

Figure 7 | The effect of α -KL expression levels on the activity of transient receptor potential vanilloid calcium channel subtype 5 (TRPV5). (a) Representative immunoperoxidase staining for TRPV5 in renal biopsy sections from human patients with diabetic nephropathy (DN), IgA nephropathy (IgAN), and minimal change disease (MCD). (b) Renal TRPV5 mRNA expression levels in DN (black bars), IgAN (striped bars), and MCD (white bars). (c) Representative immunoperoxidase staining for TRPV5 in kidney specimens from the indicated mice. (d) Renal TRPV5 mRNA expression levels in STZ diabetic (black bars) and nondiabetic (white bars) mice. (e) $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in HEK293 cells transfected with adenovirus carrying the α -KL gene (α -KL-Ad) or *Lac Z* gene as control, at the indicated doses, with or without TRPV5 expression. (f) Western blotting and (g) mRNA expression levels of α -KL (black bars) and TRPV5 (white bars) in the indicated HEK293 cells. Data are shown as means \pm s.e.m. for each group. Original magnification, $\times 100$. Student's *t*-test was used to compare groups. #*P* < 0.05, vs. HEK293 cells without TRPV5 and α -KL gene transfected; **P* < 0.05, vs. HEK293 cells transfected with TRPV5 and *Lac Z*.

α -KL^{+/+} mice within 2 weeks after the establishment of diabetes mellitus, even when DN-related further decline of α -KL expression was not detected (Figure 6). Therefore, the increased UCa/UCr levels in the diabetic patients and mouse model of diabetes result from not only some diabetes-related changes such as glomerular hyperfiltration of calcium but also the 50% reduction in renal α -KL mRNA expression. Thus, hypercalciuria in the early stages of DN is at least partly due to α -KL loss in DCT.

Recently, evidence has accumulated that TRPV5 and Na⁺/K⁺-ATPase were carriers to mediate the activity of α -KL on calcium excretion in the DCTs.^{14,18,24} Our *in vitro* analyses showed that, in HEK293 cells transfected with both TRPV5 and α -KL, calcium uptake was significantly increased in proportion to the α -KL expression, indicating that the reduction of α -KL expression may be related to a reduced absorption of calcium via TRPV5 channels in the DCTs. This effect could reduce the capacity for calcium reabsorption in the DCTs to a level insufficient to meet the demand of the glomerular hyperfiltrated calcium in DN, which would in turn lead to more increasing urinary calcium excretion as α -KL expression levels decline. However, the other molecules including Na⁺/K⁺-ATPase may mediate the activity of α -KL on calcium excretion in the kidney, and further studies will be needed to more precisely clarify these underlying mechanism.

In conclusion, α -KL expression levels in the DCTs are decreased in the early stages of DN, which may affect urinary excretion of calcium in early DN.

MATERIALS AND METHODS

Study population

This study evaluated 74 patients with DN who manifested microalbuminuria, macroalbuminuria, and/or overt proteinuria, 90 patients diagnosed with IgAN by renal biopsy, and 26 patients with MCD. Spot urine and serum samples were collected between 0600 and 1000 h after a 10-h overnight fast. Serum levels of total protein, albumin, creatinine, calcium, inorganic phosphate, and glucose, as well as urinary levels of protein, creatinine, calcium, and inorganic phosphate, were measured in all patients. Serum 1,25(OH)₂ vitamin D₃ levels were measured by radioimmunoassay, and serum i-PTH levels were measured by ECLIA (SRL, Tokyo, Japan). Serum fibroblast growth factor 23 concentrations were measured by using an ELISA kit (Kainos laboratories, Tokyo, Japan). eGFR was calculated by the creatinine-based Modification of Diet in Renal Disease Study equation.²⁵ Patient characteristics are listed in Table 1. In this study population, we evaluate renal α -KL expression levels in 31 patients with DN who had undergone renal biopsy, 31 patients with IgAN, and 7 patients with MCD. Renal biopsy had been performed in patients, whose amount of urinary protein was over 0.5 g/day. The patient characteristics of this subset used to evaluate renal α -KL expression are listed in Supplementary Table online. All clinical study protocols were approved by our institutional ethics committee (No. 2002-009, Nara Medical University Ethics

Committee). Written informed consent was obtained in all cases from either the patient or his or her family members.

Animal studies

C57BL/6 mice, originally obtained from Japan Clea (Tokyo, Japan), and α -KL^{+/-} mice¹⁵ were housed under specific pathogen-free conditions in the Animal Research Institute of Nara Medical University. Diabetes was induced in both adult male C57BL/6 mice and α -KL^{+/-} mice at 8 weeks of age by intraperitoneal injections of STZ (200 mg/kg) as previously reported.²⁶ Mice were individually housed in metabolic cages to obtain 24-h urine collections before killing. Commercial kits were used to measure concentrations of urine creatinine and calcium (Creatinine-Test and Calcium E-Test Wako, Wako, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), as well as albumin (Albuwell M, Exocell, Philadelphia, PA). All procedures involving mice were performed in accordance with the National Institutes of Health guidelines for the care and use of live animals and were approved by the Nara Medical University Animal Care Committee.

Immunohistochemical studies

α -KL was immunohistochemically labeled using KM2076 antibody (1:50 dilution; a kind gift of Kyowa Hakko Kogyo);²⁷ human type I collagen was labeled using mouse anti-human collagen type I monoclonal antibodies (1:500 dilution; MP Biomedicals, LLC, Solon, OH); TRPV5 was labeled using rabbit anti-rat TRPV5 polyclonal antibodies (1:100 dilution; Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX) in sections from human renal biopsy specimens and murine kidneys. Human CD31, a marker of PTCs, was labeled using mouse anti-human CD31 monoclonal antibodies (1:100 dilution; Dako, Glostrup, Denmark). After primary antibody staining, labeling was visualized using a Dako Envision Kit. The number of CD31-positive PTCs within the confines of each of 10 random fields (delineated by a 1-cm² ocular grid viewed at $\times 100$ magnification) was expressed as a mean per field. We also evaluated the mean percentages of each of 10 random fields positive for type I collagen by using an auto-analyzer.

DNA constructs

The coding sequence of wild-type TRPV5 was amplified from mouse (strain C57BL/6) kidney cDNA and cloned into the pcDNA3 vector (TRPV5-pcDNA3 vector). The coding sequence of wild-type α -KL was amplified from mouse (strain C57BL/6) kidney cDNA, and recombinant adenoviral vector carrying α -KL gene (adeno- α -KL) was constructed using the Adeno-X expression system according to the manufacturer's protocol (Clontech laboratories, Mountain View, CA). All constructs were verified by DNA sequence analysis.

Cell transfection and ⁴⁵Ca²⁺ uptake assay

HEK293 cells were transfected with TRPV5-pcDNA3 vector using the FuGENE HD transfection reagent according to the manufacturer's protocol (Roche, Mannheim, Germany), and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum, and infected with adeno- α -KL and the control adeno-Lac Z, respectively, in a six-well plate. Two days after transfection, ⁴⁵Ca²⁺ (1 μ Ci/ml) uptake was performed as described previously.^{28,29}

Western blotting

Kidney and cell lysates were prepared using lysis buffer, and western blot analysis was performed as previously reported.^{27,29}

using specific antibodies, including monoclonal rat antibody for α -KL protein (KM2076)²⁷ (1:500 dilution) and polyclonal rabbit antibody for TRPV5 protein (1:100; Alpha Diagnostic International).

RNA extraction, reverse transcription, and real-time RT-PCR

Total cellular RNA was extracted from human frozen renal biopsy specimens, murine renal cortex, or HEK293 cells, and first-strand cDNA was constructed as previously described.^{30,31} For real-time PCR, 1 μ l of each first-strand reaction product was amplified with appropriate primers and the corresponding fluorescent probes for human and murine α -KL (assay IDs: Hs00183100_m1, Mm00502002_m1) and TRPV5 (assay IDs: Hs00219765_m1, Mm01166029_m1), human β -actin (assay ID: Hs00242273_m1), or murine glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (assay ID: Mm99999915_m1). These probes were designed by the Applied Biosystems 'Assay-on-Demand' service (Foster City, CA). The ratios of human α -KL/ β -actin mRNA, human TRPV5/ β -actin mRNA, murine α -KL/glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase mRNA, and murine TRPV5/glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase mRNA were calculated for each sample.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the StatView 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC). Numerical results were expressed as means \pm s.d. Student's *t*-test was used for normally distributed variables. To compare groups, we used a one-way analysis of variance, followed by *post-hoc t*-test with Fisher-Protected Least Significant Differences adjustment. For variables with a skewed distribution, we used a Kruskal-Wallis analysis of variance by ranks with Bonferroni adjustment. The Pearson correlation coefficient was used to assess the relationships between renal α -KL mRNA expression levels and clinical and pathological parameters. Multiple regression analysis was performed to assess the combined influence of clinical variables on UCa/UCr among all patients with DN, IgAN, and MCD, who had undergone renal biopsy. Independent variables included levels of renal α -KL expression, serum 1,25(OH)₂ vitamin D₃, serum i-PTH, corrected serum calcium, as well as eGFR and age. *P*-values less than 0.05 were considered to be significant.

DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by a research grant from the Ministry of Education and Science of Japan. We are indebted to Miss Aya Asano and Mrs Miyako Sakaida of Nara Medical University for their excellent technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. Time course of urinary albumin to creatinine ratios (UACR) in diabetic (closed circles) and nondiabetic (open circles) mice.

Figure S2. Representative features of STZ-induced diabetic (a, b, c) and nondiabetic (d, e, f) mouse kidneys (periodic acid-methenamine-silver stain) at 0 weeks (a, d), 4 weeks (b, e), and 8 weeks (c, f) after the establishment of diabetes.

Table S1. Clinical characteristics of patients for renal α -KL expression analysis.

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/ki>

REFERENCES

- Raskin P, Stevenson MR, Barilla DE *et al*. The hypercalciuria of diabetes mellitus: its amelioration with insulin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1978; **9**: 329–335.
- Anwana AB, Garland HO. Renal calcium and magnesium handling in experimental diabetes mellitus in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1990; **122**: 479–486.
- Lee CT, Lien YH, Lai LW *et al*. Increased renal calcium and magnesium transporter abundance in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Kidney Int* 2006; **69**: 1786–1791.
- Ward DT, Yau SK, Mee AP *et al*. Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 779–790.
- Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes—a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2007; **18**: 427–444.
- Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M *et al*. Diabetic patients have an increased risk of vertebral fractures independent of BMD or diabetic complications. *J Bone Miner Res* 2009; **24**: 702–709.
- Guruprakash GH, Krothapalli RK, Rouse D *et al*. The mechanism of hypercalciuria in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism* 1988; **37**: 306–311.
- Ohara N. Impaired intestinal active calcium absorption and reduction of serum 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ in streptozotocin-induced diabetic pregnant rats with hypocalcemia in their fetuses. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2000; **27**: 100–102.
- Schedl HP, Christensen KK, Ronnenberg WC. Effects of diabetes on calcium uptake by rat brush border membrane vesicles. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; **22**: 272–276.
- Friedman PA, Gesek FA. Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation. *Physiol Rev* 1995; **75**: 429–471.
- Garland HO, Harris PJ, Morgan TO. Calcium transport in the proximal convoluted tubule and loop of Henle of rats made diabetic with streptozotocin. *J Endocrinol* 1991; **131**: 373–380.
- Boland PS, Garland HO. Renal micropuncture study of the effects of D-glucose tubular calcium handling in the anaesthetized rat. *Exp Physiol* 1993; **78**: 175–181.
- Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H *et al*. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; **390**: 45–51.
- Imura A, Tsuji Y, Murata M *et al*. α -Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science* 2007; **316**: 1615–1618.
- Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y *et al*. Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression. *Circulation* 2004; **109**: 1776–1782.
- Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T *et al*. Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol* 2003; **17**: 2393–2403.
- Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T *et al*. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 2006; **444**: 770–774.
- Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW *et al*. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science* 2005; **310**: 490–493.
- Alexander RT, Woudenberg-Vrenken TE, Buurman J *et al*. Klotho prevents renal calcium loss. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**: 2371–2379.
- Mogensen CE. Glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term and long-term juvenile diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1971; **28**: 91–100.
- Mogensen CE, Christensen CK, Pedersen MM *et al*. Renal and glycemic determinants of glomerular hyperfiltration in normoalbuminuric diabetics. *J Diabet Complications* 1990; **4**: 159–165.
- Bohle A, Mackensen-Haen S, Wehrmann M. Significance of postglomerular capillaries in the pathogenesis of chronic renal failure. *Kidney Blood Press Res* 1996; **19**: 191–195.
- Bohle A, von Gise H, Mackensen-Haen S *et al*. The obliteration of the postglomerular capillaries and its influence upon the function of both glomeruli and tubuli. Functional interpretation of morphologic findings. *Klin Wochenschr* 1981; **59**: 1043–1051.
- Cha SK, Ortega B, Kurosu H *et al*. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 9805–9810.
- Imai E, Horio M, Nitta K *et al*. Modification of the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study equation for Japan. *Am J Kidney Dis* 2007; **50**: 927–937.
- Usui HK, Shikata K, Sasaki M *et al*. Macrophage scavenger receptor-a-deficient mice are resistant against diabetic nephropathy through amelioration of microinflammation. *Diabetes* 2007; **56**: 363–372.
- Kato Y, Arakawa E, Kinoshita S *et al*. Establishment of the anti-Klotho monoclonal antibodies and detection of Klotho protein in kidneys. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **267**: 597–602.
- van de Graaf SF, Hoenderop JG, Gkika D *et al*. Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J* 2003; **22**: 1478–1487.
- Lu P, Boros S, Chang Q *et al*. The beta-glucuronidase klotho exclusively activates the epithelial Ca $_2^+$ channels TRPV5 and TRPV6. *Nephrol Dial Transplant* 2008; **23**: 3397–3402.
- Yoshimoto S, Nakatani K, Iwano M *et al*. Elevated levels of fractalkine expression and accumulation of CD16+ monocytes in glomeruli of active lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 2007; **50**: 47–58.
- Nakatani K, Fujii H, Hasegawa H *et al*. Endothelial adhesion molecules in glomerular lesions: association with their severity and diversity in lupus models. *Kidney Int* 2004; **65**: 1290–1300.

Cardiovascular Frontier

別刷



 **メディカルレビュー社**

〒113-0034 東京都文京区湯島 3-19-11 湯島ファーストビル TEL.03-3835-3041 FAX.03-3835-3063

〒541-0045 大阪市中央区道修町 1-5-18 朝日生命道修町ビル TEL.06-6223-1468 FAX.06-6223-0718

心腎連関解明の 新しい分子標的 α Klotho

財団法人先端医療振興財団先端医療センター
医薬品開発研究グループ

田中智洋

財団法人先端医療振興財団先端医療センター
センター長

鍋島陽一

Summary

α klotho 遺伝子変異マウスは石灰化や内臓肥厚などの動脈硬化病変、内臓機能障害、ストレス誘発性の不整脈、腎カルシウム・リン再吸収障害、骨密度の低下、異所性石灰化、皮膚萎縮、脱毛、性腺機能低下、肺気腫などヒトの老化に類似した多彩な表現型を若齢より発症する。しかしこれら病態と α Klotho の分子機能との関係は完全には解明されていない。 α Klotho は一回膜貫通型の膜蛋白質で、FGF23 の受容体構成分子として、また Na, K-ATPase の細胞膜移行の調節分子としてビタミン D, カルシウム, リンの制御を担う。 α Klotho には FGF23, Na, K-ATPase 以外に多数の結合分子が存在すると考えられ、さらに少なくとも一部は腎臓から分泌されて血清中に存在することから、 α Klotho が未知の分子メカニズムを介して、心腎連関、腎血管連関の病態生理に関与する可能性が注目される。

KEY WORDS

α Klotho, 動脈硬化, 石灰化, 血管内皮機能, カルシウム・リン代謝

はじめに —生命の糸を紡ぐ女神 Klotho—

ギリシャ神話では人の運命はゼウスとテミスの3人の娘、すなわちクロトー (Klotho)、ラケシス (Lakhsis)、アトロポス (Atropos) により決定づけられるとされる。クロトーは生命の糸を紡ぎ、ラケシスは糸の長さを測り、アトロポスは糸を断ち切って生命を終わりにするという。転じて遺伝子名 *klotho* は、老化症状の早期発症と寿命の著しい短縮を認める変異マウスの原因遺伝子に対し1997年に命名された¹⁾。 *klotho* の遺伝子産物は一回膜貫通型の膜蛋白質で腎臓、副甲状腺、脈絡叢、心洞房結節などに発現を認める。なぜ限局した発現を示す膜蛋白質の変異・欠失が、全身に及ぶ老化促進様症状や寿命短縮をもたらすのか、すべてはこの疑問から始まった。

心腎連関というすぐれて臨床的なコンセプトのなかで、まだまだ未知の点の多い Klotho が占める位置を正確に論じることはきわめてチャレンジングである。本稿では、 *klotho* 遺伝子変異マウスが示す心・腎・血管系の形態的・機能的異常と、Klotho の分子機能に関する最先端の知見とを呈示することで、解明された問題、未解明の課題を明確にし、責を果たしたい。

1 Klotho とは何か

klotho 遺伝子変異マウス (*kl/kl*) は、トランスジェニックマウスの作製過程で導入遺伝子が偶然ゲノム上に挿入変異を起こしたことにより得られた変異マウスで、変異遺伝子座のポジショナルクローニングにより *klotho* 遺伝子が発見された¹⁾。 *kl/kl* では挿入変異により *klotho* の mRNA 発現の著しい低下が認められ (severe hypomorph), 機能喪失型変異 (loss-of-function mutation) と考えられた。後に *klotho* ホモログである β *klotho* 遺伝子が発見されたことから、当初発見された *klotho* を現在では α *klotho* と呼ぶ。 *kl/kl* も、後に作製された α *klotho* 遺伝子欠損マウス (α *kl* $-/-$) も、生後3~4週齢までは正常に発生、発育し、野生型同胞とのあいだに外見上明らかな差を認めない。しかし4週齢以降、進行性の動脈硬化病変、骨密度の低下、皮膚萎縮、脱毛、失調性歩行、異所性石灰化、肺気腫など、ヒトの老化に類似した徴候が観察され (図1), 生後100日目までに全頭が死亡する^{1, 2)}。 *kl/kl* に認められる寿命短縮や多彩な老化様表現型は、EF-1 α promoter により

全身で α Klotho を発現させたトランスジェニックマウスとの交配によりほぼ完全に消失することから、これら表現型の原因が α Klotho の欠失であることが証明された¹⁾。

マウスの α Klotho は1014アミノ酸からなる1型膜蛋白質であり、N末端にシグナル配列を、C末端近傍に膜貫通領域を有する (図2)。N端側の長い細胞外領域には、互いに約20%のアミノ酸配列上の相同性を有し、約450アミノ酸からなる特異的配列の反復を認め、これらをN端側から順に *klotho* domain 1 (KL1) および2 (KL2) と呼ぶ¹⁾。KL1, 2は β グリコシダーゼや乳糖分解酵素 (lactase phlorizin hydrolase) とアミノ酸配列上20~40%の相同性を有するが、1型グリコシダーゼの活性中心に共通のグルタミン酸残基に変異を有し、グリコシダーゼとしての活性はきわめて弱い³⁾。 α Klotho は腎臓、脈絡叢、副甲状腺などに限局した発現分布を示し (図2), 発現臓器は *kl/kl* において顕著な表現型が認められる臓器と必ずしも一致しない。限られた臓器に発現する単一の蛋白質の欠損が、全身にわたる多彩な老化様表現型を生じるメカニズムが、 α Klotho 研究における最大の謎であった。

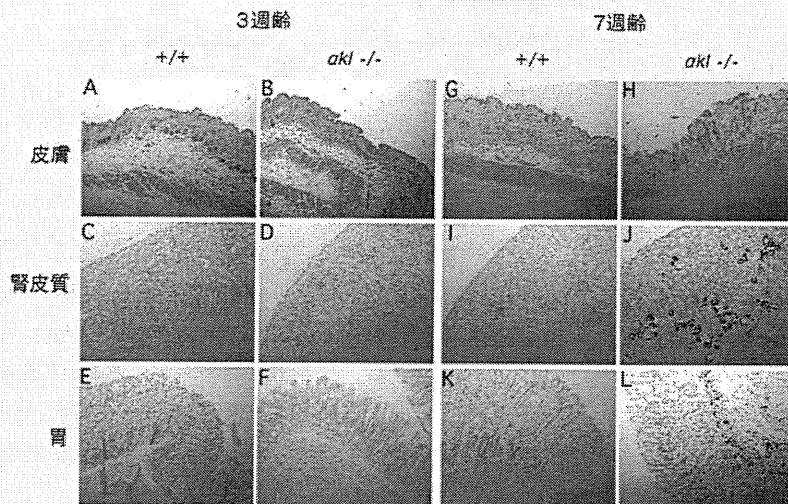


図1 α *klotho* 遺伝子欠損マウスの組織像

3週齢の α *klotho* 遺伝子欠損マウス (α *kl* $-/-$) (B, D, F) は、対照野生型同胞 (+/+) (A, C, E) と同様で正常の組織像を示すが、7週齢の α *kl* $-/-$ (H, J, L) は、+/+ (G, I, K) では認められない真皮・皮下組織の萎縮、腎皮質および胃粘膜下組織の異所性石灰化を示す。A, B, G, H 皮膚 (H&E染色 $\times 10$), C, D, I, J 腎皮質 (von Kossa 染色 $\times 20$), E, F, K, L 胃 (von Kossa 染色 $\times 20$)。

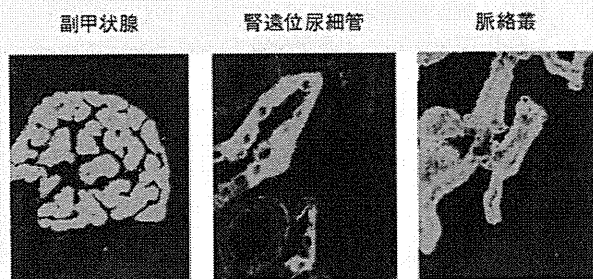
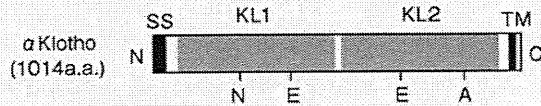


図2 マウス α Klotho の
1次構造(上段)と免疫染色像(下段)

α Klotho(1014 アミノ酸)はN末端にシグナル配列(SS)、C末端側に細胞膜貫通領域(TM)を有する1型膜蛋白質で、長い細胞外領域と短い細胞内領域を有する。細胞外領域にはグリコシダーゼ類似配列の反復を有し、これらをN端側からそれぞれKL1、KL2ドメインと呼ぶ。各々のKLドメインでは、1型グリコシダーゼにおいて保存され活性中心に位置するグルタミン酸残基(E)2カ所のうちのそれぞれ1つずつにアスパラギン(N)ないしアラニン(A)へのアミノ酸置換が認められる。 α Klothoとアミノ酸配列上高い相同性を示すホモログ、 β Klotho(1043アミノ酸)でもSS、グルタミン酸残基に変異を有するKL様ドメインの反復、TMという基本構造は保存されている。 α Klotho蛋白質は主として副甲状腺の主細胞、腎臓の遠位尿細管上皮細胞の一部、脈絡叢上皮細胞に発現が認められる。

2 α klotho 遺伝子変異マウスにおける血管・腎・心病変

kl/kl は血管系に顕著な進行性の病理組織学的変化を呈することから、初期の研究は循環器系臓器に注目して進められた。血管の形態学的異常は大動脈の広汎な中膜石灰化、中口径動脈における中膜石灰化と内膜肥厚、腎実質内などの小動脈・細動脈レベルの血管壁の石灰化である。これらの病変は4週齢頃に初めて認められた後、進行性の経過を示し、形態学的にはヒトの老化に伴って認められるMönckeberg型動脈硬化と酷似している¹⁾。異所性の石灰化は動脈壁以外に心筋組織内、胃粘膜、皮下組織、腎皮質などにも観察される(図1)¹⁾。

α klotho遺伝子ヘテロ変異マウス($kl/+$)ではニトロプルシドによる動脈拡張反応は保たれているが、アセチルコリンによる大動脈、細動脈の動脈弛緩反応が障害されていることから、 α Klothoの欠損ないし発現低下は動脈硬化病巣の形成のみならず内皮細胞の機能的障

害の原因となることが明らかとなった⁴⁾。 $kl/+$ では血管の石灰化はほとんど認められず、また早期老化様表現型や寿命短縮も認められないため、内皮機能障害はより軽微な α Klotho発現レベルの低下によって惹起されるものと考えられた。 $kl/+$ では、ノルエピネフリンによる血管収縮反応の亢進、尿中一酸化窒素(NO)代謝産物排泄の減少が報告されている^{4, 5)}。興味深いことに、 kl/kl では血管側の機能障害に加えて、凝固系側の因子であるPAI(plasminogen activator inhibitor)-1のmRNA発現が動脈硬化病巣、非病変部の血管内皮細胞、腎尿細管上皮細胞、心筋細胞において増加しており、血漿PAI-1濃度も高値を示す⁶⁾。これらの所見は、少なくとも血管病変については α klothoの単一遺伝子変異に基づく異常が、複数の障害機転を複合的に誘発することによりヒト老化に類似した病変を発症させていることを示唆する。さらに $kl/+$ や kl/kl では、血管病変の発症にとどまらず下肢虚血モデルにおける血管新生能(*in vivo*)や、切除大動脈片からの内皮細胞の遊走能(*in vitro*)が低下しており、これには骨髄や末梢血の

c-Kit⁺CD31⁺EPC(endothelial precursor cells)の減少の関与も示唆されている⁷⁾。

一方、 α Klothoの主要発現臓器である腎臓では kl/kl においてカルシウム、リンの再吸収障害が示されている⁸⁾。 kl/kl の腎臓では免疫染色により、野生型対照マウスには認めないフィブリン陽染性の糸球体が散見され、陽性糸球体数は kl/kl の全身病変の進行とともに増加する⁹⁾。腎臓における α Klotho発現量はいろいろなモデル動物やヒト症例において解析が行われており、たとえば高齢(60週齢)の自然発症高血圧ラット(SHR)、DOCA salt (deoxycorticosterone acetate salt)感受性高血圧ラット、5/6腎摘腎不全モデルラット、2型糖尿病モデルOLETFラットなどで低下することが知られている⁹⁾。 α KlothoのmRNAおよび蛋白発現の低下はヒト腎不全患者の腎生検組織においても確認されている¹⁰⁾。最近の筆者らの共同研究の結果、糖尿病性腎症症例においてはIgA腎症や微小変化群と比較して糸球体濾過率(GFR)の低下が軽度であっても早期から腎生検組織での α Klotho発現量が減少していることが示され、病態との関連が注目される¹¹⁾。糖尿病性腎症ではカルシウムの再吸収障害・尿中カルシウム喪失が顕著であることは以前より知られることから、腎臓の α Klotho発現低下がヒトにおいてもカルシウムやリン再吸収障害の原因となる可能性が強く示唆される¹¹⁾。STZ(streptozotocin)により糖尿病を誘発したマウスでは、糖尿病発症6週間後に初めて腎臓における α Klothoの発現低下が認められる。このように α Klotho発現低下は慢性的障害機転に起因すると考えられる¹¹⁾。心室壁の30~50%に及ぶ急性心筋梗塞をラットで作製し、収縮期血圧が15~25mmHg低下する程度の障害を与えても術後4ないし7日後の腎臓での α Klotho発現には差がなかったとの報告があり、急性の循環不全は腎臓での α Klotho発現に影響を及ぼさないと考えられる⁹⁾。心腎連関の観点からは、慢性うっ血性心不全、あるいは慢性心不全と腎不全の合併する病態における、腎 α Klotho発現変化に大いに興味をもたれ、今後の研究が期待される。

動脈壁や腎臓に認められる病理変化と比べると

α klotho変異マウスの心臓における形態変化は軽微といえよう¹⁾。しかし、 α klotho遺伝子の第一エクソンの大部分を欠失し、代わりにLacZリポーター遺伝子をノックインした α klotho遺伝子欠損マウス($akl^{-/-}$)を用いた詳細な発現解析においては、 α klothoは心臓内では洞房結節に限局した発現を示した¹²⁾。6週齢の kl/kl は通常飼育中には突然死を起こすことはなかったが、飲水・餌から隔離した狭いチューブ内で覚醒下で20時間拘束するという急性ストレス負荷を行うと高頻度(30匹中20匹)で突然死を生じた¹²⁾。心電図解析により突然死の原因は洞房ブロックないしは洞停止(sinus arrest)と考えられた¹²⁾。洞調律や洞房伝達異常に起因するヒトの不整脈、また慢性うっ血性心不全の病態における調律異常と α Klothoとの関連は興味深い¹⁾が、詳細は未解明である。

3 α Klothoの分子機能研究の最前線

血管、腎、心の形態・機能の異常に関する精力的研究の一方で、 α Klothoの分子機能と表現型を結びつける病態生理メカニズムの研究はなかなか進まなかった。

展開の端緒となったのは、 kl/kl の血清中のカルシウム・リン代謝に関連するホルモン濃度の測定結果であった。 kl/kl では高カルシウム血症にもかかわらず活性型のビタミンDである1,25(OH)₂ビタミンD₃の濃度が著しい高値を示したことから、持続性の高ビタミンD血症が、 kl/kl の高カルシウム・高リン血症の原因である可能性が示唆された¹³⁾。ビタミンDの前駆体は脂溶性ビタミンとして消化管から吸収されるが、コレステロールから体内で*de novo*に合成されるが、肝臓で25位が水酸化されて25(OH)ビタミンD₃となったあと、最終的には腎臓において1 α -hydroxylase(CYP27B1)により活性型の1,25(OH)₂ビタミンD₃となる。 kl/kl では腎臓での $cyp27b1$ のmRNA発現が著明に亢進しており、このことにより活性型ビタミンDが高値を持続すると考えられた¹³⁾。 kl/kl の血清1,25(OH)₂ビタミンD₃

濃度は生後2週齢で対照野生型マウスの約5倍と著しく高いが週齢とともに低下し、老化様表現型を発症したあとの9週齢では対照の約2倍程度であった¹³⁾。

高ビタミンD血症と老化様表現型との因果関係を明らかにする目的で、*kl/kl*をビタミンD欠乏食で飼育し、血中活性型ビタミンD濃度を完全に正常化させた*kl/kl*を作製したところ、血管の石灰化病変を含めて通常食下で認められた老化様表現型のほぼ全てが消失し、寿命短縮の表現型も認められなくなった¹⁴⁾。以上のことから、 α Klothoは腎臓において、ビタミンD活性化酵素のネガティブフィードバックを担っていること、*kl/kl*で認められる早期老化様表現型や寿命短縮は主としてこのネガティブフィードバック機構の破綻に起因

することが示唆された(図3)¹⁴⁾。しかし、*kl/kl*の血管病変や腎・心病変の全てがビタミンD制御異常に由来するかどうかに関しては完全には結論がでていない(図3)。

膜蛋白質である α Klothoがどのようなメカニズムで*cyp27b1*の転写制御にかかわるのか、この疑問の解決にはもう1つの重要な因子、FGF23(fibroblast growth factor 23)の登場を待たねばならなかった。 α Klotho研究とは独立に作製された*fgf23*遺伝子欠損マウスが*kl/kl*と類似した表現型を呈したことから α KlothoとFGF23との関係に注目が集まった¹⁵⁾。その後 α KlothoとFGF23、FGFR1(FGF receptor1)が3者で複合体を形成すること、さらにはFGF23によるFGF受容体シグナ

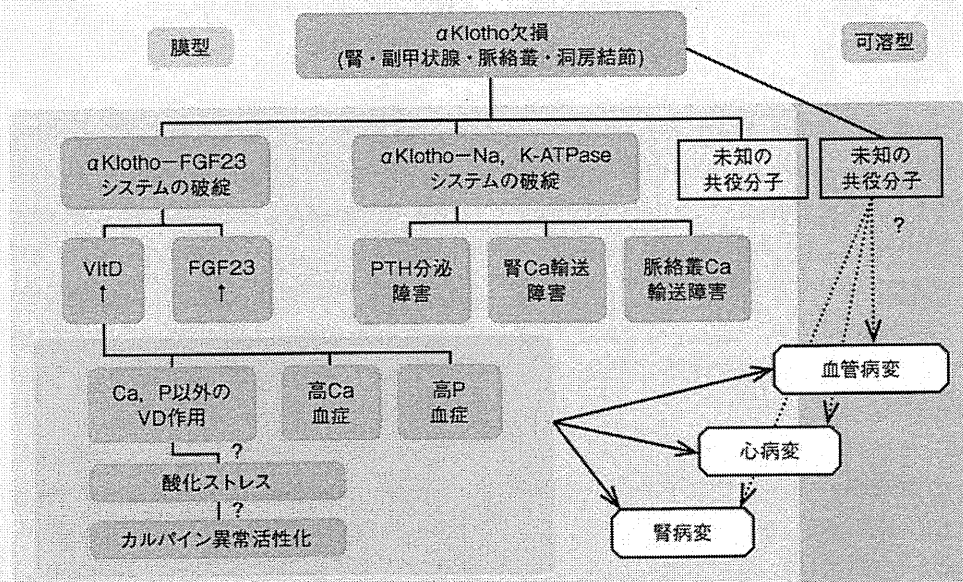


図3 α kl α 遺伝子欠損マウスにおける腎・心・血管病変発症のメカニズム (仮説)

α Klothoの欠損は α Klotho-FGF23システムの破綻による高ビタミンD(VitD)血症の原因となると同時に、 α Klotho-Na,K-ATPaseシステムの破綻による低カルシウム応答性の副甲状腺ホルモン(PTH)分泌障害・Ca上皮輸送の障害をもたらす。ビタミンD欠乏食による高ビタミンD血症の是正が血管・腎・心病変の多くを改善させることから、少なくとも完全な病態形成には高ビタミン血症が必要条件であることはすでに明らかである。しかし、高ビタミンD血症がいかにして病変を惹起するのかはほとんど未解明であり、また病態形成の十分条件であるかは決着がつかない。筆者らは、ビタミンDのカルシウム・リン代謝調節以外の作用、特に酸化ストレスの増強作用やその結果とも考えるカルパインの異常活性化²⁷⁾が重要であると考えている。さらに、膜型の α Klotho以外に可溶型(分泌型) α Klothoが主に腎臓由来の液性因子として生理作用を有する可能性もあり、可溶型 α Klothoの欠損が腎・心・血管病変の発症に関与している可能性を示唆する研究結果も多数存在する(本文参照)。

ル伝達にはαKlothoが必須であることが培養細胞への遺伝子導入実験により示された^{16,17)}。FGF23により活性化される細胞内シグナル伝達経路の詳細は現在も不明であるが、FGFR1はαKlothoと複合体を形成したFGF23をリガンドとして認識すると考えられる。筆者らの検討では*akl*^{-/-}では血中FGF23濃度が対照野生型マウスの千倍以上に上昇しており、FGF23のシグナル伝達障害を代償しようとするメカニズムの存在が示唆される¹⁸⁾。FGF23は骨細胞、骨芽細胞においてビタミンD-ビタミンD受容体により発現誘導されることがわかっており、活性型ビタミンDは、FGF23-αKlothoシグナルを介してCYP27B1を抑制することで自身の合成を強力に抑制する。FGF23の登場により、αKlothoが担うネガティブフィードバック機構の全貌が明らかとなった¹⁸⁾。

筆者らの研究室では、FGFの受容体システムの研究とは独立に、αKlotho結合蛋白質の網羅的な探索を行ってきた。その結果、多数の分子群がαKlothoと結合することが明らかとなりつつある。その1つがNa, K-ATPaseである¹⁹⁾。現在では、αKlothoはNa, K-ATPaseと結合することにより、Na, K-ATPaseの細胞内局在を制御することで副甲状腺ホルモン分泌や尿管・脈絡叢でのカルシウム上皮輸送を調節していると考えられている²⁰⁾。FGF23やFGF受容体との結合、Na, K-ATPaseとの結合のいずれもがその下流でカルシウム・リン代謝制御にかかわっており、現時点においてαKlothoはカルシウム・リン代謝のマスターレギュレーターと呼ぶことができる(図3)²⁰⁾。

しかし、さらに一般化して多くのαKlotho結合分子群を考えると、これら分子群はαKlothoにより認識される何らかの共通分子構造を有していることが想定される。筆者らのグループは最近その分子実体の解明に成功しつつあることから、αKlothoが一種の足場蛋白質として、それぞれが特異的機能を有する多数の分子と相互作用することにより、多彩な細胞生理機能を実現するものと考えている。これら結合分子群との相互作用制御や結合することの生理的意義が明らかになれば、真の意味での分子機能理解に基づいた血管・腎・

心病変の病態生理の理解が可能になるものと考えられる(図3)。

4 注目される可溶性αKlothoの機能と心腎連関

最近筆者らの研究室は共同研究により、ヒト血清中の可溶性αKlotho濃度を測ることのできるサンドウィッチELISAの樹立に成功し、健常人において血清αKlotho濃度が年齢とともに緩やかに減少すること、血清リン値と正相関、血清クレアチニン値・FGF23値と負の相関を示すことを明らかにした²¹⁾。膜蛋白質である可溶性αKlothoの血清中濃度が有する意味は何か。腎臓を低カルシウム液で順行性に灌流すると、腎静脈側に可溶性αKlothoが大量に流出する¹⁹⁾。細胞外液の低カルシウムに応答したαKlotho分泌は培養細胞系でも再現できており、正カルシウムや高カルシウム条件下ではこれら*in vivo*, *in vitro*でのαKlotho分泌は認められないことから、低カルシウム刺激により細胞内エンドソーム分画から細胞膜表面に移動したαKlothoが何らかのプロテアーゼによって切断され可溶性αKlothoとなって分泌されているものと考えられる。しかし恒常性が維持されていると考えられる健康状態での血清中αKlothoの意義ははまだ不明であり、またそもそも何らかの生理機能を有するのか、そうでないとしても何かの生命現象を反映するマーカーとしての意味をもつのか、今後の重要な研究課題の1つである。

一方で、可溶性のαKlothoが液性因子として循環し、パラクリンないしはエンドクリン因子として作用すると考えると説明しやすい現象もいくつか知られている。たとえば*kl*^{+/+}の血管内皮機能の低下は野生型マウスとの併体結合(parabiosis)により改善する⁴⁾。また腎臓でのαKlotho発現の低下と血管内皮機能障害の合併を示すOLETFラットにおいて、膜貫通部位を含む全長のαKlothoをコードするcDNAを載せたアデノウイルスベクターを骨格筋組織内に注入してαKlothoを異所性に強制発現させると、血管内皮機能は回復

する²²⁾。さらにOLETFラットにインスリン抵抗性改善薬であるPPAR γ アゴニスト、Troglitazoneを投与すると腎臓における α Klothoの発現と血管内皮機能が改善することも知られている²³⁾。これらの結果は、体内のいずれかの部位に α Klothoが十分量発現していることが血管内皮機能の維持に重要であることを示唆する。HUVEC(human umbilical vein endothelial cell)を用いた検討では、 α Klothoの全長を強制発現するCOS-1細胞の培養上清を添加、ないしはCOS-1細胞の共培養により、HUVECのACE(angiotensin converting enzyme)活性が増加することから、遺伝子を導入したCOS-1細胞から分泌された α Klothoが、液性因子として血管内皮細胞にシグナルを入れる可能性が示された²⁴⁾。最近では可溶型 α Klothoが2型VEGF受容体、TRPC-1(transient-receptor potential canonical Ca²⁺ channel 1)と血管内皮細胞の細胞膜上で結合し、これらのインターナリゼーションを促進することで内皮の透過性を抑制するとの研究もある²⁵⁾。しかし、膜型から可溶型 α Klothoへの変換のダイナミクスや正確な切断部位、切断酵素、可溶型 α Klothoのシグナル受容のstoichiometryなどいずれもまったく不明であり、全て今後の研究課題である。

ELISA法によりさまざまな体内環境や病態におけるヒト血清中 α Klotho濃度が正確に測定できるようになった今、カルシウム・リン代謝異常だけでなく、うっ血性心不全や腎不全病態での血清 α Klotho濃度を測定する臨床研究がさまざまな形で進行しつつある²⁶⁾。これらの研究成果を踏まえた一定の解釈を提唱するには尚早であるが、今後、可溶型 α Klothoの生理機能・病態生理的意義に関する臨床的見地からのヒントが得られることが大いに期待される。

おわりに

*kl/kl*において観察される血管・腎・心病変のうち何が、 α KlothoのFGF23あるいはNa, K-ATPaseとの結合に依存するカルシウム・リン代謝の破綻に起因し、

何が α Klothoの未知の分子機能の欠失に由来するのかはきわめて重要な問題である。

可溶型 α Klothoにもし生化学的、分子論的に説明可能な生理機能があるとすれば、可溶型 α Klothoは腎臓から産生され、心臓や血管内皮細胞に何らかのシグナルを伝達する液性因子というコンセプトの確立を意味し、可溶型 α Klothoは間違いなく心腎連関の中心に位置するメッセンジャーということになるであろう(図3)。 α Klothoの制御世界がこれからの研究により大きく展開されることを期待したい。

● References

- 1) Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H et al: Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* **390**: 45-51, 1997
- 2) Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y et al: Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of *klotho* gene expression. *Circulation* **109**: 1776-1782, 2004
- 3) Tohyama O, Imura A, Iwano A et al: *Klotho* is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J Biol Chem* **279**: 9777-9784, 2004
- 4) Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T et al: *Klotho* protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 324-329, 1998
- 5) Nakamura T, Saito Y, Ohyama Y et al: Production of nitric oxide, but not prostacyclin, is reduced in *klotho* mice. *Jpn J Pharmacol* **89**: 149-156, 2002
- 6) Takeshita K, Yamamoto K, Ito M et al: Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 with fibrin deposition in a model of aging, "*klotho*" mouse. *Semin Thromb Hemost* **28**: 545-554, 2002
- 7) Shimada T, Takeshita Y, Murohara T et al: Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging *klotho* mouse. *Circulation* **110**: 1148-1155, 2004
- 8) Yahata K, Mori K, Mukoyama M et al: Regulation of stanniocalcin 1 and 2 expression in the kidney by *klotho* gene. *Biochem Biophys Res Commun* **310**: 128-134, 2003
- 9) Aizawa H, Saito Y, Nakamura T et al: Downregulation of the *klotho* gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats. *Biochem Biophys Res Commun*

- 249: 865-871, 1998
- 10) Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S et al : Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochem Biophys Res Commun* **280**: 1015-1020, 2001
 - 11) Asai O, Nakatani K, Tanaka T et al : Decreased renal α -Klotho expression and urinary calcium loss in early diabetic nephropathy in humans and mice. *Kidney Intern* 2012(in press).
 - 12) Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y et al : Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression. *Circulation* **109**: 1776-1782, 2004
 - 13) Yoshida T, Fujimori T, Nabeshima Y : Mediation of unusually high concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1 α -hydroxylase gene. *Endocrinology* **143**: 683-689, 2002
 - 14) Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T et al : Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol* **17**: 2393-2403, 2003
 - 15) Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y et al : Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* **113**: 561-568, 2004
 - 16) Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T et al : Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* **444**: 770-774, 2006
 - 17) Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M et al : Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem* **281**: 6120-6123, 2006
 - 18) Tomiyama K, Maeda R, Urakawa I et al : Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling system in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 1666-1671, 2010
 - 19) Imura A, Tsuji Y, Murata M et al : Alpha-klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science* **316**: 1615-1618, 2007
 - 20) Nabeshima Y : Discovery of α -Klotho unveiled new insights into calcium and phosphate homeostasis. *Proc Jpn Acad Ser B* **85**: 125-141, 2009
 - 21) Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I et al : Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun* **398**: 513-518, 2010
 - 22) Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y et al : In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* **276**: 767-772, 2000
 - 23) Yamagishi T, Saito Y, Nakamura T et al : Troglitazone improves endothelial function and augments renal klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats with multiple atherogenic risk factors. *Hypertens res* **24**: 705-709, 2001
 - 24) Yang J, Matsukawa N, Rakugi H et al : Upregulation of cAMP is a new functional signal pathway of Klotho in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **301**: 424-429, 2003
 - 25) Kusaba T, Okigaki M, Matui A et al : Klotho is associated with VEGF receptor-2 and the transient receptor potential canonical -1 Ca²⁺ channel to maintain endothelial integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 19308-19313, 2010
 - 26) Bernheim J, Bencherit S : The potential roles of FGF23 and Klotho in the prognosis of renal and cardiovascular diseases. *Nephrol Dial Transplant* **26**: 2433-2438, 2011
 - 27) Many H, Inomata M, Fujimori T et al : Klotho protein deficiency leads to overactivation of μ -calpain. *J Biol Chem* **277**: 35503-35508, 2002

メタボリック症候群と病理
Klotho ファミリーによる代謝の統合的制御

田中智洋 鍋島陽一

病理と臨床・別刷

2010 vol. 28 no. 9

東京／文光堂／本郷

Klotho ファミリーによる代謝の統合的制御

田中智洋*¹
鍋島陽一*²

はじめに

klotho 遺伝子変異マウスが、若齢より、皮膚萎縮、脱毛、骨量減少、性腺萎縮、動脈石灰化、肺気腫などヒトの老化に類似した多彩な表現型を示し、短命であることが報告¹⁾されて既に10年以上が経過した。変異マウスの病像に関する記述的研究の蓄積の一方で、Klotho蛋白質の分子としての機能、病態発症のメカニズムはいまだ多くの謎に包まれている。Klothoの分子機能については、受容体、酵素、ホルモン、膜小胞の輸送関連分子などの可能性が報告ないし示唆されているが、標的蛋白質分子の認識・結合が重要であることを除けば、明確な答えは得られていない。

一方、この間に明瞭となったことは、Klothoの第一義的な生理機能は「老化の制御」ではなく、体液のカルシウム恒常性の維持であることである。「Klothoとは何か」を問い続けた研究の道のりは、とりもなおさず「老化とは何か」を問う道程であった。Klotho研究から得られた教訓は、老化とはすなわち生体恒常性維持機構の破綻のプロセスであるということであり、老化のプロセスを明らかにすることはすなわち代謝恒常性維持のメカニズムを解明することだ、ということである。

本稿では、Klothoの代謝制御機能解明の過程を振り返るとともに、今、何がわかっており、今後の課題は何かを明らかにしたい。

I. 生命の糸を紡ぐ女神—Klothoの発見

klotho 遺伝子変異マウス (*kl/kl*) は、トランスジェニックマウスの作製過程で導入遺伝子が偶然ゲノム上

に挿入変異を起こしたことにより得られた変異マウスであり、変異遺伝子座のポジショナルクローニングにより *klotho* 遺伝子が発見された¹⁾。*kl/kl*では挿入変異により *klotho* の mRNA 発現の著しい低下が認められ (severe hypomorph), 機能喪失型変異 loss-of-function mutation と考えられた。後に *klotho* ホモログである β *klotho* 遺伝子が発見されたことから、当初発見された *klotho* を現在では α *klotho* と呼んでいる。*kl/kl* も、後に作製された α *klotho* 遺伝子欠損マウス (α *klotho*^{-/-}) も、生後3~4週齢までは正常に発生、発育し、野生型同胞との間に外見上明らかな差を認めない。しかし4週齢以降、進行性の動脈石灰化病変、骨密度の低下、皮膚萎縮 (図1)、脱毛、失調性歩行、異所性石灰化 (図1)、肺気腫など、ヒトの老化に類似した徴候が観察され、生後100日目までに全頭が死亡する^{1,2)}。*kl/kl*で認められる寿命短縮や多彩な老化様表現型は、EF-1 α promoterにより全身で α Klotho を発現させたトランスジェニックマウスとの交配によりほぼ完全に消失することから、これら表現型の原因が α Klotho の欠失であることが遺伝学的に証明された¹⁾。

マウスの α Klotho は 1,014 アミノ酸からなる 1 型膜蛋白質であり、N 末端にシグナル配列を、C 端近傍に膜貫通領域を有する (図2)、N 端側の長い細胞外領域には、互いに約 20% のアミノ酸配列上の相同性を有し、約 450 アミノ酸からなる特異的配列の反復を認め、これらを N 端側から順に *klotho* domain 1 (KL1) および KL2 と呼ぶ¹⁾。KL1, 2 は β グリコシダーゼや乳糖分解酵素 (lactase phloridone hydrolase) とアミノ酸配列上 20~40% の相同性を有するが、1 型グリコシダーゼの活性中心で保存されているグルタミン酸残基に変異を有し、グリコシダーゼとしての活性は極めて弱い³⁾。 α Klotho は腎臓、脈絡叢、副甲状腺などに限局した発現分布を示し (図2)、これらは *kl/kl* において著明な表現型が認められる臓器とは必ずしも一致しない。限られた臓器に発現する単一の蛋白質の欠損が、

*¹ 京都大学大学院医学研究科病理系 腫瘍生物学講座*² 先端医療振興財団先端医療センター

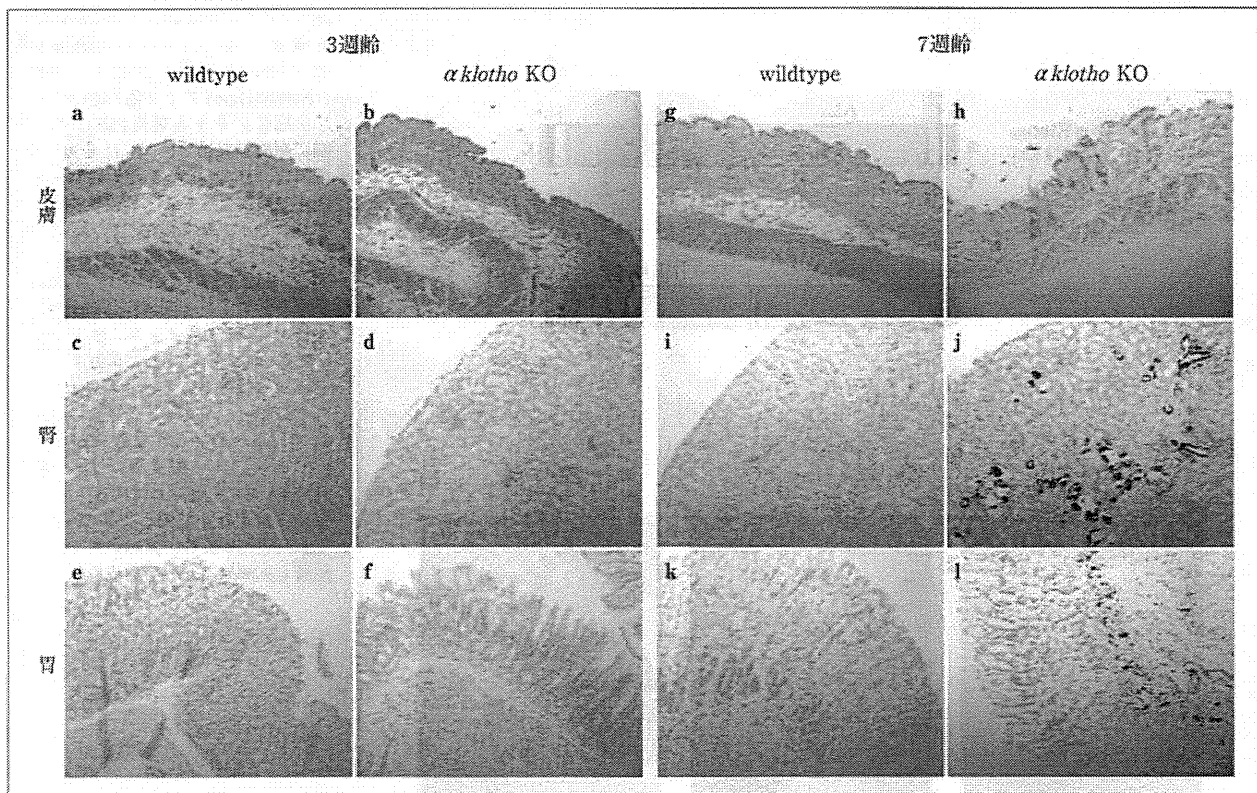


図1 α klotho 遺伝子欠損マウスの組織像 3週齢の α klotho 遺伝子欠損マウス(α klotho KO) (b, d, f)は、対照野生型同胞(wildtype) (a, c, e)と同様、正常の組織像を示すが、7週齢の α klotho KO (h, j, l)は、wildtype (g, i, k)では認められない真皮・皮下組織の萎縮、腎および胃組織の異所性石灰化を示す。a, b, g, hは皮膚(HE染色), c, d, i, jは腎臓(von Kossa染色), e, f, k, lは胃(von Kossa染色)。

全身にわたる多彩な老化様表現型を生じるメカニズムが、 α Klotho研究における最大の謎であった。ギリシャ神話の「生命の糸を紡ぐ女神」に因んで名づけられた α Klothoの分子機能の解明を目指して、研究が始められた。

II. 不老不死の遺伝子はあるか—老化制御分子としての α Klotho機能への模索

老化については以前よりプログラム説とエラー蓄積説の2つの考え方がある⁹⁾。プログラム説とは、個体発生が巧妙な分子プログラムに基づいて進行するように、個体老化も予め遺伝情報としてゲノム上に記述されたプログラムに従い進行する、という考え方である。一方、エラー蓄積説とは、細胞・個体が分裂や生命活動を続けるうちに核酸、蛋白質などの重要な生体構成分子に酸化、糖化などの非特異的変化が蓄積することが老化の本態である、とする考え方である。

プログラム説の最大の根拠は、幾つかの生物種において実際に老化を抑制し寿命を延長する遺伝子がみつかったことである。出芽酵母で発見されたNAD依存性脱アセチル化酵素sirtuinないしそのホモログ、Sirt1の過剰発現や活性化は、酵母のみならず線虫やショウジョウバエの寿命を延長することがわかっている⁵⁾。本特集でも取り上げられているように、現在、哺乳類におけるSirt1の機能・作用機序の解明や、Sirt1の活性化に必要なNADの供給系の研究⁶⁾、さらにはSirt1活性化薬の開発に世界中の注目が集まっている。

エラー蓄積説の観点からは、蓄積した変性分子が小胞体ストレス、ミトコンドリア機能異常、オートファジーの異常、アポトーシス異常などを惹起することにより、生体機能異常としての老化を引き起こすと考えられている。しかしエラーの蓄積は、「wear-and-tear」と呼ばれるようなランダムな障害と同義ではなく、「wear-and-tear」に対する生体防御応答をも

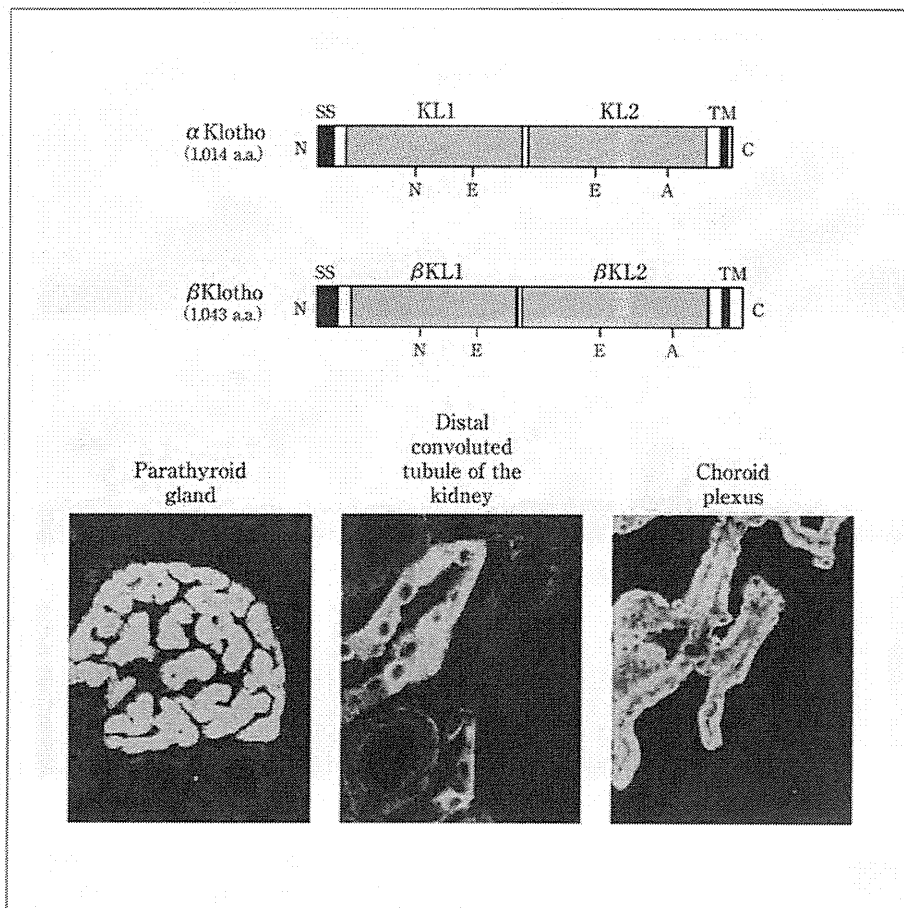


図2 マウス α Klotho・ β Klothoの一次構造(上段)と α Klothoの免疫染色像(下段) α Klotho(1,014アミノ酸), β Klotho(1,043アミノ酸)はいずれもN末端にシグナル配列(SS), C末端側に細胞膜貫通部位(TM)を有するI型膜蛋白質で, 長い細胞外領域と短い細胞内領域を有する。細胞外領域にはグリコシダーゼ類似配列の反復を有し, これらをN端側からそれぞれKL1, KL2ドメインないし β KL1, β KL2ドメインと呼ぶ。これらKLドメインでは, 1型グリコシダーゼにおいて保存され活性中心に位置するグルタミン酸残基(E)のうちのそれぞれ1つずつにアスパラギン(N)ないしアラニン(A)へのアミノ酸置換が認められ, このアミノ酸変異は α Klothoと β Klotho間で保存されている。 α Klotho蛋白質は主として副甲状腺の主細胞, 腎臓の遠位尿細管上皮細胞の一部, 脈絡叢上皮細胞に発現が認められる。

含めた総和として考えるのが一般的である。この意味でエラー蓄積説は必ずしも生体側の遺伝プログラムの関与を排除するものではない⁷⁾。さらに最近のエピジェネティクスの進歩を考えに入れるならば, より高いレベルでのエラーと遺伝プログラムの相互作用を視野に入れる必要があると考えられる。

もし α Klothoが老化を制御する分子とするならば, 先述の2つの仮説は α Klothoに関して次のように表現されうるであろう。

- ①プログラム説: α Klothoは“老化制御中枢”とも呼ぶべき腎臓, 脈絡叢, 副甲状腺において機能することにより全身の老化を調節する。
- ②エラー蓄積説: α Klothoはエラーの発生やエラーに対する生体応答としての防御機構を担っており, α Klothoの発現臓器は恒常性攪乱因子に対する生体応答性を担う。

①は極めて魅力的な仮説である。しかし, この可能性を念頭に行われた研究は当初より困難を極めた。

Ⅲ. α Klothoが制御するもの—ビタミンD

α Klothoの機能解明へのヒントは, *kl/kl*の表現型の地道な観察からもたらされた。*kl/kl*で最も広範囲に認められる変化は異所性のカルシウム沈着であり, その主原因は慢性的な高カルシウム・高リン血症と考えられた。そこで*kl/kl*の血清を用いてカルシウム・リン代謝に関連するホルモンの濃度を測定したところ, 副甲状腺ホルモン(PTH)濃度は低下, カルシトニン濃度は上昇が認められ, 高カルシウム血症に対する正常の反応と考えられた。一方, 持続的な高カルシウム血症にもかかわらず活性型ビタミンDである $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の濃度は著しい高値を示したことから, 高ビタミンD血症が*kl/kl*の高カルシウム・高リン血症の原因と考えられた⁸⁾。

ビタミンDの前駆体は脂溶性ビタミンとして消化管から吸収されるか, コレステロールから*de novo*に

体内で合成され、肝臓で25位が水酸化されて25(OH)D₃となった後、最終的には腎臓において1 α -hydroxylase (CYP27B1)により活性型の1,25(OH)₂D₃に変換される。kl/klでは腎臓におけるcyp27b1のmRNA発現が著明に亢進しており、これが活性型ビタミンD高値の原因と考えられた⁸⁾。kl/klの血清1,25(OH)₂D₃濃度は生後2週齢で対照野生型マウスの約5倍と著しく高く、週齢とともに低下するものの、老化様表現型が完成する9週齢でも対照の約2倍であった⁸⁾。

高ビタミンD血症と老化様表現型との因果関係を明らかにする目的で、kl/klを授乳中の母マウスの段階から一貫してビタミンD欠乏食で飼育し、血中活性型ビタミンD濃度を完全に正常化させたkl/klを作製した。すると、通常食下で認められた老化様表現型のほぼ全てが消失し、寿命短縮の表現型も認められなくなった⁹⁾。以上のことから、 α Klothoが腎臓においてビタミンD活性化酵素のネガティブフィードバック制御を担っていること、kl/klではこのネガティブフィードバック機構の破綻により高ビタミンD血症をきたし、二次的に早期老化様表現型や寿命の短縮をきたすことが示唆された⁹⁾。kl/klにおける老化様表現型が食餌中のビタミンDに依存することはわかったが、以下の3つの課題が残された。

- ①膜蛋白質である α Klothoによるcyp27b1の転写制御メカニズム
- ②ビタミンD合成には関与しない脈絡叢、副甲状腺での α Klothoの機能
- ③高ビタミンD血症による早期老化様表現型発症のメカニズム

以下の項ではこれら3つの課題について順に述べる。

IV. Klotho-FGFシステム—代謝制御の臓器間機能連関を担う新しいメカニズム

膜蛋白質がどのような機序により転写制御に関わるのか？ cyp27b1の転写調節領域に α Klotho応答配列とも呼ぶべきエレメントをマッピングする地道な作業が行われた。しかし α Klotho依存性のcyp27b1発現抑制を再現できる培養細胞系がなかったこともあり、明確な答えは得られなかった。 α Klothoによるcyp27b1の発現調節機構の解明にはもう一つの重要な因子、FGF23 (fibroblast growth factor 23)の登場を待たねばならなかったのである。

α Klotho 研究とは無関係に作製されたfgf23遺伝子

欠損マウスが、kl/klと極めて類似した早期老化様表現型を呈することが偶然発見され、 α KlothoとFGF23との関係が注目された¹⁰⁾。その後、 α KlothoとFGF23、FGFR1 (FGF receptor isoform 1)が3者で複合体を形成すること、さらにはFGF23によるFGF受容体シグナル伝達には α Klothoが必須であることが培養細胞への遺伝子導入実験により示された^{11,12)}。我々は一歩進んで、 α klotho^{-/-}に対するFGF23投与実験により、シグナル伝達だけではなく、FGF23による腎臓でのcyp27b1発現抑制に α Klothoが必須であることを個体レベルで証明した¹³⁾。FGF23は主として骨細胞、骨芽細胞に発現しており、ビタミンD-ビタミンD受容体シグナルにより発現誘導されることから、 α Klotho-FGF23システムは骨-腎臓間における活性型ビタミンD合成のネガティブフィードバック制御を担うと考えられる。 α klotho^{-/-}におけるcyp27b1の発現亢進は、FGF23によるネガティブフィードバック抑制の障害によると考えられ、また α klotho^{-/-}における血中FGF23濃度の数千倍の上昇は、FGF23のシグナル伝達障害に伴う代償性的変化と考えることができる¹³⁾。FGF23の登場により、 α Klothoが担うビタミンD合成制御機構の全貌が明らかとなった(図3)。

α Klothoにはアミノ酸配列上高い相同性を有するホモログ、 β Klothoが存在し、肝臓、脂肪組織、腺外分泌腺に高レベルの発現が認められる¹⁴⁾。 β klotho遺伝子欠損マウス(β klotho^{-/-})は外見上kl/klや α klotho^{-/-}のような老化様徴候を示さない。体内の発現分布から、 β Klothoは発見当初より脂質代謝を制御する分子であると考えられた。 β klotho^{-/-}の表現型の詳細な解析により、肝臓でコレステロールから胆汁酸を合成する経路の律速酵素、7 α -hydroxylase (CYP7A1)の発現亢進と、これに伴う胆汁酸のプールサイズ、糞便中排泄量の増加が明らかとなった¹⁵⁾。

α Klotho-FGF23システムによるcyp27b1の遺伝子発現抑制とのアナロジーから、 β Klotho依存性にcyp7a1の発現を制御するFGFの存在が想定された。哺乳類におけるFGFは22種類からなるファミリーで、中でもヒトFGF19、21、23は分子系統樹上近縁に位置し、一つのサブファミリーを構成すると考えられている¹⁶⁾。肝臓におけるFGF19の受容体、FGFR4の遺伝子欠損マウスでは、 β klotho^{-/-}と同様にcyp7a1の発現亢進と胆汁酸合成の増加がみられ^{17,18)}。培養細胞の実験では、FGF15 (マウスFGF15はヒトFGF19のオルトログと考えられている)のシグナル伝

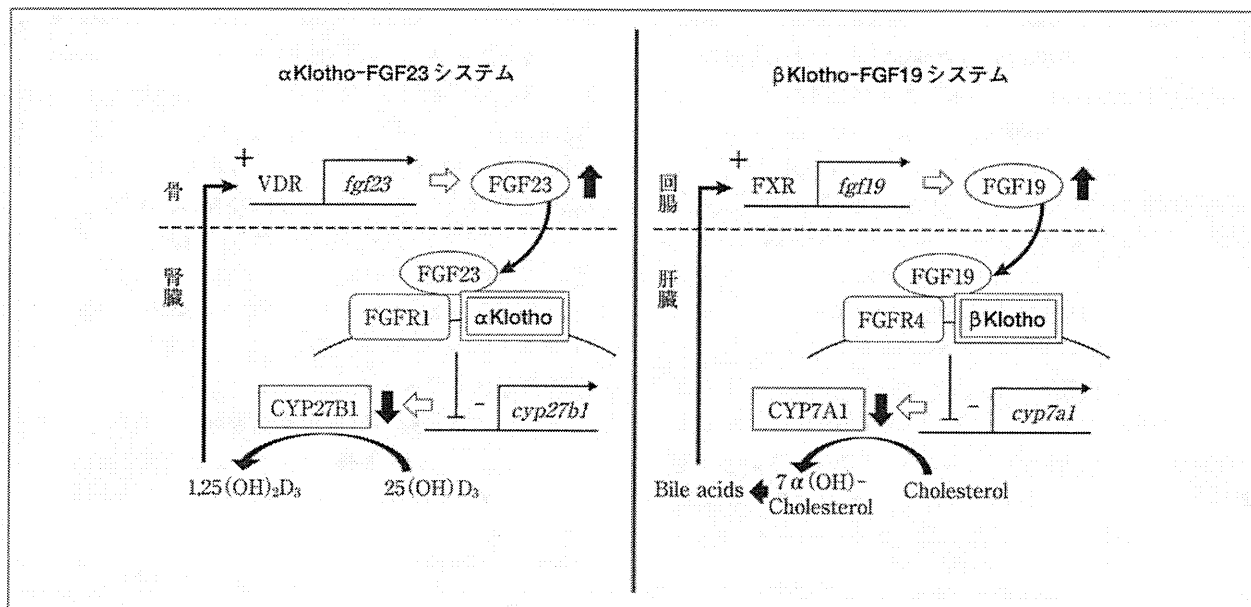


図3 Klotho-FGFシステムによる代謝の統一的制御 ビタミンD-ビタミンD受容体(VDR)シグナルの活性化により骨細胞、骨芽細胞で発現誘導されたFGF23は循環血液を介して腎臓に到達し、FGFR1、 α Klothoからなる受容体複合体を介してシグナルを伝達し、*cyp27b1*の遺伝子発現を抑制することで、それ以上の活性型ビタミンDの合成を阻害する。一方、胆汁酸-胆汁酸受容体(FXR)経路の活性化により回腸上皮細胞で発現誘導されたFGF19は循環血液を介して肝臓に到達し、FGFR4、 β Klothoからなる受容体複合体を介してシグナルを伝達し、*cyp7a1*の遺伝子発現を抑制することで、それ以上の胆汁酸の合成を阻害する。このように α Klotho-FGF23システムと β Klotho-FGF19システムは極めて整った機能上の対称性を示す。VDR: vitamin D receptor, FGF23: fibroblast growth factor 23, FGFR1: FGF receptor isoform 1, CYP27B1: 1 α -hydroxylase, D₂: vitamin D₂, FXR: farnesoid X receptor (胆汁酸受容体), FGF19: fibroblast growth factor 19, FGFR4: FGF receptor isoform 4, CYP7A1: 7 α -hydroxylase.

達には β Klothoが必須であることが報告された¹⁹⁾。さらに我々の検討により、FGF19による*cyp7a1*の発現抑制には β Klothoが必須であることが*in vivo*で証明された¹³⁾(図3)。FGF23が骨において核内受容体であるビタミンD受容体を介して誘導されるように、FGF15の発現レベルは小腸上皮細胞で胆汁酸受容体、FXR(farnesoid X receptor)により正に制御される。以上より、第一に、 β Klotho-FGF19システムが胆汁酸合成のネガティブフィードバック制御を担うこと、第二に α Klotho-FGF23と β Klotho-FGF19の2つのシステムが分子構造上のみならず、機能上も極めて整った対称性を示すことが明らかとなった(図3)。

Klotho-FGFシステムは、複数の臓器間の機能連関により巧妙に制御される代謝ネットワークの分子基盤であることが明らかとなった。FGF23、FGF19と同じサブファミリーに属するFGF21は肝臓で産生され、主たる作用標的は肝臓と脂肪細胞であると考えられている。しかし、FGF21の受容体を構成するKlothoファミリー分子は未だ同定されておらず、FGF21の機能と作用機序の全貌の解明は、新規Klothoファミリー

分子の発見やKlotho研究における新しい展開をもたらす可能性があるものと注目される。

V. 急速なカルシウム制御装置—Klotho-Na,K-ATPaseシステム

筆者らの研究室ではKlothoファミリーの分子機能の解明を目指す立場からFGFシステムの研究とは別に、 α Klotho結合蛋白質の探索を行ってきた。マウス脈絡叢組織のライセートを抗 α Klotho抗体により免疫沈降し、共沈蛋白質をLC/MS/MS法により分析したところ、Na,K-ATPaseが同定された²⁰⁾。 α KlothoとNa,K-ATPaseとの結合は脈絡叢だけでなく、副甲状腺、腎臓においても確認され、 α Klotho-Na,K-ATPase複合体は細胞外カルシウム濃度の低下にตอบสนองしてエンドソームから細胞膜表面に移動することが明らかとなった。 α Klothoは細胞膜移動後に細胞外領域が切断されて循環血液中中に分泌され、Na,K-ATPaseは膜表面に蓄積し細胞全体としてのポンプ活性の増加をもたらす。このような低カルシウム応答性のNa,K-

ATPase 活性増加は $\alpha klotho^{-/-}$ 由来の組織では消失している。

カルシウム低下にตอบสนองしたポンプ活性の増加にはどのような生理機能があるのでしょうか。ウシ由来の単離副甲状腺細胞を用いた古い検討では、Na,K-ATPase の特異的阻害薬、Ouabain の処理により、低カルシウム応答性の PTH 分泌が特異的に阻害されることが報告されている²¹⁾。低カルシウム下でポンプ活性の増加を認めない $\alpha klotho^{-/-}$ 由来の副甲状腺では、Ouabain 処理と同程度の PTH 分泌障害を認め、さらに Ouabain を加えてもそれ以上の分泌抑制効果を認めなかったことから、 $\alpha Klotho$ の欠失の効果は、Ouabain による Na,K-ATPase 活性の抑制と等価であるといえる²⁰⁾。最近の我々の研究成果によると、低カルシウム応答性の Na,K-ATPase 活性の増加は、PTH 分泌だけでなく腎尿管や脈絡叢におけるカルシウム上皮輸送においても重要であることが示唆されており、 $\alpha Klotho$ -Na,K-ATPase 複合体は秒～分の体液カルシウム制御を担っていると考えている。

$\alpha Klotho$ は FGF23/FGFR1 との結合を介してビタミン D 合成を、Na,K-ATPase との結合を介して PTH 分泌やカルシウム上皮輸送を制御する(図4)。 $\alpha Klotho$ は結合パートナー分子や発現臓器は異なっても、また制御の方向性は異なっても全体として体液カルシウム濃度の調節に深く関与しており、体液カルシウム恒常性の統合的制御因子であるといえる。一方、 $\beta Klotho$ は FGF19/FGFR4 と結合することで胆汁酸合成を抑制する。しかし、ビタミン D がカルシウム・リン代謝の調節因子であることが明らかなのは必ずしも明確ではない。筆者は $\beta Klotho$ にも、FGF19/FGFR4 以外の結合パートナー分子 X が存在すると考え(図4)、進歩の著しいプロテオミクスの技術による網羅的結合分子解析を行いつつある。 $\beta Klotho$ の新たな結合分子が発見されることで、 $\beta Klotho$ が担う脂質・エネルギー代謝恒常性の全貌が姿を現すものと考えている(図4)。

VI. カルシウム恒常性と老化を結ぶ糸

kl/kl や $\alpha klotho^{-/-}$ にみられる早期老化様表現型のほとんど全てがビタミン D 欠乏食により消失することから、老化様表現型の大部分は FGF- $\alpha Klotho$ システムの破綻による高ビタミン D 血症の二次的な結果と解釈できる。しかし、高ビタミン D 血症がヒト老

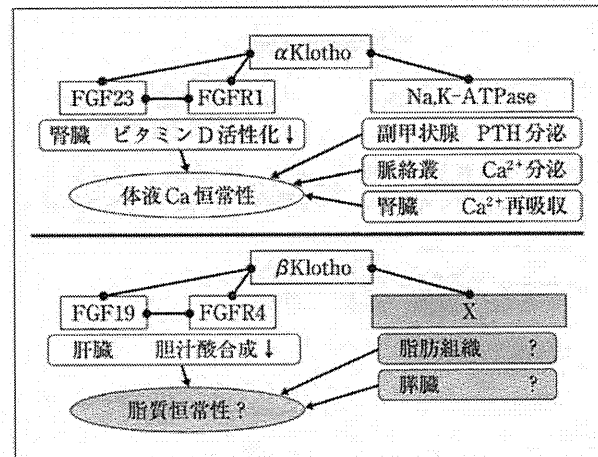


図4 $\alpha Klotho$ と $\beta Klotho$ による生体恒常性の維持 $\alpha Klotho$ は FGF23, FGFR1 との結合を介して活性型ビタミン D の合成を抑制する一方、Na,K-ATPase との結合により低カルシウム応答性の副甲状腺ホルモン分泌やカルシウム上皮輸送を抑制し、全体として体液カルシウム恒常性維持機構を構成する。一方 $\beta Klotho$ は、FGF19, FGFR4 との結合を介して胆汁酸合成を抑制する。この点で $\alpha Klotho$ と $\beta Klotho$ は極めて整った対称性を示すが、 $\beta Klotho$ が胆汁酸の合成調節を介して最終的に何の恒常性維持を担うかは必ずしも明確ではない。筆者らは $\beta Klotho$ にも FGF 以外の結合パートナー X が存在すると考え、X の同定が脂肪組織や膵臓における $\beta Klotho$ の機能の解明、さらには $\beta Klotho$ による恒常性制御の全貌解明のためのカギをにぎると考えている。

化に酷似した表現型をもたらすメカニズムについては多くが謎のままである。

ヒト高ビタミン D 血症(ビタミン D 中毒)は、高齢者骨粗鬆症や小児ビタミン D 欠乏症(くる病)に対する活性型ビタミン D 補充療法時の過量投与の結果生じる医源性的病態として報告されている²²⁾。しかし、これらの症例で認められる症状の多くは小児、成人を問わず高カルシウム血症による倦怠感や食欲不振などであり、骨塩量の減少などを除いて kl/kl の老化様表現型とは必ずしも一致しない²³⁾。また齧歯類に活性型ビタミン D を過量投与するだけで kl/kl の表現型を再現するのは困難である。 kl/kl や $fgf23$ 遺伝子欠損マウスでは生後2週頃に血中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度が極めて高く、それ以後は、対照野生型マウスより高値を維持するものの値そのものは低下の傾向を示す。また、 kl/kl では $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度は高いが前駆体の $25(\text{OH})\text{D}_3$ 濃度はむしろ低値を示す。このような FGF- $\alpha Klotho$ システムの障害に特徴的な高ビタミン D 血症のパターンが、老化様表現型の発症に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。さらに、FGF- $\alpha Klotho$ シス

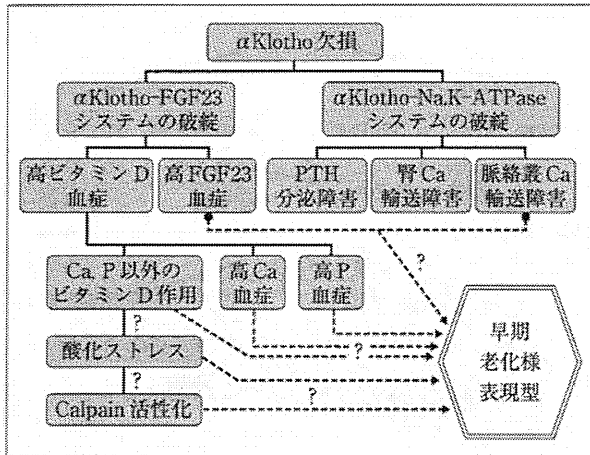


図5 *αklotho* 遺伝子欠損マウスにおける早期老化様表現型発症のメカニズム(仮説) *αKlotho*の欠損は*αKlotho*-FGF23システムの破綻による高ビタミンD血症の原因となると同時に、*αKlotho*-Na,K-ATPaseシステムの破綻による低カルシウム応答性の障害をもたらす。ビタミンD欠乏による高ビタミンD血症の是正が老化様表現型のほとんどを改善させたことから、表現型の形成には高ビタミン血症が必要条件であることは既に明らかとなっている。しかし、高ビタミンD血症がいかにして老化様表現型を惹起するかはほとんど未解明である。筆者らは、ビタミンDのカルシウム・リン代謝調節以外の作用、特に酸化ストレスの増強作用やその結果としてのカルパインの異常活性化が重要であると考えている。さらに、*αklotho* 遺伝子欠損マウスの表現型は活性型ビタミンDの過量投与のみでは必ずしもうまく再現されないことから、病態の形成への高ビタミンD血症以外の障害の関与が示唆される。

テムによるリン代謝制御作用²⁴⁾、FGFとは独立した*αKlotho*機能の障害などが老化様表現型の発症に複合的に寄与している可能性も十分残されている。筆者らはビタミンD中毒が老化様表現型発症の必要条件ではあっても十分条件ではないと考えており、研究を継続している(図5)。

*kl/kl*では老化様表現型の発症より前の2~4週齢に既に、腎臓や肺において μ -calpainの異常活性化と細胞骨格蛋白質 α 2-spectrinの切断の亢進が観察される²⁵⁾。これらの変化は正常高齢マウスにおいても*αKlotho*発現量の低下と並行して観察され、calpainの活性化による細胞骨格の破壊が*kl/kl*の老化様表現型の発症に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆される。筆者らは、酸化ストレスが高ビタミンD血症によるcalpain異常活性化のカギをにぎると考え、現在解析を進めている。

おわりに

*αKlotho*はFGF23/FGFR1との結合、Na,K-ATP

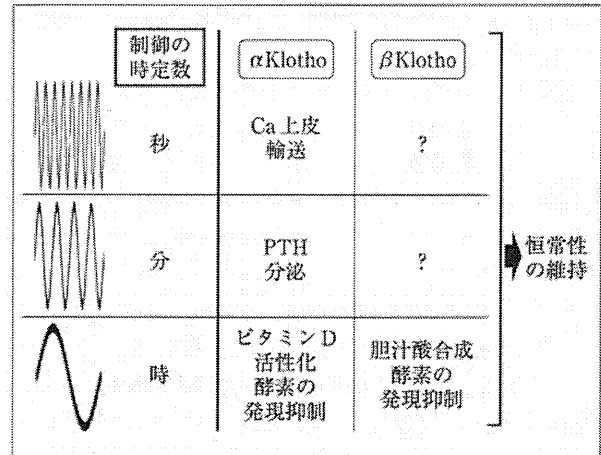


図6 *Klotho*ファミリー分子による生体恒常性維持機構の時間的重層性 生体恒常性においては時定数の小さい瞬時の制御機構と、時定数の大きいゆっくりした制御機構とが重層的に備わっていることにより、高度の安定性が保証される。*αKlotho*は秒、分、時の全ての時間単位のカルシウム代謝調節に関わっており、この意味で体液カルシウム恒常性のマスターレギュレーターといえる。筆者らは、*βKlotho*機能にも同様の時間的重層性が存在すると考え、現在研究に取り組んでいる。

aseとの結合という2つの分子機序を介して哺乳類個体の体液カルシウム恒常性を秒(カルシウム上皮輸送制御)、分(PTH分泌制御)、時~日(ビタミンD活性化制御)の単位で調節する、カルシウム代謝のマスターレギュレーターである。一般に生体恒常性はこのような複数の時定数・異なる方向性をもつ制御機構が重層的に配備されることにより、高度な安定性を獲得していると考えられる(図6)。老化や疾病は多くの場合、異常の慢性的蓄積として顕在化するため、ゆっくりとした時~日単位の制御機構の破綻による表現型が前面に出ることが多い。しかし、その背後にはより短い時間単位の異常が重積している可能性がある。この意味で、*αKlotho*が担う体液カルシウム恒常性の破綻を、ビタミンD活性化異常としてのみ解釈することは正しい理解とはいえない。筆者らは、秒~分単位の制御障害に起因する生体の揺らぎの頻度・振幅の増加をも含めて理解することにより初めて、*αKlotho*欠損に伴う老化様表現系の発症メカニズムの本質が理解されるものと考えている(図6)。老化や恒常性の破綻に起因する病態を解析する上でこのことは極めて大きな