

20030365

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鍋島陽一

平成16年(2004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-----	6
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-----	12
倉林正彦	
4. Klotho の骨疾患における意義、遺伝子多型解析 -----	14
川口 浩	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	17
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。

免疫沈降、質量分析によりKlotho蛋白結合分子を同定した。Klotho蛋白はGRP78、カルネキシン、Na⁺/K⁺ATPaseと結合していた。Na⁺/K⁺ATPaseは細胞内外のK、Naのバランス制御、細胞内外の物質輸送、浸透圧などを制御する極めて重要な分子であるが、遠位尿細管、脈絡膜細胞では特別に高発現しており、Klotho蛋白と複合体を形成し、遠位尿細管、脈絡膜細胞におけるカルシウム輸送能を制御している。（２）Klotho蛋白が1 α -hydroxylaseの発現を負に制御するネットワークを構成する分子であることが明らかとなった。活性型ビタミンDはカルシウムチャンネル、カルビンデインD28K、klotho遺伝子の発現上昇を介してカルシウム輸送の亢進をもたらし、ついで、発現上昇したKlotho蛋白が1 α -hydroxylaseの発現を負に制御することによって活性型ビタミンD濃度を下方修正する仕組みとなっており、カルシウムの恒常性を維持している。（３）Klotho蛋白の酵素活性を解析したところ、 β -Glucuronidase活性を示した。基質特異性が極めて高く、ステロイドにグルクロン酸が結合した分子のみが基質として作用を受けることが明らかとなった。生理活性ステロイドの活性化の制御がKlotho蛋白の作用機構の本質であると推定され、新たな生理活性ステロイドの探索へと研究を展開している。

下肢虚血モデルを作製し、klothoヘテロマウスで血管新生能が低下していることを確認した。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かった。次いで、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。

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。また、本系において、鉄のキレートとフリー・ラジカル・スカベンジャーがklothoの発現を低下させ、制御をもたらすことを明らかにした。

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。

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、この近傍で欠失変異解析の結果、-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。

klothoマウスおよびklotho過剰発現ラットにおいて、活性酸素種の産生、酸化ストレスマーカーの変化を検討した。また、食塩感受性Dahlラットにアデノウイルスをベクターとしてklotho遺伝子を導入し、活性酸素種の産生を検討した。その結果klotho過剰発現ラットでは、尿中イソプロスタンレベルが野生型に比し、低値であった。klotho遺伝子を導入した食塩感受性Dahlラットでは非導入ラットに比較し活性酸素種の産生が抑制された。したがって、klotho遺伝子は酸化ストレスを減少させる作用をもつと考えられる。

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

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。

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）

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。測定感度の向上、安定性など、キット化のための検討を行った。

(2) Klotho蛋白が結合あるいは修飾する生体内分子の同定

免疫沈降、質量分析によりklotho結合蛋白を同定した。ついで、結合蛋白に対する抗体により、野生型では結合蛋白が同定できるが、ノックアウトでは結合蛋白が共沈しないことを確認した。

分泌型klothoを大量に精製し、人工基質を用いて酵素活性、指摘条件を検討した。ついで、市販されているステロイドグルクロニドを用いて基質となるかどうかを検討した。

(3) 生体恒常性の維持におけるKlothoの役割について

Klotho遺伝子はカルシウムホメオスタシス・電解質代謝制御の場である腎尿細管、副甲状腺、脳の脈絡膜で発現しており、関連する分子であるNa/K ATPase, PMCA, NCX, カルシウムチャンネルなどの機能を細胞生理学的手法と分子薬理学的手法で解析した。

(4) 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的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。

(5) 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。

(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。

(7) Klotho遺伝子欠損マウスと過剰発現ラットを用いて、①酸化のマーカーである血中・尿中イソプロスタノールを測定する。②酸化ストレスの原因である活性酸素をin situで染色する。③腎不全モデルラットにklotho遺伝子を導入し、臓器障害が改善するか否かを明らかにする。

(8) 変形性腰椎症患者および脊椎韌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。次いで、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った。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た。

センダイウイルスはreplication deficientなストレーンを用いているが、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。

ヒトサンプル、個人情報、および解析結果は厳重に保管し秘密を厳守している。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している。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) 血清Klotho蛋白の濃度測定による診断システムの開発

ヒト・マウス血清中より130 kDの分泌型蛋白を見だし、サンドイッチエライザー測定システムを構築した。本システムにより血清値の測定、研究における利用が可能となった。予備的なデータではあるが、Klothoの血清濃度には個体差がかなりあること、腎不全患者血中にもかなりの量が存在することが明らかとなっている。また、ヒト血清中に多量のKlotho蛋白 (健常者の10倍程度) が存在する患者が見つかり、カルシウム代謝異常症を示す原因不明患者の解析を開始した。

(2) Klotho蛋白の酵素活性の解析と生体内基質の同定、医薬品開発への発展

Klotho蛋白は β -Glucuronidase活性を示した。基質特異性が極めて高く、ステロイド-グルクロニドからグルクロン酸を切り取る β -グルクロニダーゼ活性を有している。生理活性ステロイドの活性化の制御がKlotho蛋白の作用機構の本質であると推定される。

(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

klotho遺伝子はカルシウムホメオスタシスの中枢である腎遠位尿細管、脳の脈絡膜、副甲状腺で強く発現していた。腎遠位尿細管ではEcaC、カルビンデインD28K、NCX、Klotho蛋白が共発現しており、Na⁺/K⁺ ATPaseが強く発現していた。この結果は、Klotho発現細胞はカルシウム輸送において特殊な機能を担う細胞であることを示している。免疫沈降、質量分析によりKlotho結合蛋白としてGRP78、カルネキシン、Na⁺/K⁺ ATPaseを同定した。GRP78、カルネキシンはシャペロンとしてKlotho蛋白の成熟、細胞内輸送の制御に関わっている。Klotho蛋白はNa⁺/K⁺ ATPaseと複合体を形成し、この複合体の機能制御を介して遠位尿細管、脈絡膜細胞におけるカルシウム輸送能を制御しており、実際に、klotho欠損マウスでは、腎臓での再吸収異常、脈絡膜でのカルシウム輸送能異常がおこる。

Klotho蛋白が1 α -hydroxylase (活性型ビタミンD合成の律速酵素) の発現を負に制御するネットワークを構成する分子であることが明らかとなった。活性型ビタミンDはカルシウムチャンネル、カルビンデインD28K、klotho遺伝子の発現上昇を介してカルシウム輸送の亢進をもたらす。ついで、発現上昇したKlotho蛋白が1 α -hydroxylaseの発現を負に制御することによって活性型ビタミンD濃度を下方修正する仕組みとなっている。

(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。また、本系において、鉄のキレートとフリー・ラジカル・スカベンジャーがklothoの発現を低下させ、制御をもたらすことを明らかにした。

(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) 尿中イソプロスタニン(8-iso prostaglandin F₂ alpha)は、過剰発現ラット(102 ± 4 pg/ml Cr)で、野生型ラット(145 ± 6 pg/ml Cr)より明らかに低値であった(n=9, P<0.01)。内皮依存性血管弛緩反応は、過剰発現ラットで低下が軽度であった(54 ± 5 % vs. 41 ± 3 %, n=11, p<0.05)。②大動脈壁の活性酸素の産生は、klothoマウスで増加していた。③腎硬化症を発症したダール食塩感受性ラットでは、klotho遺伝子の発現が低下していた。klotho遺伝子の導入は、活性酸素の産生を抑制した。

(8) 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

Klotho結合蛋白の解析によりNa⁺/K⁺ ATPaseが見いだされたことは極めて重要である。Na⁺/K⁺ ATPaseは細胞内外のK, Naのバランス制御、細胞内外の物質輸送、浸透圧などを制御する極めて重要な分子であるが、遠位尿細管、脈絡膜細胞では特別に高発現しており、今回の解析によりNa⁺/K⁺ ATPaseが体液のカルシウム濃度の維持のために重要な役割を担っていることを明らかにしたことは、今後の研究に一石を投じることとなり、新たな研究の視点を与えることとなった。細胞外カルシウム濃度を感知する機構、感知したシグナルがカルシウム制御を司る分子の機能に変換される機構については未だ多くの

疑問が残されているが、本研究により新たな発展の道が切り開かれた。

活性型ビタミンD濃度の亢進が多様な変異症状の重要な要因となっていることが明らかとなり、予想を越えた現象にビタミンDが関与していることが明らかとなり、今後の臨床研究の発展へと結びつくことが期待される。

ヒト・マウス血清中より130 kDの分泌型蛋白を見だし、この分泌蛋白を高感度に認識できる新たな抗体を分離し、サンドイッチエライザー系の構築を試み、測定に利用できる感度を示す測定システムを構築した。広く市販するには血清の保存法など、検討すべき課題は残されているが、当面、本システムにより血清値の測定、研究における利用が可能となった。また、ヒト血清中に多量のKlotho蛋白(健常者の10倍程度)が存在する患者が見つかった。カルシウム代謝異常症には原因不明の患者が半数ほどおり、それらの患者についての解析により、あらたな疾患概念の確立へと発展することが期待される。

Klotho蛋白はβ-Glucuronidase活性を示した。基質特異性が極めて高く、ステロイドにグルクロン酸が結合した分子のみが基質として作用を受けることが明らかとなった。生理活性ステロイドの活性化の制御がKlotho蛋白の作用機構の本質であると推定され、ステロイドの活性制御システム、作用システムについての新たな考え方や、新たな生理活性ステロイドの探索へと研究が発展することが期待される。

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。今回明らかにした血管新生に関わる見解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。

klotho遺伝子が酸化ストレスの抑制に関与していることを明らかにした。今後、klotho遺伝子による酸化ストレス調節のシグナル伝達を解明する必要がある。酸化ストレスは臓器障害の原因として知られているが、酸化ストレスを減らす有効な手段は少ない。klotho遺伝子が酸化ストレスを減少させる機序は十分検討されていない。klotho蛋白が酸化ストレスを抑制する機序が解明されれば、老化や心血管病の新たな治療薬となる可能性がある。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。

今後は詳細な解析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) 免疫沈降、質量分析により *Klotho* 蛋白結合分子を同定した。*Klotho* 蛋白は GRP78, カルネキシン, Na⁺/K⁺ATPase と結合していた。Na⁺/K⁺ATPase は細胞内外の K, Na のバランス制御、細胞内外の物質輸送、浸透圧などを制御する極めて重要な分子であるが、遠位尿細管、脈絡膜細胞では特別に高発現しており、*Klotho* 蛋白と複合体を形成し、遠位尿細管、脈絡膜細胞におけるカルシウム輸送能を制御している。(2) *Klotho* 蛋白が 1 α -hydroxylase の発現を負に制御するネットワークを構成する分子であることが明らかとなった。活性型ビタミン D はカルシウムチャンネル、カルビンデイン D28K、*klotho* 遺伝子の発現上昇を介してカルシウム輸送の亢進をもたらす、ついで、発現上昇した *Klotho* 蛋白が 1 α -hydroxylase の発現を負に制御することによって活性型ビタミン D 濃度を下方修正する仕組みとなっており、カルシウムの恒常性を維持している。

(3) *Klotho* 蛋白の酵素活性を解析したところ、 β -Glucuronidase 活性を示した。基質特異性が極めて高く、ステロイドにグルクロン酸が結合した分子のみが基質として作用を受けることが明らかとなった。生理活性ステロイドの活性化の制御が *Klotho* 蛋白の作用機構の本質であると推定され、新たな生理活性ステロイドの探索へと研究を展開している。

(4) 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。

(5) 酸化ストレスは臓器障害の原因として知られているが、酸化ストレスを減らす有効な手段は少ない。*Klotho* 遺伝子が酸化ストレスを抑制する事が示唆された。*klotho* 遺伝子が加齢・心血管病による臓器傷害の新たな治療薬となる可能性がある。

(6) 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) Tohyama O., Imura A., Iwano A., Jean Noel Freund, Henriessat B. Fujimori T., Nabeshima Y.

Klotho is a novel β -glucuronidase capable of hydrolyzing steroid α -glucuronides. J. Biol

Chem. in press

2) K Takeshita, T Fujimori, Y Kurotaki, H Honjo, Hiroshi Tsujikawa, K Yasui, J-K Lee, K Kamiya, K Kitaichi, K Yamamoto, M Ito, T Kondo, S Iino, Y Inden, M Hirai, T Murohara, I Kodama, Y. Nabeshima Sinoatrial Node Dysfunction and Early Unexpected Death of Mice with a Defect of *Klotho* Gene Expression. Circulation in press

3) Tsujikawa H., Kurotaki Y., Fujimori T., Fukuda K., Nabeshima Y. *Klotho*, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. Molecular Endocrinology 17: 2393-2403 (2003)

4) 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)

5) 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)

6) Yahata K, Mori K, Mukoyama M, Sugawara A, Suganami T, Makino H, Nagae T, Fujinaga Y, Nabeshima Y, Nakao K. Regulation of stanniocalcin 1 and 2 expression in the kidney by *klotho* gene. Biochem Biophys Res Commun Oct 10;310(1):128-34. (2003)

7) Saito K, Ishizaka N, Mitani H, Ohno M, Nagai R. Iron chelation and a free radical scavenger suppress angiotensinII-induced downregulation of *klotho*, an anti-aging gene, in rat. FEBS Lett. 2003;551:58-62.

口頭発表

H. Tsujikawa, T. Fujimori, T. Yoshida, Y. Tsuji and Y. Nabeshima

KLOTHO, A GENE RELATED TO A SYNDROME RESEMBLING HUMAN PREMATURE AGING, FUNCTIONS IN A NEGATIVE REGULATORY CIRCUIT OF VITAMIN D ENDOCRINE SYSTEM 16th Vitamin D conference Maastricht, July 8, 2003 Nabeshima Y.

KLOTHO: A Fundamental Regulator of Calcium Homeostasis

UK-Japan Symposium on "Horizon in Ageing". Newcastle, Sept. 15, 2003

Yuichiro Saito, Tetsuya Nakamura, Masahiko

Kurabayashi, Ryozi Nagai. Overexpression of the klotho gene reduces oxidative stress and ameliorates endothelial function in rats.

American Heart Association Scientific Sessions
2003. Orland, FL, USA. Nov 10, 2003.

鍋島陽一

Klotho蛋白の機能と個体老化

医学会総会 教育講演 博多 福岡国際会議場

鍋島陽一

健康老化は人類の夢 分子生物「春のシンポジウム」
公開講座

米子 平成15年5月11日

鍋島陽一

遺伝子時代の老いと健康を考える

東京テクノフォーラム記念講演 平成15年4月16日 東京

鍋島陽一

Klotho遺伝子：健康老化は人類の夢

電力館科学ゼミナール 東京 平成15年9月20日

斎藤勇一郎、中村哲也、角野博之、坂本浩之助、黒尾誠、倉林正彦、永井良三。klothoマウスは一酸化窒素産生異常と食塩感受性高血圧を呈する。第26回日本高血圧学会。宮崎。平成15年10月30日。

川口浩：老人性骨粗鬆症の発症機序。第26回日本医学会総会（シンポジウム：骨粗鬆症の解明）。

2003. 4. 4-6（福岡）。

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・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

免疫沈降、質量分析によりKlotho蛋白結合分子を同定した。Klotho蛋白はGRP78、カルネキシン、Na⁺/K⁺ATPaseと結合していた。Na⁺/K⁺ATPaseは細胞内外のK、Naのバランス制御、細胞内外の物質輸送、浸透圧などを制御する極めて重要な分子であるが、遠位尿細管、脈絡膜細胞では特別に高発現しており、Klotho蛋白と複合体を形成し、遠位尿細管、脈絡膜細胞におけるカルシウム輸送能を制御している。(2) Klotho蛋白が1 α -hydroxylaseの発現を負に制御するネットワークを構成する分子であることが明らかとなった。活性型ビタミンDはカルシウムチャンネル、カルビンデインD28K、klotho遺伝子の発現上昇を介してカルシウム輸送の亢進をもたらす、ついで、発現上昇したKlotho蛋白が1 α -hydroxylaseの発現を負に制御することによって活性型ビタミンD濃度を下方修正する仕組みとなっており、カルシウムの恒常性を維持している。(3) Klotho蛋白の酵素活性を解析したところ、 β -Glucuronidase活性を示した。基質特異性が極めて高く、ステロイドにグルクロン酸が結合した分子のみが基質として作用を受けることが明らかとなった。生理活性ステロイドの活性化の制御がKlotho蛋白の作用機構の本質であると推定され、新たな生理活性ステロイドの探索へと研究を展開している。

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蛋白の酵素活性の解析と生体内基質の同定(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に成功し、サンドイッチエライザー系を構築した。測定感度の向上、安定性など、キット化のための検討を行った。

(2) Klotho蛋白が結合あるいは修飾する生体内分子の同定

免疫沈降、質量分析によりklotho結合蛋白を同定した。ついで、結合蛋白に対する抗体により、野生型では結合蛋白が同定できるが、ノックアウトでは結合蛋白が共沈しないことを確認した。

分泌型klothoを大量に精製し、人工基質を用いて酵素活性、指摘条件を検討した。ついで、市販されているステロイドグルクロニドを用いて基質となるかどうかを検討した。

(3) 生体恒常性の維持におけるKlothoの役割について

Klotho遺伝子はカルシウムホメオスタシス・電解質代謝制御の場である腎尿細管、副甲状腺、脳の脈絡膜で発現しており、関連する分子であるNa/K ATPase、PMCA、NCX、カルシウムチャンネルなどの機能を細胞生理学的手法と分子薬理学的手法で解析した。

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

ヒト・マウス血清中より130kDの分泌型蛋白を見だし、サンドイッチエライザー測定システムを構築した。本システムにより血清値の測定、研究における利用が可能となった。予備的なデータではあるが、Klothoの血清濃度には個体差がかなりあること、腎不全患者血清中にもかなりの量が存在することが明らかとなっている。また、ヒト血清中に多量のKlotho蛋白(健常者の10倍程度)が存在する患者が見つかり、カルシウム代謝異常症を示す原因不明患者の解析を開始した。

(2) Klotho蛋白の酵素活性の解析と生体内基質の同定、医薬品開発への発展

Klotho蛋白は β -Glucuronidase活性を示した。基質特異性が極めて高く、ステロイド-グルクロニドからグルクロン酸を切り取る β -グルクロニダーゼ活性を有している。生理活性ステロイドの活性化の制御がKlotho蛋白の作用機構の本質であると推定される。

(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

klotho遺伝子はカルシウムホメオスタシスの中枢である腎遠位尿細管、脳の脈絡膜、副甲状腺で強く発現していた。腎遠位尿細管ではEcaC、カルビンデインD28K、NCX、Klotho蛋白が共発現しており、Na⁺/K⁺ATPaseが強く発現していた。この結果は、Klotho発現細胞はカルシウム輸送において特殊な機能を担う細胞であることを示している。免疫沈降、質量分析によりKlotho結合蛋白としてGRP78、カルネキシン、Na⁺/K⁺ATPaseを同定した。GRP78、カルネキシンはシャペロンとしてKlotho蛋白の成熟、細胞内輸送の制御に関わっている。Klotho蛋白はNa⁺/K⁺ATPaseと複合体を形成し、この複合体の機能制御を介して遠位尿細管、脈絡膜細胞におけるカルシウム輸送能を制御しており、実際に、klotho欠損マウスでは、腎臓での再吸収異常、脈絡膜でのカルシウム輸送能異常がおこる。

Klotho蛋白が1 α -hydroxylase(活性型ビタミンD合成の律速酵素)の発現を負に制御するネットワークを構成する分子であることが明らかとなった。

活性型ビタミンDはカルシウムチャンネル、カルビンデインD 28 K、*klotho*遺伝子の発現上昇を介してカルシウム輸送の亢進をもたらす、ついで、発現上昇したKlotho蛋白が 1α -hydroxylaseの発現を負に制御することによって活性型ビタミンD濃度を下方修正する仕組みとなっている。

D. 考察

Klotho結合蛋白の解析により Na^+/K^+ ATPaseが見いだされたことは極めて重要である。 Na^+/K^+ ATPaseは細胞内外のK, Naのバランス制御、細胞内外の物質輸送、浸透圧などを制御する極めて重要な分子であるが、遠位尿細管、脈絡膜細胞では特別に高発現しており、今回の解析により Na^+/K^+ ATPaseが体液のカルシウム濃度の維持のために重要な役割を担っていることを明らかにしたことは、今後の研究に一石を投じることとなり、新たな研究の視点を与えることとなった。細胞外カルシウム濃度を感知する機構、感知したシグナルがカルシウム制御を司る分子の機能に変換される機構については未だ多くの疑問が残されているが、本研究により新たな発展の道が切り開かれた。

活性型ビタミンD濃度の亢進が多彩な変異症状の重要な要因となっていることが明らかとなり、予想を越えた現象にビタミンDが関与していることが明らかとなり、今後の臨床研究の発展へと結びつくことが期待される。

ヒト・マウス血清中より130 kDの分泌型蛋白を見いだし、この分泌蛋白を高感度に認識できる新たな抗体を分離し、サンドイッチエライザー系の構築を試み、測定に利用できる感度を示す測定システムを構築した。広く市販するには血清の保存法など、検討すべき課題は残されているが、当面、本システムにより血清値の測定、研究における利用が可能となった。また、ヒト血清中に多量のKlotho蛋白(健常者の10倍程度)が存在する患者が見つかった。カルシウム代謝異常症には原因不明の患者が半数ほどおり、それらの患者についての解析により、あらたな疾患概念の確立へと発展することが期待される。

Klotho蛋白は β -Glucuronidase活性を示した。基質特異性が極めて高く、ステロイドにグルクロン酸が結合した分子のみが基質として作用を受けることが明らかとなった。生理活性ステロイドの活性化の制御がKlotho蛋白の作用機構の本質であると推定され、ステロイドの活性制御システム、作用システムについての新たな考え方や、新たな生理活性ステロイドの探索へと研究が発展することが期待される。

E. 結論

免疫沈降、質量分析によりKlotho蛋白結合分子を同定した。Klotho蛋白はGRP78, カルネキシン、 Na^+/K^+ ATPaseと結合していた。 Na^+/K^+ ATPaseは細胞内外のK, Naのバランス制御、細胞内外の物質輸送、浸透圧などを制御する極めて重要な分子であるが、遠位尿細管、脈絡膜細胞では特別に高発現しており、Klotho蛋白と複合体を形成し、遠位尿細管、脈絡膜細胞におけるカルシウム輸送能を制御している。

(2) Klotho蛋白が 1α -hydroxylaseの発現を負に制御するネットワークを構成する分子であることが明らかとなった。活性型ビタミンDはカルシウムチャンネル、カルビンデインD 28 K、*klotho*遺伝子の発現上昇を介してカルシウム輸送の亢進をもたら

し、ついで、発現上昇したKlotho蛋白が 1α -hydroxylaseの発現を負に制御することによって活性型ビタミンD濃度を下方修正する仕組みとなっており、カルシウムの恒常性を維持している。(3) Klotho蛋白の酵素活性を解析したところ、 β -Glucuronidase活性を示した。基質特異性が極めて高く、ステロイドにグルクロン酸が結合した分子のみが基質として作用を受けることが明らかとなった。生理活性ステロイドの活性化の制御がKlotho蛋白の作用機構の本質であると推定され、新たな生理活性ステロイドの探索へと研究を展開している。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tohyama O., Imura A., Iwano A., Jean Noel Freund, Henrissat B. Fujimori T., Nabeshima Y.

Klotho is a novel β -glucuronidase capable of hydrolyzing steroid β -glucuronides. J. Biol Chem. in press

2) K Takeshita, T Fujimori, Y Kurotaki, H Honjo, Hiroshi Tsujikawa, K Yasui, J-K Lee, K Kamiya, K Kitaichi, K Yamamoto, M Ito, T Kondo, S Iino, Y Inden, M Hirai, T Murohara, I Kodama, Y. Nabeshima Sinoatrial Node Dysfunction and Early Unexpected Death of Mice with a Defect of Klotho Gene Expression. Circulation in press

3) Tsujikaw H., Kurotaki Y., Fujimori T., Fukuda K., Nabeshima Y.

Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. Molecular Endocrinology 17: 2393-2403 (2003)

4) 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)

5) 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)

6) Yahata K, Mori K, Mukoyama M, Sugawara A, Suganami T, Makino H, Nagae T, Fujinaga Y, Nabeshima Y., Nakao K. Regulation of stanniocalcin 1 and 2 expression in the kidney by *klotho* gene. Biochem Biophys Res Commun Oct 10;310(1):128-34. (2003)

口頭発表

H. Tsujikawa, T. Fujimori, T. Yoshida, Y. Tsuji

and Y. Nabeshima

KLOTHO, A GENE RELATED TO A SYNDROME
RESEMBLING HUMAN PREMATURE AGING,
FUNCTIONS IN A NEGATIVE REGULATORY
CIRCUIT OF VITAMIN D ENDOCRINE SYSTEM

16th Vitamin D conference Maastricht , July 8, 2003

Nabeshima Y.

KLOTHO: A Fundamental Regulator of Calcium
Homeostasis

UK-Japan Symposium on "Horizon in Ageing".

Newcastle, Sept. 15, 2003

鍋島陽一

Klotho蛋白の機能と個体老化

医学会総会 教育講演 博多 福岡国際会議場

鍋島陽一

健康老化は人類の夢 分子生物「春のシンポジウム」

公開講座

米子 平成15年5月11日

鍋島陽一

遺伝子時代の老いと健康を考える

東京テクノフォーラム記念講演 平成15年4月1

6日 東京

鍋島陽一

Klotho遺伝子：健康老化は人類の夢

電力館科学ゼミナール 東京 平成15年9月20

日

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

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

下肢虚血モデルを作製し、klotho ヘテロマウスで血管新生能が低下していることを確認した。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かった。次いで、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。

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。また、本系において、鉄のキレートとフリー・ラジカル・スカベンジャーが klotho の発現を低下させ、制御をもたらすことを明らかにした。

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。

1. 研究目的

循環器疾患の多くは、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。

2. 研究方法

以下に研究計画及び方法を列挙する

・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。

・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。

・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。

3. 研究結果及び考察

（結果）

・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。

・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。また、本系において、鉄のキレートとフリー・ラジカル・スカベンジャーが klotho の発現を低下させ、制御をもたらすことを明らかにした。

・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。

（考察）

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につながることを期待される。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. 評価

1) 達成度について

本研究の目的である klotho 因子の分子機能の解明、さらに循環器病態での病態機序解明に関して、成果をあげることができた。よって、数字で達成度の自己評価は 80% である。klotho 分子の作用メカニズムが不十分であるための評価である。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

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。一方、アンジオテンシン負荷に対する腎保護作用は現在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。

3) 今後の展望について

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につながることを期待される。一方、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。

5. 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。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表 5件
原著論文による発表 0件
それ以外（レビュー等）の表 3件
そのうち主なもの

論文発表

・ Saito Y, Kurabayashi M, Nagai R. Nippon Rinsho. 2004;62:65-70.
・ Ishizaka N, Mitani H, Nagai R. Angiotensin II regulates klotho gene expression. Nippon Rinsho. 2002;60:1935-9.
・ Saito Y, Kuroo M, Nabeshima Y, Nagai R. klotho gene. Nippon Rinsho. 2000;58:561-5.

学会発表

・ 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.
・ 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.

2) 海外

口頭発表 1件
原著論文による発表 5件
それ以外（レビュー等）の発表 1件
そのうち主なもの

論文発表

・ Saito K, Ishizaka N, Mitani H, Ohno M, Nagai R. Iron chelation and a free radical scavenger suppress angiotensinII-induced downregulation of klotho, an anti-aging gene, in rat. FEBS Lett. 2003;551:58-62.
・ 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.
・ 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.

・ Kamemori M, Ohyama Y, Kurabayashi M, Takahashi K, Nagai R, Furuya N. Expression of Klotho protein in the inner ear. Hear Res. 2002;171:103-10.

・ Nakamura T, Saito Y, Ohyama Y, Masuda H, Sumino H, Kuroo 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.

・ Nagai R, Saito Y, Ohyama Y, Aizawa H, Suga T, Nakamura T, Kurabayashi M, Kuroo M. Endothelial dysfunction in the klotho mouse and downregulation of klotho gene expression in various animal models of vascular and metabolic diseases. Cell Mol Life Sci. 2000;57:738-46.

学会発表

・ 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.

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）。

なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

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

研究者 倉林正彦 群馬大学大学院医学系研究科臓器病態内科学

klotho マウスおよび klotho 過剰発現ラットにおいて、活性酸素種の産生、酸化ストレスマーカーの変化を検討した。また、食塩感受性 Dahl ラットにアデノウイルスをベクターとして klotho 遺伝子を導入し、活性酸素種の産生を検討した。その結果 klotho 過剰発現ラットでは、尿中イソプロスタニンレベルが野生型に比し、低値であった。klotho 遺伝子を導入した食塩感受性 Dahl ラットでは非導入ラットに比較し活性酸素種の産生が抑制された。したがって、klotho 遺伝子は酸化ストレスを減少させる作用をもつと考えられる。

1.研究の目的

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 遺伝子が酸化ストレスを減少させる効果をもつか否かを分子生物学的手法を用いて明らかにする

2.研究方法

klotho 遺伝子欠損マウスと過剰発現ラットを用いて、①酸化のマーカーである血中・尿中イソプロスタニンを測定する。②酸化ストレスの原因である活性酸素を in situ で染色する。③腎不全モデルラットに klotho 遺伝子を導入し、臓器障害が改善するか否かを明らかにする。

(倫理面への配慮)

群馬大学附属動物実験施設の利用基準に従った。

3.研究の結果と考察

尿中イソプロスタニン (8-iso prostaglandin F2

alpha)は、過剰発現ラット(102 ± 4 pg/ml Cr)で、野生型ラット(145 ± 6 pg/ml Cr)より明らかに低値であった ($n=9$, $P<0.01$). 内皮依存性血管弛緩反応は、過剰発現ラットで低下が軽度であった (54 ± 5 % vs. 41 ± 3 %, $n=11$, $p<0.05$). ②大動脈壁の活性酸素の産生は、klotho マウスで増加していた。③腎硬化症を発症したダール食塩感受性ラットでは、klotho 遺伝子の発現が低下していた。klotho 遺伝子の導入は、活性酸素の産生を抑制した。

4.評価

1)達成度について

klotho 遺伝子が酸化ストレスの抑制に関与していることを明らかにした。今後、klotho 遺伝子による酸化ストレス調節のシグナル伝達を解明する必要がある。

2)学術・国際・社会的意義

酸化ストレスは臓器障害の原因として知られているが、酸化ストレスを減らす有効な手段は少ない。klotho 遺伝子が酸化ストレ

スを減少させる機序は十分検討されていない。klotho 蛋白が酸化ストレスを抑制する機序が解明されれば、老化や心血管病の新たな治療薬となる可能性がある。

3)今後の展望

klotho 遺伝子による酸化ストレス調節のシグナル伝達を解明する必要がある。

5.結論

酸化ストレスは臓器障害の原因として知られているが、酸化ストレスを減らす有効な手段は少ない。Klotho 遺伝子が酸化ストレスを抑制する事が示唆された。klotho 遺伝子が増加・心血管病による臓器傷害の新たな治療薬となる可能性がある。

6.研究発表

1)国内

口頭発表 1件

原著論文発表 0件

それ以外(レビューなど)の発表 2件

そのうち主なもの

論文発表

斎藤勇一郎、倉林正彦

血管老化防止—期待されるゲノム創薬—

Heart View 7: 748-753, 2003

学会発表

斎藤勇一郎、中村哲也、角野博之、坂本浩之助、黒尾誠、倉林正彦、永井良三。klotho マウスは一酸化窒素産生異常と食塩感受性高血圧を呈する。第26回日本高血圧学会。

宮崎。平成15年10月30日。

1)国外

口頭発表 2件

原著論文発表 0件

それ以外(レビューなど)の発表 0件

そのうち主なもの

論文発表

学会発表

Yuichiro Saito, Tetsuya Nakamura, Masahiko Kurabayashi, Ryozo Nagai. Overexpression of the klotho gene reduces oxidative stress and ameliorates endothelial function in rats. American Heart Association Scientific Sessions 2003. Orland, FL, USA. Nov 10, 2003.

7.知的所有権の出願・取得状況

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 東京大学医学系研究科

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、この近傍で欠失変異解析の結果、-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。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* の上流シグナルを明らかにする。

A. 研究目的

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

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。次いで、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った。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、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。

今後は詳細な解析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

6. 研究発表 (平成 13 年～)

1) 国内

口頭発表	142 件
原著論文による発表	0 件
それ以外 (レビュー等) の発表	57 件

そのうち主なもの

論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 川口浩: 骨と老化. 単行本「骨・関節疾患」(宮

坂信之・野田政樹・西岡久寿樹 編) (朝倉書店) pp40-46, 2003.

6. 川口浩: この1年間の骨粗鬆症研究の概要と今後の方向性 - 老化による骨粗鬆化の分子メカニズムに関する検討 - (日本骨粗鬆症学会・第3回旭化成学術振興賞受賞にあたって). Osteoporosis Japan 11 (4): 785-791, 2003.
7. 川口浩: 加齢と骨. CLINICAL CALCIUM (特集: 生活習慣病における骨代謝) 14 (2): 275-283, 2004.

学会発表

1. 川口浩, 緒方直史, 真鍋典世, 中村耕三: 骨粗鬆症の発症メカニズム. 第73回日本整形外科学会学術集会 (パネルディスカッション「骨粗鬆症における骨折の病態と予防」). 2000. 4. 6-9 (神戸).
2. 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18回日本骨代謝学会. 2000. 7. 19-22 (広島国際会議場, 広島).
3. 川野健一, 緒方直史, 細井孝行, 腰塚益理子, 白木正孝, 折茂肇, 黒尾誠, 中村耕三, 川口浩: ヒト *klotho* 遺伝子座における coding-region single nucleotide polymorphisms (cSNPs) の検索と骨代謝疾患への関与. 第18回日本骨代謝学会. 2000. 7. 19-22 (広島国際会議場, 広島).
4. 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).
5. 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).
6. 川口浩: 老人性骨粗鬆症の発症機序. 第26回日本医学会総会 (シンポジウム: 骨粗鬆症の解明). 2003. 4. 4-6 (福岡).

2) 海外

口頭発表	33 件
原著論文による発表	48 件
それ以外 (レビュー等) の発表	1 件

そのうち主なもの

論文発表

1. Ogata N, Matsumura Y, Shiraki M, Kawano K, Koshizuka Y, Hosoi T, Nakamura K, Kuro-o M, Kawaguchi H: Association of *klotho* gene

- polymorphism with bone density and spondylosis of the lumbar spine in postmenopausal women. *Bone* 31: 37-42, 2002.
2. Ogata N, Koshizuka Y, Miura T, Iwasaki M, Hosoi T, Shiraki M, Seichi A, Nakamura K, 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.
 3. Kawano K, Ogata N, Chiano M, Molloy H, Kleyn P, Spector T D, Uchida 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 Miner Res* 17: 1744-1751, 2002.
 4. Ogata N, Shiraki M, Hosoi T, Koshizuka Y, Nakamura K, 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.
 5. Manabe N, Kawaguchi H, Chikuda H, Miyaura C,

Inada M, Nagai R, Nabeshima Y, Nakamura K, Sinclair A M, Scheuermann R H, Kuro-o M: Connection between B-lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J Immunol* 167: 2625-2631, 2001.

学会発表

1. Kawaguchi H: Involutional osteoporosis: New theory. 1st Scientific Meeting of the Asia-Pacific Menopause Federation. 2001. 5. 26-29 (Seoul, Korea).
2. Kawano K, Chiano M, Ogata N, Uchida M, Hosoi T, Orimo H, Inoue S, Nakamura K, Kuro-o M, and Kawaguchi H: *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).
7. 知的所有権の出願・取得状況
特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tohyama O., Imura A., Iwano A., Jean Noel Freund, Henrissat B. Fujimori T., <u>Nabeshima Y.</u>	Klotho is a novel β -glucuronidase capable of hydrolyzing steroid - glucuronides	J. Biol Chem.	279(11)	9777- 9784	2004
K Takeshita, T Fujimori, Y Kurotaki, H Honjo, Hiroshi Tsujikawa, K Yasui, J-K Lee, K Kamiya, K Kitaichi, K Yamamoto, M Ito, T Kondo, S Iino, Y Inden, M Hirai, T Murohara, I Kodama, Y. <u>Nabeshima</u>	Sinoatrial Node Dysfunction and Early Unexpected Death of Mice with a Defect of Klotho Gene Expression.	Circulation	In press		2004
Tsujikaw H., Kurotaki Y., Fujimori T., Fukuda K., <u>Nabeshima Y.</u>	<i>Klotho</i> , a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system.	Molecular Endocrinology	17	2393- 2403	2003
Nagai T., Yamada K., Kim H-C. Kim Y-S. Noda Y., Imura A., <u>Nabeshima Y.</u> , 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
Yang J., Matsukawa N., Rakugi H., Imai M., Kida I., Nagai M., Ohta J., Fukuo K., <u>Nabeshima Y.</u> , 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
Yahata K, Mori K, Mukoyama M, Sugawara A, Suganami T, Makino H, Nagae T, Fujinaga Y, <u>Nabeshima Y</u> , Nakao K.	Regulation of stanniocalcin 1 and 2 expression in the kidney by klotho gene.	Biochem Biophys Res Commun	310(1):	128- 134.	2003
Saito K, Ishizaka N, Mitani H, Ohno M, Nagai R.	Iron chelation and a free radical scavenger suppress angiotensinII- induced downregulation of klotho, an anti-aging gene, in rat.	FEBS Lett.	551	58-62	2003