

原 著

ラット腎虚血再灌流モデルにおける klotho の発現調節

東京女子医科大学 医学部 第四内科学 (主任：二瓶 宏教授)

スギウラ ヒデカズ ヨシダ タクミ ツチヤ ケン ミト ベミチヒロ ニヘイ ヒロシ
杉浦 秀和・芳田 工・土谷 健・三戸部倫大・二瓶 宏

(受理 平成16年4月28日)

Regulation of Klotho Expression in the Experimental Ischemic-Reperfusion Renal Injury Model

Hidekazu SUGIURA, Takumi YOSHIDA, Ken TSUCHIYA, Michihiro MITOBE and Hiroshi NIHEI

Department of Medicine IV, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine

A new gene, klotho, is associated with the suppression of several aging phenotypes. High expression of the klotho gene was detected in the kidney and several studies have reported the alternation of its expression level in some animal models and stressful conditions, so we explored the physiological relevance of the klotho expression in the kidney following ischemic-reperfusion renal injury (IRI). Male Wistar rats underwent bilateral renal ischemia or sham operation, followed by reperfusion for 1, 3 and 10 days. The expression of renal klotho mRNA and protein was assessed with real-time PCR or Western blotting. Creatinine levels were determined for functional parameters. Immunohistochemical and morphological studies were performed. Apoptotic cells were determined by TUNEL staining. Renal klotho mRNA and protein expression was significantly reduced in IRI rats the first day after ischemia. The number of klotho positive cells in the kidney 3 days after IRI was less than that in the sham-operated kidney. In addition, both TUNEL and klotho staining showed co-localization. The data indicated that the klotho gene is implicated in the pathophysiology associated with IRI. Downregulation of the renal klotho gene plays a role in the aggravation of ischemic acute renal failure.

Key words: apoptosis, ischemic-reperfusion renal injury, klotho

緒 言

Insertional mutation により生じた短命、動脈硬化症、骨粗鬆症、皮膚萎縮、肺気腫、僧帽弁石灰化、および性腺機能低下など老化兆候と類似する表現型を呈するマウスから、その原因遺伝子が特定され klotho と命名された¹⁾。特徴的な点は、klotho が腎臓、脳に特異的に発現すること、また、mRNA のスプライシングによって分泌型蛋白と膜型蛋白が存在することなどである²⁾³⁾。しかしながら、klotho 発現の意義や調整メカニズムは不明な点が多い。最近、持続的なストレス下の動物モデルにおいて腎臓での klotho 発現が抑制され⁴⁾⁵⁾、また、ヒトの慢性腎不全時にも発現が抑制されていることが報告されている⁶⁾。これらの報告はストレスによる klotho 発現の低下と、老化類似の表現型を示す細胞・組織機能障害が関連することを示唆している。

今回我々は、腎臓における klotho 発現の調節を、

典型的な酸化ストレスの実験モデルである腎虚血再灌流障害 (IRI) において検討した。IRI では酸化的ストレスが組織の損傷、機能障害に関連していることが指摘されており⁷⁾⁸⁾、これらには活性酸素や炎症反応が関与し⁹⁾¹⁰⁾、細胞壊死やアポトーシスにいたる¹¹⁾¹²⁾。こうした過程における klotho 発現と細胞障害、特にアポトーシスとの関連を検討した。

対象および方法

1. 対象

200～250 g (7～8 週齢) 雄性の Wistar ラットを用いた。室温 25℃ の条件下に自由摂食、飲水とした。

動物実験は東京女子医科大学動物実験倫理委員会の承認を得て (No 03-7)、NIH の実験動物の使用ガイドラインに準拠して施行した。全ての動物は pentobarbital を用いて麻酔下に手術を施行した。

2. 方法

1) 動物モデル

ラットは次の3つのグループに無作為に分類した。

(1) 腎虚血再灌流障害 (IRI) 群 (1, 3, 10 日目, 各 n=5~6): 腎臓の虚血再灌流モデルは既報と同様の手順で作製した¹³⁾。麻酔下で腹部正中切開し両側腎門部の腎動脈, 静脈を露出させ, 動脈クリップを用いて両側腎動静脈をクランプした。60 分後動脈クリップをはずし再灌流した。

(2) Sham 群 (1, 3, 10 日目, 各 n=5~6): 麻酔下で腹部正中切開し両側腎門部における腎動脈, 静脈を露出させ, 腎動静脈のクランプを施行せず閉腹した。

(3) Control 群 (n=6): 麻酔, 手術を施行せず, 自然状態での発現のコントロールとした。

手術後 1, 3, 10 日目に, 血液採取, 腎臓摘出を行った。腎臓を分割し, 液体窒素で急速凍結, もしくは 15% ホルマリンと 4% paraformaldehyde のいずれかによって固定した。

2) RNA 抽出, reverse transcription (RT), real-time PCR

この分析も, 既報と同様の方法で行った¹³⁾。Total RNA は, TRIZOL (Invitrogen, CA, USA) を用いて腎臓より抽出した。cDNA は 5 µg の total RNA と oligo (dT) を使用し, SuperScript kit (Invitrogen) によって作製した。Real-time PCR は Prism 7700 (Sequence Detection Systems 1.6.3, Applied Biosystems, 東京) を用いて分析した。Klotho のラット特異的プライマーは 5' CGT GAA TGA GGC TCT GAA AGC 3' (forward), 5' CGG TCA CTA AGC GAA TAC G 3' (reverse) を用いた。また対照として rodent glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA を用いた。

3) Western blotting

腎組織は, lysis buffer (20 mM Tris buffer, pH 7.5, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml aprotinin from bovine lung, 2 mM DL-dithiothreitol, 1% polyoxyethylene sorbitan monolaurate, 1 mM ethylenediamine tetra-acetate) に浸しホモジネート後, 5,000 rpm 10 分間遠心し上清を分離した。

10% polyacrylamide gel を用い, 各サンプルから 1 レーンにつき 300 µg の蛋白を電気泳動し, ニトロセルロース膜へ転写した。膜を 3% スキムミルクで 4°C 一晩ブロックし, 一次抗体として recombinant human klotho 蛋白に対するモノクローナル抗体,

KM 2076¹⁴⁾ (協和発酵工業より供与, 静岡) を 3,000 倍に希釈し, 4°C 一晩反応させ, washing buffer (0.3% Tween 20 in PBS) で 10 分間 2 回洗浄した。二次抗体として horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-rat immunoglobulins (DAKO, 京都) を室温で 1 時間反応させた。その後, ECL Western blotting system (Amersham Biosciences, NJ, USA) で反応させ, X 線フィルムに撮影した。

数量化は Image J を用いて相対的な密度測定によって行った。

4) 凍結免疫組織染色

腎を 4% paraformaldehyde で 4°C 16 時間固定し, 10, 15, 20% sucrose 液に各々 4°C 12 時間浸し, その後 OCT compound に埋め込み凍結した。凍結免疫組織染色は, 一次抗体として KM 2076 および二次抗体として Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG (H+L) (Molecular Probes, OR, USA) を用いた。

非特異的結合は, 室温で 60 分間 goat serum (10% goat serum, 20 mM Tris, 225 mM NaCl, 1% BSA) でブロックした。洗浄後, anti-rat IgG (H+L) (Vector Laboratories, CA, USA) で更にブロックした。

一次抗体で 4°C 16 時間反応させ, 二次抗体で室温 60 分間反応させ, 洗浄後, VectaShield (Vector Laboratories) を用いてマウントした。

5) パラフィン免疫組織染色

腎臓は 4°C 16 時間, 4% paraformaldehyde で固定し, パラフィンに包埋した。3 µm のパラフィン切片を脱パラフィンし, 0.3% H₂O₂ メチルアルコールで 30 分反応させた。免疫組織染色には Vectastain ABC Kit Rat IgG (Vector Laboratories) を用い, 20 分間 rabbit serum (20 mM Tris, 225 mM NaCl, 0.15% rabbit serum) でブロックし, 次に 15 分間 anti-rat IgG (H+L) でブロックした。一次抗体として KM 2076 で 30 分間反応させ, 洗浄後, ビオチン化二次抗体で 30 分間反応させ, Vectastain ABC Reagent で 30 分間反応した。その後 peroxidase substrate solution DAB substrate kit (Vector Laboratories) で発色させた。

6) アポトーシス細胞の検出

Terminal deoxyribonucleotide transferase (TdT) mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 染色を施行した。対照の染色として, 4', 6-diamidino-2'-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) dye (Kirkegaard Perry Laboratories, MD, USA) を用

いた。4% paraformaldehyde で固定した凍結切片で、In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche, Penzberg, Germany)を用いて染色した。腎臓切片は、0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate で氷上 2 分間反応させ洗浄後、TUNEL reaction mixture で、暗所 37°C 60 分間反応させた。洗浄後、DAPI を暗所 4 分間反応させ、VectaShield を用いてマウントした。

7) 組織染色

腎臓は 15% ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。3 μ m のパラフィン切片に hematoxylin-eosin (HE) 染色、および periodic acid-Schiff (PAS) 染色を行った。

8) 生化学のパラメータの測定

血液サンプルは 5,000 rpm 10 分間遠心し血漿を採取した。Plasma creatinine (PCr) 濃度は自動分析器 (SRL, 東京) で測定した。

9) 統計

データは平均値 \pm 標準誤差で示した。統計的分析は群間の変化に unpaired t-test を用いた。p 値 < 0.05 を統計学的に有意とした。

結 果

PCr は IRI 群において有意に上昇した (1 日目: IRI 群 2.19 ± 1.03 mg/dl vs sham 群 0.21 ± 0.025 mg/dl, $p < 0.001$)。PCr は時間の経過とともに改善したが、IRI 群では 10 日目にも正常範囲には至らなかった (10 日目: IRI 群 0.27 ± 0.017 mg/dl vs sham 群 0.20 ± 0.045 mg/dl, $p < 0.01$) (図 1)。Sham 群の PCr は control 群と差は認めなかった。

Klotho mRNA 発現は IRI 群において著しく減少した (1 日目: IRI 群 0.16 ± 0.083 vs sham 群 0.90 ± 0.18 , $p < 0.001$)。経時的に改善がみられたが、IRI 群 10 日目でも klotho mRNA 発現量は回復しなかった (10 日目: IRI 群 0.75 ± 0.21 vs sham 群 1.15 ± 0.23 , $p < 0.005$)。Sham 群の klotho mRNA 発現量は control 群と同程度であった (図 2)。

典型的な klotho 蛋白の Western blotting を図 3 a に、数値化したものを図 3 b に示した。IRI 群 1 日目には klotho 蛋白の発現量は有意に低下し (1 日目: IRI 群 0.23 ± 0.12 vs sham 群 0.78 ± 0.19 , $p < 0.005$)、10 日目には改善傾向を示した (10 日目: IRI 群 0.76 ± 0.12 vs sham 群 0.93 ± 0.096 , $p = 0.07$, 有意差なし)。

Klotho の腎臓内での局在は、control 群でのパラフィン免疫組織染色 (図 4 a) に示すように皮質遠位尿細管とともに、髓質部でも尿細管に染色が認めら

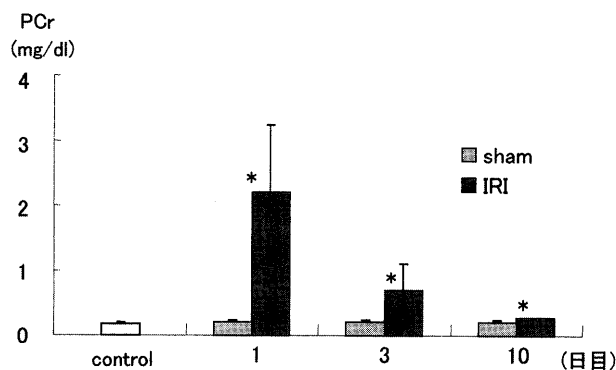


図 1 血漿 creatinine 濃度の変化
PCr は IRI 群において有意に上昇した。PCr : plasma creatinine, mean \pm SE, * : $p < 0.01$ vs sham.

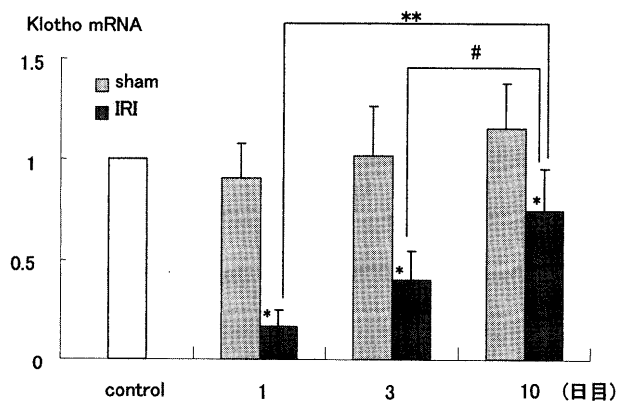


図 2 腎臓 klotho mRNA 発現量の相対的变化
腎臓の klotho mRNA 発現は有意に IRI 群で減少した。Control 群を 1 とした相対値で表示, mean \pm SE. # : $p < 0.05$, IRI 群 3 日目 vs 10 日目, ** : $p < 0.01$, IRI 群 1 日目 vs 10 日目, * : $p < 0.01$, IRI 群 vs sham 群。

れた。糸球体、近位尿細管などの他部位は染色されなかった。凍結免疫組織染色 (図 4 b) でも sham 群において klotho 蛋白が皮質遠位尿細管・髓質尿細管に発現することが示された。

IRI による組織学および klotho 染色の変化を図 4 b に示した。組織障害は、腎皮質尿細管の brush border の消失、基底膜からの上皮細胞の脱落、尿細管閉塞、尿細管拡張が HE 染色において認められた。Sham 群は組織学的異常を示さず、また、IRI 群における髓質尿細管は尿細管腔に円柱を伴っていたが尿細管上皮細胞に大きな障害は認めなかった。PAS 染色では、IRI 群と sham 群ともに糸球体障害は認められなかった。Klotho の染色は、IRI 群 1 日目では本来の染色性が皮質、髓質部ともに低下しており、IRI 群 10 日目では染色性はほぼ回復していた。

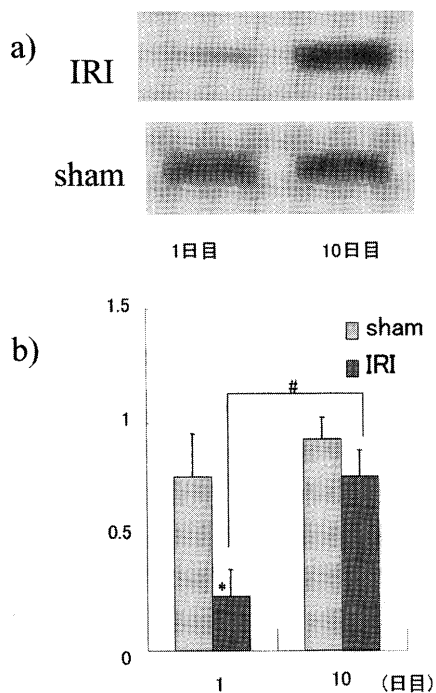


図3 腎臓 klotho 蛋白発現量の相対的变化

a: 代表的な Western blotting, b: klotho 蛋白発現の半定量.

Klotho 蛋白質発現は 1 日目 IRI 群において有意に減少した. mean \pm SE, *: $p < 0.01$, IRI 群 vs sham 群, #: $p < 0.05$, IRI 群 1 日目 vs 10 日目.

IRI における klotho 蛋白発現とアポトーシスの関係を図 4c に示した. IRI 群 1 日目の腎組織では多くの TUNEL 陽性細胞が認められたが, 検出可能な klotho 陽性細胞は認められなかった (データ未発表). IRI 群 3 日目の腎臓組織では klotho 陽性細胞の数は少数であるが存在し, さらに klotho 陽性の腎尿管に TUNEL 陽性細胞が認められ, 両者の共染色が確認された.

考 察

Insertional mutation によりマウスで見出された klotho 遺伝子は, その表現型が老化の所見に酷似することから, 老化関連遺伝子として着目された. 特に高度に腎臓に発現すること, また, ヒト腎不全患者の腎での発現が著明に抑制されていることから, 腎不全時に臨床上経験する合併症の要因をなす可能性が推測されている. しかしながら, その生物学的活性, 生理的意義, 調節機序など不明な点が多い.

今まで, 腎臓における klotho mRNA の発現低下は, 自然発症高血圧ラット, deoxy corticosterone acetate-salt 高血圧ラット, angiotensin II 負荷ラットのような高血圧動物モデルにおいて報告さ

れ⁵⁾¹⁵⁾¹⁶⁾, また, 実験的糖尿病¹⁷⁾, 慢性腎不全⁶⁾のような血圧以外のストレスや疾患でも, klotho mRNA, 蛋白が減少することが報告されている. さらに, このような持続的ストレス下での klotho 発現低下に加えて, lipopolysaccharids 投与のような急性ストレスによっても klotho 発現量に変化することが報告されている⁴⁾. そこで我々は, 典型的な腎臓のストレスモデルである腎虚血再灌流 (IRI) モデルを用いて, klotho の発現とその役割を検討した.

腎には, klotho mRNA が高度に発現することが当初より指摘されており, 腎組織では皮質尿管に局在することが報告されている¹⁴⁾. 今回の検討では, 免疫組織染色で髓質尿管にも klotho の発現を認め, 遠位系の尿管を中心とした局在が推測された (図 4a).

さらにその klotho の発現は mRNA レベルおよび蛋白量レベルにおいて, IRI により著明な抑制を受けることが明らかになった. IRI における腎機能障害の進行に関連するメカニズムには, inflammatory process, 接着分子の発現^{18)~21)}, reactive oxygen species (ROS) や nitric oxide (NO) の産生が重要な役割を果たすと考えられている^{22)~30)}. 今回の結果では, 尿管上皮細胞の klotho の発現は, IRI で減少し, 時間経過とともに徐々に回復することより, これらのストレスが klotho 発現量減少に関与していると考えられる.

血管系においては, klotho が, 抗ストレス作用, 組織保護作用を有する可能性を示唆した報告がある¹⁷⁾³¹⁾が, このストレス下での klotho 発現の動態が如何なる意義を持つかは不明である. また, アポトーシスは酸化ストレス時の病態に, 指標としても大きく関与する³²⁾. Klotho 染色と TUNEL 染色が同一細胞に局在することは, klotho 蛋白がアポトーシス細胞発現の調節に関与している可能性のあることを示している. 更には, klotho はアポトーシスを生じる前段階から陽性となり, ある細胞はアポトーシスへの進行が抑制され, ある細胞はアポトーシスへと進行するため, すべての klotho 陽性細胞にアポトーシスが現われていないと考えられる.

今回の検討では, 両染色が共染する点のみで, 実際の作用, 意義については明らかでない. 正常状態で klotho が発現している遠位系の尿管は IRI による障害が軽度で, klotho が発現していない近位系の尿管は IRI による障害が重篤であることは, klotho が虚血再灌流障害に防御的に作用している

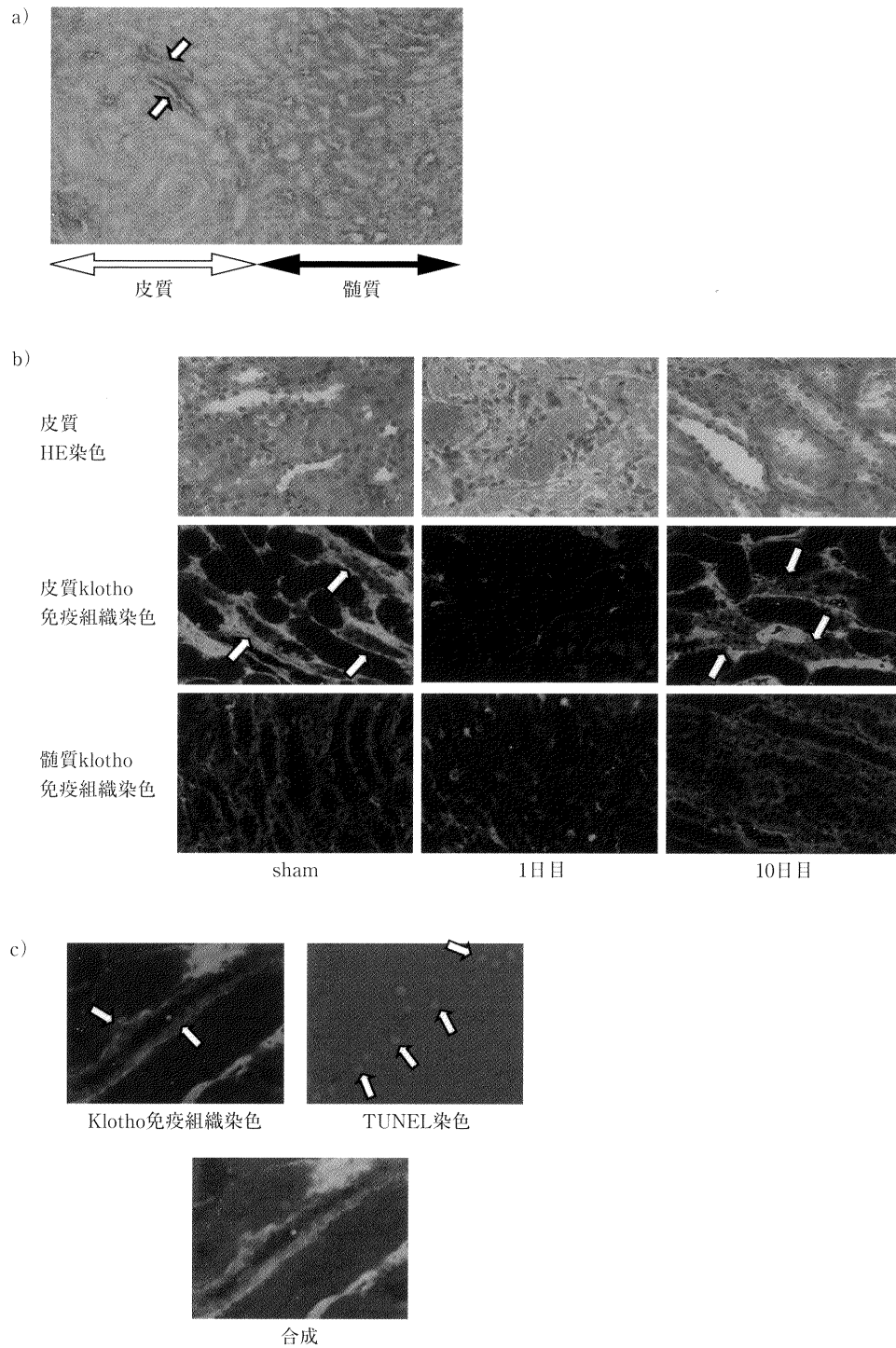


図4 a: 腎尿管における代表的な klotho パラフィン免疫組織染色 (control 群)。皮質における遠位尿管と髄質尿管に陽性となっている。矢印は皮質 klotho 陽性細胞。髄質は尿管全体に染色されている。

b: 腎 HE 染色および klotho 凍結免疫組織染色。皮質 HE 染色では IRI 群 1 日目に尿管 brush border の消失, 基底膜からの上皮細胞の脱落, 尿管閉塞, 尿管拡張が認められる。皮質 klotho 免疫組織染色では IRI 群 1 日目に klotho 染色性が低下し 10 日目に改善している。髄質 klotho 免疫組織染色では sham 群で尿管全体に淡く染色され, IRI 群 1 日目に klotho 染色性が低下し 10 日目に改善している。

c: IRI 群 3 日目の腎皮質尿管における klotho と TUNEL との二重免疫組織染色。klotho と TUNEL は同一部位で陽性細胞を認める傾向があった。矢印は klotho 陽性細胞もしくは TUNEL 陽性細胞。

可能性を示唆していると考えられる。

Klotho ノックアウトマウスの中樞、海馬においては、抗酸化酵素の活性が増加し、TUNEL 陽性細胞が多く認められ、さらに酸化防止剤である α -tocopherol の投与によってアポトーシス細胞が減少したことが報告されている³²⁾。これらの結果は、酸化的ストレスが klotho 変異マウスの老化兆候を示す表現型に関与し、そして、klotho 蛋白が抗酸化作用の調整に関連していることを示唆している。

もう一点、klotho の作用については、前述したように、mRNA のプロセシングの段階でスプライシングを受け、分泌型蛋白が存在し、液性因子として作用を発揮していることが推測されている²⁾³⁾¹⁵⁾。腎での IRI では本来、近位尿細管細胞に主に障害が生じることはよく知られている²⁷⁾。このため、免疫組織染色によって確認された遠位尿細管、髄質尿細管に発現した klotho 蛋白が paracrine として作用し、klotho の抗酸化作用が、IRI 時の、近位尿細管の細胞障害、アポトーシスに対しても影響を与える可能性が示唆される。

従来報告では、klotho 蛋白の生物学的活性について触れたものは少ない。血管への作用については、ノックアウトマウスでは、血管内皮細胞の NO 産生障害などの機能障害を伴うことが報告されている³¹⁾。また、骨代謝を含むカルシウム、リンなどの調節に関わる可能性も指摘されている³³⁾³⁴⁾。こうした特長はノックアウトマウスでの老化という表現型の多様性を説明するものであるかもしれない。そして、本研究で示された、老化現象の病態の一端である酸化ストレスでの作用は、klotho 蛋白の一つの基本的な生理作用である可能性がある。

結 論

腎虚血再灌流障害で、皮質・髄質尿細管の klotho mRNA、蛋白発現が減少することを示した。さらに、アポトーシス細胞と klotho 蛋白に関連が認められる可能性が示唆された。

本研究にご協力をいただいた坪井真由子研究員、寺岡敦子研究員に深謝いたします。

文 献

- 1) Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H et al: Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling aging. *Nature* **390**: 45-51, 1997
- 2) Shiraki-Iida T, Aizawa H, Matsumura Y: Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein.

- FEBS Lett **424**: 6-10, 1998
- 3) Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T et al: Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun* **232**: 626-630, 1998
- 4) Ohyama Y, Kurabayashi M, Matsuda H et al: Molecular cloning of rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. *Biochem Biophys Res Commun* **251**: 920-925, 1998
- 5) Aizawa H, Saito Y, Nakamura T et al: Down-regulation of the klotho gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats. *Biochem Biophys Res Commun* **249**: 865-871, 1998
- 6) Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S et al: Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochem Biophys Res Commun* **280**: 1015-1020, 2001
- 7) Noiri E, Nakao A, Uchida K et al: Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**: F 948-F 957, 2001
- 8) Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Thiemermann C: Inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase protect rat proximal tubular cells against oxidant stress. *Kidney Int* **56**: 973-984, 1999
- 9) Lloberas N, Torras J, Herrero-fresneda I et al: Postischemic renal oxidative stress induces inflammatory response through PAF and oxidized phospholipids. Prevention by antioxidant treatment. *FASEB J* **16**: 908-910, 2002
- 10) Okusa MD: The inflammatory cascade in acute ischemic renal failure. *Nephron* **90**: 133-138, 2002
- 11) Shumer M, Colombel MC, Sawczuk IS et al: Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol* **140**: 831-838, 1992
- 12) Padanilam BJ: Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**: F 608-F627, 2003
- 13) Yoshida T, Kurella M, Beato F et al: Monitoring changes in gene expression in renal ischemia-reperfusion in the rat. *Kidney Int* **61**: 1646-1654, 2002
- 14) Kato Y, Arakawa E, Kinoshita S et al: Establishment of the anti-klotho monoclonal antibodies and detection of klotho protein in kidneys. *Biochem Biophys Res Commun* **267**: 597-602, 2001
- 15) Mitani H, Ishizuka N, Aizawa T et al: In vivo klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension* **39**: 838-843, 2002
- 16) Saito K, Ishizaka N, Nitani H et al: Iron chelation and a free radical scavenger suppress angiotensin II-induced downregulation of klotho, an anti-aging gene, in rat. *FEBS Lett* **551**: 58-62, 2003
- 17) Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y et al: In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Bio-*

- chem Biophys Res Commun **267**: 767–772, 2000
- 18) **Rabb H, O'meara YM, Maderna P et al**: Leukocytes, cell adhesion molecules and ischemic acute renal failure. *Kidney Int* **51**: 1463–1468, 1997
 - 19) **Miltoris BA, Marrs J**: The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure. *Am J Med* **106**: 582–592, 1999
 - 20) **Lauriat S, Linas SL**: The role of neutrophils in acute renal failure. *Semin Nephrol* **18**: 498–504, 1998
 - 21) **Bonventre JV**: Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* **14**: S55–S61, 2003
 - 22) **Yu BP**: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* **74**: 139–162, 1994
 - 23) **Nath KA, Norby SM**: Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med* **109**: 655–678, 2000
 - 24) **Yu L, Gengaro PE, Niederberger M et al**: Nitric oxide: A mediator in rat tubular hypoxia/reoxygenation injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1691–1695, 1994
 - 25) **Peresleni T, Noiri E, Bahou WF**: Antisense oligodeoxynucleotides to inducible NO synthase rescue epithelial cells from oxidative stress injury. *Am J Physiol* **270**: F971–F977, 1996
 - 26) **Ling H, Edelstein C, Gengaro P et al**: Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Am J Physiol* **277**: F383–F390, 1999
 - 27) **Chien CT, Lee PH, Chen CF et al**: De novo demon-
stration and co-localization of free-radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol* **12**: 973–982, 2001
 - 28) **Saikumar P, Venkatachalam MA**: Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. *Semin Nephrol* **23**: 511–521, 2003
 - 29) **Bonegio R, Lieberthal W**: Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **11**: 301–308, 2002
 - 30) **Mari JF, Davis R, Safirstein RL**: Activation determines renal epithelial cell survival during oxidative injury. *Am J Physiol* **277**: 195–203, 1999
 - 31) **Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T et al**: Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 324–329, 1998
 - 32) **Nagai T, Yamada K, Hyoung-Chun Kim et al**: Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. *FASEB J* **17**: 50–52, 2002
 - 33) **Kawaguchi H, Manabe N, Miyaura C et al**: Independent impairment of osteoclast differentiation in klotho mouse exhibiting low-turnover osteopenia. *J Clin Invest* **104**: 229–237, 1999
 - 34) **Yoshida T, Fujimori T, Nabeshima Y**: Mediation of unusually high concentrations of 1, 25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1 alpha-hydroxylase gene. *Endocrinology* **143**: 683–689, 2002