なかった。

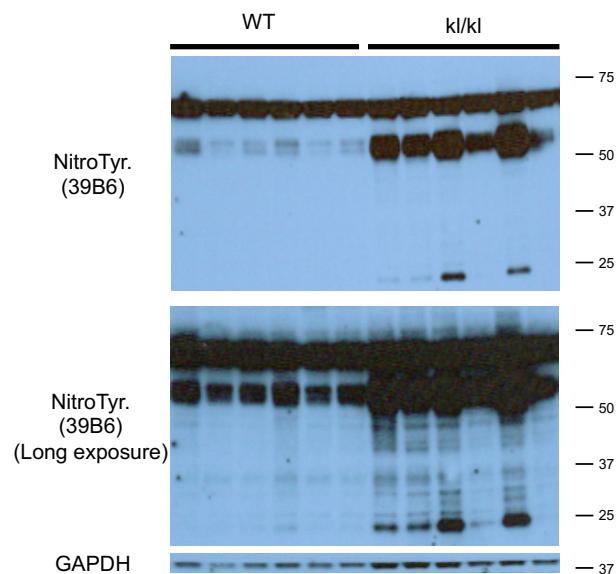


図 5B: Klotho欠損マウス (kl/kl) 腎臓での nitrotyrosine (Nitro Tyr.)のWestern blotting
 Klotho欠損マウス(n = 6)では様々な分子サイズの nitrotyrosine陽性蛋白の発現が亢進していた。

4. 考察

本研究では、ヒト腎臓での Klotho 遺伝子の発現量と年齢、腎機能、組織学的所見、p53 および抗酸化ストレス関連遺伝子 (catalase、SOD1、SOD2、PRDX3、GPX1) 発現量との関係を、腎移植の腎提供時に採取する 0 時間標本検体を用いて検討した。

老化抑制遺伝子である Klotho 遺伝子は老化した腎臓では発現量が低いとされていたが(11, 26)、本研究では加齢による変化を確認できなかった。萎縮(腎重量減少)および糸球体硬化や間質線維化と尿細管萎縮などの組織学的変化が加齢とともに現れるが(9)、これらの老化した腎臓で現れる形態学的変化と Klotho 遺伝子の発現量との関係も、本研究では確認できなかった。すなわち、Klotho 遺伝子の発現量は実際の年齢や形態の加齢性変化に関与していなかった。これらの所見は、40 歳から 76 歳までの腎移植ドナーに適する健康的な腎臓では、Klotho 遺伝子の発現量に年齢による影響がない可能性を示している。

Klotho の最も重要な生理学的効果は、FGF23 受容体の共受容体としてリン利尿の促進とビタミン D の活性化の抑制による骨ミネラル代謝の調節である(11)。またビタミン D も Klotho の発現量を調節する(11)。本研究の予備的検討では、骨ミネラル代謝に関連する因子と Klotho 遺伝子の発現量に有意な関連が確認できなかった。また、分泌型 Klotho は主に腎臓由来であると考えられるが(1, 20)、腎臓での Klotho 遺伝子の発現量とも有意な関係は確認できなかった。

Klotho 遺伝子や蛋白の発現量は、CKD の初期から減少することも報告されている(3, 20)。本研究対象の平均クレアチニンクリアランスは $107.2 \pm 17.9 \text{ ml/min/1.73m}^2$ 、平均 eGFR は $74.4 \pm 12.3 \text{ ml/min/1.73m}^2$ であったが、これら腎機能の指標と Klotho 遺伝子の発現量にも有意な相関がみられなかった。したがって、本研究対象の腎機能も Klotho 遺伝子の発現量に影響しないと考えられる。これらの Klotho に関する本研究と以前の臨床研究との相違を説明する機序として、① 本研究の検体は摘出した腎臓から直視下で採取しており、以前の臨床研究での経皮的腎生検による検体との質的相違と、② 腎移植ドナーには存在せず CKD 患者に存在する炎症、糖尿病、高血圧などの腎機能低下を進行させる因子が Klotho 遺伝子の発現に影響している可

能性、などが考えられる。

腎臓では Klotho と酸化ストレスに関連性があることが報告されている。酸化ストレスは、細胞周期および細胞死の調整、DNA や様々な細胞ストレスを含む損傷した分子の修復などに関与する p53 の活性化にも関与する(19, 24)。そのため、本研究でヒト腎臓での Klotho 遺伝子と p53 や抗酸化ストレス関連遺伝子(catalase、SOD1、SOD2、PRDX3、GPX 1)の発現量との関係を検討したところ、Klotho はいずれの遺伝子の発現量とも有意な正相関を示すことが確認された。また、重回帰分析でも同様な結果であった。ただし、本研究は遺伝子レベルのみでの検討であり、実際には、遺伝子レベルと蛋白量あるいは生理学的効果の程度が乖離している場合も多い。また、腎臓摘出の際の虚血状態や灌流の影響を受けている可能性もあり、本研究で使用した組織検体は完全な健康状態の腎臓を反映していない可能性がある。

ヒト腎臓における Klotho 遺伝子発現の p53 や抗酸化ストレス関連遺伝子発現への影響を検討するため、Klotho 過剰発現マウスや Klotho 欠損マウスの腎臓における遺伝子発現量を解析した。Klotho 過剰発現マウスの腎臓では、p53、catalase、SOD1、SOD2、SOD3、PRDX3、GPX1 遺伝子の発現量が、いずれも野生型マウスよりも有意に高く、Klotho 遺伝子の過剰発現は *in vivo* で腎臓での p53 や抗酸化ストレス酵素遺伝子発現を誘導している可能性を示唆している(図 4A)。また、Klotho 欠損マウスでは p53、SOD1、SOD2、SOD3 遺伝子の発現量が野生型マウスと比較して有意に低かった(図 4B)。Klotho 過剰発現マウスで、SOD2 蛋白の発現量の亢進と酸化ストレスに対する抵抗性が示されているが(25)、本研究結果より Klotho 遺伝子は SOD2 以外のさまざまな抗酸化ストレスメカニズムを誘導している可能性も考えられた。

Klotho 遺伝子により誘導されるこのようなメカニズムが、亢進および欠損したと考えられる Klotho 遺伝子の過剰発現および欠損マウスの腎臓での酸化ストレスの状況を検討するため、酸化ストレスによって誘発される窒素酸化物の指標である nitrotyrosine の western blotting を行った。Klotho 欠損マウスの腎臓では、さまざまなサイズの nitrotyrosine 陽性蛋白が検出され(図 5B)、Klotho 遺伝子の欠乏した腎臓における窒素酸化物の蓄積が確認された。Klotho 遺伝子が欠乏すると Klotho 遺伝子により誘導される抗酸化ストレスメカニズムが誘導されず、そのため酸化ストレスが亢進している

と考えられる。Klotho 遺伝子の過剰発現によるさまざまな酸化ストレスに対する抵抗性を示した過去の研究成果からも (10, 25)、Klotho 遺伝子は酸化ストレスに対する防御メカニズムを調節していると考えられる。

活性酸素の産生と抗酸化ストレスメカニズムの誘導のバランスによって、酸化ストレスの状態は調整されている。抗酸化ストレスメカニズムは、炎症、糖尿病、高血圧、加齢、CKD などの外因性および内因性の活性酸素による病態の悪化も抑制する (22)。Klotho の抗加齢効果には、Klotho 遺伝子により誘導される抗酸化ストレスメカニズムが関与していることが知られているが (16)、本研究成果から、Klotho による抗酸化ストレスメカニズムの調節が、ヒト腎臓における Klotho の生理的効果であることが確認された。Klotho による p53 遺伝子の誘導は確認されたが、p53 の生物学的効果における Klotho の意義は本研究では解明できなかった。p53 は、DNA 損傷、酸化ストレス、低酸素、低栄養、リボゾーム機能低下、テロメア損傷などより活性化されるが、このような細胞ストレスに対する p53 の効果と Klotho の関係については、さらなる検討が必要である。

5. おわりに

本研究により、ヒト腎臓では、Klotho 遺伝子発現量と p53 および抗酸化ストレス酵素遺伝子発現量との関連性が確認され、動物実験により、Klotho 遺伝子発現がこれらの遺伝子の発現を誘導し、Klotho 遺伝子の欠乏はこのメカニズムの作動が乏しいため、酸化ストレスが亢進すると考えられた。ヒト腎臓における Klotho 遺伝子の生理的効果として、酸化ストレスからの保護作用が示された。

引用文献

1. Akimoto T, Kimura T, Watanabe Y, Ishikawa N, Iwazu Y, Saito O, Muto S, Yagisawa T, and Kusano E. The impact of nephrectomy and renal transplantation on serum levels of soluble Klotho protein. *Transplantation proceedings* 45: 134-136, 2013.
2. Akimoto T, Yoshizawa H, Watanabe Y, Numata A, Yamazaki T, Takeshima E, Iwazu K, Komada T, Otani N, Morishita Y, Ito C, Shiizaki K, Ando Y, Muto S, Kuro-o M, and Kusano E. Characteristics of urinary and serum soluble Klotho protein in patients with different degrees of chronic kidney disease. *BMC nephrology* 13: 155, 2012.
3. Asai O, Nakatani K, Tanaka T, Sakan H, Imura A, Yoshimoto S, Samejima K, Yamaguchi Y, Matsui M, Akai Y, Konishi N, Iwano M, Nabeshima Y, and Saito Y. Decreased renal alpha-Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion. *Kidney international* 81: 539-547, 2012.
4. Azuma M, Koyama D, Kikuchi J, Yoshizawa H, Thasinas D, Shiizaki K, Kuro-o M, Furukawa Y, and Kusano E. Promoter methylation confers kidney-specific expression of the Klotho gene. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26: 4264-4274, 2012.
5. Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, Shiizaki K, Gotschall R, Schiavi S, Yorioka N, Takahashi M, Boothman DA, and Kuro-o M. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *The Journal of biological chemistry* 286: 8655-8665, 2011.
6. Drew DA, Katz R, Kritchevsky S, Ix J, Shlipak M, Gutierrez OM, Newman A, Hoofnagle A, Fried L, Semba RD, and Sarnak M. Association between Soluble Klotho and Change in Kidney Function: The Health Aging and Body Composition Study. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 28: 1859-1866, 2017.
7. Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene* 36:

3943-3956, 2017.

8. Gattineni J, Bates C, Twombly K, Dwarakanath V, Robinson ML, Goetz R, Mohammadi M, and Baum M. FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *American journal of physiology Renal physiology* 297: F282-291, 2009.
9. Glasscock RJ, and Rule AD. The implications of anatomical and functional changes of the aging kidney: with an emphasis on the glomeruli. *Kidney international* 82: 270-277, 2012.
10. Haruna Y, Kashihara N, Satoh M, Tomita N, Namikoshi T, Sasaki T, Fujimori T, Xie P, and Kanwar YS. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 2331-2336, 2007.
11. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, and Moe OW. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annual review of physiology* 75: 503-533, 2013.
12. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, and Nabeshima YI. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390: 45-51, 1997.
13. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW, and Kuro-o M. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *The Journal of biological chemistry* 281: 6120-6123, 2006.
14. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, and Kuro-o M. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science (New York, NY)* 309: 1829-1833, 2005.
15. Matsuo S, Imai E, Horio M, Yasuda Y, Tomita K, Nitta K, Yamagata K, Tomino Y, Yokoyama H, and Hishida A. Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan. *American journal of kidney diseases : the official*

journal of the National Kidney Foundation 53: 982-992, 2009.

16. Mencke R, and Hillebrands JL. The role of the anti-ageing protein Klotho in vascular physiology and pathophysiology. *Ageing research reviews* 35: 124-146, 2017.
17. Otani-Takei N, Masuda T, Akimoto T, Honma S, Watanabe Y, Shiizaki K, Miki T, Kusano E, Asano Y, Kuro OM, and Nagata D. Association between Serum Soluble Klotho Levels and Mortality in Chronic Hemodialysis Patients. *International journal of endocrinology* 2015: 406269, 2015.
18. Rule AD, Amer H, Cornell LD, Taler SJ, Cosio FG, Kremers WK, Textor SC, and Stegall MD. The association between age and nephrosclerosis on renal biopsy among healthy adults. *Annals of internal medicine* 152: 561-567, 2010.
19. Safdar A, Annis S, Kraytsberg Y, Laverack C, Saleem A, Popadin K, Woods DC, Tilly JL, and Khrapko K. Amelioration of premature aging in mtDNA mutator mouse by exercise: the interplay of oxidative stress, PGC-1alpha, p53, and DNA damage. A hypothesis. *Current opinion in genetics & development* 38: 127-132, 2016.
20. Sakan H, Nakatani K, Asai O, Imura A, Tanaka T, Yoshimoto S, Iwamoto N, Kurumatani N, Iwano M, Nabeshima Y, Konishi N, and Saito Y. Reduced renal alpha-Klotho expression in CKD patients and its effect on renal phosphate handling and vitamin D metabolism. *PloS one* 9: e86301, 2014.
21. Sun CY, Chang SC, and Wu MS. Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney international* 81: 640-650, 2012.
22. Sung CC, Hsu YC, Chen CC, Lin YF, and Wu CC. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013: 301982, 2013.
23. Vlassara H, Torreggiani M, Post JB, Zheng F, Uribarri J, and Striker GE. Role of oxidants/inflammation in declining renal function in chronic kidney disease and normal aging. *Kidney international Supplement* S3-11, 2009.
24. Vurusaner B, Poli G, and Basaga H. Tumor suppressor genes and ROS:

complex networks of interactions. *Free radical biology & medicine* 52: 7-18, 2012.

25. Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, Miyoshi M, Ogawa Y, Castrillon DH, Rosenblatt KP, and Kuro-o M. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *The Journal of biological chemistry* 280: 38029-38034, 2005.

26. Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Shimada T, Murakami J, Aono Y, Hasegawa H, Yamashita T, Nakatani K, Saito Y, Okamoto N, Kurumatani N, Namba N, Kitaoka T, Ozono K, Sakai T, Hataya H, Ichikawa S, Imel EA, Econs MJ, and Nabeshima Y. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochemical and biophysical research communications* 398: 513-518, 2010.

27. Young GH, and Wu VC. KLOTHO methylation is linked to uremic toxins and chronic kidney disease. *Kidney international* 81: 611-612, 2012.