

特集：腎障害における老化のかかわり

# 老化と尿細管障害 (Klotho)

## —腎性老化 renal senescence 仮説—

Aging and tubulo-interstitial injuries (possible implications of Klotho) : renal senescence hypothesis

柏原直樹 長洲 一 春名克祐 佐藤 稔

Naoki KASHIHARA, Hajime NAGASU, Yoshisuke HARUNA, and Minoru SATOH

### はじめに

腎臓に負託された主要な機能は内部環境(milieu interior)の恒常性維持であり、その使命達成のために、濾過装置としての糸球体と再吸収・分泌器官としての尿細管が付与された。同時に腎臓は内分泌臓器でもあり、造血にかかわるエリスロポエチンを産生し、ビタミンD活性化にも与る。「腎不全」は腎臓が担うこれらの諸機能が損なわれた状態であり、水・電解質異常、血圧変化、貧血、骨ミネラル代謝異常などを呈することになる。

腎臓は生体維持に必須の内因性物質の産生臓器でもあり、その全貌をわれわれはいまだ十分には知悉できていない。老化に深くかかわる *klotho* 遺伝子が腎臓において発見され、その遺伝子欠損動物の表現型が腎不全病態と類似することが示された。エリスロポエチン産生異常により「腎性貧血」が招来される。*klotho* 遺伝子産物の低下により「腎性老化 renal senescence」と呼称すべき病態が出現するのではないだろうか(図1)。

### 加齢による腎臓の形態変化

個体が老化に伴い機能的にも形態的にも変化を示すように、腎臓も加齢変化を免れえない。加齢に伴い腎重量、腎容積は緩徐に減少する。組織学的には糸球体硬化と間質線維化が進行する。腎重量と腎容積は加齢に伴い減少(腎萎縮)することが報告されている<sup>2)</sup>。40歳代前半にピークを示し、その後は腎重量・容積ともに減少に転じる。腎萎縮は皮質部により顕著であることも示されている。皮質部の萎

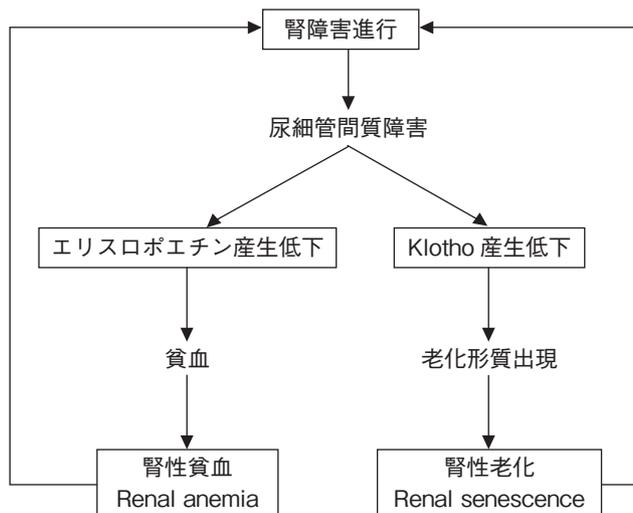


図1 腎性老化仮説

腎障害の進展過程において尿細管障害が生じる。尿細管で産生されるべき Klotho 蛋白の不足により個体として加齢病態が出現する。

縮には小動脈の加齢変化が関与している。糸球体の上流に位置する葉間動脈～弓状動脈～小葉間動脈には中膜肥厚と内腔狭小化が加齢に伴い進行する。当然、糖尿病や高血圧を合併するとこれらの変化は加速される。小動脈の内腔狭小化によって腎血流量が低下し、下流の組織に広く虚血がもたらされる。

糸球体、尿細管も加齢に伴い組織変化が進行する<sup>1,2)</sup>。糸球体では分節状硬化から全節性硬化へと進展する。尿細管では尿細管細胞数の減少に基づくネフロン長の短縮が認められる。近位尿細管の短縮、遠位尿細管では憩室が出現する。機能的にも加齢に伴い尿濃縮能、希釈能が低下する。これらの糸球体・尿細管の変化は個々の構成細胞の細胞老化の結果でもあろうし、前述した血管構築の変化によって

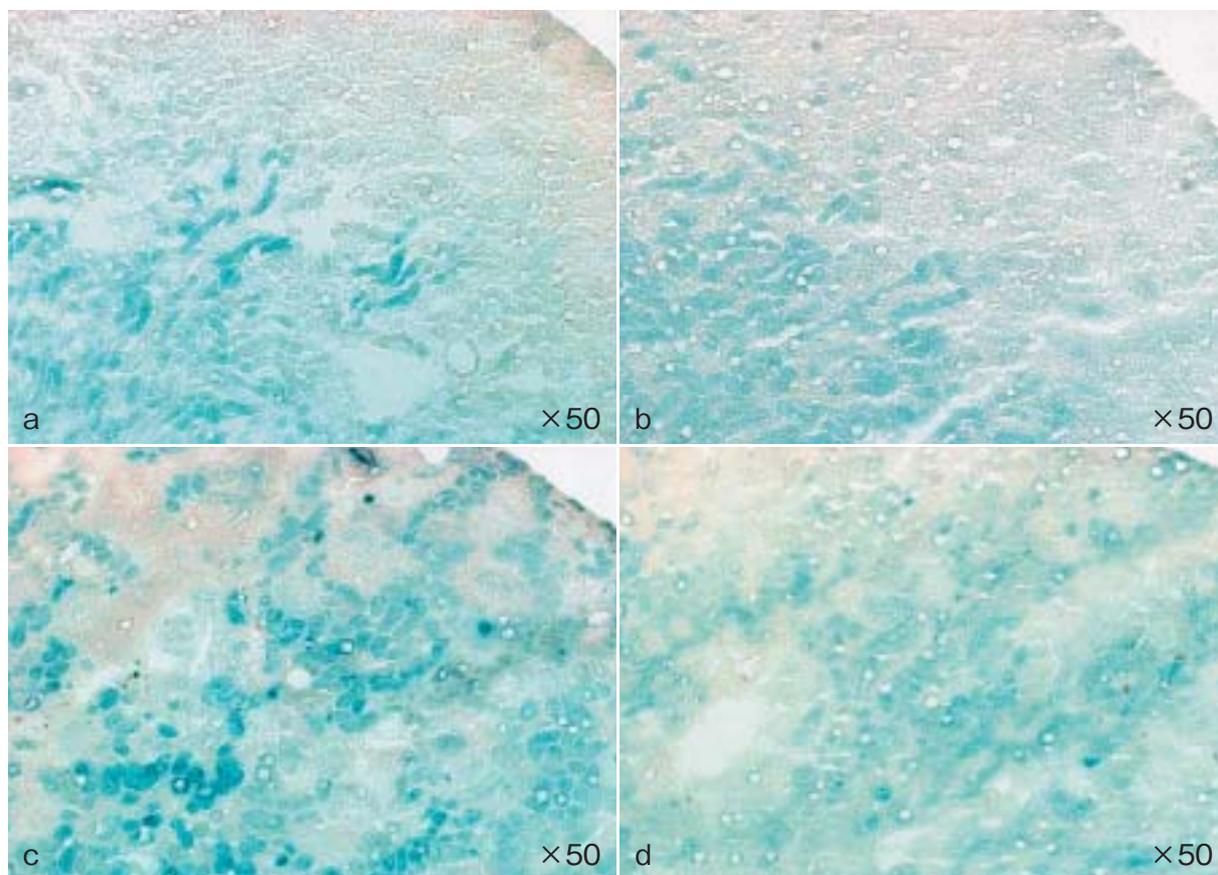


図 2 組織における senescence associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) 活性  
 40 週齢 ICGN マウス (ICGN) の腎皮質では尿細管を中心に SA- $\beta$ -gal 活性の亢進が見られる (c)。klotho 遺伝子導入 (d) により SA- $\beta$ -gal 活性が抑制される。a：同週齢の wild マウス，b：同週齢 klotho 遺伝子過剰発現マウス  
 (文献 6 より引用，改変)

生じる組織虚血が関与することも間違いのないであろう。

尿細管上皮細胞は vascular endothelial growth factor (VEGF) を産生し、傍尿細管毛細血管 (peritubular capillary : PTC) の血管構築の維持、障害時の修復機転としての血管新生に関与している<sup>3)</sup>。加齢腎では、尿細管上皮における VEGF 産生が、特に髄質部で低下することが報告されている<sup>4)</sup>。また、加齢腎の障害尿細管上皮では、ミトコンドリアの形態異常 (小型化) が認められる。ミトコンドリアが虚血センサーとして機能することも示唆されており、尿細管上皮細胞のミトコンドリア障害が VEGF 産生低下に関与することが報告されている<sup>5)</sup>。

### 慢性腎臓病病態の腎組織に認められる加齢変化

慢性腎臓病病態下では個体年齢以上に臓器・組織の加齢変化が早期から出現する (premature senescence) ことが報告されている。senescence associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -

gal) 活性は細胞老化の指標とされている。モデル動物あるいはヒト動脈硬化巣の血管壁、平滑筋細胞に細胞老化 SA- $\beta$ -gal 活性が亢進していることが示されている。さらに細胞老化の別の指標でもある p53, p21 発現も亢進しており、動脈硬化の病態形成に血管壁細胞の premature senescence の関与が示されている。

慢性腎臓病の腎組織にこのような premature senescence は認められないのであろうか。ネフローゼ域の大量蛋白尿が出現し最終的には腎不全をきたす ICR-derived glomerulonephritis (ICGN) マウスを用い解析を行った<sup>6)</sup>。

ICGN マウスは 40 週齢時点までにネフローゼ症候群、腎不全を呈して約 50% が死亡する。この時期の腎組織をみると、皮質部尿細管細胞に SA- $\beta$ -gal 活性亢進を認めた (図 2)。同部には核酸、脂質の酸化的修飾産物 (8-OHdG, NHE) の蓄積も認められ、酸化ストレス亢進が示唆された。8-OHdG は主として細胞質に染色されることから、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の酸化的障害が示唆された。実際に

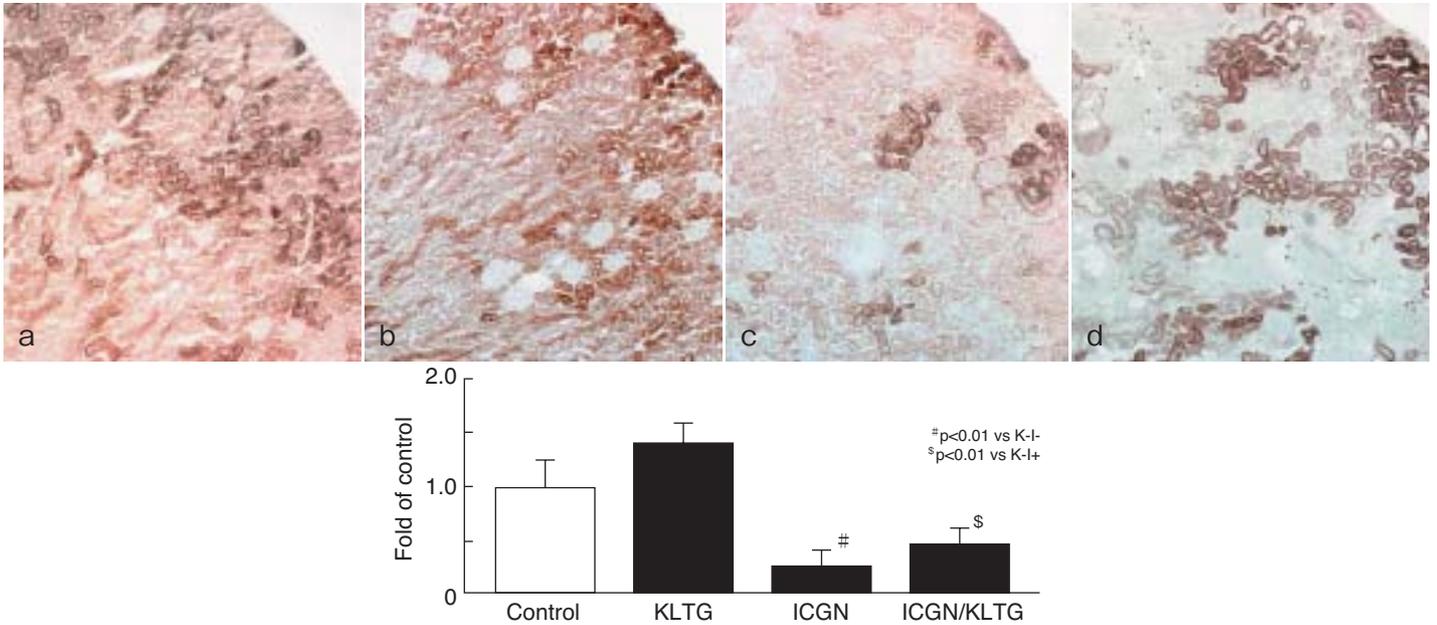


図 3 腎組織のミトコンドリア機能変化

ミトコンドリア呼吸鎖機能を cytochrome c oxidase 活性の生体染色法で評価した。40 週齢 ICGN マウス (ICGN) の腎皮質では染色性の低下を認め、尿細管細胞のミトコンドリア呼吸鎖機能の低下が示された (c)。klothoTG 遺伝子導入 (d) によりミトコンドリア呼吸鎖機能の回復が認められた。a：同週齢の wild マウス、b：同週齢 klotho 遺伝子過剰発現マウス

(文献 6 より引用、改変)

PCR 法により mtDNA 変異の蓄積が示された。さらに、ミトコンドリア機能を反映する cytochrome c oxidase 活性を評価したところ、酸化ストレス亢進部位に一致して同酵素の活性低下、すなわちミトコンドリア (呼吸鎖) 機能低下を認めた (図 3)。

ミトコンドリアあるいは mtDNA の酸化的障害の蓄積が細胞老化に関与していると考えられている<sup>7)</sup>。ICGN マウスでは腎障害の進展とともに腎組織に mtDNA の酸化的障害の蓄積、ミトコンドリア機能障害が出現し、同時に premature senescence を示唆する形質変化が出現することが明らかになった。慢性腎臓病は加速された腎組織の老化過程とみなしうるのかもしれない。

### 「腎性老化」仮説：腎障害によって個体老化が生じる

#### 1. klotho 遺伝子の発見

腎はエリスロポエチン産生、レニン産生、VitD 活性化などを行う内分泌臓器でもある。末期腎不全時にはこれらの内分泌機能も障害され、「腎性貧血」、「腎性骨症」などを呈する。腎不全の病態が濾過障害による老廃物の蓄積のみならず、生体機能の維持に重要な内因性物質の欠如によって

も形成されていることは明らかである。老化の形質とも類似する末期腎不全患者の諸症状を、腎で産生されるべきいまだ未同定の内因性物質の減少～欠如により理解することは可能であろうか。すなわち、「腎性老化：renal senescence」と呼ぶべき病態は想定可能であろうか。

1997 年に鍋島、黒尾らによって、多彩な老化形質を呈する klotho 欠損マウスが作製された<sup>8)</sup>。klotho 欠損マウスは寿命が 8～10 週と短命であるばかりか、メンケベルグ型動脈硬化、異所性石灰化、骨粗鬆症、成長障害、皮膚萎縮、性腺機能障害などを呈し、老化モデルと認識されている。非常に興味深いことに、klotho 遺伝子は主として遠位尿細管で発現しており、腎障害進展に伴いその発現減少も報告されている。klotho 欠損マウスの表現形質は末期腎不全の病態とも一部、重複している<sup>9,10)</sup>。短絡的な発想との誹りを免れえないが、われわれは、klotho 遺伝子産物の減少～欠如が末期腎不全の病態を形成しているという仮説 (腎性老化仮説) を持つに至った (図 1)。

#### 2. Klotho 蛋白の機能

klotho 遺伝子は分子量約 130 kD の 1 回膜貫通蛋白をコードしており、細胞外ドメインと細胞内ドメインを有する。Klotho 蛋白はビタミン D シグナル伝達経路を制御し、カルシウム・リン恒常性維持に重要な役割を果たしている

ことが判明した。腎におけるリン再吸収を抑制する因子として FGF23 が同定されたが、FGF23 ノックアウトマウスの表現形は、*klotho* 欠損マウスとほぼ完全に一致するものであった。さらに、FGF23 が作用を発揮するためには FGF 受容体のほかに Klotho 蛋白が必要であることが明らかになった<sup>11-13</sup>。

一方で、黒尾らは *klotho* 遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、平均寿命および最大寿命の有意な延長を認めた。線虫やショウジョウバエではインスリン/insulin-like growth factor-1 (IGF-1) 伝達系が寿命制御に関連している。哺乳類においても本経路は寿命を負に制御していることも報告された。Klotho 蛋白はインスリン/IGF シグナル伝達系を抑制し、forkhead 転写因子活性化を経て、スーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase : SOD) を増加させ、抗酸化作用が発揮されることも示されている<sup>14</sup>。

### 3. Klotho 蛋白は代償性腎肥大を抑制する

機能ネフロン数が減少すると残存糸球体は肥大し、残存腎組織は代償性に肥大する。代償性腎肥大には複数のメディエーターの関与が報告されている。なかでも IGF-1 は重要な腎肥大因子 (renotropic factor) として注目されている。前述した Klotho 蛋白がインスリン/IGF-1 シグナル伝達系を抑制するとの報告を受け、代償性腎肥大における Klotho 蛋白の役割を検討した<sup>15</sup>。*klotho* 遺伝子を過剰発現する transgenic mouse (*klotho* TG : KLTG) に片腎摘モデルを作製した。対照群の wild type mouse (WT) では 2 週後に残存腎の肥大、血清および腎組織内 IGF-1 濃度の上昇を認めた。Klotho TG マウスでは片腎摘後の代償性肥大、腎内 IGF-1 濃度の増加が抑制された。IGF-1 の細胞内シグナル伝達物質である insulin receptor substrate 1 (IRS-1) のリン酸化、細胞肥大に関与する Akt, mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路が *klotho* 遺伝子過剰発現により抑制された。IGF-1 は尿細管細胞において NAD(P)H oxidase を活性化するが、Klotho 蛋白はこの経路を抑制し、抗酸化作用を介して腎肥大を抑制することが判明した(図 4)。

### 4. Klotho は腎保護効果を有している

前述したように、ICGN マウスでは腎障害の進展とともに腎組織に premature senescence が出現する。本マウスでは腎組織における *klotho* 遺伝子発現も低下していることが示された。単純な発想ではあるが、腎障害進展時には腎を主要な発現部位とする *klotho* 遺伝子発現が減少し、老化形質の出現を誘導するのではないかという仮説を持つに至った<sup>16</sup>。これを検証するために、Klotho TG と ICGN マウス

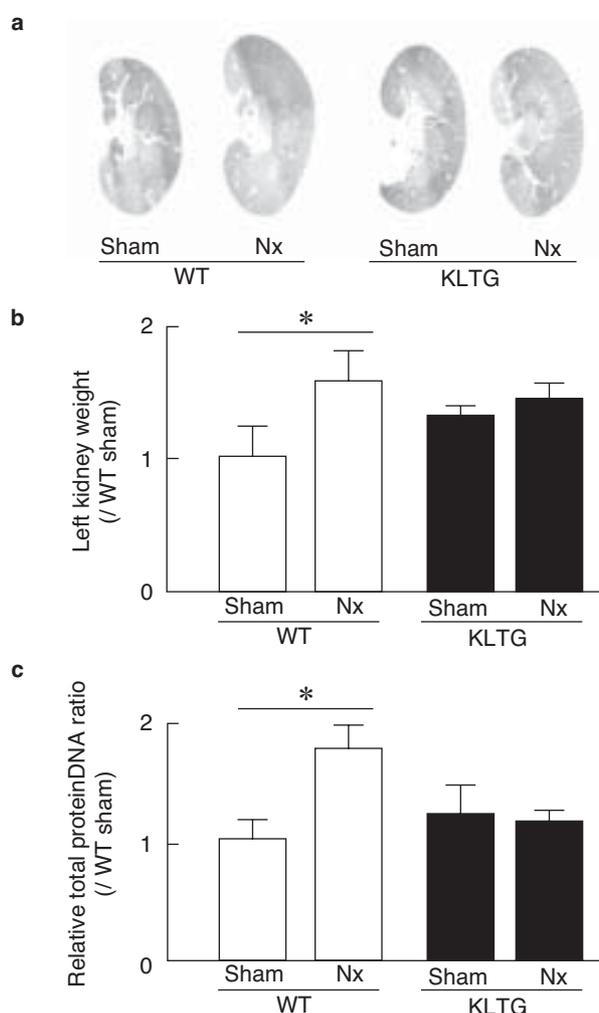


図 4 *klotho* 遺伝子産物は代償性腎肥大を抑制するマウスに片腎摘モデル(右腎摘出; Nx)を作製した。対照群(WT)の Nx では 2 週後に有意な腎重量の増大(a, b)と腎組織における蛋白/DNA 含量比の増大(c)を認めたが、*klotho* 遺伝子過剰発現マウス(KLTG)では代償性腎肥大は抑制された。擬似手術群を Sham と表示している。(文献 15 より引用改変)

を交配させ、*klotho* 遺伝子導入による効果を評価した。

まず、*klotho* 遺伝子導入により寿命の延長が認められた。ICGN 群の 40 週齢での生存率は 42%であったが、KLTG/ICGN では 79%と生存率の改善が認められた。KLTG/ICGN 群では腎機能障害、尿蛋白量、腎組織変化(糸球体硬化、間質尿細管障害)は野生型 ICGN 群に比し有意に改善していた。そのほか、野生型 ICGN では酸化ストレスの亢進、アポトーシスの亢進などを呈していたが、KLTG/ICGN 群においていずれも有意に改善していた。野生型 ICGN 群における血清リン・カルシウム濃度の有意な変化は認められず、Klotho 蛋白のカルシウム/リン代謝作用以外の作用

を介した効果であると考えられた。

### おわりに

慢性腎臓病は末期腎不全の前駆病態であるだけでなく心血管事故の独立した危険因子でもある。加齢は慢性腎臓病発症のリスク因子の一つでもある。「加齢」はもちろん介入不可能なリスク因子であるが、加齢に伴う腎臓の機能的・形態的变化には個体差が大きいことも事実である。加齢による腎組織変化のメカニズムを解明することにより、機能的にも形態的にも少なくとも年齢相応の状態に保つことは不可能なことではなかろう。とりわけ尿細管は体液組成・量の調節だけでなく、重要な内因性物質の産生を行っている。加齢に伴う尿細管変化の仕組みとその意義をより深く理解することにより、個体全体の健康寿命の維持につながる方策の立案につなげることができるのではないかと考えている。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

### 文 献

1. Brandis A, Bianchi G, Reale E, et al. Age-dependent glomerulosclerosis and proteinuria occurring in rats of the Milan normotensive strain and not in rats of the Milan hypertensive strain. *Lab Invest* 1986 ; 55 : 234-243.
2. Tauchi H, Tsuboi K, Okutomi J. Age changes in the human kidney of the different races. *Gerontologia* 1971 ; 17 : 87-97.
3. Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury : a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 17-25.
4. Kang DH, Anderson S, Kim YG, et al. Impaired angiogenesis in the aging kidney : vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. *Am J Kidney Dis* 2001 ; 37 : 601-611.
5. Satoh M, Fujimoto S, Horike H, et al. Mitochondrial damage-induced impairment of angiogenesis in the aging rat kidney. *Lab Invest* 2011 ; 91 : 190-202.
6. Haruna Y, Kashihara N, Satoh M, et al. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 2331-2336.
7. Schriener SE, Linfood NJ, Martin GM, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 2005 ; 308 : 1909-1911.
8. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997 ; 390 : 45-51.
9. Choudhury D, Levi M. Kidney aging--inevitable or preventable? *Nat Rev Nephrol* 2011 ; 7 : 706-717.
10. Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011 ; 22 : 124-136.
11. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 2006 ; 444 : 770-774.
12. Kuro-o M. Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006 ; 15 : 437-441.
13. Imura A, Tsuji Y, Murata M, et al. alpha-Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science* 2007 ; 316 : 1615-1618.
14. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* 2005 ; 309 : 1829-1833.
15. Nagasu H, Satoh M, Kuwabara A, et al. Overexpression of klotho protein modulates uninephrectomy-induced compensatory renal hypertrophy by suppressing IGF-I signals. *Biochem Biophys Res Commun* 2011 ; 407 : 39-43.
16. 柏原直樹, 佐藤 稔. 【尿細管間質障害】老化と尿細管間質障害 klotho 蛋白の関与. *医学のあゆみ* 2008 ; 225 : 311-315.