

200500144 A

様式A-1 (5)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成 18年 4月 10日

厚生労働大臣 川崎二郎 殿

住 所 〒604-8135 京都市中京区三文字町
205-3-1302

フリガナ ナベシマヨウイチ

研究者 氏 名 鍋島陽一

(所属機関 京都大学)



平成 17年度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）に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名（課題番号）：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（H16-ゲノム-005）

国庫補助金精算所要額：金 25,650,000 円也（うち間接経費 0円）

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙（別添1のとおり）
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次（別添2のとおり）
3. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書（別添3のとおり）
4. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書（別添4のとおり）
5. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添5のとおり）
6. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況

（総括研究報告書、分担研究報告書の中に、書式に従って記入すること）

7. 健康危険情報

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鍋島陽一

研究報告書目次レイアウト (参考)

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. 老化遅延。寿命延長の検討、 β Klothoと血糖値制御に関する研究	----- 6
鍋島陽一	
2. β KlothoによるFGFシグナル伝達機能を制御する分子の探索、	----- 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	-----10
伊村明浩	
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--30

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）

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ノックアウトの変異表現型はFGFR4（FGF19がリガンド）ノックアウトマウスのそれとそっくりであること、FGF23ノックアウトマウスの変異表現型がKlotho変異マウスのそれと極めて類似していることを見いだした。また、 β -Klothoノックアウトマウスでは血糖調節の異常が観察され、FGF21との関連が検討され、 β -KlothoとFGF19がコレステロール代謝を、 β -KlothoとFGF21がグルコース代謝を、そしてKlothoとFGF23がカルシウム代謝を制御していることが示唆された。循環しているFGF19, 21, 23がどのようにしてターゲット細胞の受容体を特異的に認識してシグナルを伝えるかは謎とされてきたが、この制御機構にKlotho、 β -Klothoが関与していることを示唆する結果を得た。 β -Klothoノックアウトがやや痩せており、コレステロールを排出していることから寿命延長について検討したが、明瞭な寿命延長を示唆する結果は得られていない。 β -Klotho、KlothoとFGF群による恒常性維持機構を詳細に解析し、同時にこれらの分子をターゲットとした薬剤の開発のためには、培養細胞による解析系が必須となることから、FGFシグナルが入った時にルシフェラーゼが活性化されるシステムを準備し、Klothoを発現させるとFGF23のシグナルが入り、 β -Klothoを発現させるとFGF19, FGF21のシグナルが伝わることを確認した。更に、この細胞系を用いてFGF/Klothoシグナル伝達を阻害する抗体、機能を亢進させる抗体の分離に成功した。これらの抗体をマウスに投与し、Klothoあるいは β -Klothoの機能が動物個体においても影響されることを確認した。

分担研究者

藤森俊彦・京都大学・助手

伊村明浩・京都大学・特任助教授

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リスクファクターである肥満や代謝異常におけるコレステロール代謝、グルコース代謝、カルシウム代謝の関与を解明し、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、グルコース代謝制御、カルシウム代謝制御における β -Klothoの分子機能、(2) β -KlothoによるFGFのシグナル伝達を抑制、あるいは促進するヒト抗体の探索、(3) 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3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) FGF19, 21, あるいは23 がコレステロール代謝制御、グルコース代謝制御、カルシウム代謝制御を制御する機構に β -Klotho、Klothoが関与していることがわかり、その分子機能を解析するためにEgr-1のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーター遺伝子を導入したHec293細胞を準備し、それにKlotho、あるいは β -Klotho発現ベクターを導入し、一方、培地にFGF19, 21, あるいは23を添加し、そのシグナル伝達をLuc活性を測定することで解析した。

(2) 上記の解析系にヒト抗Klotho抗体、

ヒト抗 β -Klotho抗体を添加し、シグナル伝達を促進あるいは抑制する抗体を解析した。

(3)、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。また、FGF19, 21, 23についても同様に解析を行った。更にゲノムセンターと協力してシーケンス解析を行い、疾患との相互作用解析の準備を行った。

(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。ヒトゲノム解析については、解析に必要なサンプルを採取するチームの構成メンバーがすでに申請書を提出しており、倫理指針に則って実験を行う。

C. 研究結果

β -Klothoノックアウトの上記の変異表現型はFGFR4 (FGF19がリガンド) ノックアウトマウスのそれとそっくりであること、FGF23ノックアウトマウスの変異表現型がKlotho変異マウスのそれと極めて類似していることを見いだした。FGFファミリーの中でFGF23、FGF19およびFGF21は血中を循環し、シグナル伝達因子として機能している特殊なグループである。そこで、FGF21と β -Klothoとの関連が問題となり、FGF21が脂肪細胞に作用しGLUT1の発現を亢進させ、脂肪細胞へのグルコースの取り込みを増加させ血糖値を低下させると報告されたことから、 β -Klothoノックアウトマウスに糖を負荷して、それに対する応答をしらべたところ、その異常が示唆された。これらの結果から β -KlothoとFGF19がコレステロール代謝を、 β -KlothoとFGF21がグルコース代謝を、そしてKlothoとFGF23がカルシウム代謝を制御していることが示唆された。それを確認するためにEgr-1のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーター遺伝子を導入したHec293細胞を準備し、それにKlotho、あるいは β -Klotho発現ベクターを導入し、一方、培地にFGF19, 21, あるいは23を添加し、そのシグナル伝達をLuc活性を測定することで解析した。結果として、FGF19, 21のシグナルは β -Klothoの発現細胞でのみ伝わり、FGF23のシグナルはklothoの存在下のみで伝わることを確認した。更に、この細胞系を用いてFGF/Klothoシグナル伝達を阻害する抗体、機能を亢進させる抗体の分離に成功した。これ

らの抗体をマウスに投与し、Klothoあるいは β -Klothoの機能が動物個体においても影響されることを確認した。またKlothoあるいは β -Klothoの役割を解析するために結合分子の解析に着手した。

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。

ヒト β -KlothoおよびFGF23、FGF19およびFGF21の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しようとしているところである。

D. 考察

β -Klothoが関与するシグナル伝達プロセスを制御することがコレステロール代謝改善、グルコース代謝改善につながることを示した。この結果をin vitroで解析するために効率的なアッセイシステムを開発し、 β -Klothoが存在するとFGF19シグナル、FGF21シグナルが入り、Klotho存在下ではFGF23シグナルが入ることが確認した。このシステムはLuc活性を測定することによりFGFシグナルのOn/Offが解析できる優れたアッセイシステムであり、それを利用して既に β -Klotho、Klothoの機能阻害抗体機能促進抗体のスクリーニングに成功している。このアッセイシステムを活用してFGF/Klothoシステムに作用する低分子量分子の解析に利用できると考えている。また、 β -Klotho、FGF19, 21の遺伝子多型の解析が生活習慣病の発症要因の解析に利用出来ると考えている。FGFの多様性に比してFGF受容体

は少なく循環しているFGF群がどのようにしてターゲット細胞の受容体を特異的に認識してシグナルを伝えるかは謎とされてきたが、上記の結果は、この制御機構にKlotho、 β -Klothoが関与していることを示唆しており、

E. 結論

(1) β -Klothoノックアウトの上記の変異表現型はFGFR4 (FGF19がリガンド) ノックアウトマウスのそれとそっくりであること、FGF23ノックアウトマウスの変異表現型がKlotho変異マウスのそれと極めて類似していることを見いだした。また、 β -Klothoノックアウトマウスでは血糖調節の異常が観察され。これらの結果からFGFとklothoとの関係を解析し、 β -KlothoとFGF19がコレステロール代謝を、 β KlothoとFGF21がグルコース代謝を、そしてKlothoとFGF23がカルシウム代謝を制御していることが示唆された。FGFの多様性に比してFGF受容体は少なく循環しているFGF19, 21, 23がどのようにしてターゲット細胞の受容体を特異的に認識してシグナルを伝えるかは謎とされてきたが、この制御機構にKlotho、 β -Klothoが関与していることを示唆する結果を得た

(2) β -Klothoノックアウトがやや痩せており、コレステロールを排出していることから寿命延長について検討したが、明瞭な寿命延長を示唆する結果は得られていない。

(3) β -Klotho、KlothoとFGF群による恒常性維持機構を詳細に解析し、同時にこれらの分子をターゲットとした薬剤の開発のためには、培養細胞による解析系が必須と

なることから、FGFシグナルが入った時にルシフェラーゼが活性化されるシステムを構築し、Klothoを発現させるとFGF23のシグナルが入り、 β -Klothoを発現させるとFGF19, FGF21のシグナルが伝わることを確認した。更に、この細胞系を用いてFGF/Klothoシグナル伝達を阻害する抗体、機能を亢進させる抗体の分離に成功した。これらの抗体をマウスに投与し、Klothoあるいは β -Klothoの機能が動物個体においても影響されることを確認した。また、Klothoあるいは β -Klothoの役割を解析するために結合分子の解析に着手した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito S., Fujimori T., Furuya A., Satoh J., Nabeshima Y., Nabeshima Y.

Impaired negative feedback suppression of bile acid synthesis in mice lacking bKlotho.

J. Clin. Invest. 115, 2202-2208 (2005)

Toyama R., Nabeshima Y., Tsuji Y., Fujimori T., Nabeshima Y.

Impaired regulation of gonadotropin-releasing hormone leads to the atrophy of the female reproductive system in klotho-deficient mice. Endocrinology 147(1) 120-129 (2006)

2. 学会発表

Nabeshima Y.

Klotho and Na,K-ATPase regulate the trafficking process of PTH secretory granules The Endocrine Society's 87th An

nual Meeting. San Diego, June6, 2005

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

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

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 β -KlothoおよびFGF23、FGF19およびFGF21の遺伝子多型解析を進めるために糖尿病、カルシウム代謝異常、腎障害などの患者サンプルを集積している。また、血清klothoの濃度を測定するシステムができたことから、糖尿病、カルシウム代謝異常、腎障害における血清値の測定を開始した。 β -Klothoノックアウトマウスオス、メスとも寿命の有意さを見いだすことができなかった。

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リスクファクターである肥満や代謝異常におけるコレステロール代謝、グルコース代謝、カルシウム代謝の関与を解明し、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、（2） β -Klotho、FGF19、21、23の遺伝子多型とヒト疾患との相関について解析した。

B. 研究方法

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。また、FGF19、21、23についても同様に解析を行った。更にゲノムセンターと協力してシーケンス解析を行い、疾患との相互作用解析の準備を行った。

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。ヒトゲノム解析については、解析に必要なサンプルを採取するチームの構成メンバーがすでに申請書を提出してあり、倫理指針に則って実験を進めている。

C. 研究結果

ヒト β -KlothoおよびFGF23、FGF19およびFGF21の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しようとしているところである。糖尿病、カルシウム代謝異常、腎障害などの患者サンプルを集積している。また、血清klothoの濃度を測定するシステムができたことから、糖尿病、カルシウム代謝異常、腎障害における血清値の測定を開始した。

飼育開始、3年を経過し、解析したすべてのマウスが死亡し、寿命を解析したが、オス、メスとも寿命の有為さを見いだすことができなかった。

D. 考察

解析がすすみ、遺伝子多型解析対象遺伝子としてFG19、21、23が新たに浮かび上がり、全体を求めて解析することとなり、この研究の期間内に解析を進める目処がついた。

E. 結論

ヒト β -KlothoおよびFGF23、FGF19およびFGF21の遺伝子多型解析を進めるために糖尿病、カルシウム代謝異常、腎障害などの患者サンプルを集積している。また、血清klothoの濃度を測定するシステムが

できたことから、糖尿病、カルシウム代謝異常、腎障害における血清値の測定を開始した。

β -Klothoノックアウトマウスオス、メスとも寿命の有為さを見いだすことができなかった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

2. 論文発表

Ito S., Fujimori T., Furuya A., Satoh J., Nabeshima Y., Nabeshima Y.

Impaired negative feedback suppression of bile acid synthesis in mice lacking bKlotho.

J. Clin. Invest. 115, 2202-2208 (2005)

Toyama R., Nabeshima Y., Tsuji Y., Fujimori T., Nabeshima Y.

Impaired regulation of gonadotropin-releasing hormone leads to the atrophy of the female reproductive system in klotho-deficient mice. Endocrinology 147(1) 120-129 (2006)

3. 学会発表

Nabeshima Y.

Klotho and Na,K-ATPase regulate the trafficking process of PTH secretory granules The Endocrine Society's 87th Annual Meeting. San Diego, June6, 2005

H. 知的財産の出願・登録状況

1 特許取得

2 実用新案登録

3 その他

分担研究報告書

β -Klothoの機能を制御する分子を探索するシステムの確立と探索

分担研究者 藤森俊彦 京都大学医学研究科助手

β -Klotho、KlothoとFGF群による恒常性維持機構を詳細に解析し、同時にこれらの分子をターゲットとした薬剤の開発のためには、培養細胞による解析系が必須となることから、FGFシグナルの下流で転写が活性化される遺伝子を解析し、シグナルが入った時にルシフェラーゼが活性化されるシステムを準備し、Klothoを発現させるとFGF23のシグナルが入り、 β -Klothoを発現させるとFGF19、FGF21のシグナルが伝わることを確認した。更に、この細胞系を用いてFGF/Klothoシグナル伝達を阻害する抗体、機能を亢進させる抗体の分離に成功した。これらの抗体をマウスに投与し、Klothoあるいは β -Klothoの機能が動物個体においても影響されることを確認した。

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や代謝異常の関与を解明し、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は培養細胞による解析系が必要と成ることから、FGFのシグナル伝達を効率よく解析できるシステムの構築とその活用を目的とした。

B. 研究方法

FGF19, 21, あるいは23 がコレステロール代謝制御、グルコース代謝制御、カルシウム代謝制御を制御する機構に β -Klotho、Klothoが関与していることがわかり、その分子機能を解析するためにEgr-1のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーター遺伝子を導入したHec293細胞を準備し、それにKlotho、あるいは β -Klotho発現ベクターを導入し、一方、培地にFGF19, 21, あるいは23を添加し、そのシグナル伝達をLuc活性を測定することで解析した。

(2) 上記の解析系にヒト抗Klotho抗体、

ヒト抗 β -Klotho抗体を添加し、シグナル伝達を促進あるいは抑制する抗体を解析した。

(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

Egr-1のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーター遺伝子を導入したHec293細胞を準備し、それにKlotho、あるいは β -Klotho発現ベクターを導入し、一方、培地にFGF19, 21, あるいは23を添加し、そのシグナル伝達をLuc活性を測定することで解析した。結果として、FGF19, 21のシグナルは β -Klothoの発現細胞でのみ伝わり、FGF23のシグナルはklothoの存在下のみで伝わることを確認した。更に、この細胞系を用いてFGF/Klothoシグナル伝達を阻害する抗体、機能を亢進させる抗体の分離に成功した。これらの抗体をマウスに投与し、Klothoあるいは β -Klothoの機能が動物個体においても影響されることを確認した。。

D. 考察

効率的なアッセイシステムを開発し、 β -Klothoが存在するとFGF19シグナル、FGF21シグナルが入り、Klotho存在下ではFGF23シグナルが入ることが確認した。このシステムはLuc活性を測定することによりFGFシグナルのOn/ Offが解析できる優れたアッセイシステムであり、。このアッセイシステムを活用してFGF/Klothoシステムに作用する低分子量分子の解析に利用できると考えている。

E. 結論

ルシフェラーゼ活性をレポーターとするHec293細胞解析系が準備できた。また、結果として、FGF19, 21のシグナルは β -Klothoの発現細胞でのみ伝わり、FGF23のシグナルはklothoの存在下のみで伝わることを確認できた。機能阻害、促進抗体を同定できた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito S., Fujimori T., Furuya A., Satoh J.,

Nabeshima Y., Nabeshima Y.

Impaired negative feedback suppression of bile acid synthesis in mice lacking bKlotho.

J. Clin. Invest. 115, 2202-2208 (2005)

Toyama R., Nabeshima Y., Tsuji Y., Fujimori T., Nabeshima Y.

Impaired regulation of gonadotropin-releasing hormone leads to the atrophy of the female reproductive system in klotho-deficient mice. Endocrinology 147(1) 120-129 (2006)

2. 学会発表

H. 知的財産の出願・登録状況

1 特許取得

2 実用新案登録

3 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 伊村明浩 京都大学医学研究科特任助教授

β -Klothoノックアウトの変異表現型はFGFR4（FGF19がリガンド）ノックアウトマウスのそれとそっくりであること、FGF23ノックアウトマウスの変異表現型がKlotho変異マウスのそれと極めて類似していることを見いだした。また、 β -Klothoノックアウトマウスでは血糖調節の異常が観察され、FGF21との関連が検討され、 β -KlothoとFGF19がコレステロール代謝を、 β KlothoとFGF21がグルコース代謝を、そしてKlothoとFGF23がカルシウム代謝を制御していることが示唆された

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リスクファクターである肥満や代謝異常におけるコレステロール代謝、グルコース代謝、カルシウム代謝の関与を解明し、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、コレステロール代謝制御、グルコース代謝制御、カルシウム代謝制御における β -Klothoの分子機能を解析した。

B. 研究方法

コレステロール代謝制御、グルコース代

謝制御、カルシウム代謝制御を中心に β -Klotho、Klothoノックアウトマウスの変異表現型を解析した。高コレステロール食、糖負荷などのストレスを与え、それに対する応答を解析した。

FGF19, 21, あるいは23 がコレステロール代謝制御、グルコース代謝制御、カルシウム代謝制御を制御する機構に β -Klotho、Klothoが関与していることがわかり、Hec293細胞による解析系を用いて解析した。

（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ノックアウトの上記の変異表現型はFGFR4 (FGF19がリガンド) ノックアウトマウスのそれとそっくりであること、FGF23ノックアウトマウスの変異表現型がKlotho変異マウスのそれと極めて類似していることを見いだした。FGFファミリーの中でFGF23、FGF19およびFGF21は血中を循環し、シグナル伝達因子として機能している特殊なグループである。そこで、FGF21と β -Klothoとの関連が問題となり、FGF21が脂肪細胞に作用しGLUT1の発現を亢進させ、脂肪細胞へのグルコースの取り込みを増加させ血糖値を低下させると報告されたことから、 β -Klothoノックアウトマウスに糖を負荷して、それに対する応答をしらべたところ、その異常が示唆された。これらの結果から β -KlothoとFGF19がコレステロール代謝を、 β -KlothoとFGF21がグルコース代謝を、そしてKlothoとFGF23がカルシウム代謝を制御していることが示唆された。それを確認するためにEgr-1のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーター遺伝子を導入したHec293細胞を準備し、それにKlotho、あるいは β -Klotho発現ベクターを導入し、一方、培地にFGF19, 21, あるいは23を添加し、そのシグナル伝達をLuc活性を測定することで解析した。結果として、FGF19, 21のシグナルは β -Klothoの発現細胞でのみ伝わり、FGF23のシグナルはklothoの存在下のみで伝わることを確認した。

D. 考察

FGFの多様性に比してFGF受容体は少なく循環しているFGF群がどのようにしてターゲット細胞の受容体の特異的に認識してシグナルを伝えるかは謎とされてきたが、上記の結果は、この制御機構にKlotho、 β -Klothoが関与していることを示唆しており、

E. 結論

(1) β -Klothoノックアウトの上記の変異表現型はFGFR4 (FGF19がリガンド) ノックアウトマウスのそれとそっくりであること、FGF23ノックアウトマウスの変異表現型がKlotho変異マウスのそれと極めて類似していることを見いだした。また、 β -Klothoノックアウトマウスでは血糖調節の異常が観察され。これらの結果からFGFとklothoとの関係を解析し、 β -KlothoとFGF19がコレステロール代謝を、 β KlothoとFGF21がグルコース代謝を、そしてKlothoとFGF23がカルシウム代謝を制御していることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

Klothoによるカルシウムホメオスタシス制御機構 (日本生化学会シンポジウム)

3. 学会発表

H. 知的財産の出願・登録状況

1 特許取得

2 実用新案登録

3. その他

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

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
Ito S., Fujimori T., Furuya A., Satoh J., Nabeshima Y., Nabeshima Y.	Impaired negative feedback suppression of bileacid synthesis in mice lacking bKlotho.	J. Clin. Invest.	115	2202-2208	2005
Toyama R., Nabeshima Y., Tsuji Y., Fujimori T., Nabeshima Y.	Impaired regulation of gonadotropin-releasing hormone leads to the atrophy of the female reproductive system in klotho-deficient mice.	Endocrinology	147(1)	120-129	2006

Impaired Regulation of Gonadotropins Leads to the Atrophy of the Female Reproductive System in *klotho*-Deficient Mice

Ryusuke Toyama, Toshihiko Fujimori, Yoko Nabeshima, Yoshiko Itoh, Yoshihito Tsuji, R. Yoshiyuki Osamura, and Yo-Ichi Nabeshima

Department of Pathology and Tumor Biology (R.T., T.F., Y.N., Y.T., Y.-I.N.), Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan; Core Research for Evolutional Science and Technology (T.F., Y.N., Y.-I.N.), Japan Science and Technology Corporation, Tokyo 170-0013, Japan; and Teaching and Research Support Center (Y.I.), Department of Pathology (R.Y.O.), School of Medicine, Tokai University, Boseidai, Ishihara-city, Kanagawa 259-1193, Japan

klotho-Deficient mice exhibit a syndrome resembling human premature ageing, with multiple pathological phenotypes in tissues including reproductive organs. It was proposed that *Klotho* might possess the hormonal effects on many organs. In this study, the female reproductive system of *klotho* mice was examined to reveal the mechanism that brought the female sterility by histological and molecular approaches. We observed cessation of ovarian follicular maturation at the preantral stage and the presence of numerous atretic ovarian follicles and atrophic uteri. *In situ* hybridization analysis revealed that LH receptor and aromatase P450 were not expressed in the ovaries. These results suggest the impairment of gonadal development during the antral transition process. We next addressed the responsible organs for the failure of

antral transition. Transplantation of *klotho* ovaries to wild-type mice resulted in the ability to bear offspring. Administration of FSH or GnRH induced advanced maturation of ovaries and uteri in *klotho* mice. These results indicate that the female reproductive organs in *klotho* mice are potentially functional and that *klotho* gene deficiency leads to the atrophy of reproductive organs via impairment of the hypothalamic-pituitary axis. Absence of the estrus cycle and constant low trends of both FSH and LH levels were found in female *klotho* mice. Immunohistochemical analysis revealed that the production of both FSH and LH were decreased in pituitary gland. Taken together, our findings suggest the involvement of *klotho* in the regulatory control of pituitary hormones. (*Endocrinology* 147: 120–129, 2006)

WE ESTABLISHED A mouse mutant exhibiting a syndrome resembling human ageing that includes short lifespan, atrophy of outer genital organs, impaired maturation of gonadal cells, sterility of both sexes, osteopenia, arteriosclerosis, skin atrophy, growth retardation, ectopic calcification, impaired glucose metabolism, atrophy of thymus, and pulmonary emphysema (1). We also identified the responsible gene, *klotho*, which is expressed mainly in the kidney and choroid plexus and weakly in some other organs including the pituitary gland and ovary (1, 2). The *klotho* gene encodes a membrane protein containing the KL domains that show homology to β -glucosidase, which is secreted after the cleavage in the extracellular domain (1, 3, 4). The secreted *Klotho* protein was found in sera and cerebrospinal fluid (5). Atrophic tissues in *klotho* mouse are different from those that express *klotho*, suggesting that *Klotho* or other soluble factor(s) might exert hormonal effects. So far, a function for secreted *Klotho* protein has been implicated by the partial rescue of some organs by ectopic expression of the membrane form of *Klotho* (6, 7). Alternatively, the possibility exists that pituitary hormones might mediate *Klotho* activity (1). Ovar-

ian follicular development is mainly regulated by pituitary gonadotropins, FSH and LH (8, 9). Both FSH and LH are synthesized in gonadotrophs of the anterior pituitary, stored in secreting granules (10), and secreted in response to GnRH signals from the hypothalamus. Ovarian follicular growth proceeds to the preantral stage independently of gonadotropin regulation (11, 12). Further development requires the FSH signal through the FSH receptor, exclusively expressed in the granulosa cells (13). FSH signal induces granulosa cell proliferation and expression of several genes including LH receptor (LHR) and aromatase P450 (P450arom) (14). P450arom is encoded by the *cyp19* gene and catalyzes the final step in the biosynthesis of estrogens from androgens (15). Estrogens, produced by the collaborative actions of granulosa and theca cells (8), possess many functions affecting the reproductive system (16), bone and mineral metabolism (17, 18), or others.

In this study, we examined the female genital organs of *klotho* mice and attempted to determine how *Klotho* exerts its function. *klotho* mice exhibited hypogonadotropic hypogonadism (19), probably due to the lack of GnRH stimulation. These results indicate that *klotho* deficiency affects the regulation of the endocrine system by the hypothalamic-pituitary axis.

Materials and Methods

Animals

Wild-type (+/+) and homozygous *klotho* mice (*kl/kl*) were obtained by mating heterozygous mice (*kl/+*) carrying the insertional mutation

First Published Online September 22, 2005

Abbreviations: hCG, Human chorionic gonadotropin; LHR, LH receptor; P450arom, aromatase P450; PMSG, pregnant mare's serum gonadotropin; SCID, severe combined immunodeficiency disease.

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

in the *klotho* gene locus (TA20; C3H/J and C57BL/6J mixed background) (1). All animals were maintained and used according to accepted standards of human animal care and use under specific pathogen-free conditions at Kyoto University (Kyoto, Japan).

Histology

Ovaries and uteri were dissected out, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 16 h, dehydrated through an ethanol series (70, 95, 100%), penetrated with chloroform, embedded in paraffin, and microtome-sectioned to a thickness of 6 μm . Specimens were dewaxed through xylene, 100, 90, 70, and 50% ethanol, and processed for staining with hematoxylin and eosin or for *in situ* hybridization analysis.

Fragments of pituitary were fixed by immersion with 1% glutaraldehyde in phosphate buffer (pH 7.4) for 2 h at room temperature, dehydrated in graded methanol at -30°C , and embedded in Lowicryl K4M at -20°C . It took 24 h at -20°C and a subsequent 48 h at room temperature for the polymerization of Lowicryl K4M using UV rays. Immunoelectron microscopic staining was done on ultrathin sections using the protein A gold method after applying primary antibodies. Immunoreacted ultrathin sections were examined with a JEOL 1200EX electron microscope (20).

Ovary transplantation

Ovary transplantation was performed as described previously (21–23), using 4-wk-old *klotho* mice as donors and 6-wk-old severe combined immunodeficiency disease (SCID) mice as recipients to avoid immunological rejection of tissues. The ovaries of anesthetized *klotho* mice were harvested and kept in prewarmed culture medium. Recipient SCID female mice were anesthetized with Avertin. A dorsolateral incision about 1.0 cm long was made in the lumbar region on the either side of the midline. Through the incision, the gonadal tissues were gently pulled outside the body. The fat pad of the tissue was fastened to a cotton gauze by forceps to operate easily. The ovarian bursa was cut to make a small incision at the opposite side of the oviduct. Then, the ovary was removed by cutting the ovarian stalk with scissors. After bleeding stopped, donor ovaries from each *klotho* mouse were transplanted into the empty bursas of each recipient SCID mouse. Then, the bursas were placed back and incisions closed using wound clips. Two weeks after operation, treated female SCID mice were mated with 8-wk-old BALB/c male mice. Offspring born to recipient mice were examined for coat color and confirmed by genotyping PCR.

Gonadotropin treatment

To induce ovulation, 5-wk-old mice were injected intraperitoneally with 5 IU pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) (Serotropin,

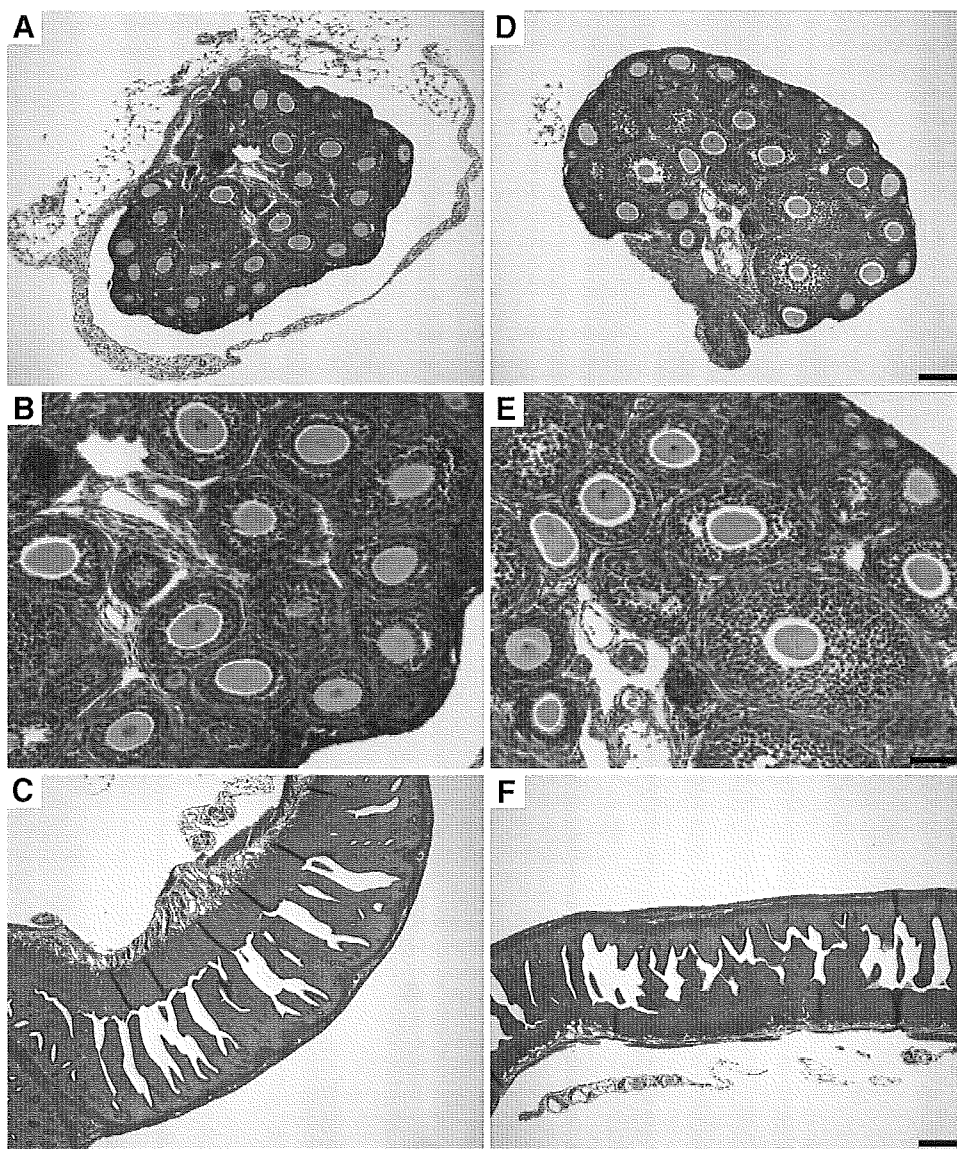


FIG. 1. Histology of reproductive organs obtained from 12-d-old wild-type (A–C) and *klotho* (D–F) mice. Wild-type (A) and *klotho* (D) ovaries; bar, 100 μm . B and E, Higher magnification of A and D, respectively; bar, 50 μm . There was no apparent difference between the genotypes. Uterus of wild-type (C) and *klotho* (F) mice; bar, 200 μm .

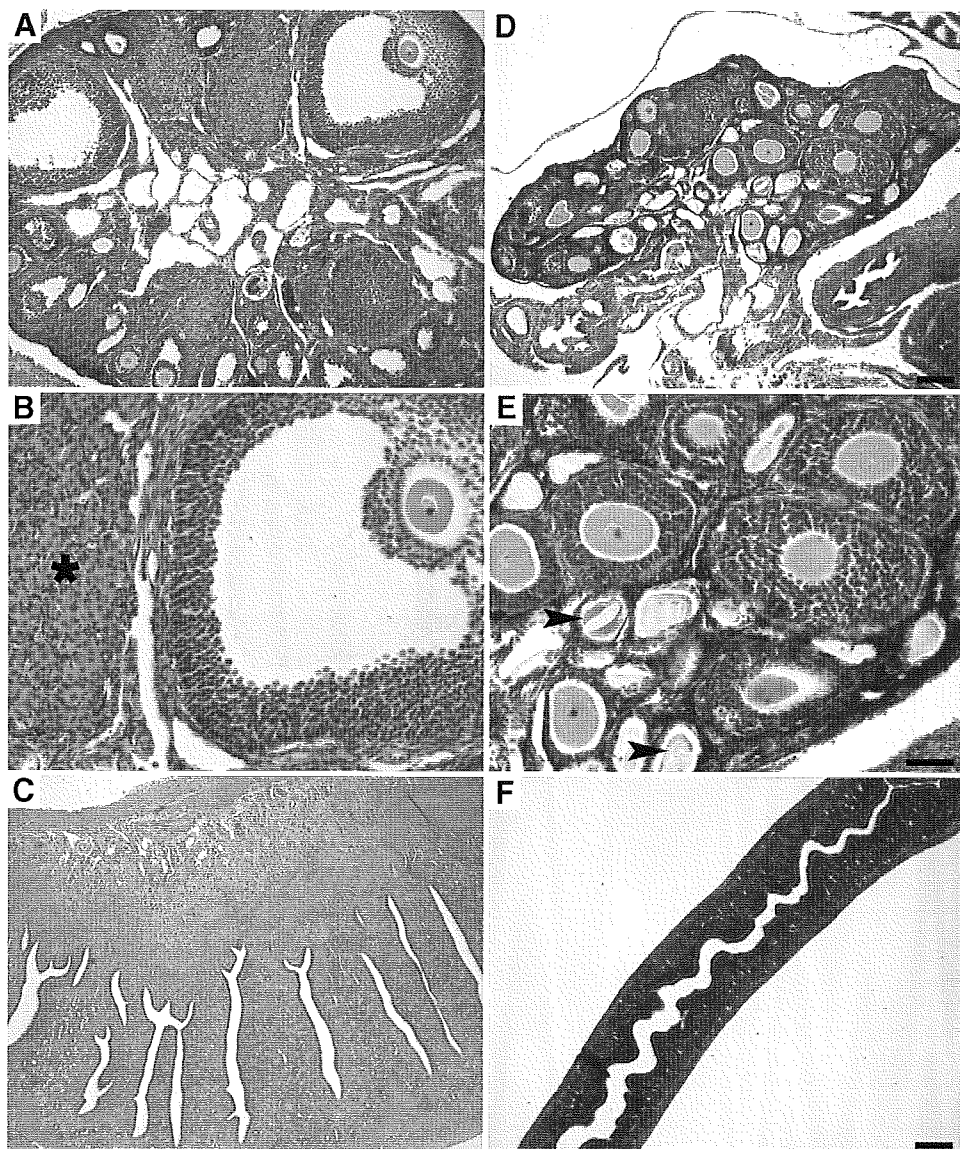


FIG. 2. Histology of reproductive organs obtained from 8-wk-old wild-type (A–C) and *klotho* (D–F) mice. Wild-type (A) and *klotho* (D) ovaries; bar, 100 μ m. B and E, Higher magnification of A and D, respectively; bar, 50 μ m. Large antral follicles and corpora lutea (marked with asterisk) were present in wild type. There were many atretic follicles (arrowheads), but matured follicles beyond the preantral stage were not observed in *klotho* mouse ovaries. Uterus of wild-type (C) and *klotho* (F) mice; bar, 200 μ m. Uterus size was decreased and the endometrium appeared lean in *klotho* mice.

Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd., Tokyo, Japan). Forty-eight hours after treatment, 5 IU human chorionic gonadotropin (hCG) (Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) was administered. Ovarian tissues were collected 48 h after PMSG treatment or 24 h after hCG treatment.

FSH and GnRH treatments

Female *klotho* mice at 4–5 wk of age were injected sc with 4 μ g ovine FSH (Biogenesis, Ltd., Poole, UK), 20% polyvinyl pyrrolidone (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan), 0.9% NaCl (24, 25), or 300 ng GnRH (Bachem, Bubendorf, Switzerland), 20% polyvinyl pyrrolidone, or 0.9% NaCl twice a day for 3 d. For long-term experiments, 50 ng GnRH in 0.9% NaCl was administered sc to female *klotho* mice at 4–5 wk of age every 2 h for 5 d (26), and then ovaries and uteri were dissected out and used for histological analysis and *in situ* hybridization analysis.

In situ hybridization

In situ hybridization was performed as described (27). Processed slides were counterstained with nuclear fast red. RNA probes used were designed basically as previously described (28). Sense and antisense probes for FSHR were designed from nucleotides 367–1266 of GenBank clone AF095642, LHR probes were designed for 592–1331 of M81310, and

P450arom probes were designed for 42–659 of D00659. These regions were subcloned into pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA) vectors and used to synthesize RNA probes with DIG RNA Labeling kit (Roche Molecular Biochemicals Corp., Mannheim, Germany) according to the manufacturer's protocol.

Measurement of serum levels of gonadotropins and steroids by RIA

Aliquots of blood were collected from 7- to 8-wk-old female wild-type and *klotho* mice. Sera were prepared at 4 C and kept at –80 C until the assay. Measurements of FSH and LH levels in sera were performed by SRL, Inc. (Tokyo, Japan) using the rat FSH [125 I] and LH [125 I] assay systems (BIOTRAK, Amersham Pharmacia biotech UK, Ltd., Buckinghamshire, UK), according to the manufacturer's instruction. Measurements of estradiol and progesterone levels in sera were performed by SRL, Inc. using the DPC estradiol kit and DPC progesterone (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA), respectively, according to the manufacturer's instruction. The inter- and intraassay coefficients of variation were within 5–12%. Limits of detection for the hormone assay were 0.09 ng/tube (FSH), 0.08 ng/tube (LH), 12.2 pg/ml (estradiol), and 0.06 ng/ml (progesterone). Sera (200–500 μ l) were used for measurements.

Statistical analysis

FSH, LH, estradiol, and progesterone concentrations in sera of wild-type and *klotho* mice were compared by F test for variance and Wilcoxon-Mann-Whitney test for median. Statview software (SAS Institute, Inc., Cary, NC) was used for the analysis. Differences between the two groups were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results

To investigate the female reproductive system of *klotho* mice, ovaries and uteri were examined histologically. Marked differences were not found between 12-d-old *klotho* mice and wild-type littermates (Fig. 1), except that granulosa cells appeared slightly more layered in ovarian follicles of *klotho* mice than those of wild-type mice. At 8 wk old, apparent differences were observed. Although ovaries of wild-type mice contained corpora lutea and follicles at every stage of development including preovulatory follicles (Fig. 2, A and B), ovaries of *klotho* homozygous littermates did not contain any follicles beyond the preantral stage or corpora

lutea (Fig. 2, D and E). Instead, many atretic follicles were observed (Fig. 2E, arrowheads). More than 50 ovaries of randomly selected *klotho* mice were examined, and this was the case in all of them. The uteri recovered from 8-wk-old *klotho* mice were lean and atrophic, whereas those of wild-type mice were healthy (Fig. 2, C and F). These differences emerged around 3 wk of age and became apparent at 7 wk of age (data not shown).

Next, we examined the expression of genes at the specific stage of follicular maturation by *in situ* hybridization. At the age of 8 wk, FSHR was sufficiently expressed in some follicles of both wild-type and *klotho* mice (Fig. 3, A and D). P450arom (cyp19) was expressed in antral follicles of wild-type mice (Fig. 3B, arrows) but could not be detected in *klotho* mouse ovaries (Fig. 3E). LHR was abundantly expressed in mural granulosa cells of preovulatory follicles, luteal cells, and theca cells in ovaries of 8-wk-old wild-type mice (Fig. 3C), whereas it was not detectable in ovaries of 8-wk-old *klotho* mice, even in the theca cells (Fig. 3F).

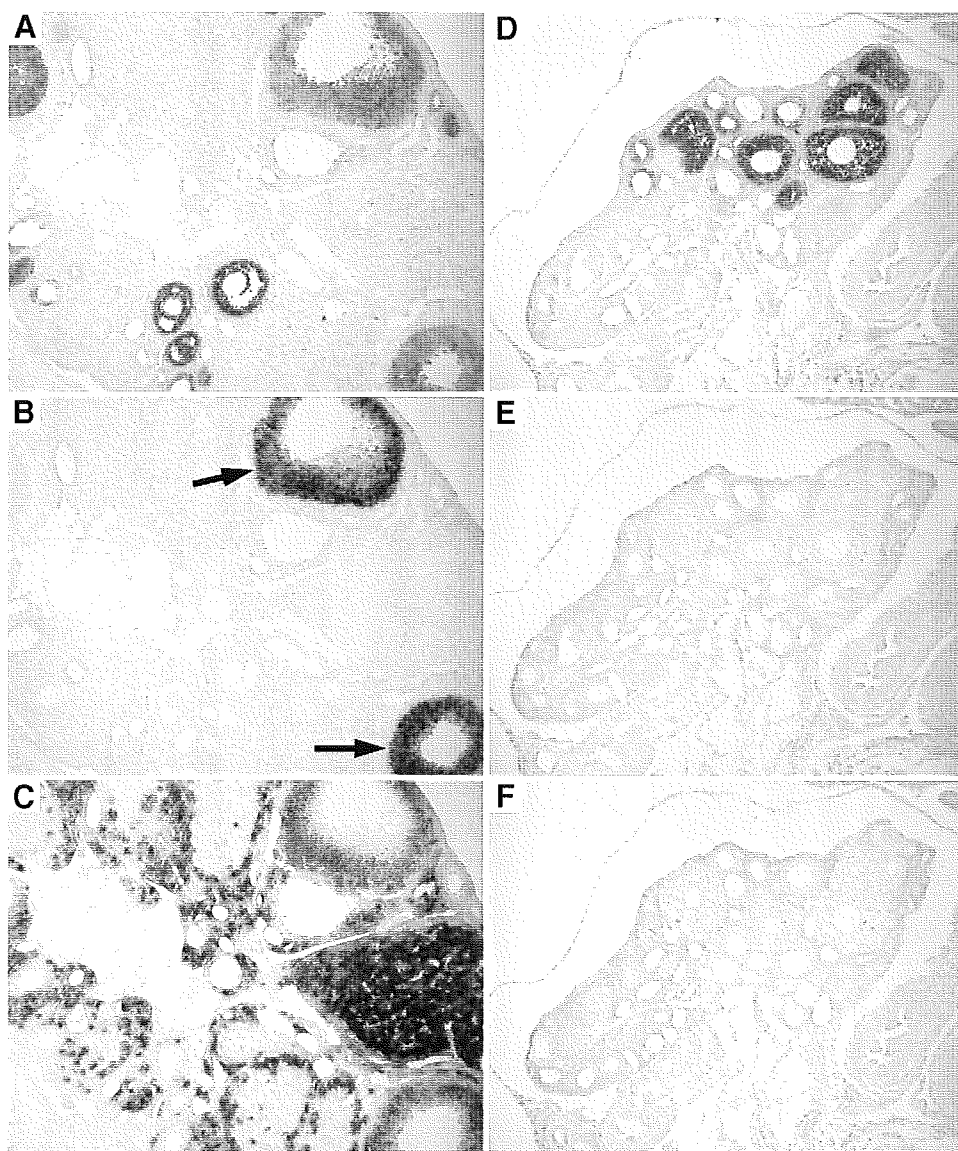


FIG. 3. *In situ* hybridization analysis of FSHR, LHR, and P450arom in 8-wk-old wild-type and *klotho* ovaries. FSHR (A and D), LHR (B and E), and P450arom (C and F) expression were examined by *in situ* hybridization in wild-type (A–C) and *klotho* (D–F) ovaries. FSHR was expressed in healthy follicles of wild-type (A) and *klotho* (D) ovaries. P450arom was abundantly expressed in preovulatory follicles (arrows) of wild type (B), whereas no signal was detected in *klotho* ovaries (E). LHR was abundantly expressed in healthy follicles and corpora lutea of wild-type mice (C). In *klotho* mice (F), LHR was not detected even in the theca cells of healthy follicles.

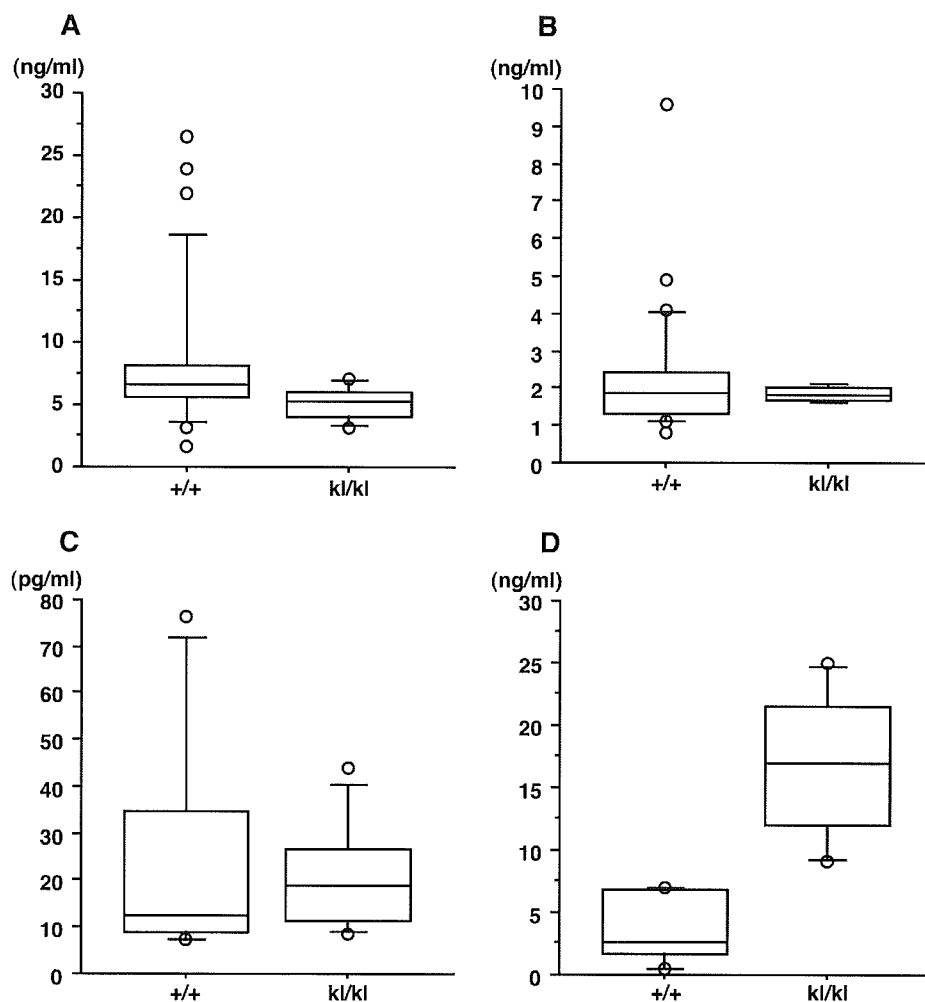


FIG. 4. Gonadotropin and steroid concentration in sera of 7- to 8-wk-old wild-type and *klotho* female mice. Data are represented by box and whiskers plot for FSH (A), LH (B), estradiol (C), and progesterone (D). Significant differences in the variance were obtained for FSH ($P < 0.001$) and LH ($P < 0.001$). Significant difference in the median was obtained only for progesterone ($P < 0.01$).

Because the vaginal opening was too narrow to recover the vaginal smear and amount of serum volume was too small, it was difficult to determine the stage of estrus cycle in individual *klotho* mice. Accordingly, we selected mice randomly to collect serum samples and measured the concentration of hormones. The serum FSH levels of 7- to 8-wk-old female wild-type (+/+) and *klotho* (*kl/kl*) mice were 8.3 ± 6.0 ng/ml (mean \pm SD, $n = 30$) and 5.2 ± 1.4 ng/ml ($n = 8$), respectively (Fig. 4A). The serum LH levels of 7- to 8-wk-old female wild-type and *klotho* mice were 2.3 ± 1.8 ng/ml ($n = 26$) and 1.8 ± 0.2 ng/ml ($n = 5$), respectively (Fig. 4B). The serum estradiol levels of 7- to 8-wk-old female wild-type and *klotho* mice were 25.4 ± 26.8 pg/ml ($n = 6$) and 20.7 ± 12.1 pg/ml ($n = 8$), respectively (Fig. 4C). The serum progesterone levels of 7- to 8-wk-old female wild-type and *klotho* mice were 3.5 ± 2.8 ng/ml ($n = 6$) and 16.9 ± 5.9 ng/ml ($n = 8$), respectively (Fig. 4D). Serum concentrations of both gonadotropins, FSH and LH, showed significantly smaller variance in *klotho* mice than in wild-type mice ($P < 0.001$). This might reflect the nonexistence of the estrus cycle in female *klotho* mice. Significant differences in the median were obtained only for progesterone ($P < 0.01$) but not for FSH ($P = 0.053$), LH ($P = 0.957$), and estradiol ($P = 0.082$). It was reported that low levels of *klotho* gene expression were detected in ovary

(1). To examine whether the marked gonadal abnormalities in *klotho* mice are primarily due to the defects in ovaries, we carried out two types of experiments. First, we examined the effect of ovary transplantation. Ovaries of 4-wk-old *klotho* homozygotes (*kl/kl*) (coat color is agouti) were transplanted into ovarian bursas of 6-wk-old wild-type SCID (albino) females, and recipient mice were subsequently bred to wild-type BALB/c (albino) males. All six recipient females became pregnant. A total of 34 pups (5.7 pups/litter) were born, 26

TABLE 1. Summary of ovary transplantation from *klotho* mice to wild-type mice

	Experiment						Total
	1	2	3	4	5	6	
+/+ (albino)	2	3	0	2	1	0	8
<i>kl/+</i> (agouti)	5	4	5	5	2	5	26

Ovaries of 4-wk-old *klotho* mice (agouti) were transplanted to six wild-type SCID mice (albino). These mice were crossed with wild-type Balb/c males (albino). The numbers of pups born in each litter are shown. Transplanted *klotho* mouse ovaries gave rise to offspring with agouti coat color in all six experiments. All agouti pups carried a heterozygous mutation in the *klotho* locus (*kl/+*). Albino pups come from the remainder of recipient (SCID) mouse ovary due to the incomplete removal.