

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

老化疾患における Klotho の意義の解明と臨床応用に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鍋島陽一

平成14年（2002年）3月

## 目次

### I. 総括研究報告

老化疾患における Klotho の意義の解明と臨床応用に関する研究	1
鍋島陽一	

### II. 分担研究報告

1. Klotho の機能解析、測定系の開発・供給、結合・修飾分子の解析に関する研究	5
鍋島陽一	
2. Klotho の心血管疾患における意義、遺伝子多型解析	9
永井良三	
3. モデル動物、in vitro 系を用いた分泌型 Klotho の解析、肺疾患の解析	10
倉林正彦	
4. Klotho の骨疾患における意義、遺伝子多型解析	11
川口 浩	

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

老化疾患におけるKlothoの意義の解明とその臨床応用に関する研究

主任研究者 鍋島陽一 京都大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

本研究では（１）血清中に存在する130KdのKlotho蛋白を測定するシステムのキット化とKlotho蛋白の濃度測定による診断システムの開発、（２）130Kdの血清中のKlotho蛋白の蛋白医薬としての可能性の検討、および（３）Klotho蛋白が結合あるいは修飾する生体内分子の同定と医薬品開発への発展、（４）ヒトklotho遺伝子多型（SNP's）と老化関連疾患との連鎖解析（５）多彩な老化症状はカルシウム・電解質代謝など生体の恒常性維持機構の破綻によってもたらされており、その分子病態の詳細な解析、の5つを目的と研究を行い、以下の結果を得た。

（１）ヒトklotho遺伝子座のSNPs解析により日本人閉経後女性においては、promoter領域（-395G→A）およびexon4（1818C→T）がBMDと有意な相関を示し、英国人においては、加齢とともにその相関は強くなり、65歳以上の高齢群では、1818C→T SNP（ $p=0.010$ ）と-395 G→A SNPにおいてもBMDとの間に有意な相関が認められた（ $p=0.001$ ）。また、G-395Aは核蛋白との結合を著明に低下させることが明らかとなった。よってklotho遺伝子産物が、老化に伴う骨粗鬆化に関与している可能性が示された。

（２）循環器疾患におけるklothoの意義の解明を進め、klothoが下肢虚血における血流回復ならびに血管新生能に関与すること、klothoがアンジオテンシンによる腎障害に対して保護的に作用すること、さらにklothoが一酸化窒素の細胞内分子シグナル経路を介して作用すること等を明らかにした。klotho因子は、腎・血管細胞の寿命決定や生理機能を調節する因子であり、ホメオスタシスに寄与すると考えられるため、klotho遺伝子ならびにその蛋白の投与は、血管障害や個体老化の防止に有用であると考えられる。

（３）Klotho遺伝子による血管保護作用の分子機構の解明と新しい遺伝子治療への応用を検討した。肥満、高血圧、糖尿病を合わせ持つOLETFラットに対して、マウス全長型Klothoを発現する組換えアデノウイルスベクターを週1回3週間筋注投与し、アセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応、一酸化窒素NO産生（尿中NO代謝産物NOx）および血管リモデリング（大動脈の中膜肥厚と冠動脈周囲の繊維化）が改善するか否かを検討し、Klotho遺伝子は、血管内皮細胞におけるNO産生を高めることにより、血管保護効果を示すことを明らかにした。

（４）分泌蛋白を高感度に認識できる新たな抗体の分離に成功し、サンドイッチエライザー系を構築した。血清より130kdの細胞外ドメイン全体を含む分泌型Klothoの同定に成功した。分泌型Klothoを発現するトランスジェニックマウスを作成し、掛け合わせにより、レスキュー活性を解析中である。Klotho蛋白と共沈する5個の結合蛋白を同定した。これらの蛋白はKlotho変異マウスからは分離されず、TOF-MAS解析によりその分子構造を決定している。また、Klotho蛋白の糖鎖切断活性を測定した結果、酵素活性があることを強く示唆する結果が得られた。Klotho変異マウスでは活性型ビタミンD合成の律速酵素である $1\alpha$ -hydroxylaseの発現が顕著に亢進しており、結果として血清の活性型ビタミンD濃度が上昇し、血清カルシウム、リンが上昇している。Klotho蛋白が $1\alpha$ -hydroxylase遺伝子の発現を負に制御するシグナル回路の新たな構成要素であることが明らかとなった。更に、klotho変異マウスでは $\mu$ Calpainの顕著な活性化と引き続く細胞崩壊が起こることが明らかとなった。

分担研究者氏名・所属機関・職名

永井良三 東京大学医学研究科・教授  
倉林正彦 群馬大学医学部 教授  
川口 浩 東京大学医学研究科・講師

A. 研究目的

本研究では（１）血清中に存在する130KdのKlotho蛋白を測定するシステムのキット化とKlotho蛋白の濃度測定による診断システムの開発、

（２）130Kdの血清中のKlotho蛋白の蛋白医薬としての可能性の検討、および（３）Klotho蛋白が結合あるいは修飾する生体内分子の同定と医薬品開発への発展、（４）ヒトklotho遺伝子多型（SNP's）と老化関連疾患との連鎖解析（５）多彩な老化症状はカルシウム・電解質代謝など生体の恒常性維持機構の破綻によってもたらされており、その分子病態の詳細な解析、の5つを目的と研究を行い、以下の結果を得た。

B. 研究方法

（１）血清Klotho蛋白の濃度測定による診断システムの開発

分泌蛋白を高感度に認識できる新たな抗体の分離に成功し、サンドイッチエライザー系を構築した。血清より130kdの細胞外ドメイン全体を含む分泌型Klothoの同定に成功しており、血清にはおおよそ数百ピコグラム/mlの分泌型Klotho蛋白が存在する。これらの抗体を用いて測定キットを完成させる。

（２）130Kdの血清中のKlotho蛋白の蛋白医薬としての可能性の検討

Klotho変位マウスに各種の方法（精製した蛋白の投与、分泌型を発現する細胞を入れたホロファイバーの皮下への埋め込み、分泌型のみを発現するTgマウスの掛け合わせなど）で分泌型Klotho蛋白を発現誘導させて、そのレスキュー活性により、分泌型蛋白の有効性の解析と投与法の検討を行う。

（３）Klotho蛋白が結合あるいは修飾する生体内分

## 子の同定と医薬品開発への発展

Klotho蛋白が結合あるいは修飾する生体内分子は重要な医薬品の候補であり、新たな創薬ターゲットとなる可能性が高い。Hzビーズに抗Klotho抗体を共有結合させることによって、効率よくKlotho蛋白を分離する方法を確立しており、本ビーズによりKlotho蛋白共沈分子を電気泳動で分離し、TOF-MAS解析により候補分子を同定し、その分子の構造、機能解析へと進む。

Klotho蛋白に酵素活性があることを強く示唆する結果が得られており、最も有効な基質、至適反応条件の検討を行うと共に、生体内基質の同定を試みる。これまでに、各種の機能ドメインに変異を導入した遺伝子を構築しており、一方では活性に必要な構造、機能ドメインを解析し、他方では活性はないが、ターゲット分子との結合が可能な変位Klotho蛋白を同定する。

## (4) ヒトklotho遺伝子多型 (SNP's) と老化関連疾患との連鎖解析

ヒトklotho遺伝子の解析により、日本人においては6カ所、英国人においては8カ所のSNPsが同定され、そのうちの3カ所(プロモーター領域の1カ所、exon 4の2カ所)は共通であった。本研究では、この3カ所のSNPsと、動脈硬化症、骨粗鬆症、変形性脊椎症、脊柱靭帯骨化症、肺気腫、糖尿病、腎不全との相関をcase-control association studyによってのみならず、internal association study (個々の疾患の中でのSNPsと重症度との関係)についても解析し、疾患の発症・進展に直接関与しているSNPsの特定を目指す。また、両人種に共通に同定されたプロモーター領域の遺伝子多型を示す配列には転写因子の結合が示唆されており、多型により結合能に差異が生じることから、変異による転写制御の変化の有無について検討する。また、プロモーター領域の遺伝子多型と血清Klotho蛋白量との相関について解析する。

## (5) 生体恒常性の維持におけるKlothoの役割について

Klotho遺伝子欠損マウスではカルシウムホメオスタシスを制御するシステムに異常を見いだしている。そこで、一連のカルシウム代謝関連遺伝子の発現と機能の変化を中心に解析し、どのシグナル伝達カスケードのどの分子の機能にKlotho蛋白が作用しているかを解析し、分子病態解明の基盤とする。

## (6) 循環器疾患、腎疾患におけるKlothoの意義について

klothoの腎保護作用を検討するために、アンジオテンシンを負荷した動物モデルにklothoのアデノウイルスを投与し、腎保護作用を腎機能検査及び病理組織検査にて検討した。また、klothoは血管内皮機能の保持を通して血管保護に寄与するが、血管新生への寄与について検討するために、ヘテロマウスの下肢虚血モデルを作製し、経時的に血流の回復をレーザードップラー血流測定ならびに病理組織学手法を用いて検討した。さらにklothoの細胞内シグナルについて検討するために、klothoを発現する仙台ウイルスを構築し、これを細胞に投与後、各種細胞シグナルの活性について検討した。

## 倫理面への配慮

申請者らはそれぞれ、各大学の組み替えDNA実験規定、動物実験指針、ヒトサンプルの解析に関する倫理委員会の承認のもとに研究を行っており、さらにインフォームドコンセントに基づいて得られたヒトサンプルのみを解析に供しているが、今後も倫理規定を遵守して研究を行う。

## C. 研究結果

### (1) 血清Klotho蛋白の濃度測定による診断システムの開発

分泌蛋白を高感度に認識できる新たな抗体の分離に成功し、サンドイッチエライザー系を構築した。血清より130kdの細胞外ドメイン全体を含む分泌型Klothoの同定に成功しており、血清にはおおよそ数100ピコグラム/mlの分泌型Klotho蛋白が存在することを確認した。

### (2) 130Kdの血清中のKlotho蛋白の蛋白医薬としての可能性の検討

130kdの細胞外ドメイン全体を含む分泌型Klotho蛋白を発現するトランスジェニックマウスを作成し、掛け合わせにより、レスキュー活性を解析中である。、各種の病態モデルにおいて、Klothoを発現するアデノウイルスの投与が病態を改善することが確認され、Klothoの蛋白医薬、遺伝子医薬としての可能性が示唆された。

### (3) Klotho蛋白が結合あるいは修飾する生体内分子の同定と医薬品開発への発展

Klotho蛋白との共沈分子を電気泳動で分離したところ、5個の蛋白が同定された。これらの蛋白はKlotho変異マウスからは分離されず、結合していることは明らかである。TOF-MAS解析によりその分子構造を決定している。また、Klotho蛋白の糖鎖切断活性を測定した結果、酵素活性があることを強く示唆する結果が得られた。酵素活性に必須である機能ドメインに変異を導入した遺伝子を構築し、トランスジェニックマウスの作成を試みている。

### (4) ヒトklotho遺伝子多型 (SNP's) と老化関連疾患との連鎖解析

ヒトklotho遺伝子座のSNPs解析により日本人閉経後女性においては、promoter領域(-395G→A)およびexon4 (1818C→T)がBMDと有意な相関を示し、英国人においては、加齢とともにその相関は強くなり、65歳以上の高齢群では、1818C→T SNP (p=0.010)と-395 G→A SNPにおいてもBMDとの間に有意な相関が認められた (p=0.001)。また、G-395Aは核蛋白との結合を著明に低下させることが明らかとなった。よってklotho遺伝子産物が、老化に伴う骨粗鬆化に関与している可能性が示された。

### (5) カルシウムホメオスタシスにおけるKlothoの役割について

活性型ビタミンD合成の律速酵素である1 $\alpha$ -hydroxylaseの発現が顕著に亢進しており、結果として血清の活性型ビタミンD濃度が上昇し、血清カルシウム、リンが上昇している。1 $\alpha$ -hydroxylase遺伝子はPTH、CTによって正に制御されており、ビタミンDによって負に制御されていると考えられてきたが、Klotho蛋白が1 $\alpha$ -hydroxylase遺伝子の発現を負に制御するシグナル回路の新たな構成要素であることが明らかとなった。更に、klotho変異マウスではmCalpainの顕著な活性化と引き続き細胞崩壊が起こることが明らかとなった。

### (6) 循環器疾患、腎疾患におけるKlothoの役割について

アンジオテンシン負荷マウスでは、腎臓におけるklothoの発現は低下しており、同負荷マウスにklothoのアデノウイルスを投与すると、アンジオテンシン負荷による腎障害(蛋白尿、GFR低下、病理)が改善した。

klothoヘテロマウスに下肢虚血モデルを作製した結果、klothoヘテロマウスは野生型のコントロールに比し、血管新生能が低下していた。また、klothoヘテロマウスでは血管新生を示すCD31陽性の毛細血管も少なく、klothoマウスでは血管新生が低

下していた。

klothoの細胞内シグナルについて検討するために、klothoを発現する仙台ウイルスを構築し、これを血管内皮細胞に投与した。各種細胞シグナルの活性について検討した結果、内皮型一酸化窒素合成酵素eNOSのリン酸化（活性化）を認めた。

Klotho遺伝子による血管保護作用の分子機構の解明と新しい遺伝子治療への応用を検討した。肥満、高血圧、糖尿病を合わせ持つOLETFラットに対して、マウス全長型Klothoを発現する組換えアデノウイルスベクターを週1回3週間筋注投与し、アセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応、一酸化窒素NO産生（尿中NO代謝産物NOx）および血管リモデリング（大動脈の中膜肥厚と冠動脈周囲の繊維化）が改善するかどうかを検討し、Klotho遺伝子は、血管内皮細胞におけるNO産生を高めることにより、血管保護効果を示すことを明らかにした。

#### D. 考察

血清Klotho蛋白の測定系の開発を進めており、加齢に伴う減少や個体差を示唆するデータを得つつあるが、測定感度の向上、安定性など、キット化のための検討を進めることが重要である。各種の変異を導入したKlotho蛋白を発現するTgマウス、アデノウイルスを構築し、機能と構造の相関を解析することによって蛋白、遺伝子医薬の開発の基礎データを与えることが重要である。ビタミンDの合成制御は健康の維持にとって極めて重要なシステムであり、その分子機構解明を目的として、1 $\alpha$ -hydroxylase遺伝子の転写制御因子の解析、1 $\alpha$ -hydroxylase遺伝子の発現制御に関わるシグナル伝達経路の解析、Klotho蛋白が結合、あるいは修飾する分子の解析へと発展させることが重要である。mCalpainの活性化を引き起こす要因を解析すること、また、mCalpainの阻害剤が変異症状の改善に寄与するかどうかを解析し、新たな治療薬開発のターゲットとしての意義を確認することが次の課題である。

Klotho因子は液性因子であり、一酸化窒素のパスウェイを介した内皮機能の調節することを今までの検討で示した。今回、klothoは血管新生に関与し、アンジオテンシン負荷による腎障害を拮抗する作用を有することを明らかにした。また、血管新生能に寄与することを明らかにした。さらに、klothoの細胞内シグナルを明らかにした。klotho因子は、腎・血管細胞の寿命決定や生理機能を調節する因子であり、腎・血管のホメオスタシスに寄与すると考えられる。ここにeNOSのリン酸化を通じた活性化のパスウェイが存在すると考えられる。klotho遺伝子ならびにその蛋白の投与は、血管障害や個体老化の防止に有用であると考えられる。

今回の検討で、klothoマイクロサテライト多型が関与している年齢層が骨粗鬆症と変形性腰椎症で異なっていた。変形性腰椎症との相関が若年群で見られたのは、変形性腰椎症の発症・進展において重要な環境因子である慢性的・持続的な力学的負荷の蓄積の影響が若年群ではまだ少ないためと考えられる。

また、高齢者女性における骨量は大きく3つの要素によって決定される。壮年期における最大骨量（peak bone mass）、閉経直後のエストロゲン欠乏による急速な骨粗鬆化、そしてその後の加齢に伴う緩やかな骨粗鬆化である。骨密度との相関がマイクロサテライト多型においてもSNPsにおいても、高齢群で強くなった事実は、klotho遺伝子が主として3番目の加齢に伴う緩やかな骨粗鬆化を制御している可能性を示唆するものと言える。

#### E. 結論

分泌蛋白を高感度に認識できる新たな抗体の分離に成功し、サンドイッチエライザー系を構築した。血清より130kdの細胞外ドメイン全体を含む分泌型Klothoの同定に成功した。分泌型Klothoを発現するトランスジェニックマウスを作成し、掛け合わせにより、レスキュー活性を解析中である。Klotho蛋白と共沈する5個の結合蛋白を同定した。これらの蛋白はKlotho変異マウスからは分離されず、TOF-MAS解析によりその分子構造を決定している。また、Klotho蛋白の糖鎖切断活性を測定した結果、酵素活性があることを強く示唆する結果が得られた。Klotho変異マウスでは活性型ビタミンD合成の律速酵素である1 $\alpha$ -hydroxylaseの発現が顕著に亢進しており、結果として血清の活性型ビタミンD濃度が上昇し、血清カルシウム、リンが上昇している。Klotho蛋白が1 $\alpha$ -hydroxylase遺伝子の発現を負に制御するシグナル回路の新たな構成要素であることが明らかとなった。更に、klotho変異マウスではmCalpainの顕著な活性化と引き続く細胞崩壊が起こることが明らかとなった。

心血管系は種々の環境要因により血管は種々の環境要因の影響により、変性をきたすことが病態の発症・進展と深く関わる。老化はその中でも遺伝的・環境的な要因療法を併せ持つことを特徴とする。klothoはヒトの環境要因への対応（環境負荷、ストレス等）に関わると考えられる。klothoの作用機序を明らかにすることで、klothoを用いた新しい心血管系の保護治療が可能になると考えられる。

ヒトklotho遺伝子は骨粗鬆症や変形性腰椎症などの骨軟骨疾患に関与している可能性が示された。特に人種差を超えて加齢に伴う骨密度の減少に直接関与していると考えられる。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表 1. 論文発表

- 1) Yamashita T., Sekiya I., Kawaguchi N., Nabeshima Y., Noda M.  
klotho-deficient mice are resistant to bone loss induced by unloading due to sciatic neurectomy. *J. Endocrinology* 168 (2) 347-351, (2001)
- 2) Uchida A., Komiya Y., Tashiro T., Yorifuji H., Kishimoto T., Nabeshima Y., Hisanaga S.  
Neurofilaments of Klotho, the mutant mouse prematurely displaying symptoms resembling human aging. *J. Neurosci. Res.* 64, 364-370 (2001)
- 3) Noriyo Manabe, Hiroshi Kawaguchi, Hirotaka Chikuda, Chisato Miyaura, Masanori Inada, Ryoza Nagai, Yo-ichi Nabeshima, Kozo Nakamura, Angus M Sinclair, Richard H Scheuermann, and Makoto Kuro-o  
Connection between B-lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J. Immunol* 167, 2625-2631 (2001)

- 4) Morishita K., Shirai A., Kubota M., Katakura Y., Nabeshima Y., Takeshige K., Kamiya T. The progression of aging in klotho mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc. *J. Nutrition* 131, 3182-3188 (2001)
- 5) Yoshida T., Fujimori T., Nabeshima Y. Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1 $\alpha$ -hydroxylase gene. *Endocrinology* 143, 683-689 (2002)
- 6) Mitani H, et al. Angiotensin II downregulates renal expression of anti-aging gene, klotho, and klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension* in press.
- 7) Yamagishi T, et al. Troglitazone improves endothelial function and augments renal klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats with multiple atherogenic risk factors. *Hypertens Res.* 2001 24:705-9.

## 2. 学会発表

Nabeshima Y.  
**Biological importance of klotho gene related aging associated disorders**  
 International Congress of Developmental Biology Symposium July 10th, 2001 Kyoto  
 Nabeshima Y.  
 Our life, how to begin, how to close  
 Symposium on stem cell biology, Japan-England exchange program of science  
 Cambridge Dec. 2nd 200  
 Noriyo Manabe, Hiroshi Kawaguchi, Hirotaka Chikuda, Chisato Miyaura, Masaki Inada, Kozo Nakamura, and Makoto Kuro-o: Connection between B-lymphocyte and osteoclast differentiation pathway. 22nd annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2000. 9.22 - 9.26 (Toronto, Canada)  
 Ken-ichi Kawano, Naoshi Ogata, Takao Suzuki, Hideyo Yoshida, Takayuki Hosoi, Hajime Orimo, Satoshi Inoue, Mariko Koshizuka, Makoto Kuro-o, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi: Identification of coding region single-nucleotide polymorphisms (cSNPs) in the human klotho gene and their association with bone density in postmenopausal women. 22nd annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2000. 9.22 - 9.26 (Toronto, Canada).  
 Hiroshi Kawaguchi: Involutional osteoporosis:

New theory. 1st Scientific Meeting of the Asia-Pacific Menopause Federation. 2001. 5. 26-29 (Seoul, Korea).

Ken-ichi Kawano, Mathias Chiano, Naoshi Ogata, Motoyuki Uchida, Takayuki Hosoi, Hajime Orimo, Satoshi Inoue, Kozo Nakamura, Makoto Kuro-o, and Hiroshi Kawaguchi: Klotho promoter polymorphism associated with bone density of aged postmenopausal women in Caucasian and Japanese populations. 23rd annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2001. 10.12 - 16 (Phoenix, Arizona).

鍋島陽一

Klotho研究の新展開——生態恒常性の維持機構——  
 パーオキサイド研究会 8月25日、2001仙台  
 鍋島陽一

Klotho研究の新展開——生体恒常性の維持機構——  
 第43回基礎歯科医学会総会 特別講演 9月19日  
 2001 大宮

鍋島陽一

Klotho蛋白の機能解析——カルシウム・リンホメオスタシスの制御機構——  
 24回日本分子生物学会年会シンポジウム「老化の多面的機構」12月10日、  
 2001年、横浜

永井良三 第44回日本腎臓学会学術集会 教育講演  
 (1) 「klotho遺伝子と腎臓・血管機能」東京  
 2001. 5. 27

川口浩: Reverse & forward genetic analyses of the involvement of an aging-suppressor klotho gene in the etiology of skeletal disorders. 第5回脊椎と神経を語る会. 2001. 3. 17-18 (昭島市、東京).

川口浩: Forward & reverse geneticsからの骨軟骨疾患へのアプローチ. 第74回日本整形外科学会学術集会 (ランチョンセミナー). 2001. 4. 19-22 (幕張メッセ国際会議場、千葉).

穴水依人、小柳清光、川口浩、星地亜都司、鍋島陽一、中村耕三: rRNA genetranscription activity in cervical anterior horn cells of klotho mutant mice. 日本神経病理学会. 2001. 5. 24-26 (都市センターホテル、東京).

川野健一、緒方直史、Mathias Chiano、内田素行、細井孝之、鈴木隆雄、吉田英世、折茂肇、井上聡、中村耕三、川口浩: ヒトklotho遺伝子プロモーターの多型は閉経後女性の老化に伴う骨粗鬆化に関与する (優秀演題賞受賞). 第19回日本骨代謝学会. 2001. 8. 8-11 (名古屋国際会議場、名古屋).

川野健一、緒方直史、Mathias Chiano、内田素行、中村耕三、川口浩: ヒトklotho遺伝子プロモーターの多型は老化に伴う骨粗鬆化に関与する - 異なる人種でのSNPsによる解析 -. 第16回日本整形外科学会基礎学術集会. 2001. 10. 18-19 (広島国際会議場、広島).

H. 知的財産権の出願・登録状況  
 なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

Klothoの機能解析、測定系の開発・供給、結合、修飾分子の解析に関する研究

分担研究者 鍋島陽一 京都大学大学院医学研究科 教授

### 研究要旨

本研究では（１）血清中に存在する130KdのKlotho蛋白を測定するシステムのキット化とKlotho蛋白の濃度測定による診断システムの開発、（２）130Kdの血清中のKlotho蛋白の蛋白医薬としての可能性の検討、および（３）Klotho蛋白が結合あるいは修飾する生体内分子の同定と医薬品開発への発展、（４）多彩な老化症状はカルシウム・電解質代謝など生体の恒常性維持機構の破綻によってもたらされており、その分子病態の詳細な解析、の4つを目的と研究を行い、以下の結果を得た。

分泌蛋白を高感度に認識できる新たな抗体の分離に成功し、サンドイッチエライザー系を構築した。血清より130kdの細胞外ドメイン全体を含む分泌型Klothoの同定に成功した。分泌型Klothoを発現するトランスジェニックマウスを作成し、掛け合わせにより、レスキュー活性を解析中である。Klotho蛋白と共沈する5個の結合蛋白を同定した。これらの蛋白はKlotho変異マウスからは分離されず、TOF-MAS解析によりその分子構造を決定している。また、Klotho蛋白の糖鎖切断活性を測定した結果、酵素活性があることを強く示唆する結果が得られた。Klotho変異マウスでは活性型ビタミンD合成の律速酵素である $1\alpha$ -hydroxylaseの発現が顕著に亢進しており、結果として血清の活性型ビタミンD濃度が上昇し、血清カルシウム、リンが上昇している。Klotho蛋白が $1\alpha$ -hydroxylase遺伝子の発現を負に制御するシグナル回路の新たな構成要素であることが明らかとなった。更に、klotho変異マウスでは $\mu$ Calpainの顕著な活性化と引き続く細胞崩壊が起こることが明らかとなった。

### A. 研究目的

本研究では（１）血清中に存在する130KdのKlotho蛋白を測定するシステムのキット化とKlotho蛋白の濃度測定による診断システムの開発、（２）130Kdの血清中のKlotho蛋白の蛋白医薬としての可能性の検討、および（３）Klotho蛋白が結合あるいは修飾する生体内分子の同定と医薬品開発への発展、（４）多彩な老化症状はカルシウム・電解質代謝など生体の恒常性維持機構の破綻によってもたらされており、その分子病態の詳細な解析、の4つを目的としている。

### B. 研究方法

（１）血清Klotho蛋白の濃度測定による診断システムの開発

分泌蛋白を高感度に認識できる新たな抗体の分離に成功し、サンドイッチエライザー系を構築した。血清より130kdの細胞外ドメイン全体を含む分泌型Klothoの同定に成功しており、血清にはおおおよそ数百ピコグラム/mlの分泌型Klotho蛋白が存在する。これらの抗体を用いて測定キットを完成させる。

（２）130Kdの血清中のKlotho蛋白の蛋白医薬としての可能性の検討

Klotho変位マウスに各種の方法（精製した蛋白の投与、分泌型を発現する細胞を入れたホロファイバーの皮下への埋め込み、分泌型のみを発現するTgマウスの掛け合わせなど）で分泌型Klotho蛋白を発現誘導させて、そのレスキュー活性により、分泌型蛋白の有効性の解析と投与方法の検討を行う。

（３）Klotho蛋白が結合あるいは修飾する生体内分子の同定と医薬品開発への発展

Klotho蛋白が結合あるいは修飾する生体内分子は重要な医薬品の候補であり、新たな創薬ターゲットとなる可能性が高い。Hzビーズに抗Klotho抗体を共有結合させることによって、効率よくKlotho蛋白を分離する方法を確立しており、本ビーズによりKlotho蛋白共沈分子を電気泳動で分離し、TOF-MAS解析により候補分子を同定し、その分子の構造、機能解析へと進む。

Klotho蛋白に酵素活性があることを強く示唆する結果が得られており、最も有効な基質、至適反応条件の検討を行うと共に、生体内基質の同定を試みる。これまでに、各種の機能ドメインに変異を導入した遺伝子を構築しており、一方では活性に必要な構造、機能ドメインを解析し、他方では活性はないが、ターゲット分子との結合が可能な変位Klotho蛋白を同定する。

（４）生体恒常性の維持におけるKlothoの役割について

Klotho遺伝子欠損マウスではカルシウムホメオスタシスを制御するシステムに異常を見いだしている。そこで、一連のカルシウム代謝関連遺伝子の発現と機能の変化を中心に解析し、どのシグナル伝達カスケードのどの分子の機能にKlotho蛋白が作用しているかを解析し、分子病態解明の基盤とする。

倫理面への配慮

申請者らはそれぞれ、各大学の組み替えDNA実験規定、動物実験指針、ヒトサンプルの解析に関する倫理委員会の承認のもとに研究を行っており、さらにインフォームドコンセントに基づいて得られたヒトサンプルのみを解析に供しているが、今後も倫理規定を遵守して研究を行う。

## C. 研究結果

(1) 血清Klotho蛋白の濃度測定による診断システムの開発

分泌蛋白を高感度に認識できる新たな抗体の分離に成功し、サンドイッチエライザー系を構築した。血清より130kdの細胞外ドメイン全体を含む分泌型Klothoの同定に成功しており、血清にはおおよそ数100ピコグラム/mlの分泌型Klotho蛋白が存在することを確認した。

(2) 130Kdの血清中のKlotho蛋白の蛋白医薬としての可能性の検討

130kdの細胞外ドメイン全体を含む分泌型Klotho蛋白を発現するトランスジェニックマウスを作成し、掛け合わせにより、レスキュー活性を解析中である。各種の病態モデルにおいて、Klothoを発現するアデノウイルスの投与が病態を改善することが確認され、Klothoの蛋白医薬、遺伝子医薬としての可能性が示唆された。

(3) Klotho蛋白が結合あるいは修飾する生体内分子の同定と医薬品開発への発展

Klotho蛋白との共沈分子を電気泳動で分離したところ、5個の蛋白が同定された。これらの蛋白はKlotho変異マウスからは分離されず、結合していることは明らかである。TOF-MAS解析によりその分子構造を決定している。また、Klotho蛋白の糖鎖切断活性を測定した結果、酵素活性があることを強く示唆する結果が得られた。酵素活性に必須である機能ドメインに変異を導入した遺伝子を構築し、トランスジェニックマウスの作成を試みている。

(4) カルシウムホメオスタシスにおけるKlothoの役割について

活性型ビタミンD合成の律速酵素である1 $\alpha$ -hydroxylaseの発現が顕著に亢進しており、結果として血清の活性型ビタミンD濃度が上昇し、血清カルシウム、リンが上昇している。1 $\alpha$ -hydroxylase遺伝子はPTH、CTによって正に制御されており、ビタミンDによって負に制御されていると考えられてきたが、Klotho蛋白が1 $\alpha$ -hydroxylase遺伝子の発現を抑制するシグナル回路の新たな構成要素であることが明らかとなった。更に、klotho変異マウスでは $\mu$ Calpainの顕著な活性化と引き続く細胞崩壊が起こることが明らかとなった。

## D. 考察

血清Klotho蛋白の測定系の開発を進めており、加齢に伴う減少や個体差を示唆するデータを得つつあるが、測定感度の向上、安定性など、キット化のための検討を進めることが重要である。各種の変異を導入したKlotho蛋白を発現するTgマウス、アデノウイルスを構築し、機能と構造の相関を解析することによって蛋白、遺伝子医薬の開発の基礎データをえることが重要である。ビタミンDの合成制御は健康の維持にとって極めて重要なシステムであり、その分子機構解明を目的として、1 $\alpha$ -hydroxylase遺伝子の転写制御因子の解析、1 $\alpha$ -hydroxylase遺伝子の発現制御に関わるシグナル伝達経路の解析、Klotho蛋白が結合、あるいは修飾する分子の解析へと発展させることが重要である。 $\mu$ Calpainの活性化を引き起こす要因を解析すること、また、 $\mu$ Calpainの阻害剤が変異症状の改善に寄与するかどうかを解析し、新たな治療薬開発のターゲットとしての意義を確認することが次の課題である。

## E. 結論

分泌蛋白を高感度に認識できる新たな抗体の分離に成功し、サンドイッチエライザー系を構築した。血清より130kdの細胞外ドメイン全体を含む分泌型Klothoの同定に成功した。分泌型Klothoを発現するトランスジェニックマウスを作成し、掛け合わせにより、レスキュー活性を解析中である。Klotho蛋白と共沈する5個の結合蛋白を同定した。これらの蛋白はKlotho変異マウスからは分離されず、TOF-MAS解析によりその分子構造を決定している。また、Klotho蛋白の糖鎖切断活性を測定した結果、酵素活性があることを強く示唆する結果が得られた。Klotho変異マウスでは活性型ビタミンD合成の律速酵素である1 $\alpha$ -hydroxylaseの発現が顕著に亢進しており、結果として血清の活性型ビタミンD濃度が上昇し、血清カルシウム、リンが上昇している。Klotho蛋白が1 $\alpha$ -hydroxylase遺伝子の発現を負に制御するシグナル回路の新たな構成要素であることが明らかとなった。更に、klotho変異マウスでは $\mu$ Calpainの顕著な活性化と引き続く細胞崩壊が起こることが明らかとなった。

F. 健康危険情報  
なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamashita T., Sekiya I., Kawaguchi N., Nabeshima Y., Noda M.  
klotho-deficient mice are resistant to bone loss induced by unloading due to sciatic neurectomy. *J. Endocrinology* 168 (2) 347-351, (2001)
- 2) Uchida A., Komiya Y., Tashiro T., Yorifuji H., Kishimoto T., Nabeshima Y., Hisanaga S.  
Neurofilaments of Klotho, the mutant mouse prematurely displaying symptoms resembling human aging. *J. Neurosci. Res.* 64, 364-370 (2001)
- 3) Noriyo Manabe, Hiroshi Kawaguchi, Hirotaka Chikuda, Chisato Miyaura, Masanori Inada, Ryoza Nagai, Yo-ichi Nabeshima, Kozo Nakamura, Angus M Sinclair, Richard H Scheuermann, and Makoto Kuro-o  
Connection between B-lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J. Immunol* 167, 2625-2631 (2001)
- 4) Morishita K., Shirai A., Kubota M., Katakura Y., Nabeshima Y., Takeshige K., Kamiya T.  
The progression of aging in klotho mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc. *J. Nutrition* 131, 3182-3188 (2001)
- 5) Yoshida T., Fujimori T., Nabeshima Y.  
Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1 $\alpha$ -hydroxylase gene. *Endocrinology* 143, 683-689 (2002)



2. 学会発表

Nabeshima Y.

Biological importance of klotho gene related  
aging associated disorders

International Congress of Developmental  
Biology Symposium July 10th, 2001 Kyoto

Nabeshima Y.

Our life, how to begin, how to close

Symposium on stem cell biology, Japan-England  
exchange program of science

Cambridge Dec. 2nd 200

鍋島陽一

Klotho研究の新展開——生態恒常性の維持機構——

パーオキシサイド研究会 8月25日、2001仙台

鍋島陽一

Klotho研究の新展開——生体恒常性の維持機構——

第43回基礎歯科医学会総会 特別講演 9月19

日 2001 大宮

鍋島陽一

Klotho蛋白の機能解析——カルシウム・リンホメオ

スタシスの制御機構——24回日本分子生物学会年

会シンポジウム「老化の多面的機構」12月10日、

2001年、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Klothoの心血管疾患における意義、遺伝子多型解析

分担研究者 永井良三 東京大学大学院医学系研究科・循環器内科

研究要旨

我々は、循環器疾患における老化抑制遺伝子klothoの病態生理学的意義の解明と診断・治療法開発への応用を目的とした研究を行っている。環器系疾患の病態におけるklotho因子の役割を生化学的、細胞生物学的、さらに発生工学的な手法を用いて機能を解析している。Klotho因子の活性をはじめ、その制御パスウエーやターゲット分子の同定を目的とした研究を現在行っている。今までに、klotho因子は液性因子であり、一酸化窒素のパスウエーを介した内皮機能の調節することを示した。本年度は、1) klothoが下肢虚血における血流回復ならびに血管新生能に関与すること、2) klothoがアンジオテンシンによる腎障害に対して保護的に作用すること、さらに3) klothoが一酸化窒素の細胞内分子シグナル経路を介して作用すること等を明らかにした。klotho因子は、腎・血管細胞の寿命決定や生理機能を調節する因子であり、ホメオスターシスに寄与すると考えられるため、klotho遺伝子ならびにその蛋白の投与は、血管障害や個体老化の防止に有用であると考えられる。

A. 研究目的

循環器系疾患の多くは、加齢現象に伴う血管障害が原因である。加齢による血管障害の病態を解明し、予防・治療法を開発することは重要な課題である。

我々は全身の老化を来たす挿入突然変異マウスの解析から、早期老化の原因遺伝子であるklothoを単離した。本研究は、個体老化を抑制する新規遺伝子klothoならびにKlotho蛋白の分子機能を明らかにし、循環器病態でどのような役割を担っているかを明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

以下に研究計画及び方法を列挙する

a. klothoの腎保護作用

klothoの腎保護作用を検討するために、アンジオテンシンを負荷した動物モデルにklothoのアデノウイルスを投与し、腎保護作用を腎機能検査及び病理組織検査にて検討した。

b. klothoの血管新生促進作用

klothoは血管内皮機能の保持を通して血管保護に寄与するが、血管新生への寄与について検討するために、ヘテロマウスの子虚血モデルを作製し、経時的に血流の回復をレーザードップラー血流測定ならびに病理組織学手法を用いて検討した。

c. klothoの細胞内シグナル

klothoの細胞内シグナルについて検討するために、klothoを発現する仙台ウイルスを構築し、これを細胞に投与後、各種細胞シグナルの活性について検討した。

(倫理面への配慮)

上記実験は全て動物実験である。動物の扱いに関しては、当施設のガイドラインに従って行った。動物愛護の観点から配慮した。

D. 研究結果

a. klothoの腎保護作用

アンジオテンシン負荷マウスでは、腎臓におけるklothoの発現は低下しており、同負荷マウスにklothoのアデノウイルスを投与すると、アンジオテンシン負荷による腎障害（蛋白尿、GFR低下、病理）が改善した。

b. klothoの血管新生促進作用

klothoヘテロマウスに子虚血モデルを作製した結果、klothoヘテロマウスは野生型のコントロールに比し、血管新生能が低下していた。また、klothoヘテロマウスでは血管新生を示すCD31陽性の毛細血管も少なく、klothoマウスでは血管新生が低下していた。

c. klothoの細胞内シグナル

klothoの細胞内シグナルについて検討するために、klothoを発現する仙台ウイルスを構築し、これを血管内皮細胞に投与した。各種細胞シグナルの活性について検討した結果、内皮型一酸化窒素合成酵素eNOSのリン酸化（活性化）を認めた。

D. 考察

Klotho因子は液性因子であり、一酸化窒素のパスウエーを介した内皮機能の調節することを今までの検討で示した。今回、klothoは血管新生に関与し、アンジオテンシン負荷による腎障害を拮抗する作用を有することを明らかにした。また、血管新生能に寄与することを明らかにした。さらに、klothoの細胞内シグナルを明らかにした。klotho因子は、腎・血管細胞の寿命決定や生理機能を調節する因子であり、腎・血管のホメオスターシスに寄与すると考えられる。ここにeNOSのリン酸化を通じた活性化のパスウエーが存在すると考えられる。klotho遺伝子ならびにその蛋白の投与は、血管障害や個体老化の防止に有用であると考えられる。

## E. 結論

心血管系は種々の環境要因により血管は種々の環境要因の影響により、変性をきたすことが病態の発症・進展と深く関わる。老化はその中でも遺伝的・環境的な要因療法を併せ持つことを特徴とする。klothoはヒトの環境要因への対応（環境負荷、ストレス等）に関わると考えられる。klothoの作用機序を明らかにすることで、klothoを用いた新しい心血管系の保護治療が可能になると考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

・ Mitani H, et al. Angiotensin II downregulates renal expression of anti-aging gene, klotho, and klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage. Hypertension in press.

・ Fukino K, et al. Regulation of Angiogenesis by the Aging Suppressor Gene klotho. submitted.

・ Yamagishi T, et al. Troglitazone improves endothelial function and augments renal klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats with multiple atherogenic risk factors. Hypertens Res. 2001 24:705-9.

・ Manabe N, et al. Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. J Immunol. 2001;167:2625-31.

### 2. 学会発表

永井良三。2001.5.27 第44回日本腎臓学会学術集会 教育講演（1）「klotho遺伝子と腎臓・血管機能」東京

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）。

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

分担研究報告書

モデル動物、in vitro 系を用いた分泌型 Klotho の解析、肺疾患の解析  
分担研究者 倉林正彦 群馬大学医学部第二内科

研究要旨

Klotho 遺伝子の欠損マウスの肺組織においては、野生型の肺に比較し TUNEL 陽性細胞が増加していた。Klotho 蛋白を過剰に発現する細胞を樹立した。この細胞は、対照細胞に比較し、アポトーシス刺激に対する caspase 3 の活性化が低下していた。したがって、Klotho 蛋白は抗アポトーシス作用を持つ可能性がある。

A. 研究目的

Klotho 遺伝子の欠損マウスは、肺気腫や中小動脈の石灰化を伴うメンケベルグ型の動脈硬化を呈する。これらは、肺胞上皮細胞や血管内皮細胞のアポトーシスによる病理変化の可能性があり、そこで、本研究は、まず、肺組織でのアポトーシスの有無を Klotho ホモマウスと野生型マウスで比較した。次に、Klotho 過剰発現細胞を樹立し Klotho 蛋白がアポトーシスを抑制するか否かを in vitro で検討した。

B. 研究方法

Klotho ホモマウスの肺組織の TUNEL 染色をおこなった。また、Klotho 発現細胞樹立のため、マウス膜型 Klotho cDNA をメタロチオネインプロモーターの下流に連結したプラスミドと ネオマイシン遺伝子を含むプラスミドをヒト腎上皮細胞 293 細胞に共導入し、G418 耐性細胞を選択することによって Klotho 遺伝子を亜鉛添加依存性に発現する細胞株を樹立することを試みた。亜鉛添加、非添加時の Klotho 蛋白の発現レベルはウエスタンブロットにて検討した。また、アポトーシスは Ca イオノフォア A23187 を用いた。アポトーシスの検出のため、活性化 Caspase3 のウエスタンブロットをおこなった。

C. 研究結果

Klotho ホモマウスの肺組織においては野生型に比較し、明らかに TUNEL 陽性細胞が増加していた。また、Klotho cDNA とネオマイシン遺伝子導入後 G418 を含む培地で4週間培養し、耐性細胞を12個選択した。このうちで、亜鉛添加下の培養において Klotho 蛋白の発現量が最も多い細胞株 (M16 細胞と命名) を以下の実験に供した。M16 細胞では、亜鉛添加により、発現量の増加は認められるが、亜鉛非添加時にも明らかに Klotho 蛋白の発現が認められた。Klotho cDNA を含まない G418 耐性細胞 (C1 細胞) には Klotho 蛋白は検出されなかった。したがって、M16 細胞と C1 細胞を用いて、アポトーシス感受性の相違を検討した。Ca イオノフォア添加によって、C1 細胞においては caspase3 の活性化が認められたが、M16 細胞においてはほとんど認められなかった。

D. 考察

M16 細胞は Klotho 蛋白を亜鉛の添加、非添加に関わらず、発現していた。M16 細胞中の Klotho の発現はメタロチオネインプロモーターのもとに発現するよう

にデザインしてあるが、実際にはメタロチオネインプロモーターは「leaky promoter」のため、亜鉛の存在しない条件下においても転写活性をもっていた。亜鉛を添加しない条件でも klotho 蛋白は C1 細胞に比し明らかに過剰発現していたため、アポトーシス刺激に対する感受性を両者間で比較することとした。caspase 3 は、アポトーシス特異的に活性化される酵素であり、この活性化の程度は C1 細胞の方が M16 細胞よりも有意に強度であった。

E. 結論

Klotho 遺伝子を欠損しているマウスで認められる肺気腫は、少なくとも一部は肺胞上皮細胞のアポトーシスが亢進していることによるであろう。また、Klotho 蛋白を過剰に発現する細胞 M16 細胞は、ほとんど発現していない C1 細胞に比較し、Ca イオノフォアによるアポトーシスに抵抗性であった。したがって、Klotho 遺伝子は、アポトーシスを抑制し、細胞生存を促す機能をもつ可能性が示唆された。

F. 危険情報

該当なし

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) Suga T, Kurabayashi M, et al. Disruption of the klotho Gene Induces Pulmonary Emphysema in Mice: Defect in Maintenance of Pulmonary Integrity during Postnatal Life. Am J Resp Cell Mol Biol. 22, 26-33, 2000

2 学会発表

日本呼吸器学会「klotho 遺伝子欠損マウスは血管内皮機能が低下している」  
田島俊児他 10 名

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

*klotho* の骨疾患における意義、遺伝子多型解析

分担研究者 川口 浩（東京大学医学部整形外科講師）

研究要旨： 本研究では、老化抑制遺伝子 *klotho* 欠損マウスが低回転型骨粗鬆症を呈する事実に基づいて、ヒト *klotho* 遺伝子の閉経後女性の骨粗鬆化における関与についてゲノム解析を行って検討した。ヒト *klotho* 遺伝子座において SNPs のスクリーニングを日本人と英国在住白人女性のサンプルを用いて行った。更に、日本人と英国人に共通に見られた3カ所の SNPs に関して、日本人閉経後女性 364 例、英国人女性 1,187 例においてそれぞれ骨密度（BMD）との association study を行った。日本人閉経後女性においては、promoter 領域（-395G→A）および exon4（1818C→T）が BMD と有意な相関を示した。一方、英国人においては、加齢とともにその相関は強くなり、65 歳以上の高齢群では、1818C→T SNP（ $p=0.010$ ）と-395 G→A SNP においても BMD との間に有意な相関が認められた（ $p=0.001$ ）。更に、この変異が Klotho 蛋白の機能に及ぼす影響について検討した。G-395A サイトを含む oligonucleotide probe と *klotho* 遺伝子の発現を確認しているヒト腎臓由来 293 細胞からの核抽出蛋白との結合能をゲルシフト法で解析したところ、G→A 置換は核蛋白との結合を著明に低下させることが明らかとなった。以上の結果から、全身性因子のひとつと考えられている *klotho* 遺伝子産物が、老化に伴う骨粗鬆化に関与している可能性が示された。

A. 研究目的

平均寿命が伸びて高齢者の比率が急増している現在において、老化および老化関連疾患の細胞・分子機構の解明は医学、生物学研究における最大関心事のひとつといえる。骨軟骨領域における代表的な疾患である骨粗鬆症や変形性関節症は、その発症・進展に老化が重要な要素となっている疾患群であるが、そのメカニズムについてはほとんど解明されていない。新規老化抑制遺伝子 *klotho* 変異のホモ接合体は、骨粗鬆症、関節軟骨や軟部組織の石灰化をはじめ、ヒトの老化に極めて類似した多彩な表現型を呈する画期的な老化モデル動物と言える。*klotho* 遺伝子がコードする蛋白（KL 蛋白）は、野生型マウスにおいて、表現型を呈する組織とは関係なく多くの組織でその発現が認められることから、何らかの全身性のシグナルを介して個体の老化を抑制していると考えられている。本研究では、ヒト

*klotho* 遺伝子の上記骨軟骨異常疾患における関与について、ゲノム解析を行って検討した。

B. 研究方法

閉経後女性の末梢白血球からインフォームドコンセントに基づいて抽出した DNA、および個々の患者の骨密度を含むデータベースを蓄積した。まず PCR-SSCP、ダイレクトシーケンスのためのプライマー設計などのシステムの確立を行った。更に、これらの症例の内、115 例前後の症例について PCR-SSCP、direct sequence により、プロモーター領域および全 5 個の exon のスクリーニングを行い、変異/多型（single nucleotide polymorphisms: SNPs）を検索した。また、同様の SNPs スクリーニングを英国在住の白人（英国 GEMINI 社との共同研究）においても行い、2 民族に共通の SNPs につき、各疾患群との

間の association study を行った。さらに各疾患の患者内において、mutation と重症度や発症年齢との相関について解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京大学医学部研究倫理審査委員会の承認を得て行っている。サンプル、個人情報、および解析結果は当教室で厳重に保管し秘密を厳守する。結果を学術論文や学会で報告する場合も患者のプライバシーの保護を優先する。個人情報はコードナンバーとして暗号化され、患者が特定されることは決してない。

### C. 研究結果

① ヒト *klotho* 遺伝子座における single nucleotide polymorphisms (SNPs) の検索：ヒト *klotho* 遺伝子座においてその遺伝子の機能に直接関連のある領域（全5つの exon とその近傍の intron、および promoter 領域）における SNPs のスクリーニングを行った。本研究は、民族による遺伝的背景の差を除外するために、日本人（115例）と英国在住白人女性（288例、英国 GEMINI 社との共同研究）より採取した末梢白血球 DNA サンプルを用いて行った。その結果、日本人においては6カ所、英国人においては8カ所の SNPs が同定され、そのうちの3カ所は共通であった。この3カ所の SNPs の内訳は、promoter 領域に1カ所（-395G->A）、exon4 に2カ所（1818C->T および 2298C->T）であった。

② SNPs と骨密度との association study：この共通の3カ所の SNPs に関して、日本人閉経後女性364例、英国人女性1,187例においてそれぞれ骨密度（BMD）との association study を行った。日本人閉経後女性においては、-395G->A および 1818C->T が BMP と有意な相関を示した。一方、英国人においても同様の結果が見られ、1,187例全体では相関がなかったが、明らかな閉経後

女性に対象を絞ると 1818C->T SNP と BMD の間に有意な相関が見られた

( $p=0.029$ )。この閉経後女性を更に年代別に検討すると、加齢とともにその相関は強くなり、65歳以上の高齢群では、1818C->T SNP ( $p=0.010$ ) と -395G->A SNP においても BMD との間に有意な相関が認められた ( $p=0.001$ )。

③ Promoter 領域の SNP と機能との関係：-395G->A SNP が Klotho 蛋白の機能に及ぼす影響について検討した。G-395A サイトを含む oligonucleotide probe と *klotho* 遺伝子の発現を確認しているヒト腎臓由来 293 細胞からの核抽出蛋白との結合能をゲルシフト法で解析したところ、G->A 置換は核蛋白との結合を著明に低下させることが明らかとなった。以上の結果は、ヒト *klotho* 遺伝子が人種差を超えて加齢に伴う骨密度の変化に直接関与している可能性を示唆するものと言える。

### D. 考察

今回の検討で、*klotho* マイクロサテライト多型が関与している年齢層が骨粗鬆症と変形性腰椎症で異なっていた。変形性腰椎症との相関が若年群で見られたのは、変形性腰椎症の発症・進展において重要な環境因子である慢性的・持続的な力学的負荷の蓄積の影響が若年群ではまだ少ないためと考えられる。

また、高齢者女性における骨量は大きく3つの要素によって決定される。壮年期における最大骨量 (peak bone mass)、閉経直後のエストロゲン欠乏による急速な骨粗鬆化、そしてその後の加齢に伴う緩やかな骨粗鬆化である。骨密度との相関がマイクロサテライト多型においても SNPs においても、高齢群で強くなった事実は、*klotho* 遺伝子が主として3番目の加齢に伴う緩やかな骨粗鬆化を制御している可能性を示唆するものと言える。

## E. 結論

ヒト *klotho* 遺伝子は骨粗鬆症や変形性腰椎症などの骨軟骨疾患に関与している可能性が示された。特に人種差を超えて加齢に伴う骨密度の減少に直接関与していると考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kawaguchi H, Manabe N, Miyaura C, Chikuda H, Nakamura K, and Kuro-o M: Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation in *klotho* mouse exhibiting low-turnover osteopenia. *J Clin Invest* 104: 229-237, 1999.
  - 2) Kawaguchi H, Manabe N, Chikuda H, Nakamura K, and Kuro-o M: Cellular and molecular mechanism of low-turnover osteopenia in the *klotho*-deficient mouse. *Cell Mol Life Sci* 57: 731-737, 2000.
  - 3) Kawaguchi H, Nakamura K, Ogata N, Manabe N, Chikuda H, Kawano K, and Kuro-o M: Mutation in aging suppressor gene, *klotho*, causes decreases in bone formation and resorption in mice. *Connect Tissue* 32: 295-301, 2000.
  - 4) Manabe N, Kawaguchi H, Chikuda H, Miyaura C, Inada M, Nagai R, Nabeshima Y, Nakamura K, Sinclair AM, Scheuermann RH, and Kuro-o M: Connection between B-lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J Immunol* 167: 2625-2631, 2001.
  - 5) 川口浩, 筑田博隆: *klotho* 遺伝子と老人性骨粗鬆症. 臨床科学 34 (10) (特集: 骨粗鬆症「基礎から臨床へ」): 1373-1377, 1998.
  - 6) 真鍋典世, 川口浩, 中村耕三, 宮浦千里, 尾上佳子, 鍋島陽一, 黒尾 誠: 新規老化モデル *klotho* マウスにおける骨芽細胞、破骨細胞の分化異常と骨髓造血異常のメカニズム. 日本骨代謝学会雑誌 16 (4): 152-154, 1999.
  - 7) 川口浩: 老化関連遺伝子と骨代謝. CLINICAL CALCIUM 9 (4) (特集: 骨カルシウム研究の最近の進歩): 507-510, 1999.
  - 8) 川口浩: 老化抑制遺伝子 *Klotho* と骨代謝. 腎と骨代謝 12 (3) (特集: 骨の分子発生学): 279-284, 1999.
  - 9) 川口浩: 老化抑制遺伝子 *klotho* と骨代謝異常 (ミニレビュー). 骨代謝学会誌 17 (3): 110-115, 2000.
  - 10) 川口浩: *Klotho* 遺伝子変異マウスにおける骨代謝異常. 医学のあゆみ (特集: 遺伝子異常と骨): 702-707, 2000.
  - 11) 川口浩: *klotho* 遺伝子の骨粗鬆症への関与. ホルモンと臨床 (増刊号) 「骨粗鬆症のマネジメントのすべて」: 62-68, 2000.
  - 12) 川口浩: 老化と *klotho* 遺伝子. 整形災害外科 43 (11) (連載: 分子レベルからみた整形外科疾患 - シリーズ II -): 1178-1179, 2000.
- ### 2. 学会発表
- 1) 真鍋典世, 川口浩, 中村耕三, 宮浦千里, 筑田博隆, 黒尾 誠: 骨髓 B リンパ球が破骨細胞へ lineage switch する可能性. 第 15 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2000. 9. 28-29 (国立京都国際会館, 京都).
  - 2) 川野健一, 緒方直史, 鈴木隆雄, 吉田英世, 細井孝行, 井上聡, 折茂肇, 白木正孝, 黒尾誠, 中村耕三, 川口浩: ヒト *klotho* 遺伝子座の全 exon およ

- び promoter 領域における SNPs (cSNPs)の検索と骨代謝疾患への関与. 第 15 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2000. 9. 28-29 (国立京都国際会館, 京都).
- 3) 川口浩: Reverse genetics から forward genetics へ: *klotho* 遺伝子と FGF-2. つくば骨粗鬆症講演会. 2000. 11. 14 (筑波第一ホテル, 茨城).
  - 4) 川口浩: Forward & reverse genetics による骨代謝疾患へのアプローチ. 第 4 回兵庫骨代謝懇話会. 2001. 2. 3 (新神戸オリエンタルホテル, 神戸).
  - 5) 川口浩: Reverse & forward genetic analyses of the involvement of an aging-suppressor *klotho* gene in the etiology of skeletal disorders. 第 5 回脊椎と神経を語る会. 2001. 3. 17-18 (昭島市, 東京).
  - 6) 川口浩: Forward & reverse genetics からの骨軟骨疾患へのアプローチ. 第 74 回日本整形外科学会学術集会 (ランチョンセミナー). 2001. 4. 19-22 (幕張メッセ国際会議場, 千葉).
  - 7) 穴水依人, 小柳清光, 川口浩, 星地亜都司, 鍋島陽一, 中村耕三: rRNA gene transcription activity in cervical anterior horn cells of *klotho* mutant mice. 日本神経病理学会. 2001. 5. 24-26 (都市センターホテル, 東京).
  - 8) 川野健一, 緒方直史, Mathias Chiano, 内田素行, 細井孝之, 鈴木隆雄, 吉田英世, 折茂肇, 井上聡, 中村耕三, 川口浩: ヒト *klotho* 遺伝子プロモーターの多型は閉経後女性の老化に伴う骨粗鬆化に関与する (優秀演題賞受賞). 第 19 回日本骨代謝学会. 2001. 8. 8-11 (名古屋国際会議場, 名古屋).
  - 9) 川野健一, 緒方直史, Mathias Chiano, 内田素行, 中村耕三, 川口浩: ヒト *klotho* 遺伝子プロモーターの多型は老化に伴う骨粗鬆化に関与する - 異なる人種での SNPs による解析 -. 第 16 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2001. 10. 18-19 (広島国際会議場, 広島).
  - 10) Noriyo Manabe, Hiroshi Kawaguchi, Hirotaka Chikuda, Chisato Miyaura, Masaki Inada, Kozo Nakamura, and Makoto Kuro-o: Connection between B-lymphocyte and osteoclast differentiation pathway. 22<sup>nd</sup> annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2000. 9. 22 - 9. 26 (Toronto, Canada)
  - 11) Ken-ichi Kawano, Naoshi Ogata, Takao Suzuki, Hideyo Yoshida, Takayuki Hosoi, Hajime Orimo, Satoshi Inoue, Mariko Koshizuka, Makoto Kuro-o, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi: Identification of coding region single-nucleotide polymorphisms (cSNPs) in the human *klotho* gene and their association with bone density in postmenopausal women. 22<sup>nd</sup> annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2000. 9. 22 - 9. 26 (Toronto, Canada).
  - 12) Hiroshi Kawaguchi: Involutional osteoporosis: New theory. 1st Scientific Meeting of the Asia-Pacific Menopause Federation. 2001. 5. 26-29 (Seoul, Korea).
  - 13) Ken-ichi Kawano, Mathias Chiano, Naoshi Ogata, Motoyuki Uchida, Takayuki Hosoi, Hajime Orimo, Satoshi Inoue, Kozo Nakamura, Makoto Kuro-o, and Hiroshi Kawaguchi: *Klotho*



promoter polymorphism associated  
with bone density of aged  
postmenopausal women in  
Caucasian and Japanese  
populations. 23<sup>rd</sup> annual

meeting of the American Society  
for Bone and Mineral Research.  
2001. 10.12 - 16 (Phoenix,  
Arizona).

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号ページ出版年
Yamashita T, et al.	klotho-deficient mice are resistant to bone loss induced by unloading due to sciatic neurectomy	J.Endocrinology	168(2)347-351 2001
Uchida A., et al.	Neurofilaments of Klotho, mutant mouse prematurely displaying symptoms resembling human aging.	J.Neurosci.Res.	64,364-370 2001
Manabe N., et al.	Connection between B-lymphocyte and osteoclast differentiation pathways.	J.Immunol.	167,2625-2631 2001
Morishita K., et al.	The progression of aging in klotho mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc.	J.Nutrition	131,3182-3188 2001
Yoshida T., et al.	Mediation of unusually high concentrations of 1.25-dihydroxyvitamin D3 in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1 alpha hydroxylase gene.	Endocrinology	143,683-689 2002
Mitani H., et al.	Angiotensin II downregulates renal expression of anti-aging gene, klotho, and klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage.	Hypertension in press.	
Yamagishi T., et al.,	Troglitazone improves endothelial function and augments renal klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats with multiple atherogenic risk factors.	Hypertens Res.	24,705-709