

200607004 B

別紙1

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

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に関する研究

平成16年度～18年度 総合研究報告書

主任研究者 鍋島 陽一

平成19(2007)年 4月

目 次

I. 総合研究報告

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に関する研究-----1

鍋 島 陽 一

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 6

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 8

総合研究報告書

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、 β -Klotho ノックアウトマウスを作成し、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。

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。更に、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/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。この系を利用して機能促進抗体、機能抑制抗体を分離した。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。 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。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

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 システムの機能を制御するシステムの開発と制御分子の探索、(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項目を検討した。

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。

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。

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。

(2) β -Klotho/FGF システムの機能を制御するシステムの開発と制御分子の探索、 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。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。

一方、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、機能解析システムとしての可能性を検討した。

(3) 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。

(4) 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年間以上、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。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。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)。

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台糖能を調べたが、やや低下している可能性が示唆されたが、結論に至るには更に解析条件を検討しなければならないと考えている。これらの結果から β -Klotho と FGF19 がコレステロール代謝をそして 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 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、それを確認するために EGR-1 のプロモーターの下流に

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。また、このシステムでは FGF21 のシグナル伝達には β -Klotho が必須であるとの結論が得られた。

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した。培養脂肪細胞からは ER に存在すると報告されている蛋白が同定され、免疫沈降、ウェスタンブロットによる解析でも確認されたが、この蛋白の知られている機能と β -Klotho ノックアウトマウスの変異表現型とのつながりが浮かび上がっていない。そこで、動物個体の肝臓、脂肪細胞、膵臓から免疫沈降を試みているが、最終結論にはいたっていない。

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ことは示された。

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、阻害活性を示す低分子化合物がリストされた。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が推定され、検討している。

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、このシステムを新たな薬剤開発のターゲットと考えている。コレステロール代謝改善につながる新しい方法として特許出願した。なお、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が、解析対象疾患、解析患者数の問題が残されており、検討を継続している。 β -Klotho ノックアウトマウ

スの寿命についても解析半ばであり、継続すべき課題となった。

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 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

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.* 279(11) 9777-9784 (2004)
- 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* 109(14) 1776-1782 (2004)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) Nabeshima Y.
Klotho deficient mouse: an in vivo model for human aging. *Drug Discovery Today: Disease Models* Vol.1(3) 223-227 (2004)
- 6) Ito S., Fujimori T., Furuya A., Satoh J., Nabeshima Y., Nabeshima Y.

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

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

7) 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)

8) Nabeshima Y.

Toward a better understanding of Klotho.

Sci. Aging Knowledge Evolution. 2006 May 3; 2006(8): pe11 PMID: 16672727

9) Segawa H, Yamanaka S, Ohno Y, Onitsuka A, Shiozawa K, Aranami F, Furutani J, Tomoe Y, Ito M, Kuwahata M, Tatsumi S, Imura A, Nabeshima Y, Miyamoto KI.

Correlation between hyperphosphatemia and type II Na/Pi cotransporter activity in klotho mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* (2006) Sep. 19

10) 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)

11) 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 Calcium homeostasis. Science in press

2. 学会発表

1) Nabeshima Y.

Klotho and Na,K-ATPase regulate the trafficking process of PTH secretory granules The Endocrine Society's 87th Annual Meeting. San Diego, June 6, 2005

2) Nabeshima Y.

α -Klotho; a fundamental regulator of calcium homeostasis

Anti-aging International Meeting

April 2006 Tokyo

3) Nabeshima Y.

α -Klotho; a fundamental regulator of calcium homeostasis

IUBMB conference June 18-23, 2006 Kyoto

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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

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

なし

2. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

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
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 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
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

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 bile acid synthesis in mice lacking β Klotho.	J. Clin. Invest.	115	2202-2208	2005
Toyama R., Nabeshi ma Y., Tsuji Y., Fuji mori T., Nabeshima Y.	Impaired regulation of gonadotropin-rel easing hormone lea ds to the atrophy of the female reprodu ctive system in klot ho-deficient mice.	Endocrinology	147(1)	120-129	2006
Nabeshima Y.	Toward a better un derstanding Klotho.	Sci. aging know ledge evolution.	2006 May 3	PMID:1667 2727	2006
Sato A., Hirai T Imu ra A., Kita A., Iwan o A., Muro S., Nabes hima Y., Suki B., Mi shima M.	Morphological mech anism of the develo pment of pulmonary emphysema in klot ho 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., Togas hi K., Tominaga M., Kita N., Tomiyama K., Iijima J., Nabehs ima Y., Fujioka M., Asato R., Tanaka S., Kojima K., Ito J., N ozaki K., Hashimoto N., Ito T., Nishio T., Uchiyama T., Fujim ori T., Nabehsima Y.	α -Klotho as a regulator of Ca homeostasis	Science	In press		2007