

氏 名	木村 貴明
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	乙第 764 号
学位授与年月日	平成 31 年 2 月 21 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 3 項該当
学 位 論 文 名	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 審 査 委 員	(委員長) 教授 森 下 義 幸 (委 員) 教授 齋 藤 修 教授 古 川 雄 祐

論文内容の要旨

1 研究目的

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、認知症などの老化様症状を呈し短命である。一方で、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。

Klotho 蛋白は、1 回膜貫通型の I 型膜たんぱく質 (膜型 Klotho) で、一部は、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、さまざま生理作用を有すると考えられている。一方、膜型 Klotho は fibroblast growth factor (FGF) receptor と複合体を形成し、co-receptor として FGF23 のシグナルを標的細胞内に伝達する。腎臓における尿中リン排泄の促進と活性型ビタミン D の抑制が主な生理作用である。

腎臓は加齢とともに、腎機能低下だけでなく、形態的变化も現れる。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。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、酸化ストレスが Klotho 発現を減少させることなどの関係も報告されている。

多機能を有する腫瘍抑制遺伝子 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。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が主な生物学的作用である。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。

このように、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、これに老化抑制遺伝子 Klotho や細胞傷害に関与する酸化ストレス、調整分子の p53 などが含まれ、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。

本研究では、Klotho 遺伝子の生理学的意義を確認するために、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、Klotho 遺伝子発現の効果の検討を行った。

2 研究方法

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。ただし、9 例はマージナルドナーであった。0 時間生検として腎上極から楔状の採取した組織の一部からリアルタイム PCR 法で Klotho、p53、抗酸化ストレス遺伝子発現量を測定した。また、組織学的評価として、糸球体硬化数と間質線維化と尿細管萎縮の割合を評価した。

動物実験として、8 週齢の Klotho 過剰発現マウスと Klotho 欠損マウスの腎臓にて、同様の遺伝子発現量を評価した。さらに、これらのマウスの腎臓からのタンパク質を抽出し、western blotting 法により酸化ストレス蛋白を評価した。

3 研究成果

- ・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

すべての遺伝子の発現量は 1.5 倍の範囲内であった。Klotho 遺伝子発現量は、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、尿中リン排泄率とは有意な相関を認めなかったが、p53、catalase、superoxide dismutase 1 (SOD1)、SOD2、peroxiredoxin3 (PRDX3)、glutathione peroxidase 1 (GPX1)遺伝子発現量と有意な正の相関関係を認めた。重回帰分析でも Klotho 遺伝子発現量は、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。

- ・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 過剰発現マウスの p53、catalase、SOD1、SOD2、SOD3、PRDX3、GPX1 遺伝子発現量は、野生型マウスと比較して有意に高値であった。一方、Klotho 欠損マウスでは、p53、SOD1、SOD2、SOD3 遺伝子発現量が野生型マウスと比較して有意に低値であった。

- ・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。しかし、Klotho 過剰発現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。

4 考察

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、本研究では年齢や老化で現れる形態学的変化との関係は確認できなかった。すなわち、腎移植ドナーに適する健康的な腎臓では、Klotho 遺伝子の発現量に加齢による影響がない可能性を示している。

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。本研究対

象の平均クレアチニンクリアランスは 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。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 CKD 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 Klotho と酸化ストレスとの関連が報告されている。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 の活性化にも関与している。本研究でのヒト腎臓の Klotho 遺伝子と p53 や抗酸化ストレス関連遺伝子の発現量との関係の検討により、Klotho はいずれの遺伝子の発現量とも有意に正相関をすることが明らかにされた。また、重回帰分析でも同様な結果であった。

ヒト腎臓で明らかにされた Klotho 遺伝子発現と p53 や抗酸化ストレス関連遺伝子発現との関係を検討するため、Klotho 過剰発現マウスと 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における p53 と抗酸化ストレス遺伝子発現量は、いずれも野生型マウスよりも有意に高かった。これは 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。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。これらの結果より、Klotho 遺伝子が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、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も含めて、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。

本研究結果から、Klotho による抗酸化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 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 結論

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。

論文審査の結果の要旨

Klotho は老化抑制分子として知られており、主に腎臓、副甲状腺、脳の脈絡叢に発現している。Klotho 蛋白は 1 回膜貫通型の I 型膜たんぱく質（膜型 Klotho）で、一部は、分泌型 Klotho 蛋白として血液、尿、脳脊髄液などの細胞外に分泌されている。腎臓では膜型 Klotho 蛋白は **fibroblast growth factor (FGF) receptor** と複合体を形成し **co-receptor** として尿中リン排泄促進と活性型ビタミン D の抑制作用を担っている。近年、腎臓の加齢による機能・形態変化に Klotho 分子と酸化ストレスや細胞・組織傷害に関連する **p53** 分子の関連が示唆されているが、未だ十分解明されておらず、特にヒト腎組織では十分検討されていない。本研究では腎移植ドナーの腎提供時に採取されたヒト腎生検組織を用いて、ドナー腎で Klotho 遺伝子発現量と抗酸化ストレス遺伝子 (**Catalase, superoxidase dismutase1, superoxidase dismutase2, peroxiredoxin3, glutathione peroxidase1**) および **p53** 遺伝子の発現量が正相関することを明らかにした。さらに Klotho 分子過剰発現マウスでは抗酸化ストレス遺伝子および **p53** 遺伝子発現が増加し、Klotho 分子欠損マウスでは抗酸化ストレス遺伝子および **p53** 遺伝子発現が減少し、さらに生体内酸化ストレス亢進を示唆する **nitrotyrosine** 陽性蛋白の発現が亢進していることを基礎的検討でも明らかにした。これらの内容は腎臓における Klotho 分子の生理作用として酸化ストレスからの保護作用を示すものであり学問的意義が高いと考えられた。またこれらの内容をヒト腎組織で定量的リアルタイム PCR 法により評価し、さらに Klotho 遺伝子改変マウスを用いて同様に評価している点が新規で独創的である。

以上の結果を踏まえ、木村 貴明氏の論文は学位論文にふさわしい内容だと判断した。なお、「試問の結果」において記述した「論文の一部変更」は正しく行われた。変更後の最終論文を、学位論文にふさわしいと判断した。

試問の結果の要旨

申請者 木村 貴明 氏の研究テーマは「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」であった。本研究では腎移植ドナーの腎提供時に採取されたヒト腎生検組織を用いて、ドナー腎で Klotho 遺伝子発現量と抗酸化ストレス遺伝子 (**Catalase, superoxidase dismutase1, superoxidase dismutase2, peroxiredoxin3, glutathione peroxidase1**) および **p53** 遺伝子の発現量が正相関することを明らかにした。さらに Klotho 分子過剰発現マウスでは抗酸化ストレス遺伝子および **p53** 遺伝子発現が増加し、Klotho 分子欠損マウスでは抗酸化ストレス遺伝子および **p53** 遺伝子発現が減少し、さらに生体内酸化ストレス亢進を示唆する **nitrotyrosine** 陽性蛋白の発現が亢進していることを基礎的検討でも明らかにした。

木村 貴明 氏は、審査員の質問に真摯に応じており、学位審査の試問として問題はないと考え

た。内容的にも、質の高い英文誌に掲載されており、それに関して特別に考慮しなければいけない点はない。審査員から以下の点について質問および指摘があった。審査員からの質問、指摘と、それに対する木村 貴明 氏の応答を以下に列挙した。

1. 摘出したドナー腎の処置法の詳細を記載すること。

⇒詳細な処置法を記載することに同意された。

2. Klotho 分子の抗酸化作用の可能性は腎臓だけなのか全身的なものか？

⇒本研究では腎臓についてのみ検討した。全身的な作用かどうかは今後の検討課題としたい。

3. Klotho 分子の抗酸化作用の分子学的機序については？

⇒本研究ではヒト腎臓で Klotho 遺伝子と抗酸化遺伝子および P53 遺伝子の正相関を明らかにした。Klotho 分子過剰発現マウスや Klotho 分子欠損マウスを用いた動物研究でも同様の結果であった。しかし Klotho 分子と抗酸化遺分子および P53 分子の関係の詳細な分子学的機序については検討できておらず今後の検討課題としたい。

4. Klotho 分子と抗酸化遺分子および P53 分子の関係についてたんぱく質レベルでの検討ができていないことを記載すべきではないか？

⇒上記を追加記載することに同意された。

5. 摘出したドナー腎の処置により結果が影響を受けている可能性を記載すべきではないか？

⇒上記を追加記載することに同意された。

6. 図と表の一部が不明瞭であるため修正すべきである。

⇒上記を修正することに同意された。

以上、木村 貴明 氏の応答の内容も鑑み、審査員一同合格に値すると判定した。