

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

高齢者疾患の共通のリスクファクター・肥満を抑えるための新戦略

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鍋島陽一

平成17(2005)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
高齢者疾患の共通のリスクファクター・肥満を抑えるための新戦略	-----1
鍋島陽一	
II. 分担研究報告	
1. ヒト β Klotho遺伝子の多型解析・老化遅延。寿命延長の検討	----- 5
鍋島陽一	
2. 低分子化合物の探索に関する研究	----- 8
藤森俊彦	
3. 肥満・コレステロール代謝制御における β Klothoの機能解明に関する研究	-----11
伊藤慎二	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 14
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 15

総括研究報告書

高齢者疾患の共通のリスクファクター・肥満を抑えるための新戦略

主任研究者 鍋島陽一 京都大学医学研究科教授

β -Klothoがコレステロール代謝を制御する機構にどのように関与しているかを解析するために、コレステロール代謝に関連するトランスポーター、チャンネル、転写因子、コレステロール代謝、胆汁酸代謝について、詳細な検討を行った。コレステロールを胆汁酸へと変換する律速酵素（Cyp7A1）とCyp8 B1の活性が亢進していた。コレステロール、胆汁酸の腸肝循環を担う分子群には大きな異常がなく、Cyp7A1とCyp8B1を共通に負に制御する転写因子、Small heterodimer partner (SHP)の発現、活性制御に異常があり、絶えずCyp7A1、及びCyp8 B1遺伝子の発現が亢進していることを突き止めた。コレステロール代謝改善剤の新たなターゲットとして β -Klothoシステムが想定され、特許出願した。

分担研究者

藤森俊彦・京都大学・助手

伊藤慎二・京都大学・助手

A. 研究目的

本研究は申請者が発見した新たな事実を基盤として、動脈硬化、高血圧、糖尿病などの加齢に伴って発症する疾患の最大のリスクファクターである肥満におけるコレステロール代謝の関与を解明し、加齢に伴う肥満を抑え、ひいては加齢疾患の発症予防、老化遅延、健康老化の実現を目指すものである。この目的を実現す

るために、（1）コレステロール代謝制御における β -Klothoの分子機能、（2） β -Klothoの機能を抑える低分子化合物の探索、（3）ヒト β -Klotho遺伝子多型と加齢疾患の発症頻度、（4） β -Klothoノックアウトマウスにおいて老化遅延、寿命延長が起こるかの4項目の検討した。

B. 研究方法

本研究課題は β -Klothoの機能解析を行い、その成果を肥満、加齢関連疾患の予防と克服へと発展させることを目的としている。具体的には以下の4点についての研

究を行った。

(1) β -Klothoがどのような機構でコレステロール代謝を制御しているか？
肝臓、血液、消化管、胆嚢などのコレステロール、胆汁酸および、その代謝産物の量を解析した。ついで、肝臓、小腸よりRNAを調製し、コレステロール代謝に関連する代謝酵素（p 450 遺伝子群）、トランスポーター、チャンネル、転写因子の発現について、詳細な検討を行った。ついで、コレステロール、胆汁酸の腸肝循環を担う分子群の機能と発現について解析した。

(2) β -Klothoがどのような機構でコレステロールホメオスタシスを制御しているか？
 β -Klotho蛋白と結合している蛋白分子の同定が鍵であると考え、抗 β -Klotho蛋白モノクローナル抗体を分離し、免疫沈降により結合分子を集め、電気泳動にて分離し、各バンドを質量分析により解析した。ヒットスコアの高い候補分子を選び、免疫沈降、ウェスタンブロット、局在等の解析等を進めた。

(3) β -Klothoの機能を低下させる低分子化合物の探索システムの構築
低分子化合物を効率よく探索するための*in vitro*解析系の構築を試みた。野生型、及び β -Klothoノックアウトマウスの肝臓より初代培養細胞を分離し、胆汁酸負荷によるCyp7A1とCyp8 B1の発現が β -Klothoに依存して変化する系の開発をめざした。

(4) ヒト β -Klotho遺伝子多型

データベース上の遺伝子多型配列を検索し、遺伝子多型、特に β -Klotho蛋白をコードする部分の遺伝子多型を見つけだし、その多型の頻度の解析へと進めた。

(5) β -Klothoノックアウトマウスの老化遅延、寿命延長に関する研究を進めた。コレステロールの排泄増加、体重減少はカロリー制限に相当し、摂取カロリーを制限すると体重減少と共に老化遅延、寿命延長がおこることから、 β -Klothoノックアウトマウスと野生型マウスを長期間飼育し、老化遅延寿命延長が起こるかを検討している。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み替え、動物実験については京都大学実験指針に則って行った。ヒトゲノム解析については、今年度は予定しておらず、解析チームが立ち上がった時点で、チームの構成メンバーが所属する施設に申請書を提出する予定であり、倫理指針に則って実験を行う。

C. 研究結果

β -Klotho遺伝子ノックアウトマウスでは多量のコレステロールが胆汁酸に変換されて糞便中に排泄され、体内のコレステロール量が低下し、体重が減少する。コレステロール代謝は個人の代謝特性、すなわち、遺伝的要因に大きく規定されており、 β -Klotho遺伝子は、この代謝特性を担う遺伝子の一つであると推定され、 β -Klothoがコレステロール代謝を制御する機構にどのように関与しているかを中

心に解析を進め、コレステロール代謝に関連するトランスポーター、チャンネル、転写因子、コレステロール代謝、胆汁酸代謝について、詳細な検討を行ったが、コレステロールを胆汁酸へと変換する律速酵素（Cyp7A1）とCyp8 B1の活性が亢進していることを突き止めた。引き続き、これらの酵素遺伝子の発現が亢進する理由を探るべく検討を続け、コレステロール、胆汁酸の腸肝循環を担う分子群には大きな異常がなく、Cyp7A1とCyp8B1を共通に負に制御する転写因子、Small heterodimer partner (SHP)の発現、活性制御に異常があり、絶えずCyp7A1、及びCyp8 B1遺伝子の発現が亢進していることを突き止めた（特許出願した）。

極めて効率よく β -Klotho蛋白を免疫沈降するモノクローナル抗体を作成し、免疫沈降と質量分析により β -Klotho蛋白に結合する蛋白の候補者を同定した。

β -Klotho蛋白の機能を解析するための初代培養肝細胞系を用いたin vitroアッセイシステムの構築を進めた。

ヒト β -Klotho遺伝子多型についての情報を収集し、臨床グループとの共同研究を開始すべく準備を進めている。

D. 考察

Cyp7A1とCyp8B1を共通に負に制御する転写因子、Small heterodimer partner (SHP)の発現、活性制御に異常があり、絶えずCyp7A1、及びCyp8 B1遺伝子の発現が亢進していることを突き止め、このシグナル伝達プロセスを制御することによっ

てコレステロール代謝改善につながることを示し特許出願した。一方で、この結果を臨床応用するには、効率的なアッセイシステムの開発が必須であり、培養細胞系による解析システムを検討した。 β -Klothoの遺伝子多型による発症要因の解析システムの確立のためのデータが臨床家の提供され、一方、 β -Klothoに結合する蛋白を明らかにすることによって、 β -Klotho蛋白の機能解析に道を開くことが展望され、基礎、臨床の両面にわたって将来の発展につながるデータが得られた。

E. 結論

β -Klothoがコレステロール代謝を制御する機構にどのように関与しているかを解析するために、コレステロール代謝に関連するトランスポーター、チャンネル、転写因子、コレステロール代謝、胆汁酸代謝について、詳細な検討を行った。コレステロールを胆汁酸へと変換する律速酵素（Cyp7A1）とCyp8 B1の活性が亢進していた。コレステロール、胆汁酸の腸肝循環を担う分子群には大きな異常がなく、Cyp7A1とCyp8B1を共通に負に制御する転写因子、Small heterodimer partner (SHP)の発現、活性制御に異常があり、絶えずCyp7A1、及びCyp8 B1遺伝子の発現が亢進していることを突き止めた。コレステロール代謝改善剤の新たなターゲットとして β -Klothoシステムが想定され、特許出願した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito S, Fujimori T., Furuya A., Nabeshima Y., Nabeshima Y. Impaired negative feedback suppression of Bile acid synthesis in mice lacking β -Klotho. In press
- 2) 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.* 279(11) 9777-9784 (2004)
- 3) 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* 109(14) 1776-1782 (2004)
- 4) Imura A. Iwano A., Kita N., Thoyama O. Fujimori T. and Nabeshima Y.
Secreted Klotho protein in sera and CSF: Implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Letter* 565(1-3) 143-147 (2004)
- 5) Shimada T., Takeshita Y., Murohara T., Sasaki KI, Egami K., Shintani S., Katsuda Y., Ikeda H., Nabeshima Y., Imaizumi

- T. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging Klotho mouse. *Circulation* 110, 1148-1155 (2004)
- Nabeshima Y. Klotho deficient mouse: an in vivo model for human aging.
- 6) Nabeshima Y. Klotho deficient mouse: an in vivo model for human aging. *Drug Discovery Today: Disease Models* Vol. 1(3) 223-227 (2004)

2. 学会発表

- 1) 鍋島陽一 Klothoの分子機能
日本分子生物学会シンポジウム、グライコワールドの新展開
2004年12月8日、神戸
 - 2) 鍋島陽一 Klothoの分子機能の解明
皮膚科学会 2005年1月22日、東京
 - 3) Nabeshima Y.
KLOTHO: A fundamental regulator of calcium homeostasis COE Symposium
平成16年10月29日、京都
- ## H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

コレステロール代謝改善剤開発のための新たなターゲットの発見
発明者：鍋島陽一、伊藤慎二、藤森俊彦、鍋島曜子

出願日：平成16年12月8日

2. 実用新案登録

3. その他

分担研究報告書

ヒト β -Klotho遺伝子多型、 β -Klothoノックアウトマウスの寿命に関する研究

分担研究者 鍋島陽一 京都大学医学研究科教授

ヒト遺伝子多型については既に多くの情報がデータベース上に報告されていることから、 β -Klotho遺伝子多型についての情報を収集した。また、多型を推定される配列、特に蛋白をコードする部分については確認した。この結果に基づき、臨床グループとの共同研究を開始すべく準備を進めた。

β -Klothoノックアウトマウスの作成後、2年以上にわたって野生型マウスとノックアウトマウスの飼育を続け、寿命について検討しているが、未だに死亡個体がなく、 β -Klothoノックアウトマウスは少なくとも寿命の短縮をもたらさないと推定される。

A. 研究目的

本研究は申請者が発見した新たな事実を基盤として、動脈硬化、高血圧、糖尿病などの加齢に伴って発症する疾患の最大のリスクファクターである肥満におけるコレステロール代謝の関与を解明し、加齢に伴う肥満を抑え、ひいては加齢疾患の発症予防、老化遅延、健康老化の実現を目指すものである。この目的を実現するために、（1）ヒト β -Klotho遺伝子多型と加齢疾患の発症頻度、（2） β -Klotho

oノックアウトマウスにおいて老化遅延、寿命延長が起こるかの2項目の検討した。

B. 研究方法

本研究課題は β -Klothoの機能解析を行い、その成果を肥満、加齢関連疾患の予防と克服へと発展させることを目的としている。具体的には以下の2点についての研究を行った。

（1）ヒト β -Klotho遺伝子多型

データベース上の遺伝子多型配列を検索し、遺伝子多型、特に β -Klotho蛋白をコードする部分の遺伝子多型を見つけだし、

その多型の頻度の解析へと進めた。

(2) β -Klothoノックアウトマウスの老化遅延、寿命延長に関する研究を進めた。コレステロールの排泄増加、体重減少はカロリー制限に相当し、摂取カロリーを制限すると体重減少と共に老化遅延、寿命延長がおこることから、 β -Klothoノックアウトマウスと野生型マウスを長期間飼育し、老化遅延寿命延長が起こるかを検討している。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み替え、動物実験については京都大学実験指針に則って行った。ヒトゲノム解析については、16年度は予定しておらず、解析チームが立ち上がった時点で、チームの構成メンバーが所属する施設に申請書を提出する予定であり、倫理指針に則って実験を行う。

C. 研究結果

ヒト遺伝子多型については既に多くの情報がデータベース上に報告されていることから、 β -Klotho遺伝子多型についての情報を収集した。また、多型を推定される配列、特に蛋白をコードする部分については、再度、確認した。この結果に基づき、臨床グループとの共同研究を開始すべく準備を進めている。

β -Klothoノックアウトマウスの作成後、2年以上にわたって野生型マウスとノックアウトマウスの飼育を続け、寿命について検討しているが、未だに死亡個体がなく、 β -Klothoノックアウトマウスは少なくとも寿命の短縮をもたらさな

いと推定される。

D. 考察

β -Klothoの遺伝子多型による発症要因の解析システムの確立が展望される。 β -Klothoの機能欠失が寿命の短縮をもたらさないことがわかり、 β -Klothoの機能低下をターゲットとした創薬を展望するための良い結果と考えている。

E. 結論

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

3. 論文発表

- 1) Ito S, Fujimori T., Furuya A., Nabeshima Y., Nabeshima Y. Impaired negative feedback suppression of Bile acid synthesis in mice lacking β -Klotho. In press
- 2) 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. 279(11) 9777-9784 (2004)
- 3) 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 10

9(14) 1776-1782 (2004)

4) Imura A, Iwano A., Kita N., Thoyama O, Fujimori T. and Nabeshima Y.

Secreted Klotho protein in sera and CSF: Implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. FEBS Letter 565(1-3) 143-147 (2004)

5) Shimada T., Takeshita Y., Murohara T., Sasaki KI, Egami K., Shintani S., Katsuda Y., Ikeda H., Nabeshima Y., Imaizumi

T. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging Klotho mouse. Circulation 110, 1148-1155 (2004)

Nabeshima Y. Klotho deficient mouse: an in vivo model for human aging.

6) Nabeshima Y. Klotho deficient mouse: an in vivo model for human aging. Drug Discovery Today: Disease Models Vol.1(3) 223-227 (2004)

1. 学会発表

1) 鍋島陽一 Klothoの分子機能

日本分子生物学会シンポジウム、グライコワールドの新展開

2004年12月8日、神戸

2) 鍋島陽一 Klothoの分子機能の解明

皮膚科学会 2005年1月22日、東京

3) Nabeshima Y.

KLOTHO: A fundamental regulator of calcium homeostasis COE Symposium

平成16年10月29日、京都

H. 知的財産の出願・登録状況

4. 特許取得

コレステロール代謝改善剤開発のための新たなターゲットの発見

発明者：鍋島陽一、伊藤慎二、藤森俊彦、鍋島曜子

出願日：平成16年12月8日

5. 実用新案登録

6. その他

分担研究報告書

β-Klothoに結合する分子の同定と低分子化合物探索システムの確立

分担研究者 藤森俊彦 京都大学医学研究科助手

極めて効率よくβ-Klotho蛋白を免疫沈降するモノクローナル抗体を作成した。3T3細胞から分化誘導した脂肪細胞より免疫沈降と質量分析によりβ-Klotho蛋白に結合する蛋白の候補者をリストした。培養肝臓細胞、野生型、ノックアウトの肝臓の初代培養肝細胞系を用いたシステムを立ち上げ、β-Klotho 遺伝子のあるなしをCyp7a1の発現に反映させるシステムの構築を試みたが、いずれも不安定で低分子探索システムとしては利用できない。

A. 研究目的

本研究は申請者が発見した新たな事実を基盤として、動脈硬化、高血圧、糖尿病などの加齢に伴って発症する疾患の最大のリスクファクターである肥満におけるコレステロール代謝の関与を解明し、加齢に伴う肥満を抑え、ひいては加齢疾患の発症予防、老化遅延、健康老化の実現を目指すものである。この目的を実現するために、(1) β-Klothoの機能を抑える低分子化合物の探索、(2) β-Klothoに結合する分子について検討した。

B. 研究方法

(1) β-Klothoの機能を低下させる低分子化合物の探索システムの構築

低分子化合物を効率よく探索するための*in vitro*解析系の構築を試みた。野生型、及びβ-Klothoノックアウトマウスの肝臓より初代培養細胞を分離し、胆汁酸負荷によるCyp7A1とCyp8 B1の発現がβ-Klothoに依存して変化する系の開発をめざした。

(2) β-Klothoがどのような機構でコレステロールホメオスタシスを制御しているかを解析する上で、β-Klotho蛋白と結合している蛋白分子の同定は鍵であると考え、抗β-Klotho蛋白モノクローナル抗体を分離し、免疫沈降により結合分子を集め、電気泳動にて分離し、各バンドを質量分析により解析した。ヒットスコアの高い候補分子を選び、免疫沈降、ウェ

スタンプロット、局在等の解析等を進めた。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み替え、動物実験については京都大学実験指針に則って行った。

C. 研究結果

極めて効率よく β -Klotho蛋白を免疫沈降するモノクローナル抗体を作成した。脂肪組織でも β -Klotho蛋白が発現していることから3T3細胞を脂肪細胞に分化誘導し、免疫沈降と質量分析により β -Klotho蛋白に結合する蛋白の候補者をリストした。引き続き免疫沈降、ウエスタンプロットにより結合分子の候補を絞ったが、最終結論を得るにいたっていない。

β -Klotho蛋白の機能を抑制する低分子化合物の探索のためには、効率的な解析システムの確立が必須であり、培養肝臓細胞、野生型、ノックアウトの肝臓の初代培養肝細胞系を用いたシステムを立ち上げ、 β -Klotho 遺伝子のあるなしをCyp7a1の発現に反映させるシステムの構築を試みた。また、FGFシグナルがこの制御に関連することが示唆されたことから、FGFシグナル伝達における β -Klotho 蛋白の必要性について検討した。いずれも個体差が大きく不安定な結果で、これを探索システムに応用することは困難であり、更に良い培養システムの確立が必要であると考えている。

D. 考察

β -Klothoに結合する蛋白を明らかに

することによって、 β -Klotho蛋白の機能解析に道を開くことが展望されることから、幾つかのシステムを立ち上げ、結合分子の同定に結びつけたい。また、低分子探索システムの確立のためには、現在の方法では不安定で利用できないと考えており、新たなシステムを模索したい。

E. 結論

極めて効率よく β -Klotho蛋白を免疫沈降するモノクローナル抗体を作成した。3T3細胞から分化誘導した脂肪細胞より免疫沈降と質量分析により β -Klotho蛋白に結合する蛋白の候補者をリストした。

培養肝臓細胞、野生型、ノックアウトの肝臓の初代培養肝細胞系を用いたシステムを立ち上げ、 β -Klotho 遺伝子のあるなしをCyp7a1の発現に反映させるシステムの構築を試みたが、いずれも不安定で低分子探索システムとしては利用できない。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

2. 論文発表

- 1) Ito S, Fujimori T., Furuya A., Nabeshima Y., Nabeshima Y. Impaired negative feedback suppression of Bile acid synthesis in mice lacking β -Klotho. In press
- 2) 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. 279(11) 9
777-9784 (2004)

3) K Takeshita, T Fujimori, Y Kurotaki,
H Honjo, Hiroshi Tsujikawa, K Yasui, J-
K Lee, K Kamiya, K Kitaichi, K Yamam
oto, M Ito, T Kondo, S Iino, Y Inden,
M Hirai, T Murohara, I Kodama, Y. Nab
eshima

Sinoatrial Node Dysfunction and Early Un
expected Death of Mice with a Defect of
Klotho Gene Expression. Circulation 10
9(14) 1776-1782 (2004)

4) Imura A. Iwano A., Kita N., Thoyama
O. Fujimori T. and Nabeshima Y.

Secreted Klotho protein in sera and CSF:
Implication for post-translational cleavage
in release of Klotho protein from cell m
embrane. FEBS Letter 565(1-3) 143-147
(2004)

H. 知的財産の出願・登録状況

7. 特許取得

コレステロール代謝改善剤開発のための新
たなターゲットの発見

発明者：鍋島陽一、伊藤慎二、藤森俊彦、
鍋島曜子

出願日：平成16年12月8日

8. 実用新案登録

9. その他

分担研究報告書

肥満・コレステロール代謝制御における β Klothoの機能解明

分担研究者 伊藤慎二 京都大学医学研究科助手

コレステロール代謝に関連するトランスポーター、チャンネル、転写因子、コレステロール代謝、胆汁酸代謝について、詳細な検討を行った。コレステロールを胆汁酸へと変換する律速酵素（Cyp7A1）とCyp8 B1の活性が亢進していた。コレステロール、胆汁酸の腸肝循環を担う分子群には大きな異常がなく、Cyp7A1とCyp8B1を共通に負に制御する転写因子、Small heterodimer partner (SHP)の発現、活性制御に異常があり、絶えずCyp7A1、及びCyp8 B1遺伝子の発現が亢進していることを突き止めた。、コレステロール代謝改善剤の新たなターゲットとして β -Klothoシステムが想定され、特許出願した。

A. 研究目的

本研究は申請者が発見した新たな事実を基盤として、動脈硬化、高血圧、糖尿病などの加齢に伴って発症する疾患の最大のリスクファクターである肥満におけるコレステロール代謝の関与を解明し、加齢に伴う肥満を抑え、ひいては加齢疾患の発症予防、老化遅延、健康老化の実現を目指すものである。この目的を実現するために、（1）コレステロール代謝制御における β -Klothoの分子機能検討した。

B. 研究方法

β -Klothoがどのような機構でコレステロール代謝を制御しているかについて、以下のように研究をおこなった。肝臓、血液、消化管、胆嚢などのコレステロール、胆汁酸および、その代謝産物の量を解析した。ついで、肝臓、小腸よりRNAを調製し、コレステロール代謝に関連する代謝酵素（p 450 遺伝子群）、トランスポーター、チャンネル、転写因子の発現について、詳細な検討を行った。ついで、コレステロール、胆汁酸の腸肝循環を担う分子群の機能と発現について解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み替え、動物実験については京都大学実験指針に則って行った。

C. 研究結果

β -Klotho遺伝子ノックアウトマウスでは多量のコレステロールが胆汁酸に変換されて糞便中に排泄され、体内のコレステロール量が低下し、体重が減少する。コレステロール代謝は個人の代謝特性、すなわち、遺伝的要因に大きく規定されており、 β -Klotho遺伝子は、この代謝特性を担う遺伝子の一つであると推定され、 β -Klothoがコレステロール代謝を制御する機構にどのように関与しているかを中心に解析を進め、コレステロール代謝に関連するトランスポーター、チャンネル、転写因子、コレステロール代謝、胆汁酸代謝について、詳細な検討を行ったが、コレステロールを胆汁酸へと変換する律速酵素 (Cyp7A1) とCyp8 B1の活性が亢進していることを突き止めた。引き続き、これらの酵素遺伝子の発現が亢進する理由を探るべく検討を続け、コレステロール、胆汁酸の腸肝循環を担う分子群には大きな異常がなく、Cyp7A1とCyp8B1を共通に負に制御する転写因子、Small heterodimer partner (SHP)の発現、活性制御に異常があり、絶えずCyp7A1、及びCyp8 B1遺伝子の発現が亢進していることを突き止めた (特許出願した)。

D. 考察

Cyp7A1とCyp8B1を共通に負に制御する

転写因子、Small heterodimer partner (SHP)の発現、活性制御に異常があり、絶えずCyp7A1、及びCyp8 B1遺伝子の発現が亢進していることを突き止め、このシグナル伝達プロセスを制御することによってコレステロール代謝改善につながることを示すことができた。なお、FGFR4のノックアウトが β -Klotho遺伝子ノックアウトマウスと同じ変異表現型を示すことからFGFシグナルにおける β -Klothoの役割に興味もたれる。

E. 結論

β -Klothoがコレステロール代謝を制御する機構にどのように関与しているかを解析するために、コレステロール代謝に関連するトランスポーター、チャンネル、転写因子、コレステロール代謝、胆汁酸代謝について、詳細な検討を行った。コレステロールを胆汁酸へと変換する律速酵素 (Cyp7A1) とCyp8 B1の活性が亢進していた。コレステロール、胆汁酸の腸肝循環を担う分子群には大きな異常がなく、Cyp7A1とCyp8B1を共通に負に制御する転写因子、Small heterodimer partner (SHP)の発現、活性制御に異常があり、絶えずCyp7A1、及びCyp8 B1遺伝子の発現が亢進していることを突き止めた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

3. 論文発表

1) Ito S, Fujimori T., Furuya A., Nabeshima Y., Nabeshima Y. Impaired negative f

feedback suppression of Bile acid synthesis
in mice lacking *Klotho*. In press

発明者：鍋島陽一、伊藤慎二、藤森俊彦、
鍋島曜子

4. 学会発表

出願日：平成16年12月8日

H. 知的財産の出願・登録状況

11. 実用新案登録

10. 特許取得

12. その他

コレステロール代謝改善剤開発のための新
たなターゲットの発見

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., Nabeshima Y.	Klotho is a novel β -glucuronidase capable of hydrolyzing steroid β -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 Kitachi, 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	109(14)	1776-1782	2004
Imura A. Iwano A., Kita N., Thoyama O. Fujimori T. and Nabeshima Y.	Secreted Klotho protein in sera and CSF: Implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane.	FEBS Letter	565(1-3)	143-147	2004
Shimada T., Takeshita Y., Murohara T., Sasaki KI, Egami K., Shintani S., Katsuda Y., Ikeda H., Nabeshima Y., Imaizumi T.	Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging Klotho mouse.	Circulation	110	1148-1155	2004
Nabeshima Y.	Klotho deficient mouse: an in vivo model for human aging.	Drug Discovery Today: Disease Models	1(3)	223-227	2004