

20020415

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鍋島陽一

平成15年(2003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 -----	12
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	13
-----------------------	----

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) 分泌型Klotho蛋白を高感度に認識できる抗体により、130kdの細胞外ドメイン全体を含む分泌型Klotho蛋白が血清中に存在することを確認し、濃度測定を開発した。ラボ内ボランテアの血清値を測定したところ、個人差がかなり高いことがわかった。また、血清値が顕著に亢進している患者が発見され、その血清活性型ビタミンD、リン、カルシウムが低下していることが明らかとなった。

2) Klotho蛋白と共沈する5個の結合蛋白を同定し、質量分析によりその分子構造を推定し、ついて、抗体によって推定された分子が共沈していることが確認された。

3) Klotho蛋白は活性型ビタミンD合成の律速酵素である1 α -hydroxylaseの発現を負に制御する回路の構成要素であることが明らかとなり、klotho変異マウスでは血清の活性型ビタミンD濃度が上昇し、血清カルシウム、リン値が亢進しており、逆に血清Klotho亢進患者では活性型ビタミンD、リン、カルシウム値が低下していた。

4) beta-glycosidaseのホモログであったことから、糖鎖切断活性を測定し、beta-glukuronidase活性をもつことを明らかにした。

5) klothoが血管新生能に関与するという昨年度の研究結果を発展させ、薬剤投与によるklothoマウスでの血管新生能の亢進及び新たに構築した。センダイウイルスコンストラクトを用いたklothoの外的投与による血管新生能の亢進の新規知見を得た。

6) 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。

7) 高血圧性腎硬化症モデルにおいて、klotho mRNAの発現減少と血管内皮機能障害が同時に認められた。klotho遺伝子の導入により、血管内皮機能障害は一部改善し、腎機能障害の進行の抑制が観察された。klotho遺伝子は腎保護作用を有する可能性がある。そのメカニズムはklotho遺伝子によるNO産生の増加や酸化ストレスの減少によると考えられる。

8) ヒトklotho遺伝子プロモーター領域のSNPである-395G->Aが人種差を超えて高齢女性において骨密度と有意な相関を示すこと、このG->A変異は核内転写因子との結合能に影響を及ぼすことを報告した。しかしながら本年度の検討で、骨密度と有意な相関を示したSNPsと、変形性脊椎症の重症度および脊椎靭帯骨化症とは有意な相関を示さなかった。また、ヒトklotho遺伝子の転写活性について検討を行ったところ、このG->A置換はklothoの発現効率に大きな変化を及ぼさなかったが、この近傍でのdeletion studyの結果-410と-370の間で有意なルンフェラーゼ活性の低下が見られた。

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

離し、サンドイッチエライザー系を構築した。また、血清より130kdの細胞外ドメイン全体を含む分泌型Klothoを高感度に免疫沈降するシステムを構築した。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。これらのシステムを用いて分泌型Klothoの血清濃度を測定する。

（2）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。抗Klotho抗体によりKlotho蛋白共沈分子を集め、電気泳動で分離し、質量分析により候補分子を同定し、候補分子に対する抗体により結合を確認した。また、候補分子を発現する培養細胞を準備し、結合を確認した。

Klotho蛋白の酵素活性を確認するためにKlotho-Fcキメラ蛋白を発現するベクターを構築し、分泌型キメラ蛋白を細胞上清より回収し、抗Fc抗体で吸着し、各種の人工基質を用いて酵素反応を解析した。ついて、最も有効な基質、至適反応条件の検討を行い、さらに、各種の阻害剤を用いて反応特性を解析した。

（3）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ー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解析した。また、変異マウスにおいて1 α -hydroxylaseの発現亢進をもたらすシグナル回路について解析した。

(4) Klotho蛋白の蛋白医薬としての可能性の検討については以下のように行った。

a. 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の制御をするために、statin系薬剤を投与し、血管新生能への影響を検討した。一方、klothoのセンダイウイルス (replication-deficient) コンストラクトを作製し、皮膚創傷治癒モデルに投与し、klothoの発現と治癒の関係を病理組織学的に検討した。

b. 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。

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を発現するセンダイウイルスを構築し、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。

d. klotho遺伝子による動脈硬化抑制の機序を解析した。酸化ストレスは、血管内皮障害を引き起こし、動脈硬化の発症・進展に関与する。klotho蛋白が酸化ストレスを減少させるメカニズムについて分子生物学的手法を用いて解析した。

e. 腎不全モデルラット (Dahl食塩感受性高血圧ラット) に対して、アデノウイルスベクターを用いて *in vivo* でklotho遺伝子を導入することにより腎不全の進行を抑制するか否かを検討した。

(5) Klotho遺伝子多型について

ゲノムの相関解析については、変形性腰椎症患者および脊椎靭帯骨化症患者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データベースを蓄積した。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、高齢者の骨密度と有意な相関を示したプロモーター領域のSNP (-395G→A) についてその遺伝子型と重症度の相関を検討した。

転写解析については、ルシフェラーゼアッセイによってklotho遺伝子の転写調節部位の探索を行う。既に、転写開始点より上流1400, 1200, 1000, 800, 500, 410, 370 bpのプロモーター領域をそれぞれルシフェラーゼ遺伝子に結合させたDNAをヒト腎臓由来293細胞に導入して安定発現クローンを樹立した。また、上記のプロモーターのG→A置換によるルシフェラーゼ活性の変化を検討した。

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の同定に成功した。血清濃度は個人差が大きい。また、進行した腎不全患者では腎臓における発現は顕著に低下しているにも関わらず、血清濃度は顕著に低下していない。最近、血清Klotho蛋白が顕著に亢進している患者が見つかり、変異マウスとは逆に血清ビタミンD、カルシウム、リンが低下していることが明らかとなった。

(2) 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、質量分析により5個の蛋白が同定した。抗体による解析では、これらの蛋白はKlotho変異マウスからの免疫沈降物には存在していない。また、培養細胞に各候補分子を発現させ、共沈することを確認した。

Klotho蛋白の糖鎖切断活性を測定した結果、beta-glucuronidase活性をもつこと、特異阻害剤で活性阻害が起こること、既知のbeta-glucuronidaseとは性質を異にしていることを確認した。

(3) 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 α -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 α -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 α -hydroxylase遺伝子の発現を負に制御していることが明らかとなった。更に活性型ビタミンDがklotho遺伝子の発現を誘導することが明らかとなり、Klothoは活性型ビタミンD合成の負の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。

(4) klothoの血管新生促進作用

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。さらに、klothoの制御を通した血管新生能の制御の可能性について検討した。Statin系薬剤をklothoマウスに投与したところ、血流改善がみられたことより、老化による血管新生能低下はstatin薬剤の投与で改善する可能性があることを示唆する結果を得た。さらに、新たに作製したklothoのセンダイウイルスコンストラクトを皮膚創傷治癒モデルに投与したところ、創傷治癒の促進がみられ、血管新生の亢進をとまなうことを認めた。Klotho投与が血管新生亢進を促す結果を得た。

(5) 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。

(6) 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を発現するセンダイウイルスを構築し、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。

(7) *klotho*遺伝子欠損マウスは、野生型に比べ、大動脈に石灰化と内膜肥厚を認めた。アセチルコリン投与前の細動脈径は野生型、ヘテロ、ホモ個体でそれぞれ 49 ± 5 、 43 ± 4 、 $33 \pm 3 \mu\text{m}$ であった。アセチルコリン($10\text{-}5\text{M}$)による最大血管拡張反応は野生型、ヘテロ、ホモ個体でそれぞれ 41 ± 5 、 27 ± 3 、 $12 \pm 3\%$ であった。すなわち、*klotho*遺伝子欠損マウスにおいては、*klotho*遺伝子発現量に依存した内皮依存性血管弛緩反応が見られた。

(8) 尿中のNO代謝産物であるNO₂-およびNO₃- (NO_x)を、オートアナライザーを用いて測定した。ヘテロ個体の尿中NO_xは $142 \pm 16 \text{ nmol/day}$ と野生型($241 \pm 28 \text{ nmol/day}$)に比較し著明に低下していた。また、*Klotho*遺伝子欠損マウスでは大動脈壁の活性酸素の産生が増加傾向を示していた。

(9) 6週令のDahl食塩感受性高血圧ラットに8%高食塩食または0.3%低食塩食を与えた($n=6$)。11週令にて、アセチルコリンによる内皮依存性血管弛緩反応、尿中のNO代謝産物、尿中アルブミンを測定した。次に、マウス膜型*klotho* cDNA全長を含むアデノウイルスベクターを作成した。*Klotho*導入群は、8週令から週1回、3週間 $5 \times 10^8 \text{ pfu}$ を大腿に筋注した($n=7$)。さらに、腎臓組織のHE染色を行い、糸球体の腫大と血管周囲の繊維化について検討した。高食塩食の収縮期血圧は $261 \pm 11 \text{ mmHg}$ に上昇しており(低食塩食 $144 \pm 7 \text{ mmHg}$)、アセチルコリンによる血管弛緩反応は、低食塩食群 $98 \pm 2\%$ に比べ、 $43 \pm 6\%$ に減弱していた。腎臓における*klotho* mRNAの発現も有意に減少していた。*Klotho*導入群では、筋注をした局所に*klotho* 遺伝子の発現が認められた。*Klotho*導入群の収縮期血圧は $233 \pm 6 \text{ mmHg}$ であり、アセチルコリンによる血管弛緩反応は、 $61 \pm 9\%$ に改善していた。尿中アルブミンは、無処置のラット($656 \pm 220 \text{ mg/day}$)に比べ $96 \pm 24 \text{ mg/day}$ に減少していた。また、腎臓の組織所見では、*klotho*導入群において、糸球体の腫大と血管周囲の繊維化の抑制が認められた。

(10) プロモーター領域のSNP (-395G→A)は、変形性腰椎症患者の重症度を示す Kellgren-Lawrence scoreとも、脊椎靭帯骨化症患者の重症度を示す骨化椎体数とも有意な相関を示すことはなかった。また、既に*klotho*の発現が確認されているヒト腎臓由来293細胞において、長さの異なるプロモーター・ルシフェラーゼ DNAの導入細胞クローンをを用いて転写活性の検討を行ったところ、上記のプロモーターのG→A置換は*klotho*の発現効率に大きな変化を及ぼさなかった。しかしながら、この近傍で deletion studyを行ったところ、-410と-370の間で有意なルシフェラーゼ活性の低下が見られた($p=0.04$)。

D. 考察

(1) 血清*Klotho*蛋白の測定系の開発により、血清濃度が顕著に亢進した患者を見いだすことにつながった。引き続き、カルシウム、リン、ビタミンD濃度に異常を示す患者の解析を広く進める事を計画している。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。

(2) 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 α -hydroxylase遺伝子の転写制御因子の解析、1 α -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。

(3) *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。今回明らかにした血管新生に関わる知見は極めて重要である。血管新生は虚血性血管疾患のみならず、癌、網膜の増殖性疾患等様々な疾患の病態に関わる。*klotho*欠損マウスにおける薬剤投与による血管新生能の制御は高齢者における血管新生能低下の治療法の開発、またセンダイウイルスによる*Klotho*の外的投与による血管新生能の亢進は*klotho*投与による新しい血管治療法の開発にそれぞれ糸口となる可能性がある。*Klotho*が血管新生の制御に関わるならば、*klotho*を用いた治療戦略はこれらの疾患の治療法の開発につながると期待される。一方、アンジオテンシン負荷に対する腎保護作用は現在重要な社会医学的な問題である腎不全の患者の治療、透析医療の医療費問題の軽減に結びつく可能性がある。すなわち、アンジオテンシンの過剰が病態発症・維持に関わる高血圧症・腎硬化症による腎不全の進行、透析医療への移行を防止・遅延する治療法として、*Klotho*の遺伝子導入あるいはタンパク投与を用いた治療法の開発が期待される。

(4) *klotho*マウスは動脈硬化、肺気腫、骨粗鬆症、性腺萎縮などの著明な老化徴候を示し、加齢に伴って発症する多くの疾患の成因を解析するための重要なモデルとなることが期待されている。すでに、我々は循環器系の各種病態で*klotho*遺伝子の発現が低下していること、*Klotho*蛋白が血管内皮保護作用を持つ液性因子である可能性を明らかにし、現在そのメカニズムに酸化ストレスの減少が関与している。

*klotho*遺伝子導入により腎障害の進行を遅らせることができれば*klotho*が新たな腎不全に対する治療薬となる可能性がある。*klotho*遺伝子の病態生理学的役割を解明できれば、高血圧、心疾患ばかりでなく肺気腫、骨粗鬆症の病態解明や診断、治療に新たな展開をもたらす。さらに、*Klotho*蛋白を用いて、新しい予防・治療薬の開発が可能になると期待される。

(5) 今回の検討で、*klotho*遺伝子は加齢に伴う骨粗鬆化に関与しているものの、変形性腰椎症や脊椎靭帯骨化症など、他の老化関連骨軟骨疾患には関与していないことが示された。我々が既にヒト*klotho* マイクロサテライト多型の解析で示したように、変形性腰椎症や脊椎靭帯骨化症の発症・進展において慢性的・持続的な力学的負荷の蓄積などの環境因子の関与が重要であると考えられた。今後は更にプロモーターのdeletion studyやmutation studyを進めて、ルシフェラーゼ assayによって転写調節部位の探索を行う。また、転写制御因子を同定することによって*klotho*の上流シグナルを検討する。これを契機として、老化の分子メカニズムの解明に迫れる可能性がある。

E. 結論

1) 分泌型*Klotho*蛋白を高感度に認識できる抗体により、 130 kd の細胞外ドメイン全体を含む分泌型*Klotho*蛋白が血清中に存在することを確認し、濃度測定を開発した。血清値の個人差がかなり高く、また、血清値が顕著に亢進している患者が発見され、その血清活性型ビタミンD、リン、カルシウムが低下していることが明らかとなった。

2) *Klotho*蛋白と共沈する5個の結合蛋白を同定し、抗体によって質量分析により推定された分子が特異的に共沈していることを確認した。

3) *Klotho*蛋白は律速酵素である1 α -hydroxylaseの発現を抑制する回路の構成要素であることが明らかとなり、*klotho*変異マウスでは血清の活性型ビタミンD濃度が上昇し、血清カルシウム、リン値が亢進しており、逆に血清*Klotho*亢進患者では活性型

ビタミンD、リン、カルシウム値が低下していた。
4) Klotho蛋白がbeta-glukuronidase活性をもつことを明らかにした。

5) 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。

6) klotho遺伝子は、NO産生の増加や酸化ストレスの減少に働き、心血管系を保護する働きがあると考えられる。

高血圧性腎硬化症モデルにおいて、klotho mRNAの発現減少と血管内皮機能障害が同時に認められた。klotho遺伝子の導入により、血管内皮機能障害は一部改善し、腎機能障害の進行の抑制が観察された。klotho遺伝子は腎保護作用を有する可能性がある。

7) ヒトklotho遺伝子プロモーターのdeletion studyを行ったところ、-410と-370の間で有意なルシフェラーゼ活性の低下が見られた。今後は更に転写調節部位の探索を行い、転写制御因子を同定することによってklothoの上流シグナルを検討する。これを契機として、老化の分子メカニズムの解明に迫れる可能性がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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 1alpha-hydroxylase gene. *Endocrinology* 143, 683-689 (2002)

2) Ito S., Fujimori T., Hayashizaki Y., Nabeshima Y.

Identification of a novel mouse membrane-bound family 1 glycosidase-like protein, which carries an atypical active site structure. *Biochem. Biophys. Acta* 1576(3) 341-345, 2002

3) Kashimada K., Yamashita T., Tsuji K., Nifuji A., Mizutani S., Nabeshima Y., Noda M.

Defects in growth and bone metabolism in klotho mutant mice are resistant to growth hormone treatment. *J. Endocrinology* 2002 Sep;174(3):403-410.

4) Manya H., Fujimori T., Nabeshima Y., Endo T.

Klotho protein deficiency leads to overactivation of (Mu)-calpain. *J. Biol. Chem.* 277 (38) 35503-35508 (2002)

5) Kawano K., Ogata N., Chiano M., Molloy H., Kleyn P., Spector T.D., Uchino M., Hosoi T., Suzuki T., Orimo H., Inoue S., Nabeshima Y., Nakamura K., Kuro-o M., Kawaguchi H. Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J. Bone and Mineral Res.* 17(10) 1744-1751 (2002)

6) Yamashita T., Okada S., Higashio K., Nabeshima Y., Noda M.

Double mutations in klotho and osteoprotegerin gene loci rescued osteopetrotic phenotype. *Endocrinology*. 2002 Dec;143(12):4711-7.

7) Takeshita K., Yamamoto K., Ito M., Kondo T., Matsushita T., Hirai M., Kojima T., Nishimura M., Nabeshima Y., Loskutoff D.J., Saito H., Murohara T. Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 with fibrin deposition in a murine model of aging. *Klotho mouse*. *Semin Thromb Hemost.* 2002 Dec;28(6):545-553

8) Nagai T., Yamada K., Kim H-C, Kim Y-S, Noda Y., Imura A., Nabeshima Y., Nabeshima T.

Cognition impairment in the genetic model of aging. Klotho gene mutant mice: A role of oxidative stress. *Faseb J.* 17(1) 50-52, (2003)

9) Yang J., Matssukawa N., Rakugi H., Imai M., Kida I., Nagai M., Ohta J., Fukuo K., Nabeshima Y., Ogihara T.

Upregulation of cAMP is a new functional signal pathway of Klotho in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 301(2) 424-429 (2003)

10) Nabeshima Y.

Klotho: A fundamental regulator of aging. *Ageing Res. Rev.* 1(4) 627-638 (2002)

11) Mitani H., Ishizawa H., Aizawa T., Ohno M., Usui M., Suzuki T., Amaki T., Mori I., Nakamura Y., Sato M,

Nangaku M., Hirata Y., Nagai R. Angiotensin II downregulates renal expression of anti-aging gene, klotho, and klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension*. 2002;39:838-43.

12) Fukino K., Suzuki T., Saito Y., Shindo T., Amaki T., Kurabayashi M., Nagai R. Regulation of Angiogenesis by the Aging Suppressor Gene klotho. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293:332-7.3.

13) Kamemori M., Ohyama Y., Kurabayashi M., Takahashi K., Nagai R., Furuya N. Expression of Klotho protein in the inner ear. *Hear Res.* 2002;171:103-110.

14) Nakamura T., Saito Y., Ohyama Y., Masuda H., Sumino H., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R., Kurabayashi M. Production of nitric oxide, but not prostacyclin, is reduced in klotho mice. *Jpn J Pharmacol.* 2002;89:149-56.

15) T. Yamagishi, Y. Saito, T. Nakamura, S. Takeda, H. Kanai, H. Sumino, M. Kuro-o, Y. Nabeshima, M. Kurabayashi, R. Nagai. Toroglitazone 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, 2001.

16) K Fukino, T Suzuki, Y Saito, T Shindo, T Amaki, M Kurabayashi, R Nagai. Regulation of angiogenesis by the aging suppressor gene klotho. *Biochem Biophys Res Commun.* 293:332-337, 2002

17) T Nakamura, Y Saito, Y Ohyama, H Masuda, H Sumino, M Kuro-o, Y Nabeshima, R Nagai, M Kurabayashi. Production of nitric oxide, but not prostacyclin, is reduced in klotho mice. *Jpn J Pharmacol.* 89:149-56, 2002

18) Ogata N, Koshizuka Y, Miura T, Iwasaki M, Hosoi T,

Shiraki M, Seichi A, Nakamura K, and Kawaguchi H: Association of bone metabolism regulatory factor gene polymorphisms with susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine and its severity. *Spine* 27: 1765-1771, 2002.

19) Ogata N, Matsumura Y, Shiraki M, Kawano K, Koshizuka Y, Hosoi T, Nakamura K, Kuro-o M, and Kawaguchi H: Association of klotho gene polymorphism with bone density and spondylosis of the lumbar spine in postmenopausal women. *Bone* 31: 37-42, 2002.

20) Ogata N, Shiraki M, Hosoi T, Koshizuka Y, Nakamura K, and Kawaguchi H: A polymorphic variant at the Werner helicase (wrn) gene is associated with bone density, but not spondylosis, in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab* 19: 296-301, 2001.

21) Kawano K, Ogata N, Chiano M, Molloy H, Kleyn P, Spector TD, Uchida M, Hosoi T, Suzuki T, Orimo h, Inoue S, Nabeshima Y, Nakamura K, Kuro-o M, and Kawaguchi H: Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 17:1744-1751, 2002.

22) 鍋島陽一
老化モデルマウス 医学のあゆみ「免疫疾患」 3
36-341 2002

23) 鍋島陽一
Klotho遺伝子と老化 老年消化器病 14巻、
63-66、2002

24) 鍋島陽一
老化モデルとしてのklotho遺伝子変異マウス
ヒト型モデル動物 井上達、野田哲生、野本明男
編 85-94 (2002) シュプリンガー・フェ
アラーク東京

25) 川口浩: 加齢と骨. 単行本「新臨床医のための分子医学シリーズ: 骨・軟骨代謝と注目の骨疾患 - 骨新生から骨疾患の病態解明・治療まで -」(松本俊夫編) (羊土社): 96-104, 2002.

26) 筑田博隆、川口浩: 骨・血管相関に関わる遺伝子 - MGP, klotho, OPG -. クリニカルカルシウム (骨と血管の異常 - 遺伝子からのアプローチ -) 12 (3): 368-372, 2002.

27) 川口浩: Reverse & forward geneticsからの骨軟骨疾患へのアプローチ - 老化による骨粗鬆化メカニズムの解明をめざして. 整形外科 53 (12): 1569-1579, 2002.

28) 川口浩: 老化による骨粗鬆化の分子メカニズム. 生体の科学 (特集: 加齢の克服 - 21世紀の課題) 53 (5): 490-496, 2002.

2. 学会発表

1) Nabeshima Y.

Activation of calcium dependent proteolysis during aging
Development of New Therapy for Muscular Dystrophy --
Progress in Brain Research-- Tokyo Jan. 17, 2002

2) Nabeshima Y.

Molecular function of the Klotho protein
Workshop on Genetics of aging, Human Genome Meeting
Shanghai April 16th 2002

3) Nabeshima Y.

Klotho: A fundamental regulator of calcium homeostasis

The 15th Naito Conference on Molecular Biological
Approaches for interactable diseases (III)

Kanagawa Oct. 4, 2002

4) Nabeshima Y.

Klotho: A fundamental regulator of calcium homeostasis.
The second JSPS science forum in Stockholm
Stockholm Oct. 28, 2002

5) Nabeshima Y.

Klotho: a fundamental regulator of aging. the 4th IISong
Symposium on aging Seoul Dec. 12, 2002

6) Saito et al. In Vivo Klotho Gene Delivery Protects
against Endothelial Dysfunction in Dahl Salt-Sensitive
Hypertensive Rats. アメリカ心臓病学会 (2002年11月
シカゴにて)

7) 鍋島陽一

Klotho蛋白の機能と個体老化
第6回遺伝子治療研究会シンポジウム 老化の分子
生物学 3月2日 2002年 大阪

8) 鍋島陽一

カルシウムホメオスタシス制御におけるKlotho蛋白
の役割 日本生化学会シンポジウム 10月17日
京都 2002

9) 鍋島陽一

Klotho蛋白の機能と老化
基礎老化学会シンポジウム 11月30日
京都 2002

10) 日本循環器学会総会 (2002年4月、札幌にて)
天木幹博ら。Mechanisms of maintenance of
endothelial function by the aging-suppressor
gene Klotho.

11) 日本循環器学会総会 (2002年4月、札幌にて)
三谷治夫ら。Angiotensin II downregulates
renal expression of anti-aging gene, klotho,
and exogenous klotho gene transfer ameliorates
angiotensin II-induced renal damage.

12) 川口浩: 骨粗鬆症の病態解明と治療、その最
前線. 東海炎症研究会研修講演会. 2002. 6. 22
(名鉄ニューグランドホテル、名古屋).

13) 川口浩: 骨粗鬆症の病態解明と治療の最前
線. 旭川整形外科医会 (三木会). 2002. 6. 27
(旭川グランドホテル、北海道).

14) 川口浩: 老化による骨粗鬆化の分子メカニ
ズム. 第22回骨形態計測学会 (ランチョンセミ
ナー). 2002. 6. 29 (東京女子医科大学弥生講堂、
東京).

15) 川口浩: 骨粗鬆症の病態解明と治療の最前
線. 第5回城東整形外科医会. 2002. 7. 13 (東
京マリOTTホテル錦糸町、東京).

16) 川口浩: 骨粗鬆症の病態と治療. いわき市
整形外科医会. 2002. 8. 30 (福島県).

17) 川口浩: 骨粗鬆化の分子メカニズム - ノック
アウトマウスとゲノム解析からのアプローチ -.
第15回京滋骨粗鬆症研究会. 2002. 10. 5 (京都国
際ホテル、京都).

18) 川口浩: 骨粗鬆症 (骨代謝) - 基礎と臨床の
接点 -. 第51回東日本整形災害外科学会 (シン
ポジウム: 整形外科基礎研究と臨床の接点).
2002. 10. 24 (ホテルハマツ、福島)

19) 川口浩: 骨粗鬆化の病態解明と治療の最前線.
第3回骨粗鬆症学術講演会. 2003. 1. 25 (宇都宮
グランドホテル、栃木).

20) 川口浩: 変形性関節症病態解明への新たな
視点. 厚生労働省厚生科学研究公開シンポジウム.

2003.

21) 穴水依人、小柳清光、松原四郎、河上江美子、星地亜都司、川口浩、中村耕三: Klothoマウス: 脊髄前角細胞、前根と骨格筋の所見について。第44回日本神経病理学会。2003. 5. 29-31 (名古屋、愛知)。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)。

1. 特許取得

Klotho蛋白の酵素活性に基づく生理活性物質解析の開発 出願

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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）老化疾患の病態解析の一環として、カルシウム・電解質代謝など生体の恒常性維持機構におけるKlotho蛋白の役割解明、（2）診断法開発を目的として血清中に存在する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、（3）治療法開発への発展を目標としてKlotho蛋白が結合あるいは修飾する生体内分子の同定の3つを目的と研究を行い、以下の結果を得た。

分泌型Klotho蛋白を高感度に認識できる抗体により、130kDの細胞外ドメイン全体を含む分泌型Klotho蛋白が血清中に存在することを確認し、濃度測定を開発した。ラボ内ボランティアの血清値を測定したところ、個人差がかなり高いことがわかった。また、血清値が顕著に亢進している患者が発見され、その血清活性型ビタミンD、リン、カルシウムが低下していることが明らかとなった。Klotho蛋白と共沈する5個の結合蛋白を同定し、質量分析によりその分子構造を推定し、ついで、抗体によって推定された分子が共沈していることが確認された。Klotho蛋白は活性型ビタミンD合成の律速酵素である1 α -hydroxylaseの発現を抑制する回路の構成要素であることが明らかとなり、klotho変異マウスでは血清の活性型ビタミンD濃度が上昇し、血清カルシウム、リン値が亢進しており、逆に血清Klotho亢進患者では活性型ビタミンD、リン、カルシウム値が低下していた。beta-glycosidaseのホモログであったことから、糖鎖切断活性を測定し、beta-glucuronidase活性をもつことを明らかにした。

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）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、（3）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3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し、サンドイッチエライザー系を構築した。また、血清より130kDの細胞外ドメイン全体を含む分泌型Klothoを高感度に免疫沈降するシステムを構築した。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。これらのシステムを用いて分泌型Klothoの血清濃度を測定する。

（2）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。抗Klotho抗体によりKlotho蛋白共沈分子を集め、電気泳動で分離し、質量分析により候補分子を同定し、候補分子に対する抗体により結合を確認した。また、候補分子を発現する培養細胞を準備し、結合を確認した。

Klotho蛋白の酵素活性を確認するためにKlotho-Fcキメラ蛋白を発現するベクターを構築し、分泌型キメラ蛋白を細胞上清より回収し、抗Fc抗体で吸着し、各種の人工基質を用いて酵素反応を解析した。ついで、最も有効な基質、至適反応条件の検討を行い、さらに、各種の阻害剤を用いて反応特性を解析した。

（3）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

現と機能の変化を解析した。また、変異マウスにおいて1 α -hydroxylaseの発現亢進をもたらすシグナル回路について解析した。

倫理面への配慮

申請者はそれぞれ、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の同定に成功した。血清濃度は個人差が大きい。また、進行した腎不全患者では腎臓における発現は顕著に低下しているにも関わらず、血清濃度は顕著に低下していない。最近、血清Klotho蛋白が顕著に亢進している患者が見つかり、変異マウスとは逆に血清ビタミンD、カルシウム、リンが低下していることが明らかとなった。

（2）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、質量分析により5個の蛋白が同定した。抗体による解析では、これらの蛋白はKlotho変異マウスからの免疫沈降物には存在していない。また、培養細胞に各候補分子を発現させ、共沈することを確認した。

Klotho蛋白の糖鎖切断活性を測定した結果、beta-glucuronidase活性をもつこと、特異阻害剤で活性阻害が起こること、既知のbeta-glucuronidaseとは性質を異にしていることを確認した。

（3）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 α -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 α -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 1α -hydroxylase遺伝子の発現を負に制御していることが明らかとなった。更に活性型ビタミンDがklotho遺伝子の発現を誘導することが明らかとなり、Klothoは活性型ビタミンD合成の負の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。

D. 考察

血清Klotho蛋白の測定系の開発により、血清濃度が顕著に亢進した患者を見いだすことにつながった。引き続き、カルシウム、リン、ビタミンD濃度に異常を示す患者の解析を広く進める事を計画している。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。

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、 1α -hydroxylase遺伝子の転写制御因子の解析、 1α -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。

E. 結論

分泌型Klotho蛋白を高感度に認識できる抗体により、130kdの細胞外ドメイン全体を含む分泌型Klotho蛋白が血清中に存在することを確認し、濃度測定を開発した。血清値の個人差がかなり高く、また、血清値が顕著に亢進している患者が発見され、その血清活性型ビタミンD、リン、カルシウムが低下していることが明らかとなった。Klotho蛋白と共沈する5個の結合蛋白を同定し、抗体によって質量分析により推定された分子が特異的に共沈していることを確認した。Klotho蛋白は律速酵素である 1α -hydroxylaseの発現を負に制御する回路の構成要素であることが明らかとなり、klotho変異マウスでは血清の活性型ビタミンD濃度が上昇し、血清カルシウム、リン値が亢進しており、逆に血清Klotho亢進患者では活性型ビタミンD、リン、カルシウム値が低下していた。Klotho蛋白がbeta-glukuronidase活性をもつことを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 1α -hydroxylase gene. *Endocrinology* 143, 683-689 (2002)
- 2) Ito S., Fujimori T., Hayashizaki Y., Nabeshima Y.
Identification of a novel mouse membrane-bound family 1 glycosidase-like protein, which carries an atypical active site structure. *Biochem. Biophys. Acta* 1576(3) 341-345, 2002
- 3) Kashimada K., Yamashita T., Tsuji K., Nifuji A., Mizutani S., Nabeshima Y., Noda M.
Defects in growth and bone metabolism in klotho mutant mice are resistant to growth hormone treatment. *J. Endocrinology* 2002 Sep;174(3):403-410.
- 4) Many H., Fujimori T. Nabeshima Y., Endo T.

Klotho protein deficiency leads to overactivation of (Mu)-calpain *J. Biol. Chem.* 277 (38) 35503-35508 (2002)

5) Kawano K., Ogata N., Chiano M., Molloy H., Kleyn P., Spector T.D., Uchino M., Hosoi T., Suzuki T., Orimo H., Inoue S., Nabeshima Y., Nakamura K., Kuro-o M., Kawaguchi H. Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J. Bone and Mineral Res.* 17(10) 1744-1751 (2002)

6) Yamashita T., Okada S., Higashio K., Nabeshima Y., Noda M. Double mutations in klotho and osteoprotegerin gene loci rescued osteopetrotic phenotype. *Endocrinology*. 2002 Dec;143(12):4711-7.

7) Takeshita K., Yamamoto K., Ito M., Kondo T., Matsushita T., Hirai M., Kojima T., Nishimura M., Nabeshima Y., Loskutoff D.J., Saito H., Murohara T. Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 with fibrin deposition in a murine model of aging, *Klotho* mouse. *Semin Thromb Hemost.* 2002 Dec;28(6):545-553

8) Nagai T., Yamada K., Kim H-C. Kim Y-S. Noda Y., Imura A., Nabeshima Y., Nabeshima T.

Cognition impairment in the genetic model of aging, klotho gene mutant mice: A role of oxidative stress. *Faseb J.* 17(1) 50-52, (2003)

9) Yang J., Matsukawa N., Rakugi H., Imai M., Kida I., Nagai M., Ohta J., Fukuo K., Nabeshima Y., Ogihara T. Upregulation of cAMP is a new functional signal pathway of Klotho in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 301(2) 424-429 (2003)

10) Nabeshima Y.

Klotho: A fundamental regulator of aging. *Ageing Res. Rev.* 1(4) 627-638 (2002)

11) 鍋島陽一
老化モデルマウス 医学のあゆみ「免疫疾患」 3
36-341 2002

12) 鍋島陽一
Klotho遺伝子と老化 老年消化器病 14巻、
63-66、2002

13) 鍋島陽一
老化モデルとしてのklotho遺伝子変異マウス
ヒト型モデル動物 井上達、野田哲生、野本明男
編 85-94 (2002) シュプリンガー・フェ
アラーク東京

2. 口頭発表

1) Nabeshima Y.
Activation of calcium dependent proteolysis during aging
Development of New Therapy for Muscular Dystrophy --
Progress in Brain Research-- Tokyo Jan. 17, 2002

2) Nabeshima Y.
Molecular function of the Klotho protein
Workshop on Genetics of aging, Human Genome
Meeting Shanghai April 16th 2002

3) Nabeshima Y.
Klotho: A fundamental regulator of calcium homeostasis
The 15th Naito Conference on Molecular Biological
Approaches for intractable diseases (III)
Kanagawa Oct. 4, 2002

4) Nabeshima Y.

Klotho: A fundamental regulator of calcium homeostasis.
The second JSPS science forum in Stockholm
Stockholm Oct. 28, 2002

5) Nabeshima Y.

Klotho: a fundamental regulator of aging. the 4th IIsong
Symposium on aging Seoul Dec. 12, 2002

6) 鍋島陽一

Klotho蛋白の機能と個体老化
第6回遺伝子治療研究会シンポジウム 老化の分子
生物学 3月2日 2002年 大阪

7) 鍋島陽一

カルシウムホメオスタシス制御におけるKlotho蛋白
の役割 日本生化学会シンポジウム 10月17日
京都 2002

8) 鍋島陽一

Klotho蛋白の機能と老化
基礎老化学会シンポジウム 11月30日
京都 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

Klotho蛋白の酵素活性に基づく生理活性物質解析
の開発 出願

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

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

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が血管新生能に関与するという昨年度の研究結果を発展させ、薬剤投与によるklothoマウスでの血管新生能の亢進及び新たに構築したセンダイウイルスコンストラクトを用いたklothoの外的投与による血管新生能の亢進の新規知見を得た。また、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、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の制御をするために、statin系薬剤を投与し、血管新生能への影響を検討した。

一方、klothoのセンダイウイルス (replication-deficient) コンストラクトを作製し、皮膚創傷治療モデルに投与し、klothoの発現と治療の関係を病理組織学的に検討した。

b. 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。

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を発現するセンダイウイルスを構築し、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。センダイウイルスはreplication deficientなストレインを用いているが、P3レベルでの管理が可能な共同研究施設で作業を行った。

C. 研究結果

a. klothoの血管新生促進作用

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。

さらに、klothoの制御を通じた血管新生能の制御の可能性について検討した。Statin系薬剤をklothoマウスに投与したところ、血流改善がみられたことより、老化による血管新生能低下はstatin薬剤の投与で改善する可能性があることを示唆する結果を得た。さらに、新たに作製したklothoのセンダイウイルスコンストラクトを皮膚創傷治療モデルに投与したところ、創傷治療の促進がみられ、血管新生の亢進をともなうことを認めた。Klotho投与が血管新生亢進を促す結果を得た。

b. 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。

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を発現するセンダイウイルスを構築し、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、一酸化窒素のバスタ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。今回明らかにした血管新生に関わる知見は極めて重要である。血管新生は虚血性血管疾患のみならず、癌、網膜の増殖性疾患等様々な疾患の病態に関わる。klotho欠損マウスにおける薬剤投与による血管新生能の制御は高齢者における血管新生能低下の治療法の開発、またセンダイウイルスによるKlothoの外的投与による血管新生能の亢進はklotho投与による新しい血管治療法の開発にそれぞれが糸口となる可能性がある。Klothoが血管新生の制御に関わるならば、klothoを用いた治療戦略はこれらの疾患の治療法の開発につながると期待される。一方、アンジオテンシン負荷に対する腎保護作用は現在重要な社会医学的な問題である腎不全の患者の治療、透析医療の医療費問題の軽減に結びつく可能性がある。すなわち、アンジオテンシンの過剰が病態発症・維持に関わる高血圧症・腎硬化症による腎不全の進行、透析医療への移行を防止・遅延する治療法として、Klothoの遺伝子導入あるいはタンパク投与を用いた治療法の開発が期待される。

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。老化は其中でも遺伝的・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

1. Mitani H, Ishizawa H, Aizawa T, Ohno M, Usui M, Suzuki T, Amaki T, Mori I, Nakamura Y, Sato M, Nangaku M, Hirata Y, Nagai R. Angiotensin II downregulates renal expression of anti-aging gene, klotho, and klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension*. 2002;39:838-43.
2. Fukino K, Suzuki T, Saito Y, Shindo T, Amaki T, Kurabayashi M, Nagai R. Regulation of

Angiogenesis by the Aging Suppressor Gene klotho. *Biochem Biophys Res Commun*.

2002;293:332-7.3. Kamemori M, Ohyama Y, Kurabayashi M, Takahashi K, Nagai R, Furuya N. Expression of Klotho protein in the inner ear. *Hear Res*. 2002;171:103-110.

4. Nakamura T, Saito Y, Ohyama Y, Masuda H, Sumino H, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nagai R, Kurabayashi M. Production of nitric oxide, but not prostacyclin, is reduced in klotho mice. *Jpn J Pharmacol*. 2002;89:149-56.

2. 学会発表

1. 日本循環器学会総会（2002年4月、札幌にて）
天木幹博ら。Mechanisms of maintenance of endothelial function by the aging-suppressor gene Klotho.
2. 日本循環器学会総会（2002年4月、札幌にて）
三谷治夫ら。Angiotensin II downregulates renal expression of anti-aging gene, klotho, and exogenous klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage.
3. アメリカ心臓病学会（2002年11月シカゴにて）
Saito et al. In Vivo Klotho Gene Delivery Protects against Endothelial Dysfunction in Dahl Salt-Sensitive Hypertensive Rats.

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

厚生科学研究費補助金（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）

分担研究報告書

血管機能調節に関する Klotho の役割

研究者 倉林正彦 群馬大学医学部第二内科

研究要旨

高血圧性腎硬化症モデルにおいて、*klotho* mRNA の発現減少と血管内皮機能障害が同時に認められた。*klotho* 遺伝子の導入により、血管内皮機能障害は一部改善し、腎機能障害の進行の抑制が観察された。*klotho* 遺伝子は腎保護作用を有する可能性がある。そのメカニズムは *klotho* 遺伝子による NO 産生の増加や酸化ストレスの減少によると考えられる。

A. 研究目的

klotho 遺伝子は個体老化の抑制機能を有する。*klotho* 遺伝子欠損マウスは著明な動脈硬化、肺気腫、骨粗鬆症などの多彩な老化徴候をきたす。

我々は、*klotho* 遺伝子欠損マウスにおいて、細動脈および大動脈における血管内皮機能の低下と NO 産生の異常を明らかにした。

次に、肥満、高血圧、糖尿病、高脂血症を合併する病態モデルラットにおいても *klotho* mRNA の発現が低下していた。アデノウイルスベクターを用いて *in vivo* で *klotho* 遺伝子を導入することにより血管リモデリングが抑制されことを報告した。以上の結果より、高血圧などの循環器疾患ばかりでなく糖尿病、高脂血症などの代謝異常においても *klotho* 遺伝子が重要な循環調節因子であることが示唆される。

本研究では、分子生物学的手法を用いて、*klotho* 遺伝子による動脈硬化の分子機構の解明と腎不全に対する新しい遺伝子治療への応用を検討する。

B. 研究方法

klotho 遺伝子による動脈硬化抑制の機序を解明する。酸化ストレスは、血管内皮障害を引き起こし、動脈硬化の発症・進展に関与する。*klotho* 蛋白が酸化ストレスを減少させるメカニズムについて分子生物学的手法を用いて明らかにする

腎不全モデルラット (Dahl 食塩感受性高血圧ラット) に対して、アデノウイルスベクターを用いて *in vivo* で *klotho* 遺伝子を導入することにより腎不全の進行を抑制するか否かを検討する。

C. 研究結果

klotho 遺伝子欠損マウスは、野生型に比べ、大動脈に石灰化と内膜肥厚を認めた。アセチルコリン投与前の細動脈径は野生型、ヘテロ、ホモ個体でそれぞれ 49 ± 5 、 43 ± 4 、 33 ± 3 mm であった。アセチルコリン (10^{-5} M) による最大血管拡張反応は野生型、ヘテロ、ホモ個体でそれぞれ 41 ± 5 、 27 ± 3 、 $12 \pm 3\%$ であった。すなわち、*klotho* 遺伝子欠損マウスにおいては、*klotho* 遺伝子発現量に依存した内皮依存性血管弛緩反応が見られた。尿中の NO 代謝産物である NO_2 および NO_3 (NO_x) を、オートアナライザーを用いて測定した。ヘテロ個体の尿中 NO_x は 142 ± 16 nmol/day と野生型 (241 ± 28 nmol/day) に比較し著明に低下していた。また、*klotho* 遺伝子欠損マウスでは大動脈壁の活性酸素の産生が増加傾向を示していた。

6 週令の Dahl 食塩感受性高血圧ラットに 8% 高食塩食または 0.3% 低食塩食を与えた ($n=6$)。11 週令にて、アセチルコリンによる内皮依存性血管弛緩反応、尿中の NO 代謝産物、尿中アルブミンを測定した。次に、マウス膜型 *klotho* cDNA 全長を

含むアデノウイルスベクターを作成した。Klotho 導入群は、8 週令から週 1 回、3 週間 5×10^8 pfu を大腿に筋注した($n=7$)。さらに、腎臓組織の HE 染色を行い、糸球体の腫大と血管周囲の繊維化について検討した。高食塩食の収縮期血圧は 261 ± 11 mmHg に上昇しており(低食塩食 144 ± 7 mmHg)、アセチルコリンによる血管弛緩反応は、低食塩食群 $98 \pm 2\%$ に比べ、 $43 \pm 6\%$ に減弱していた。腎臓における klotho mRNA の発現も有意に減少していた。Klotho 導入群では、筋注をした局所に klotho 遺伝子の発現が認められた。Klotho 導入群の収縮期血圧は 233 ± 6 mmHg であり、アセチルコリンによる血管弛緩反応は、 $61 \pm 9\%$ に改善していた。尿中アルブミンは、無処置のラット(656 ± 220 mg/日)に比べ 96 ± 24 mg/日に減少していた。また、腎臓の組織所見では、klotho 導入群において、糸球体の腫大と血管周囲の繊維化の抑制が認められた。

D. 考察

klotho マウスは動脈硬化、肺気腫、骨粗鬆症、性腺萎縮などの著明な老化徴候を示し、加齢に伴って発症する多くの疾患の成因を解析するための重要なモデルとなることが期待されている。すでに、我々は循環器系の各種病態で klotho 遺伝子の発現が低下していること、Klotho 蛋白が血管内皮保護作用を持つ液性因子である可能性を明らかにし、現在そのメカニズムに酸化ストレスの減少が関与している。klotho 遺伝子導入により腎障害の進行を遅らせることができれば klotho が新たな腎不全に対する治療薬となる可能性がある。klotho 遺伝子の病態生理学的役割を解明できれば、高血圧、心疾患ばかりでなく肺気腫、骨粗鬆症の病態解明や診断、治療に新たな展開をもたらす。さらに、Klotho 蛋白を用いて、新しい予防・治療薬の開発が可能になると期待される。

E. 結論

klotho 遺伝子は、NO 産生の増加や酸化ストレスの減少に働き、心血管系を保護する働きがあると考えられる。

高血圧性腎硬化症モデルにおいて、klotho mRNA の発現減少と血管内皮機能障害が同時に認められた。klotho 遺伝子の導入により、血管内皮機能障害は一部改善し、腎機能障害の進行の抑制が観察された。klotho 遺伝子は腎保護作用を有する可能性がある。

F. 危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. T. Yamagishi, Y. Saito, T. Nakamura, S. Takeda, H. Kanai, H. Sumino, M. Kuro-o, Y. Nabeshima, M. Kurabayashi, R. Nagai. Toroglitazone 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, 2001.
2. K Fukino, T Suzuki, Y Saito, T Shindo, T Amaki, M Kurabayashi, R Nagai. Regulation of angiogenesis by the aging suppressor gene klotho. *Biochem Biophys Res Commun.* 293:332-337, 2002
3. T Nakamura, Y Saito, Y Ohyama, H Masuda, H Sumino, M Kuro-o, Y Nabeshima, R Nagai, M Kurabayashi. Production of nitric oxide, but not prostacyclin, is reduced in klotho mice. *Jpn J Pharmacol.* 89:149-56, 2002

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

ヒト *klotho* 遺伝子のプロモーター解析と老化関連骨軟骨疾患における関与

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： 昨年までの研究で、ヒト *klotho* 遺伝子プロモーター領域の SNP である -395G→A が人種差を超えて高齢女性において骨密度と有意な相関を示すこと、この G→A 変異は核内転写因子との結合能に影響を及ぼすことを報告した。しかしながら本年度の検討で、骨密度と有意な相関を示した SNPs と、変形性脊椎症の重症度および脊椎靭帯骨化症とは有意な相関を示さなかった。また、ヒト *klotho* 遺伝子の転写活性について検討を行ったところ、この G→A 置換は *klotho* の発現効率に大きな変化を及ぼさなかったが、この近傍での deletion study の結果 -410 と -370 の間で有意なルシフェラーゼ活性の低下が見られた。今後は更にプロモーターの詳細な deletion study や mutation study を進めることによって、*klotho* の上流シグナルを検討する予定である。

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。現在までの検討で、*klotho* 遺伝子が老化関連骨軟骨異常疾患の中でも加齢による骨粗鬆化に関与していることが明らかとなった。本研究では、高齢者の骨密度と有意な相関を示したプ

ロモーター領域の SNP と、変形性腰椎症と脊椎靭帯骨化症の重症度との相関を検討した。また、ヒト *klotho* 遺伝子のプロモーター解析を行い、*klotho* の上流シグナルを解明することを目的とした。

B. 研究方法

まず、ゲノムの相関解析については、変形性腰椎症患者および脊椎靭帯骨化症患者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データベースを蓄積した。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、高齢者の骨密度と有意な相関を示したプロモーター領域の SNP (-395G→A) についてその遺伝子型と重症度の相関を検討した。

転写解析については、ルシフェラーゼアッセイによって *klotho* 遺伝子の転写調節部位の探索を行う。既に、転写開始点より上流 1400, 1200, 1000, 800, 500, 410, 370 bp のプロモーター領域をそれぞれルシフェラーゼ遺伝子に結合させた DNA をヒト腎臓由来 293 細胞に導入して安定発現クローンを樹立した。また、上

記のプロモーターの G→A 置換によるルシフェラーゼ活性の変化を検討した。

(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 プロモーター領域の SNP (-395G→A) は、変形性腰椎症患者の重症度を示す Kellgren-Lawrence score とも、脊椎靭帯骨化症患者の重症度を示す骨化椎体数とも有意な相関を示すことはなかった。

② また、既に *klotho* の発現が確認されているヒト腎臓由来 293 細胞において、長さの異なるプロモーター・ルシフェラーゼ DNA の導入細胞クローンを用いて転写活性の検討を行ったところ、上記のプロモーターの G→A 置換は *klotho* の発現効率に大きな変化を及ぼさなかった。しかしながら、この近傍で deletion study を行ったところ、-410 と -370 の間で有意なルシフェラーゼ活性の低下が見られた ($p=0.04$)。

D. 考察

今回の検討で、*klotho* 遺伝子は加齢に伴う骨粗鬆化に関与しているものの、変形性腰椎症や脊椎靭帯骨化症など、他の老化関連骨軟骨疾患には関与していないことが示された。我々が既にヒト *klotho* マイクロサテライト多型の解析で示したように、変形性腰椎症や脊椎靭帯骨化症の発症・進展において慢性的・持続的な力学的負荷の蓄積などの環境因子の関与が重要であると考えられた。

今後は更にプロモーターの deletion study や mutation study を進めて、ル

シフェラーゼ assay によって転写調節部位の探索を行う。また、転写制御因子を同定することによって *klotho* の上流シグナルを検討する。これを契機として、老化の分子メカニズムの解明に迫れる可能性がある。

E. 結論

ヒト *klotho* 遺伝子プロモーターの deletion study を行ったところ、-410 と -370 の間で有意なルシフェラーゼ活性の低下が見られた。今後は更に転写調節部位の探索を行い、転写制御因子を同定することによって *klotho* の上流シグナルを検討する。これを契機として、老化の分子メカニズムの解明に迫れる可能性がある。

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) Ogata N, Koshizuka Y, Miura T, Iwasaki M, Hosoi T, Shiraki M, Seichi A, Nakamura K, and Kawaguchi H: Association of bone metabolism regulatory factor gene polymorphisms with susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine and its severity. *Spine* 27: 1765-1771, 2002.
 - 6) Ogata N, Matsumura Y, Shiraki M, Kawano K, Koshizuka Y, Hosoi T, Nakamura K, Kuro-o M, and Kawaguchi H: Association of *klotho* gene polymorphism with bone density and spondylosis of the lumbar spine in postmenopausal women. *Bone* 31: 37-42, 2002.
 - 7) Ogata N, Shiraki M, Hosoi T, Koshizuka Y, Nakamura K, and Kawaguchi H: A polymorphic variant at the Werner helicase (*wrn*) gene is associated with bone density, but not spondylosis, in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab* 19: 296-301, 2001.
 - 8) Kawano K, Ogata N, Chiano M, Molloy H, Kleyn P, Spector TD, Uchida M, Hosoi T, Suzuki T, Orimo h, Inoue S, Nabeshima Y, Nakamura K, Kuro-o M, and Kawaguchi H: *Klotho* gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 17:1744-1751, 2002.
 - 9) 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.
 - 10) 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髄造血異常のメカニズム. 日本骨代謝学会雑誌 16 (4): 152-154, 1999.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) 川口浩: 骨粗鬆症の発症機構 - Reverse genetics と forward genetics からの解明 -. 組織培養工学 26 (14) (特集: 骨粗鬆症研究

- の最近の進歩): 553-556, 2000.
- 18) 川口浩: 骨粗鬆症と老化. 医学のあゆみ (特集: 骨粗鬆症の基礎と臨床) 198 (9): 559-562, 2001.
 - 19) 川口浩: 加齢と骨. 単行本「新臨床医のための分子医学シリーズ: 骨・軟骨代謝と注目の骨疾患 - 骨新生から骨疾患の病態解明・治療まで -」(松本俊夫編) (羊土社): 96-104, 2002.
 - 20) 筑田博隆、川口浩: 骨・血管関連に関わる遺伝子 - MGP, *klotho*, OPG -. クリニカルカルシウム (骨と血管の異常 - 遺伝子からのアプローチ -) 12 (3): 368-372, 2002.
 - 21) 川口浩: Reverse & forward geneticsからの骨軟骨疾患へのアプローチ - 老化による骨粗鬆化メカニズムの解明をめざして. 整形外科 53 (12): 1569-1579, 2002.
 - 22) 川口浩: 老化による骨粗鬆化の分子メカニズム. 生体の科学 (特集: 加齢の克服 - 21世紀の課題) 53 (5): 490-496, 2002.
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: 骨髄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) 川口浩: 骨粗鬆症の病態解明と治療、その最前線. 東海炎症研究会研修講演会. 2002. 6. 22 (名鉄ニューグランドホテル、名古屋).
 - 11) 川口浩: 骨粗鬆症の病態解明と治療の最前線. 旭川整形外科医会(三木会). 2002. 6. 27 (旭川グランドホテル、北海道).
 - 12) 川口浩: 老化による骨粗鬆化の分子メカニズム. 第22回骨形態計測学会 (ランチョンセミナー). 2002. 6. 29 (東京女子医科大学弥生講堂、東京).
 - 13) 川口浩: 骨粗鬆症の病態解明と治療の最前線. 第5回城東整形外科医会. 2002. 7. 13 (東京マリオットホテル錦糸町、東京).
 - 14) 川口浩: 骨粗鬆症の病態と治療. いわき市整形外科医会. 2002. 8. 30 (福島県).
 - 15) 川口浩: 骨粗鬆化の分子メカニズム - ノックアウトマウスとゲノム解析からのアプローチ -. 第15回京滋骨粗鬆症研究会. 2002. 10. 5 (京都国際ホテル、京都).
 - 16) 川口浩: 骨粗鬆症 (骨代謝) - 基礎と臨床の接点 -. 第51回東日本整形災害外科学会 (シンポジウム: 整形外科基礎研究と臨床の接点). 2002. 10. 24 (ホテルハマツ、福島).
 - 17) 川口浩: 骨粗鬆化の病態解明と治療の最前線. 第3回骨粗鬆症学術講演会. 2003. 1. 25 (宇都宮グランドホテル、栃木).
 - 18) 川口浩: 変形性関節症病態解明への新たな視点. 厚生労働省厚生科学研究公開シンポジウム. 2003.
 - 19) 穴水依人、小柳清光、松原四郎、河上江美子、星地垂都司、川口浩、中村耕三: Klotho マウス: 脊髄前角細胞、前根と骨格筋の所見について. 第44回日本神経病理学会. 2003. 5. 29-31 (名古屋、愛知).
 - 20) 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)
 - 21) 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).
 - 22) Hiroshi Kawaguchi: Involutional osteoporosis: New theory. 1st Scientific Meeting of the Asia-Pacific Menopause Federation. 2001. 5. 26-29 (Seoul, Korea).
 - 23) 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