

200607004A

別紙1

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鍋島陽一

平成19（2007）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. β Klothoの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--11
伊村明浩

- 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

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ノックアウトマウスでは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。FGF19/15がFGFR 4を介してCyp7A1の発現を抑制しており、このシグナル伝達システムに β -Klothoが必須である事を確認した。また、 β -KlothoノックアウトマウスではFGF15の発現が亢進していた。また、絶食によりFGF15の発現亢進が示唆されており、これらの結果から β -Klothoは食事摂取に応答してコレステロール代謝を制御する機構に関与していると推定される。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/FGF/15/19システムが想定され、その機能を解析する培養系を立ち上げた。 α -Klothoの機能を詳細に解析し、カルシウム恒常性制御の鍵を握る分子である事を明らかにした。ヒト β -Klotho遺伝子多型、特に蛋白をコードする部分について確認した。糖尿病との連鎖を解析したが現時点では明瞭な連鎖が確認されていない。

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最大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、 α -Klothoの分子機能、（2） β -Klotho/FGFシステムの機能に影響を与える分子の検索、（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) 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 (p450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。更にコレステロール、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？
FGF19が β -Klothoと同様にコレステロール代謝の制御関わる事が解り、 β -KlothoがFGF19のシグナル伝達の制御にどのように関わるかを解析した。

(3) β -Klothoの機能を制御する分子の探索

β -Klothoの機能を制御する分子を効率よく探索するためのin vitro解析系を構築した。FGFシグナルはEgr-1の発現を誘導することが知られており、Egr-1のプロモ

ーターの下流にLuc遺伝子をつないだレポーターを導入した細胞を作り、それに β -Klothoとトランスフェクトし、FGF19, 21, 23のシグナル伝達を解析した。

(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が糖尿病、肥満と連鎖するかを解析した。

(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、京大病院で倫理委員会にかけ、解析が認められたサンプルについてのみ解析に供した。

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。 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。 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。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 α -Klotho、 β -Klothoが関与していることを示唆しており、Egr-1のプロモーターの下流にLucをつないだ解析系により、FGF19, 21のシグナル伝達に β -Klothoが、FGF23のシグナル伝達に α -Klothoが必須である事を確認した。これらの結果から β -KlothoとFGF19がコレステロール代謝を、KlothoとFGF23がカルシウム代謝を制御していることを確認した。

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解析中である。

ヒト β -Klotho遺伝子多型と肥満、糖尿病と連鎖するかどうかを解析するために臨床グループ、ゲノム解析センターのグループとの共同研究を進めたが、現時

点では連鎖する多型は確認されていない。

D. 考察

上記の結果はFGF19, 21のシグナル伝達に β -Klothoが、FGF23のシグナル伝達に α -Klothoが必須である事を示しており、 β -KlothoとFGF19がコレステロール代謝を、KlothoとFGF23がカルシウム代謝を制御していることを確認した。この結果から、新たなコレステロール代謝制御システムが浮かび上がり、新たな薬剤開発のターゲットと考えている。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、機能促進抗体、機能阻害抗体を分離した。 β -Klothoの遺伝子多型を解析したが、現時点では連鎖が確認されていない。 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ノックアウトマウスでは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。FGF19/15がFGFR4を介してCyp7A1の発現を抑制しており、このシグナル伝達システムに β -Klothoが必須である事を確認した。また、 β -KlothoノックアウトマウスではFGF15の発現が亢進していた。さらに、絶食によりFGF15の発現亢進が示唆されており、これらの結果から β -Klothoは食事摂取に応答してコレステロー

ル代謝を制御する機構に関与していると推定される。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/FGF/15/19システムが想定され、その機能を解析する培養系を立ち上げた。 α -Klothoの機能を詳細に解析し、カルシウム恒常性制御の鍵を握る分子である事を明らかにした

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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)

Nabeshima Y. Toward a better understanding of Klotho. *Sci. Aging Knowledge Environ.* 2006 May 3; 2006(8):pe11 PMID: 16672727

Sato A., Hirai T., Imura A., Kita A., Iwano A., Muro S., Nabeshima Y., Suki B., Mishima M. Morphological mechanism of the development of pulmonary emphysema in klotho mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(7) 2331-2336 (2007)

Imura A., Tsuji Y., Murata M., Maeda R., Kubota K., Iwano A., Obuse C., Togashi K., Tominaga M., Kita N., Tomiyama K., Iijima J., Nabeshima Y., Fujioka

M., Asato R., Tanaka S., Kojima K., Ito J., Nozaki K., Hashimoto N., Ito T., Nishio T., Uchiyama T., Fujimori T., Nabeshima Y.

α -Klotho as a regulator of Ca homeostasis. *Science in press*

2. 学会発表

Nabeshima Y.

α -Klotho; a fundamental regulator of calcium homeostasis

Anti-aging International Meeting April 2006 Tokyo

Nabeshima Y.

α -Klotho; a fundamental regulator of calcium homeostasis

IUBMB conference June 18-23, 2006 Kyoto
Nabeshima Y.

α -Klotho; a fundamental regulator of calcium homeostasis

Cold Spring Harbor Symposium on Molecular Mechanism of Aging. Oct 3-7 2006
New York

鍋島陽一

Klotho蛋白が制御する新たな生体応答システム 第79回日本内分泌学会学術総会特別講演 4月19日 2006 神戸
鍋島陽一

Klotho familyによる生体恒常性維持機構 第30回阿蘇シンポジウム(ゲノムを医学する) 7月28日、2006 熊本

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

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、ゲノム解析センター、臨床グループとの共同研究を行い、肥満、糖尿病との連鎖を解析したが現時点では明瞭な連鎖が確認されていない。 β -Klothoノックアウトマウスを3年以上にわたって野生型マウスとノックアウトマウスを最も安定した条件で飼育するためにブリーダーに飼育を依頼し、飼育を続けているが現時点では飼育期間が短すぎて結論を得るに至っていない。 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ことは確認している。

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 -Klot

ho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。ついで、臨床科、ゲノム解析センターと共同で肥満、糖尿病との連鎖を解析した。

(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3年間、厳密な飼育条件下で飼育することを計画し、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。また、遺伝子多型解析はゲノムセンターの担当者が倫理委員会に申請し、許可を受けた計画に従って解析を進めた。なお、多型解析に用いたヒト遺伝子はインフォームドコンセントにより解析を承諾したヒトのサンプルのみを用いた。

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、実際の解析は京大ゲノムセンターにおいて行い、糖尿病

を中心に連鎖解析を実効したが、現時点では明瞭に連鎖する多型を見いだしていない。

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、ノックアウトがやや寿命が長い可能性があるが、更に多数のマウスの結果が得られないと統計学的な結論を出すことが出来ない状態にある。ただし、 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については結論が得られていない。 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の機能をターゲットとした創薬の可能性について今後発展させていきたい。

E. 結論

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、ゲノム解析センター、臨床グループとの共同研究を行い、肥満、糖尿病との連鎖を解析したが現時点では明瞭な連鎖が確認されていない。 β -Klothoノックアウトマウスを3年以上にわたって野生型マウスとノックアウトマウスを最も安定した条

件で飼育するためにブリーダーに飼育を依頼し、飼育を続けているが現時点では飼育期間が短すぎて結論を得るに至っていない。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ことは確認している。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

3. 論文発表

4. 論文発表

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)

Nabeshima Y. Toward a better understanding of Klotho. *Sci. Aging Knowledge Environment*. 2006 May 3; 2006(8):pe11 PMID: 16672727

Sato A., Hirai T., Imura A., Kita A., Iwano A., Muro S., Nabeshima Y., Suki B., Mishima M. Morphological mechanism of the development of pulmonary emphysema in klotho mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(7) 2331-2336 (2007)

Imura A., Tsuji Y., Murata M., Maeda R., Kubota K., Iwano A., Obuse C., Togashi K., Tominaga M., Kita N., Tomiyama K., Iijima J., Nabeshima Y., Fujioka M., Asato R., Tanaka S., Kojima K., It

o J., Nozaki K., Hashimoto N., Ito T., Nishio T., Uchiyama T., Fujimori T., Nabeshima Y.

α-Klotho as a regulator of Ca homeostasis. *Science* in press

5. 学会発表

Nabeshima Y.

α-Klotho; a fundamental regulator of calcium homeostasis Anti-aging International Meeting April 2006 Tokyo

Nabeshima Y.

α-Klotho; a fundamental regulator of calcium homeostasis

IUBMB conference June 18-23, 2006 Kyoto Nabeshima Y.

α-Klotho; a fundamental regulator of calcium homeostasis

Cold Spring Harbor Symposium on Molecular Mechanism of Aging. Oct 3-7 2006 New York

鍋島陽一

Klotho蛋白が制御する新たな生体応答システム 第79回日本内分泌学会学術総会 特別講演 4月19日 2006 神戸 鍋島陽一

Klotho familyによる生体恒常性維持機構 第30回阿蘇シンポジウム(ゲノムを医学する) 7月28日、2006 熊本

H. 知的財産の出願・登録状況

4. 特許取得

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結合分子、 β -Klothoの機能を制御する分子の探索

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決定した。ついで、発現臓器である肝臓、脂肪細胞において結合分子の探索を続けている。FGF19、21シグナル伝達に β -Klothoが必要であるとの結果が得られ、この事実をもとに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、 α -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、 β -Klotho、 α -Klothoをターゲットとした治療法開発に道を開いた。

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) β -Klothoに結合する分子について検討した。(2) β -Klothoの機能を効率良く解析するアッセイ系を確

立し、臨床応用を目指した研究を行った。

B. 研究方法

(1) 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。

(1) β -Klothoの機能を制御する分子の探索

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系列の細胞を準備し、それに α -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により、 β -Klothoの機能を解析した。

(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

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。分化した脂肪組織でも 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を同定した。ERに存在する膜蛋白が候補に挙がり、引き続いて免疫沈降、ウエスタンブロットにより結合分子の候補を絞ったが、えられた分子の生物学的機能と β -Klothoの関係が明瞭となっていない。そこで、再度、発現臓器である肝臓、脂肪細胞から免疫沈降を試み、候補者をリストしている段階にある。

β -Klotho蛋白の機能を制御する分子の探索のためには、効率的な解析システムの確立が必須であり、Egr-1/Lucによる解析システムを立ち上げた。このシス

テムを用いて2つの方向から検討した。一つは有効な抗体の分離であり、多数のモノクローナル抗体の効果を検討し、機能阻害、機能促進抗体を分離した。一方、Klothoが β -glycosidaseファミリーメンバーであったことから、その酵素活性を測定し、活性は弱い β -glucuronidase活性を持つことが解り、それを基盤に低分子化合物の探索を行い、ステロイドグルクロニドに阻害活性があることが解った。この阻害活性はFGFのシグナル伝達におけるKlothoの機能の制御を介して作用している可能性を検討している。

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蛋白に結合する膜蛋白を同定した。

β -Klotho蛋白機能阻害、機能促進抗体を分離した。一方、Klothoの酵素活性を基盤に低分子化合物の探索を行い、一連のステロイドグルクロニドに阻害活性があることが解った。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

6. 論文発表

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)

Imura A., Tsuji Y., Murata M., Maeda R., Kubota K., Iwano A., Obuse C., Togash

i K., Tominaga M., Kita N., Tomiyama K., Iijima J., Nabehsima Y., Fujioka M., Asato R., Tanaka S., Kojima K., Ito J., Nozaki K., Hashimoto N., Ito T., Nishio T., Uchiyama T., Fujimori T., Nabehsima Y.

α -Klotho as a regulator of Ca homeostasis. *Science in press*

H. 知的財産の出願・登録状況

7. 特許取得

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ノックアウトマウスではコレステロールを胆汁酸へと変換する律速酵素（Cyp7A1）とHMG-CoA reductaseの活性が亢進していた。一方、FGFR 4ノックアウトにおいても同様の変異表現型が観察され、FGF19/15がFGFR 4を介してCyp7A1の発現を抑制していることが推定され、このシグナル伝達システムに β -Klothoが必須である事を確認した。また、 β -KlothoノックアウトマウスではFGF15の発現が亢進していた。更に、絶食によるFGF15の発現亢進が示唆されており、これらの結果から β -Klothoは食事摂取に応答してコレステロール代謝を制御する機構に関与していると推定される。

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）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

（1） β -KlothoがCyp7A1の発現抑制に作

用してコレステロールホメオスタシスを制御していることが明らかとなっていたが、FGF19が β -Klothoと同様にコレステロール代謝の制御関わる事が解り、 β -KlothoがFGF19のシグナル伝達の制御にどのように関わるかを解析するためにin vitro解析システムを構築した。すなわち、FGFシグナルはEgr-1の発現を誘導することが知られており、Egr-1のプロモーターの下流にLuc遺伝子をつないだレポーターを導入した細胞を作り、それに β -Klothoとトランスフェクトし、FGF19, 21, 23のシグナル伝達を解析した。

（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

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、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。

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。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 α -Klotho、 β -Klothoが関与していることを示唆しており、Egr-1のプロモーターの下流にLucをつないだ解析系により、FGF19, 21のシグナル伝達に β -Klothoが、FGF23のシグナル伝達に α -Klothoが必須である事を確認した。これらの結果から β -KlothoとFGF19がコレステロール代謝を、KlothoとFGF23がカルシウム代謝を制御していることを確認した。

D. 考察

上記の結果はFGF19, 21のシグナル伝達に β -Klothoが、FGF23のシグナル伝達に α -Klothoが必須である事を示しており、 β -KlothoとFGF19がコレステロール代謝を、KlothoとFGF23がカルシウム代謝を制御していることを確認した。この結果から、新たなコレステロール代謝制御システムが浮かび上がり、新たな薬剤開発のターゲットと考えている。 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。

E. 結論

β -Klothoノックアウトマウスでは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。FGF19/15がFGFR 4を介してCyp7A1の発現を抑制しており、このシグナル伝達システムに β -Klothoが必須である事を確認した。また、 β -KlothoノックアウトマウスではFGF15の発現が亢進していた。さらに、絶食によりFGF15の発現

亢進が示唆されており、これらの結果から β -Klothoは食事摂取に応答してコレステロール代謝を制御する機構に関与していると推定される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

7. 論文発表

Sato A., Hirai T., Imura A., Kita A., Iwano A., Muro S., Nabeshima Y., Suki B., Mishima M. Morphological mechanism of the development of pulmonary emphysema in klotho mice. Proc Natl Acad Sci USA 104(7) 2331-2336 (2007)

Imura A., Tsuji Y., Murata M., Maeda R.

Kubota K., Iwano A., Obuse C., Togashi K., Tominaga M., Kita N., Tomiyama K., Iijima J., Nabeshima Y., Fujioka M., Asato R., Tanaka S., Kojima K., Ito J., Nozaki K., Hashimoto N., Ito T., Nishio T., Uchiyama T., Fujimori T., Nabeshima Y.

α -Klotho as a regulator of Ca homeostasis. Science in press

8. 学会発表

H. 知的財産の出願・登録状況

10. 特許取得

11. 実用新案登録

12. 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
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
Nabeshima Y.	Toward a better understanding of Klotho.	Sci. Aging Knowledge Evolution.	2006 May3	pe11 PMID: 16672727	2006
Sato A., Hirai T, Imura A., Kita A., Iwano A., Muro S., Nabeshima Y., Suki B., Mishima M.	Morphological mechanism of the development of pulmonary emphysema in klotho mice.	Proc Natl Acad Sci USA	104(7)	2331-2336	2007
Imura A., Tsuji Y., Murata M., Maeda R. Kubota K., Iwano A., Obuse C., Togashi K., Tominaga M., Kita N., Tomiyama K., Iijima J., Nabeshima Y., Fujioka M., Asato R., Tanaka S., Kojima K., Ito J., Nozaki K., Hashimoto N., Ito T., Nishio T., Uchiyama T., Fujimori T., Nabeshima Y.	α -Klotho as a regulator of Ca homeostasis.	Science	in press		2007