

腎線維化と老化

Aging and renal fibrosis

柏原直樹 佐藤 稔

Naoki KASHIHARA and Minoru SATOH

はじめに

わが国の現在の総人口は約1億2,779万人(2011(平成23)年10月)であるが、その構成をみると年少人口(0～14歳)が減少し老年人口(65歳以上)が増加したため、ひょうたん型～紡錘形を呈している(図1)¹⁾。1930年代には典型的なピラミッド型を示していたが、近年の少子化と1950(昭和25)年以降、一貫して老年人口が増加し続けてきたためである。老年人口の増加は今後も続き、2013(平成25)年には30%を超えることが予想されている。高齢者社会の本格的な到来を迎え、高齢者が例外的な存在ではなく、むしろ診療現場の主体となりつつある。高齢者は急性腎障害AKIを惹起する高リスク状態であり、AKI自体も重症化しやすい。認知機能障害は、高齢者社会が背負う深刻な問題である。CKDが認知機能障害を加速させることも判明している²⁾。さらに腎を代謝・排泄経路とする薬剤も多く、安全な医療を実施するうえでも加齢腎の特徴を知る必要がある。

本稿では加齢に伴う腎機能変化について概説し、次いで、加齢腎の特徴的変化である腎線維化、尿細管間質変化についてメカニズム面での最近の知見を紹介したい。

加齢による腎臓の機能的変化

1. 糸球体機能の加齢変化

腎の主要な機能である糸球体濾過率(glomerular filtration ratio : GFR)は加齢に伴い低下する³⁾。わが国では60歳代の男性の約30%、女性の約45%が推算GFR 60mL/分/1.73m²未満であると推測されている。

加齢に伴うGFRの低下には腎実質内の血行動態変化が

関係している。加齢に伴い、有効腎血漿流量(effective renal plasma flow : ERPF)が低下する。欧米人では30歳以降、10年ごとに約10%ずつERPFが低下することが示されている。腎皮質部で血流低下が著しく、髄質部の血流は比較的保たれる。また男性は女性に比して、加齢に伴う腎血漿流量(RPF)低下がより顕著である。高齢者の腎内血管では血管拡張因子である一酸化窒素(nitric oxide : NO)やプロスタグランジンI₂の産生能が低下していること示されている。高齢者ではNO産生酵素(NOS)の内因性阻害物質であるasymmetric dimethylarginine(ADMA)が増加することも報告されている。cyclooxygenase(COX)阻害薬であるNSAIDsの使用により高齢者では容易にRPFの減少と急激な腎機能低下をきたすことがあり注意が必要である。

GFRはRPF以外にも、糸球体血管壁の限外濾過係数(Kf値)によっても規定される。高齢者では、糸球体構築変化と機能糸球体数の減少を反映してKf値が低下する。RPF減少はGFR低下よりも著しいために、濾過率(filtration fraction : FF)は増大する。

高齢者には高血圧合併例が多い。全身血圧に対して尿中Na排泄量をプロットすると圧・利尿曲線が描かれる。高齢者では圧・利尿曲線の傾きの鈍化が認められ、血圧は食塩感受性を呈する。

2. 尿細管機能の加齢変化

尿細管機能も加齢とともに変化する。尿細管におけるNa再吸収能は加齢に伴い低下する。塩分摂取量の低下に対する尿細管のNa再吸収亢進は、高齢者では若年者よりも2倍近く遅延することが示されている。若年者と比較すると高齢者では血漿レニン活性、アルドステロン濃度ともに30～50%の低値を示し、さらに脱水などのレニン産生刺激に対する応答が高齢者では低下する。

Na排泄能力も高齢者では低下する。同等量のNa排泄を

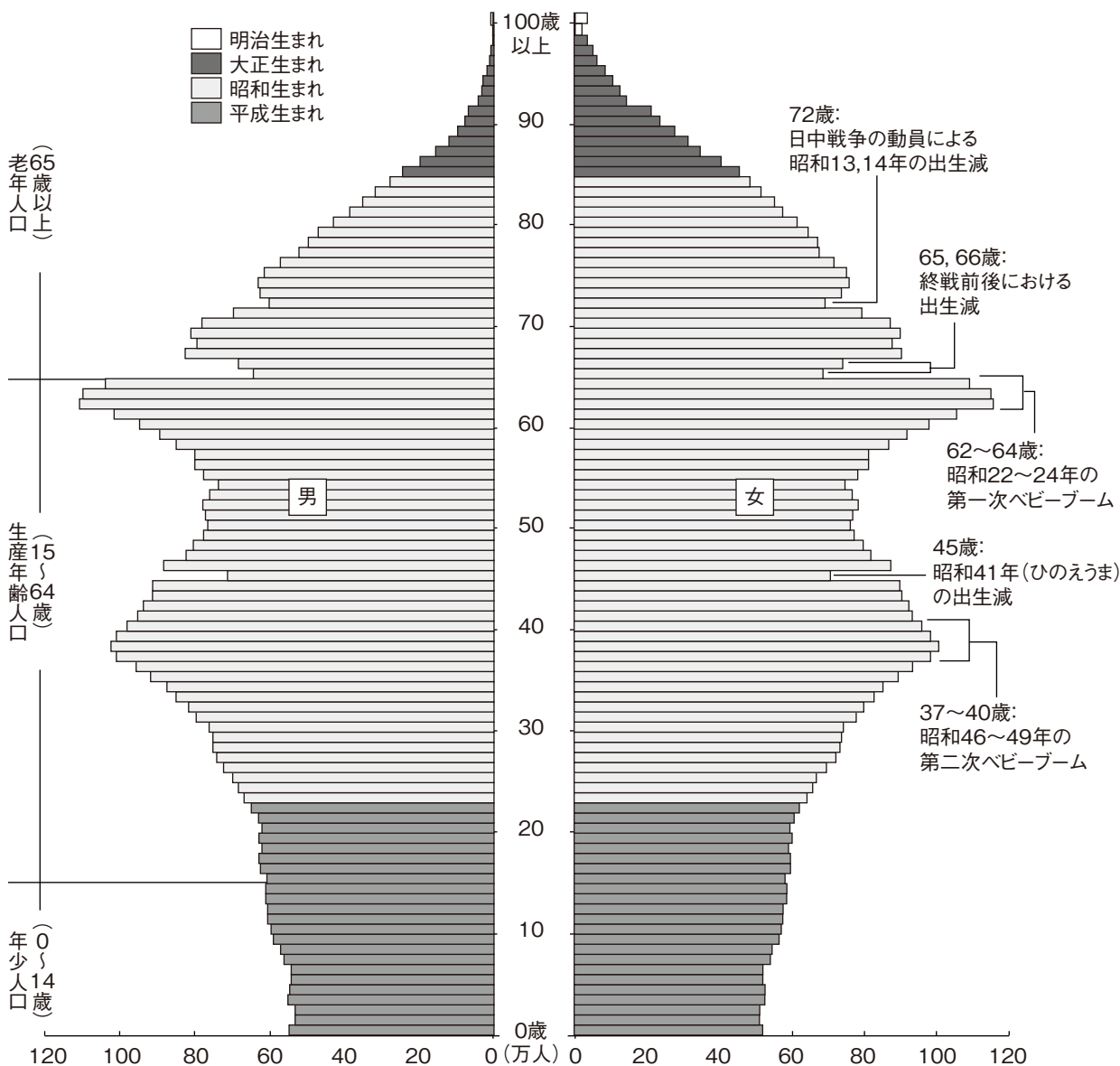


図1 わが国の人口ピラミッド(2011(平成23)年10月1日現在)

2011(平成23)年10月時点でのわが国の人口ピラミッドを示す。総人口に占める割合では、年少人口が13.1%、生産年齢人口が63.6%、老年人口が23.3%であり、老年人口が継続的に増加している。(文献1より引用)

行うために、高齢者では若年者と比較してより長時間を要するために、夜間の尿量増加をきたしやすい。Na利尿ホルモンである ANP の血清濃度は加齢に伴い増加するが、ANP に対する反応性は加齢に従って低下する。

さらに高齢者では、尿の最大濃縮力が低下する。体液量減少あるいは血漿浸透圧上昇に対するバソプレシン分泌反応は若年者と変わらないが、バソプレシンに対する集合尿管の反応性低下が示唆されている。

サイアザイド系利尿薬の使用により低Na血症をきたし、逆に飲水制限により高ナトリウム血症を惹起しやすい。口渇感も低下していることが多く、容易に体液量の異常をき

たしやすい。

以上のように、高齢者では若年者と比較して体液量やNa濃度の恒常性維持能力が低下していることを念頭に置くことが重要である。

加齢による腎臓の形態変化

1. 臓器レベルの変化

個体が老化に伴い形態的に変化を示すように、腎形態も加齢変化を免れえない⁴⁾。腎重量と腎体積は、加齢に伴い減少(腎萎縮)することが報告されている。40歳代前半に

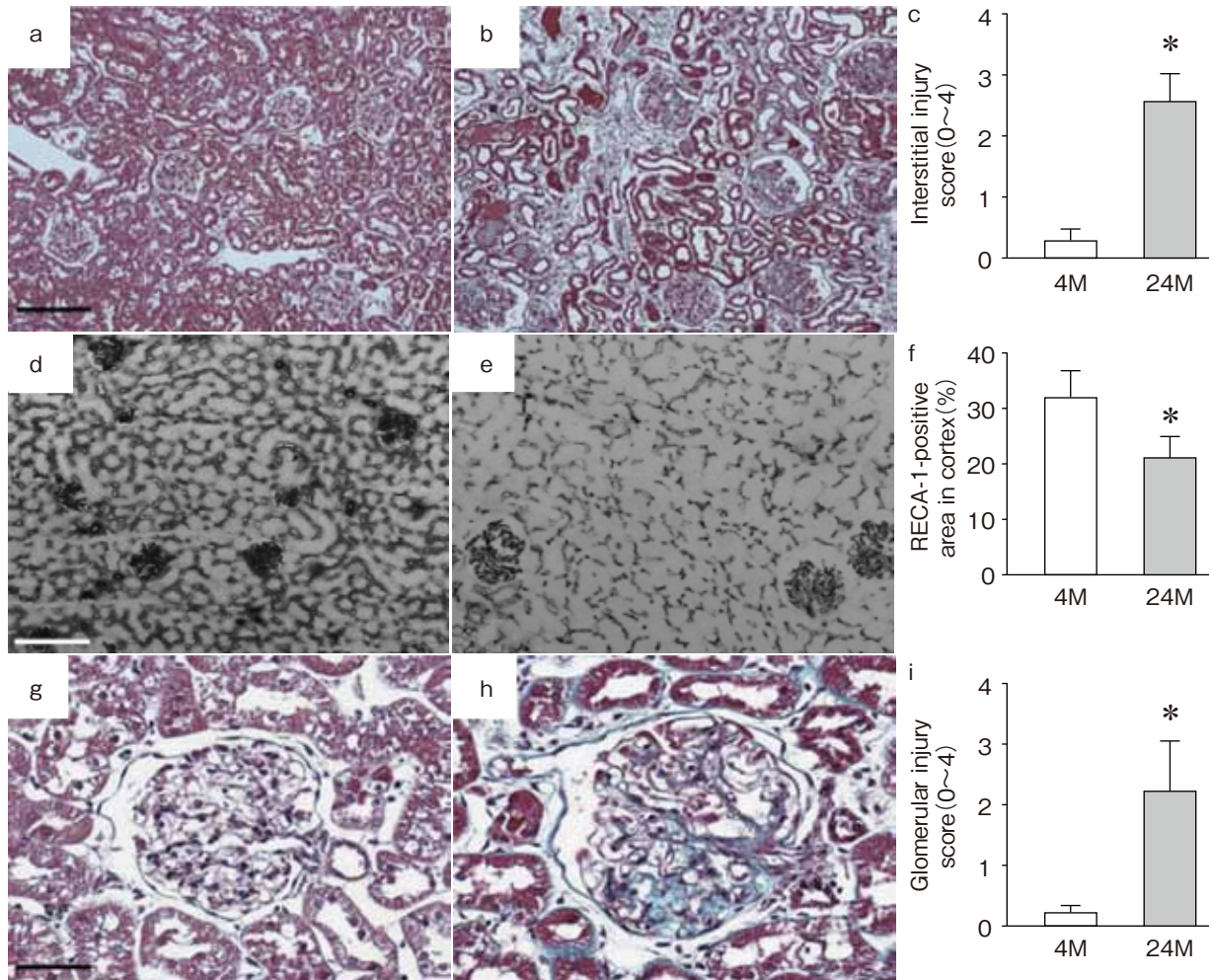


図2 加齢腎の組織変化

a, d, g: 4カ月齢ラット b, e, h: 24カ月齢ラット a, b, g, h: Masson Trichrome 染色 d, e: rat endothelial cell antigen (RECA)-1 染色。加齢腎の組織変化 24カ月齢の高齢ラットでは、尿細管萎縮と間質線維化(b)が進行し、間質の毛細血管数が減少する(e)。糸球体には分節状硬化が生じる(h)。(文献5より引用, 改変)

ピークを示し、その後は腎重量・体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。肉眼的には腎表面の癒痕化による凹凸不整、嚢胞形成が認められる。糸球体には分節状硬化から全節性硬化の各段階の変化が認められる。皮質部と比較して髄質部では軽度であり、傍髄質部の糸球体のなかには代償性に肥大したものも認められる。

2. 血管系変化

葉間動脈～弓状動脈～小葉間動脈には内膜・中膜肥厚(fibrointimal hyperplasia)と内腔狭小化が加齢に伴い進行する。輸入細動脈には硝子化(hyaline arteriosclerosis)も認められる。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～細小動脈の内腔狭小化は腎血流量の低下と関連する。

間質に豊富に存在する毛細血管網の退縮(capillary rar-

efaction)も特徴的所見である。また、傍尿細管毛細血管(peritubular capillary: PTC)数が減少するほか、一連の血管系の変化により腎・腎間質血流が低下し、広範な組織虚血を招来する。

3. 尿細管・間質変化

尿細管上皮の萎縮、尿細管内腔の拡大、尿細管基底膜の肥厚も加齢腎で広範に出現する。尿細管の萎縮に伴い、間質領域の拡大、線維化が進行する(図2)⁵⁾。尿細管上皮は萎縮するだけでなく細胞数も減少し、さらに尿細管長も短縮する。近位尿細管長は加齢により短縮し、遠位尿細管では憩室が出現する。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生じる組織虚血も関与していると考えられる。

このように加齢腎の組織学的特徴は、糸球体硬化、尿細

管萎縮, 間質線維化, 小動脈内腔狭小化~PTC 減少であるが, これらの変化は腎機能正常の高齢者においても潜在的に存在するという, 生体腎移植のドナー腎の組織学的解析結果が報告されている。対象者はいずれも GFR 正常で微量アルブミン尿を有しない, すなわち CKD 非合併例である。硬化糸球体数は加齢に伴い直線的に増加し, 若年者(18~29歳)では2.7%であったが, 高齢者(70~77歳)では73%に認められた。硬化糸球体数と尿中アルブミン排泄量, 夜間血圧, 高血圧との間に相関を認めた。

従って, 健常高齢者においても潜在的な腎臓の加齢変化の存在を念頭に置く必要がある。

加齢に伴う腎線維化メカニズム

1. 血管系変化

1) 血管新生能の障害: impaired angiogenesis

尿細管上皮細胞は vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) を代表とする血管新生促進因子を産生し, PTC の血管構築維持, 修復機転としての血管新生に関与する。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⁶⁾。

Sirt2(silent information regulator-2)は, カロリー制限による寿命延長に関与する NAD⁺依存性ヒストン脱アセチル化酵素である。哺乳類ホモログとして7種類のサーチュイン(Sirtuin)ファミリーが存在する。低酸素状態になると HIF-2 α は Sirt1 により脱アセチル化され, その活性を上昇させる。Sirt1 は腎の加齢変化に関与することが示されている⁷⁾。

内皮細胞特異的に *Sirt1* 遺伝子を欠損させると内皮細胞に細胞老化形質 (premature senescence) が出現し, 比較的若年時から部分的に間質線維化が出現する⁸⁾。本モデルに急性・慢性腎障害モデルを作製すると著明な間質線維化を認め, また, 内皮細胞の細胞老化が間質線維化に関与することが示された。興味深いことに, 同モデルでは加齢に従い心筋間質線維化を伴う拡張型心不全も認められた。高齢者は CKD と拡張型心不全を合併することが多く, 心腎連関にも内皮細胞老化が関与することを示唆している。組織障害の修復機転において内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells: EPC) が動員され, 血管新生・組織修復に関与する。加齢動物では EPC における *Sirt1* 発現が低下し, 血管新生能が低下することも示されている。

高齢マウスに若年マウスの骨髄移植を行うことで, 加齢

による腎組織変化が改善することも示されており⁹⁾, EPC の加齢変化も腎加齢の加速因子となると考えられる。また加齢による内皮機能障害に microRNAs (miRNAs) の発現変化が病的に関与することも示されており¹⁰⁾, 加齢マウス内皮細胞では microRNA-125a-5p (mir-125a-5p)が増加し, eNOS, VEGF 発現が低下した。

以上のように, 加齢腎では複合的な要因により血管新生能が低下する。

2) 血管新生抑制因子 (anti-angiogenic factor) の増加

capillary rarefaction は血管新生能の低下 (impaired angiogenesis) と同時に血管新生抑制因子の増強によっても生じる¹¹⁾。

生体内には数多くの血管新生抑制因子が存在する。endostatin は XVIII 型コラーゲンの C 末端フラグメントが切り出されて産生される。高齢動物では endostatin 産生増加が間質線維化と同時に生じることが示されている。

Angiostatin は分子量 38kDa のプラスミノゲン分解産物である。プラスミノゲン自体には血管新生抑制能はないが, 分解産物である angiostatin は血管内皮細胞の増殖抑制, アポトーシス促進, 遊走能阻止により血管新生を抑制する。angiostatin はプラスミノゲンあるいはプラスミンが MMP(3, 9, 12)などのセリンプロテアーゼにより分解され生じる。

われわれは, 高齢動物では加齢とともに腎組織において angiostatin 産生が亢進し, 同時にその産生に cathepsin D が関係することを示した¹²⁾。同時に加齢腎組織では eNOS とその活性を制御する dimethylarginine dimethylaminohydrolyase (DDAH)-1, 2 の発現が低下し, NO 産生量の低下を認めた。興味深いことは cathepsin D の発現・活性化が NO によって制御されていることである。すなわち, NO 不足の状況(加齢腎)では cathepsin D の発現・活性が亢進し, angiostatin 産生が亢進する。NO ドナーは一連の変化を抑制し, 腎線維化を改善することも示された。加齢に伴い血管内皮機能が低下することは広く認められており, 内皮機能障害が血管新生抑制因子 angiostatin 発現の亢進を介して腎線維化の原因となることが示されたわけである。

2. Wnt/ β -catenin 経路の関与

Wnt 経路は発生, 発癌, 細胞死などの多彩な生命現象に関与している¹³⁾。Wnt 経路活性化は老化, 臓器線維化にも関与する。Wnt は分子量約4万の分泌蛋白である。Wnt は, 少なくとも3種類の細胞内シグナル伝達経路を介して生物活性を発揮する。① β -catenin 経路, ②planar cell polarity (PCP: 平面内細胞極性経路), ③細胞内 Ca²⁺経路, であ

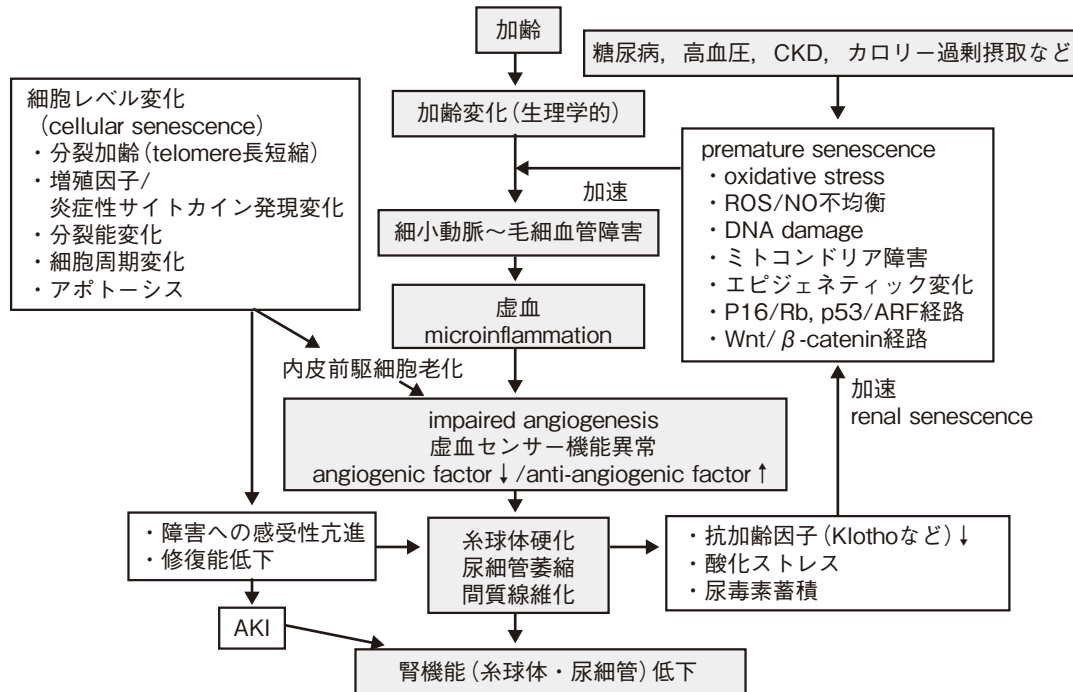


図3 加齢腎の病態

加齢腎では生理的加齢変化をベースにして、これに高血圧，糖尿病，CKD，カロリー過剰摂取などがストレスとして重複することにより加齢変化が加速される(stress-induced premature senescence)。

る。 β -catenin 経路を古典的 Wnt 経路 (canonical Wnt pathway)，それ以外を非古典的 Wnt 経路 (non-canonical Wnt pathway) と呼称する。これまでに 19 種類の Wnt が同定され，受容体として 10 種類の 7 回膜貫通型受容体 Frizzled (Frz) が発見されている。非刺激下では細胞膜もしくは細胞質に存在する β -catenin は glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)，casein kinase 1 (CK1) などにより構成される β -catenin 分解複合体によってリン酸化・ユビキチン化され，さらにプロテアソームで分解制御されている。

われわれは Wnt レポーター遺伝子発現動物を用いて，腎線維化過程で Wnt/ β -catenin 経路が活性化されることを示した¹⁴⁾。Wnt 3a は培養腎細胞を G2/M 期で cell cycle を停止させ，pro-fibrotic phenotype へ移行させる。Klotho 蛋白が Wnt 経路抑制を介して一連の変化を抑制することも判明した。加齢腎あるいは障害腎では Klotho 発現が低下することから，加齢腎あるいは CKD 全般の腎線維化に Klotho/Wnt/ β -catenin 経路が関与することが明らかになった。

3. ミトコンドリア障害の関与

ミトコンドリアは酸化的リン酸化による細胞内エネルギー産生器官である。そのため，常時一定の活性酸素種が産生される。加齢によるミトコンドリア酸化ストレスの亢進によるミトコンドリア機能異常，ミトコンドリア DNA

の酸化的障害の蓄積が加齢変化をさらに加速させると推定されている。一方，高齢動物でカロリー制限を行うことによって，異常ミトコンドリアの autophagy による除去が亢進し，加齢変化を抑制できることが報告されている。

また，加齢腎の障害尿管上皮では，ミトコンドリアの形態異常 (小型化) が認められる。われわれはミトコンドリアが虚血センサーとして機能することを見出し，尿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を報告した¹⁵⁾。

以上のように，加齢腎では生理的加齢変化をベースにして，これに高血圧，糖尿病，CKD，カロリー過剰摂取などがストレスとして重複することにより加齢変化が加速される (stress-induced premature senescence) (図 3)。

4. Premature aging としての CKD

CKD はその進行とともに，骨変化 (CKD-MBD)，動脈硬化，創傷治癒の遅延，骨格筋量の減少 (sarcopenia)，皮膚萎縮，認知機能障害が進行し，実年齢以上に個体レベルでの老化が進行した状態 premature aging 状態とみなすことができる¹⁶⁾。そのメカニズムとして 2 つの仮説が成り立つ。すなわち，1) CKD で個体老化を加速させる原因 (物質) が重積する，2) 腎臓に存在する内在性物質が不足・欠落する場合である。

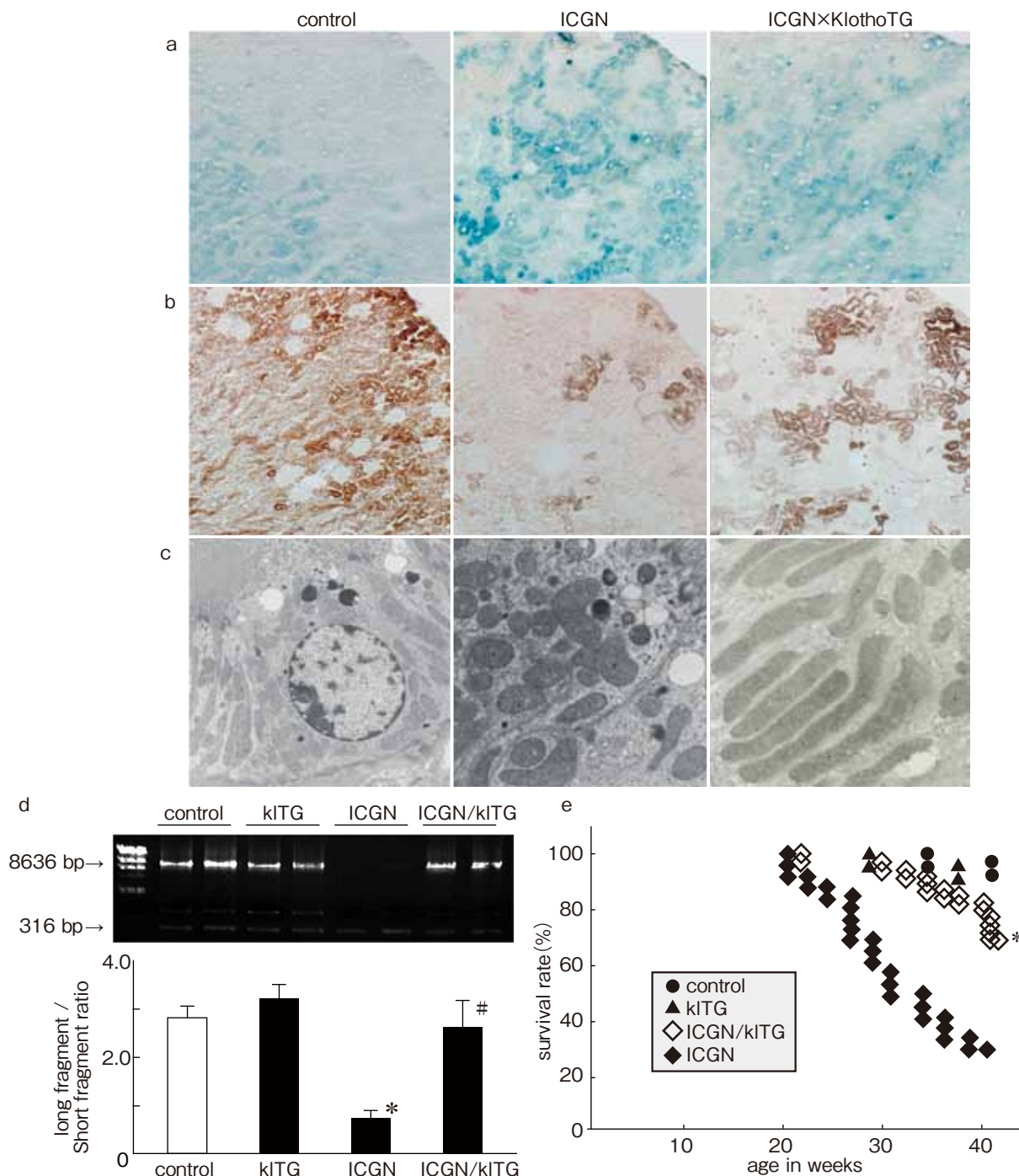


図4 CKDモデル腎組織における加齢変化

CKDモデルであるICGNマウス腎組織では、皮質部尿管を中心に細胞老化の指標であるβ-galactosidase活性の亢進を認めた(a)。同部ではミトコンドリア機能(呼吸鎖機能: cytochrome C oxidase)の低下(b)およびミトコンドリアの形態異常を認めた(c)。ミトコンドリアDNA(mtDNA)の異常をwhole mtDNA PCR法で評価したところ、腎組織において異常mtDNAの蓄積を認めた(d)。以上の一連の変化はKlotho遺伝子高発現により抑制され、寿命の延長を認めた(e)。(文献16より引用, 改変)

興味深いことに、CKDでは腎組織自体に加齢変化が加速していることが判明した¹⁷⁾。腎不全モデルであるICGNマウスでは、腎組織に細胞老化の指標であるβ-galactosidase活性亢進を認め、細胞老化に深く関与するミトコンドリア

障害を認めた。またCKD腎組織では尿管のミトコンドリアが小型化し、呼吸鎖機能(cytochrome C oxidase活性)の低下を認めた。これらのことより、疾患腎組織は“老いている”といえる(図4)。

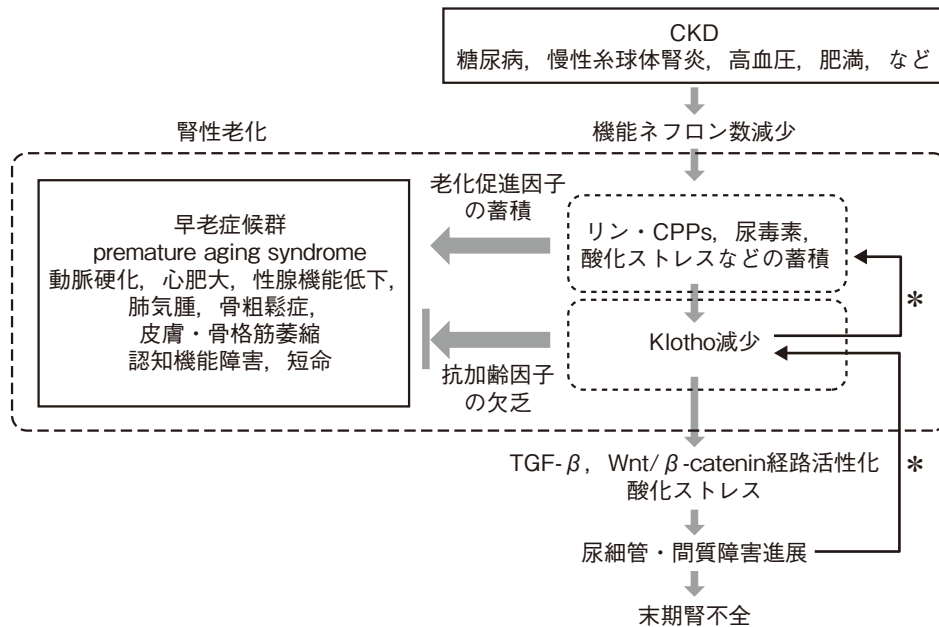


図5 腎性老化(renal senescence)仮説

CKDではその進行とともに、実年齢以上に個体レベルでの老化が進行した状態 premature aging 状態とみなすことができる。そのメカニズムとして2つの仮説が成り立つ。すなわち、1)CKDで個体老化を加速させる原因物質(老化促進因子)が重積する、2)腎臓に存在する内在性物質(抗老化因子)が不足・欠落する場合である。

1) 尿毒素, 酸化ストレス

CKDは全般的に酸化ストレス亢進状態である。酸化ストレスが、核酸、蛋白、脂質などの生体成分を酸化的に修飾し、老化病態に関与することが示されている。癌抑制遺伝子でもある p53 は活性酸素種が仲介する細胞増殖反応、cell-cycle arrest, 細胞老化, アポトーシス誘導などに中心的役割を果たしている。酸化ストレスは p53 の転写活性を活性化させることが判明している¹⁸⁾。

尿毒素が細胞レベルでの老化形質の発現に関与することも示されている。尿毒素のなかのインドキシル硫酸が抗酸化遺伝子、解毒酵素遺伝子の発現を統御する転写因子 nuclear factor-like 2 (Nrf2) の転写活性を抑制し、酸化ストレス亢進の一因をなすことが報告された。また、インドキシル硫酸は血管平滑筋に酸化ストレス亢進を介して、細胞老化形質の指標である p53, p21, β -galactosidase 活性を亢進させる¹⁹⁾。心筋の間質線維化(腎不全の心筋障害の特徴)にもインドキシル硫酸の関与が示されている。

2) Klotho 遺伝子

腎はエリスロポエチン産生, レニン産生, ビタミン D 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。腎不全の病態が尿毒素の蓄積のみならず、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)」と呼ぶべき病態を想定可能であろうか。

1997年に Kuro-o 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²⁰⁾。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。逆に Klotho 高発現マウスは長命である。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¹⁶⁾。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)を持つに至り(図5), 腎不全の病態形成に Klotho 遺伝子産物が関係することを示した^{21,22)}。

Klotho は1回膜貫通型の蛋白であり, 切断されると分泌型 Klotho が産生される。膜型 Klotho は FGF 受容体と会合し, FGF23 の受容体として機能する。FGF23 遺伝子欠損マウスの表現型は Klotho (遺伝子欠損)マウスと酷似してい

る。FGF23 は腎臓に作用してリン利尿ホルモンとして作用し、同時に活性型ビタミン D 合成を抑制し、副甲状腺では PTH の分泌を抑制する。Klotho マウス、FGF23、Na⁺/リン酸共輸送体、ビタミン D 受容体などの遺伝子欠損マウスで認められる老化形質は低リン食によって著しく改善されることから、高リン血症が老化形質の発現に関与することが示された^{23,24)}。

分泌型 Klotho は血中に分泌され多彩な作用を発揮する。IGF-1²⁵⁾、Wnt^{26,27)}、TGFβ1²⁸⁾、経路のシグナル伝達に抑制的に作用する。カルシウムチャネル TRPV5 やカリウムチャネル ROMK1 の細胞膜上の局在を安定化させ、リンの取り込みを制御している Pit1/2 を阻害することも報告されている。

CKD の進行とともに、Klotho 遺伝子発現が低下することが示され²⁹⁾、またインドキシル硫酸が DNA methyltransferases 1, 3a, 3b 発現亢進を介して、Klotho 遺伝子の発現をエピジェネティックに制御することが示されていることから³⁰⁾、CKD と老化は Klotho 遺伝子の発現低下という共通点を有している。

おわりに

わが国では高齢者人口の増加が続いている。「加齢」はもちろん修正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。そのためには、血圧・血糖管理、適正な体重維持・食事内容などの stress-induced premature senescence の要因排除に若年時から留意する必要がある。われわれは、加齢に伴う腎臓の総合的な機能維持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. 総務省統計局. 人口推計(平成 23 年 10 月 1 日現在). <http://www.stat.go.jp/data/jinsui/2011np/index.htm>
2. Anand S, Johansen KL, Kurella Tamura M. Aging and chronic kidney disease : the impact on physical function and cognition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014 ; 69(3) : 315-322. doi : 10.1093/gerona/glt109.
3. Imai E, Horio M, Yamagata K, Iseki K, Hara S, Ura N, Kiyohara Y, Makino H, Hishida A, Matsuo S. Slower decline of glomerular filtration rate in the Japanese general population : a longitudinal 10-year follow-up study. *Hypertens Res* 2008 ; 31(3) : 433-441. doi : 10.1291/hypres.31.433.
4. Glasscock RJ, Rule AD. The implications of anatomical and functional changes of the aging kidney : with an emphasis on the glomeruli. *Kidney Int* 2012 ; 82(3) : 270-277. doi : 10.1038/ki.2012.65.
5. Satoh M, Fujimoto S, Horike H, Ozeki M, Nagasu H, Tomita N, Sasaki T, Kashihara N. Mitochondrial damage-induced impairment of angiogenesis in the aging rat kidney. *Lab Invest* 2011 ; 91(2) : 190-202. doi : 10.1038/labinvest.2010.175.
6. Kang DH, Anderson S, Kim YG, Mazzalli M, Suga S, Jefferson JA, Gordon KL, Oyama TT, Hughes J, Hugo C, Kerjaschki D, Schreiner GF, Johnson RJ. Impaired angiogenesis in the aging kidney : vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. *Am J Kidney Dis* 2001 ; 37(3) : 601-611.
7. Kume S, Kitada M, Kanasaki K, Maegawa H, Koya D. Anti-aging molecule, Sirt1 : a novel therapeutic target for diabetic nephropathy. *Arch Pharm Res* 2013 ; 36(2) : 230-236. doi : 10.1007/s12272-013-0019-4.
8. Vasko R, Xavier S, Chen J, Lin CH, Ratliff B, Rabadi M, Maizel J, Tanokuchi R, Zhang F, Cao J, Goligorsky MS. Endothelial sirtuin 1 deficiency perpetrates nephrosclerosis through downregulation of matrix metalloproteinase-14 : relevance to fibrosis of vascular senescence. *J Am Soc Nephrol* 2014 ; 25(2) : 276-291. doi : 10.1681/ASN.2013010069.
9. Yang HC, Rossini M, Ma LJ, Zuo Y, Ma J, Fogo AB. Cells derived from young bone marrow alleviate renal aging. *J Am Soc Nephrol* 2011 ; 22(11) : 2028-2036. doi : 10.1681/ASN.2010090982.
10. Che P, Liu J, Shan Z, Wu R, Yao C, Cui J, Zhu X, Wang J, Burnett MS, Wang S, Wang J. miR-125a-5p impairs endothelial cell angiogenesis in aging mice via RTEF-1 downregulation. *Aging Cell* 2014 ; 13(5) : 926-934. doi : 10.1111/accel.12252.
11. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011 ; 473(7347) : 298-307. doi : 10.1038/nature10144.
12. Satoh M, Kidokoro K, Ozeki M, Nagasu H, Nishi Y, Ihoriya C, Fujimoto S, Sasaki T, Kashihara N. Angiostatin production increases in response to decreased nitric oxide in aging rat kidney. *Lab Invest* 2013 ; 93(3) : 334-343. doi : 10.1038/labinvest.2012.171.
13. Clevers H, Nusse R. Wnt/β-catenin signaling and disease. *Cell* 2012 ; 149(6) : 1192-1205. doi : 10.1016/j.cell.2012.05.012.
14. Satoh M, Nagasu H, Morita Y, Yamaguchi TP, Kanwar YS, Kashihara N. Klotho protects against mouse renal fibrosis by inhibiting Wnt signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012 ; 303(12) : F1641-1651. doi : 10.1152/ajprenal.00460.2012.
15. Satoh M, Kidokoro K, Ozeki M, Nagasu H, Nishi Y, Ihoriya C,

- Fujimoto S, Sasaki T, Kashihara N. Angiostatin production increases in response to decreased nitric oxide in aging rat kidney. *Lab Invest* 2013 ; 93(3) : 334-343. doi : 10.1038/labinvest.2012.171.
16. Shanahan CM. Mechanisms of vascular calcification in CKD—evidence for premature ageing? *Nat Rev Nephrol* 2013 ; 9(11) : 661-670. doi : 10.1038/nrneph.2013.176.
 17. Haruna Y, Kashihara N, Satoh M, Tomita N, Namikoshi T, Sasaki T, Fujimori T, Xie P, Kanwar YS. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104(7) : 2331-2336.
 18. Gambino V, De Michele G, Venezia O, Migliaccio P, Dall'Olio V, Bernard L, Minardi SP, Della Fazio MA, Bartoli D, Servillo G, Alcalay M, Luzi L, Giorgio M, Scralle H, Pellicci PG, Migliaccio E. Oxidative stress activates a specific p53 transcriptional response that regulates cellular senescence and aging. *Aging Cell* 2013 ; 12(3) : 435-445. doi : 10.1111/accel.12060.
 19. Muteliefu G, Shimizu H, Enomoto A, Nishijima F, Takahashi M, Niwa T. Indoxyl sulfate promotes vascular smooth muscle cell senescence with upregulation of p53, p21, and prelamin A through oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012 ; 303(2) : C126-134. doi : 10.1152/ajpcell.00329.2011.
 20. 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, Nabeshima YI. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997 ; 390(6655) : 45-51.
 21. Sugiura H, Yoshida T, Shiohira S, Kohei J, Mitobe M, Kurosu H, Kuro-o M, Nitta K, Tsuchiya K. Reduced Klotho expression level in kidney aggravates renal interstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012 ; 302(10) : F1252-1264. doi : 10.1152/ajprenal.00294.2011.
 22. Nagasu H, Satoh M, Kuwabara A, Yorimitsu D, Kidokoro K, Nishi Y, Tomita N, Sasaki T, Kashihara N. Overexpression of klotho protein modulates uninephrectomy-induced compensatory renal hypertrophy by suppressing IGF-I signals. *Biochem Biophys Res Commun* 2011 ; 407(1) : 39-43. doi : 10.1016/j.bbrc.2011.02.089.
 23. Kuro-o M. Klotho, phosphate and FGF-23 in ageing and disturbed mineral metabolism. *Nat Rev Nephrol* 2013 ; 9(11) : 650-660. doi : 10.1038/nrneph.2013.111.
 24. Kuro-o M. Klotho in health and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012 ; 21(4) : 362-368. doi : 10.1097/MNH.0b013e32835422ad.
 25. 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, Kuro-o M. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* 2005 ; 309(5742) : 1829-1833.
 26. Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, Liu J, Cao L, Chen J, Malide D, Rovira II, Schimel D, Kuo CJ, Gutkind JS, Hwang PM, Finkel T. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 2007 ; 317(5839) : 803-806.
 27. Satoh M, Nagasu H, Morita Y, Yamaguchi TP, Kanwar YS, Kashihara N. Klotho protects against mouse renal fibrosis by inhibiting Wnt signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012 ; 303(12) : F1641-1651. doi : 10.1152/ajprenal.00460.2012.
 28. Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, Shiizaki K, Gotschall R, Schiavi S, Yorioka N, Takahashi M, Boothman DA, Kuro-o M. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem* 2011 ; 286(10) : 8655-8665. doi : 10.1074/jbc.M110.174037.
 29. Choudhury D, Levi M. Kidney aging—inevitable or preventable? *Nat Rev Nephrol* 2011 ; 7(12) : 706-717. doi : 10.1038/nrneph.2011.104.
 30. Sun CY, Chang SC, Wu MS. Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney Int* 2012 ; 81(7) : 640-650. doi : 10.1038/ki.2011.445.