

**Fig. 1.** Tissue-specific, action-specific insulin resistance in obesity-diabetes syndrome. Even in obese subjects with insulin resistance in glucose uptake into skeletal muscle or suppression of glucose output from liver, insulin action on adipose tissue remains intact or rather exaggerated due to hyperinsulinemia. This sometimes causes difficulties in body weight reduction. In obesity-related type2 diabetes, excessive insulin, endogenously or exogenously, causes body weight gain and ectopic lipid overload in non-adipose tissues. In the liver, for example, the ability of insulin to suppress hepatic glucose output is impaired, whereas insulin-stimulated *de novo* lipogenesis and resultant VLDL secretion is increased.

organ (tissue) dysfunction in non-adipose tissue is categorized as lipotoxicity and adipotoxicity [22] (Fig. 1). Taken together, the key for ameliorating obesity-related metabolic derangement is primarily the control of energy balance between caloric intake and energy expenditure.

Inter-tissue network by adipose tissue has stimulated great interest in areas of clinicals and drug discoveries [9]. Leptin controls appetite and energy homeostasis, thereby enhancing whole body insulin sensitivity and fuel homeostasis. Even with morbid obesity, both leptin-deficient humans and rodents (e.g. *ob/ob* mouse) show a robust sensitivity to leptin in terms of appetite suppression and body weight loss [33]. Similarly, leptin is effective in subjects with few amount of circulating leptin (e.g. patients with generalized lipodystrophy [4] and lipodystrophic murine models [31]).

On the other hand, the clinical application of leptin for the treatment of obesity-diabetes syndrome has been hampered by the fact that leptin does not fully exert its beneficial metabolic impact on prevalent forms of human obesity [8]. Although the mechanism of leptin insufficiency formulation in the hypothalamus has not been fully elucidated, at least five factors were shown to be involved; (1) impaired leptin transport into the brain from the periphery [5], (2) augmented signaling of neuropeptide Y, a primary target for leptin and is involved in regulating the signal relay of orexigenic/anorexigenic pathways in the hypothalamus [14], (3) impairment of leptin receptor signaling through leptin-dependent induction of SOCS-3 [13], (4) impairment of leptin receptor signaling by blunting both AMP-activated protein kinase (AMPK) and Stat 3 [21], and (5) augmented endoplasmic reticulum (ER) stress in response to high fat feeding [25].

In an attempt to further elucidate the underlying mechanism of leptin insufficiency formulation in obesity, we found that the activity of skeletal muscle AMPK tightly parallels hypothalamic leptin sensitivity and metabolic phenotype in transgenic mice overexpressing leptin exclusively in liver (transgenic skinny mice) [19,24]. AMPK is activated by decreased energy stores and orchestrates energy-sparing reaction in a tissue-specific manner [12]. In skeletal muscle, activation of AMPK stimulates glucose uptake, glycolysis, fatty acid  $\beta$ -oxidation and mitochondrial biogenesis [12]. Most importantly, AMPK mediates leptin-induced  $\beta$ -oxidation in skeletal muscle [17]. Our previous work using

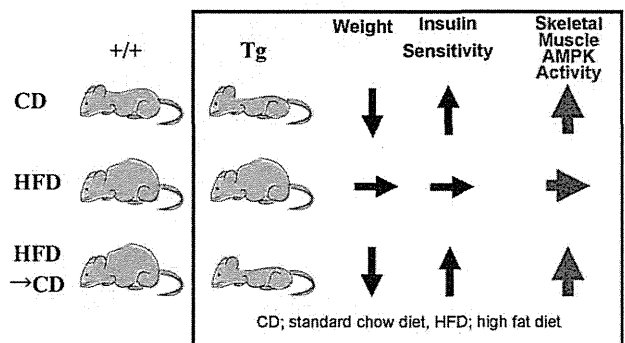
transgenic mice overexpressing leptin clearly demonstrated that AMPK activity in skeletal muscle parallels insulin sensitivity, and inversely correlates with energy efficiency under standard diet and high fat diet [34]. This finding indicates that AMPK activity in skeletal muscle tightly reflects leptin sensitivity in the hypothalamus.

## 2. Lessons learned from transgenic skinny mice (leptin transgenic mice overexpressing leptin)

To explore the long-term effects of leptin *in vivo*, we created transgenic mice overexpressing leptin under the control of the liver-specific serum amyloid P (SAP) component promoter [19,24]. In this unique mouse model, circulating level of leptin remains high irrespective of nutritional status or caloric intake, because the promoter activity of SAP is unaffected by feeding status or body energy storage [19,24]. Consequently, chronic hyperleptinemia results in the complete disappearance of white fat depots (WAT) for a long period of time [19,24]. We therefore call these animal transgenic skinny mice. Despite the lack of WAT throughout the body, transgenic skinny mice exhibit increased glucose metabolism, accompanied by enhanced proximal insulin receptor signaling in the liver and skeletal muscle. As far as transgenic skinny mice are housed on a chow diet, they represent excellent glucose and lipid homeostasis throughout the life [19,24]. However, enhanced fuel homeostasis and insulin sensitivity in transgenic skinny mice are expeditiously attenuated on a high-fat diet, with a progressive increase in body weight and food consumption equal to the wild type mice on a high fat diet [34]. Even with pronounced hyperleptinemia, AMPK activity in the skeletal muscle is concomitantly attenuated to the level of non-transgenic littermates. It is interesting to note that switching from a high fat diet to the standard diet leads to a prominent recovery of skeletal muscle AMPK activity in transgenic mice before they regain their skinny phenotype [34] (Fig. 2).

The hypothalamic melanocortin system consists of endogenous melanocortin agonists and the corresponding receptors. Ligand for the receptors is synthesized as proopiomelanocortin (POMC) preprohormone, which is proteolytically cleaved to generate melanocyte-stimulating hormones (MSHs). POMC is predominantly expressed in the arcuate nuclei of the hypothalamus (Arc)

### Reversal of Leptin Resistance on a Dietary Switch



**Fig. 2.** AMPK activity in skeletal muscle tightly reflects the hypothalamic leptin sensitivity. In transgenic mice overexpressing leptin in the liver, circulating level of leptin remains high irrespective of feeding status. Chronic hyperleptinemia results in the complete disappearance of white adipose tissue (WAT). As far as transgenic mice are housed on a chow diet, they represent excellent glucose and lipid homeostasis throughout the life. Interestingly, enhanced fuel homeostasis and insulin sensitivity in transgenic mice are expeditiously attenuated on a high-fat diet, with a progressive increase in body weight and food consumption. In this mouse model, AMPK activity in skeletal muscle parallels insulin sensitivity and inversely correlates with food intake, indicating that AMPK activity in skeletal muscle tightly reflects leptin sensitivity in the hypothalamus.

and the nucleus of the solitary tract (NTS) of the brainstem [28]. In the Arc, most of the POMC-expressing neurons coexpress functional leptin receptor, Ob-Rb, thereby conveying satiety signal of leptin [3]. Neuropeptide Y, a primary target for leptin, exerts a restraint on melanocortin system via synapses on POMC neurons in the Arc, thereby regulating the signal relay of orexigenic/anorexigenic pathways in the hypothalamus [14]. It should be noted that obese rodents respond normally to central supply of leptin [9,14], indicating that hypothalamic melanocortin signaling does not affect leptin sensitivity *per se* in the hypothalamus.

Both murine models and human subjects with defective melanocortin signaling develop late-onset, morbid obesity [7], however, it is controversial whether the hypothalamic melanocortin system does regulate fuel homeostasis in skeletal muscle. In our experiments, neither transgenic hyperleptinemia nor ICV leptin injection increased skeletal muscle AMPK activity under high fat feeding [35]. On the other hand, ICV administration of a potent melanocortin 3/4 receptor (MC3R/4R) agonist, Melanotan-II (MT-II) did increase skeletal muscle AMPK activity even in mice on a fed high fat diet [35]. These results indicate a mechanism upstream of hypothalamic melanocortin system that is responsible for leptin resistance. Considering the crucial role of AMPK in skeletal muscle in terms of the regulation of fatty acid  $\beta$ -oxidation, our data strongly suggest a metabolic link between the hypothalamic melanocortin signaling and fatty acid mobilization.

POMC neurons are mainly present in Arc and NTS, whereas MC4R, a representative melanocortin receptor involved in energy homeostasis, is widely distributed, but expresses highly in the paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) and the dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) [16]. Therefore, further studies are warranted to identify which nuclei within the hypothalamic melanocortin system mediate skeletal AMPK activation in skeletal muscle.

Leptin exerts diverse biological effects on energy homeostasis, reproduction, blood pressure and bone metabolism [1,20], and it remains controversial which functions of leptin are melanocortin-dependent [10]. We demonstrated that both pharmacological (SHU9119) and genetic ( $KKA^y$ ) blockade of the hypothalamic melanocortin receptor signaling considerably attenuated leptin-

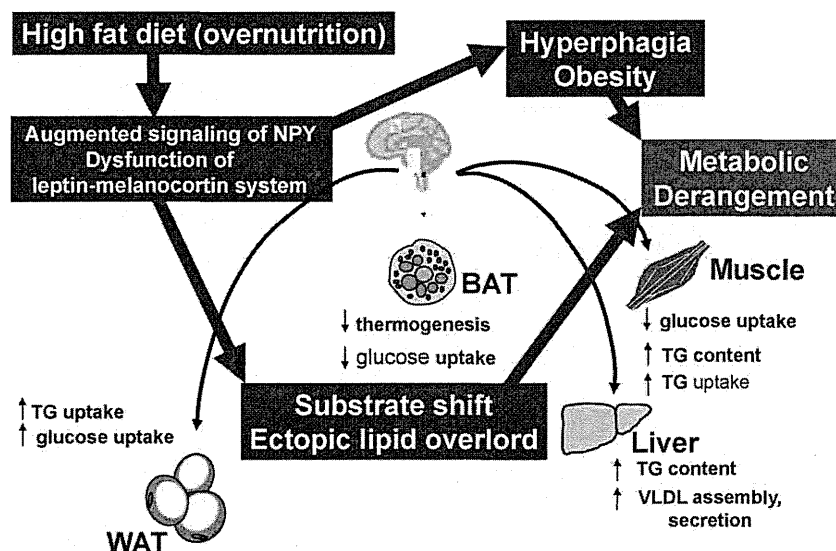
dependent AMPK and ACC phosphorylation in skeletal muscle [35]. These results provide evidence that “leptin-skeletal muscle AMPK axis” is regulated by the hypothalamic melanocortin system. It should be noted that leptin-induced augmentation in AMPK and ACC phosphorylation was abrogated in both 6-week-old and 10-week-old  $KKA^y$  mice. In 10-week-old “obese”  $KKA^y$ , attenuated response of AMPK to leptin is partly attributable to the secondary effect of obesity. On the other hand, lack of AMPK activation in skeletal muscle was similarly observed even in non-obese 6-week-old  $KKA^y$ , further supporting the notion that hypothalamic melanocortin signaling is necessary for leptin-induced muscular AMPK activation [35].

A recent study showed that peripheral but not central administration of ciliary neurotrophic factor (CNTF), a potent satiety agent even in diet-induced obesity, also activated AMPK in the skeletal muscle [38]. As is the case with leptin, anorectic effects of CNTF have been shown to be due to diminution in NPY signaling [26]. Although CNTF, like leptin, augments Stat3 signaling in the Arc, the anorectic effect of CNTF still remains intact in MC4R knockout mice [18]. Considering that the satiety effect of leptin is attenuated in MC4R knockout mice [18], these findings suggest that hypothalamic signaling cascades of leptin and CNTF are distinct at the level of the melanocortin system, and that hypothalamus-mediated AMPK activation in the skeletal muscle may be unique to leptin-melanocortin signaling cascades.

A recent work has shown that leptin-induced  $\alpha$ -MSH secretion from Arc was abrogated in diet-induced obese mice [6]. Interestingly, the study showed that MC4R expression level was markedly elevated in PVN of diet-induced obese mice [6], further supporting the notion that agonistic intervention for MC4R is effective in both satiety and activation of muscular AMPK even on a high fat diet.

### 3. Perspective of therapeutic application

Our findings reinforce the notion that MC4R is a promising drug target for the treatment of lipotoxicity and obesity-diabetes syndrome. However, further studies are warranted to explore the clinical efficacy and safety of melanocortin agonists. A previous *in vitro* study clearly demonstrated that MC4R, a G protein-coupled



**Fig. 3.** Activation of hypothalamic melanocortin signals causes metabolically-beneficial changes in multiple tissues. On a high fat diet, augmented signaling of neuropeptide Y, a primary target for leptin and is involved in regulating the signal relay of orexigenic/anorexigenic pathways and dysfunction of leptin-melanocortin system in the hypothalamus cause leptin insufficiency, hyperphagia, body weight gain, and resultant ectopic lipid overload in skeletal muscle, liver, pancreas, heart or perivascular regions. Lipid deposition-associated organ (tissue) dysfunction in non-adipose tissue is known as lipotoxicity or adipotoxicity. Recent works support a notion that hypothalamic melanocortin activation exerts metabolically beneficial effects in multiple tissues (e.g. skeletal muscle, liver, brown adipose tissue and white adipose tissue), via the sympathetic nervous system. Even on a high fat diet, MC4R agonism provokes substrate shift and nutrient partitioning without changing circulating triglyceride or FFA levels, thereby reducing ectopic lipid overload and ameliorating fuel dyshomeostasis in multiple organs.

receptor (GPCR) undergoes considerable internalization and desensitization to agonists [32], raising the possibility of intermittent administration in human clinics.

A recent work involving murine models demonstrated that the hypothalamic melanocortin activation caused parallel metabolically-beneficial effects in multiple tissues (e.g. skeletal muscle, liver, brown adipose tissue and white adipose tissue) via the sympathetic nervous system (Fig. 3). Agonistic agents for MC4R provoke substrate shift and nutrient partitioning without elevating level of circulating triglyceride or FFA, thereby reducing ectopic lipid overload [23]. From the standpoint of therapeutic application, recent research has highlighted an array of leptin sensitizing peptides, chemical chaperones or chemical agents, including amylin, 4-phenyl butyric acid (PBA), tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) and metformin [15,25,27]. Further investigation to explore the possible involvement of such leptin sensitizers in hypothalamic melanocortin signaling pathways would be extremely intriguing.

In summary, the chemical activation of MC4R in a safe manner can ameliorate hyperphagia as well as fuel dyshomeostasis in multiple metabolic organs, achieving “ideal” oligo- or monopharmacy [11] for the treatment of obesity-diabetes syndrome in humans.

### Acknowledgments

We are grateful to Profs. Tamotsu Shibasaki, Seiji Shioda and Kazuhiro Takahashi for favoring us an opportunity to participate in the International Symposium of Neuropeptides and Neuroendocrinology held in Tokyo, Japan on 29th of August, 2008. We also thank Profs. Yoshihiro Ogawa, Yasuhiko Minokoshi and Michio Shimabukuro for discussion. This work was supported in part by Grants-in-Aid (MEXT, Japan) B: 1939-02480001, Takeda Medical Research Foundation, Smoking Research Foundation and Lilly Research Foundation.

### References

- Aizawa-Abe M, Ogawa Y, Masuzaki H, Ebihara K, Satoh N, Iwai H, et al. Pathophysiologic role of leptin in obesity-related hypertension. *J Clin Invest* 2000;105:1243–52.
- Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: A pathogenic paradox. *Cell Metab* 2008;7:95–6.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 2001;411:480–4.
- Ebihara K, Kusakabe T, Hirata M, Masuzaki H, Miyayama F, Kobayashi N, et al. Efficacy and safety of leptin-replacement therapy and possible mechanisms of leptin actions in patients with generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:532–41.
- El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2000;105:1827–32.
- Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, et al. Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab* 2007;5:181–94.
- Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hrubby VJ, Cone RD. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 1997;385:165–8.
- Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 2004;116:337–50.
- Flier JS, Maratos-Flier E. What fuels fat? *Scientific Am* 2007;297:46–57.
- Greenfield JR, Miller JW, Keogh JM, Henning E, Satterwhite JH, Cameron GS, et al. *N Engl J Med* 2009;360:44–52.
- Grundy SM. Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:295–309.
- Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMP-activated protein kinase Development of the energy sensor concept. *J Physiol* 2006;574:7–15.
- Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzameli I, Bjorbaek C, Flier JS. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of *Socs3*. *Nat Med* 2004;10:734–8.
- Kalra SP. Central leptin insufficiency syndrome: An interactive etiology for obesity, metabolic and neural diseases and for designing new therapeutic interventions. *Peptides* 2008;127–38.
- Kim YW, Kim JY, Park YH, Park SY, Won KC, Choi KH, et al. Metformin restores leptin sensitivity in high-fat-fed obese rats with leptin resistance. *Diabetes* 2006;55:716–24.
- Liu H, Kishi T, Roseberry AG, Cai X, Lee CE, Montez JM, et al. Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. *J Neurosci* 2003;23:7143–54.
- Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 2002;415:339–43.
- Marsh DJ, Holoopeter G, Huszar D, Laufer R, Yagaloff KA, Fisher SL, et al. Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet* 1999;21:119–22.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Aizawa-Abe M, Hosoda K, Suga J, Ebihara K, et al. Glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic mice overexpressing leptin with lethal *Yellow agouti* mutation. Usefulness of leptin for the treatment of obesity-associated diabetes. *Diabetes* 1999;48:1615–22.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, et al. Nonadipose tissue production of leptin: Leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997;3:1029–33.
- Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004;428:569–74.
- Nakao K. Adiposclerosis and adipotoxicity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2009;5:63.
- Nogueiras R, Wiedmer P, Perez-Tilve D, Veyrat-Durebex C, Keogh JM, Sutton GM, et al. The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *J Clin Invest* 2007;117:3475–88.
- Ogawa Y, Masuzaki H, Hosoda K, Abe M, Suga J, Suda M, et al. Increased glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic skinny mice overexpressing leptin. *Diabetes* 1999;48:1822–9.
- Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 2009;9:35–51.
- Pu S, Dhillion H, Moldawer L, Kalra PS, Kalra SP. Neuropeptide Y counteracts the anorectic and weight reducing effects of ciliary neurotropic factor. *J Endocrinol* 2000;12:827–32.
- Roth JD, Roland BL, Cole RL, Trevaskis JL, Weyer C, Koda J, et al. Leptin responsiveness restored by amylin agonism in diet-induced obesity: evidence from nonclinical and clinical studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:7257–62.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Bum P, et al. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 1997;46:2119–23.
- Semple RK, Sleight A, Murgatroyd PR, Adams CA, Bluck L, Jackson S, et al. Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis. *J Clin Invest* 2009;119:315–22.
- Shimabukuro M. Cardiac adiposity and global cardiometabolic risk—New concept and clinical implication. *Circ J* 2009;73:27–34.
- Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 1999;401:73–6.
- Shinyama H, Masuzaki H, Fang H, Flier JS. Regulation of melanocortin-4 receptor signaling: Agonist-mediated desensitization and internalization. *Endocrinology* 2003;144:1301–14.
- Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001;104:531–43.
- Tanaka T, Hidaka S, Masuzaki H, Yasue S, Minokoshi Y, Ebihara K, et al. Skeletal muscle AMP-activated protein kinase phosphorylation parallels metabolic phenotype in leptin transgenic mice under dietary modification. *Diabetes* 2005;54:2365–74.
- Tanaka T, Masuzaki H, Yasue S, Ebihara K, Shiuchi T, Ishii T, et al. Central melanocortin signaling restores skeletal muscle AMP-activated protein kinase phosphorylation in mice fed a high fat diet. *Cell Metab* 2007;5:395–402.
- Unger RH. Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology* 2003;144:5159–65.
- Unger RH. Reinventing type 2 diabetes: pathogenesis, treatment and prevention. *JAMA* 2008;299:1185–7.
- Watt MJ, Dzamko N, Thomas WG, Rose-John S, Ernst M, Carling D, et al. CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK. *Nat Med* 2006;12:541–8.



**[発行元]**

株式会社 羊土社  
〒101-0052  
東京都千代田区神田小川町2-5-1  
TEL 03(5282)1211(代表)  
FAX 03(5282)1212  
E-mail eigyo@yodosha.co.jp  
URL <http://www.yodosha.co.jp/>

© YODOSHA CO., LTD.

本誌に掲載する著作物の複製権・上映権・演説権・公衆送信権(送信可能化権を含む)は(株)羊土社が保有します。本誌を無断で複製する行為(コピー、スキャン、デジタルデータ化など)は、著作権法上での認められた例外(「私的使用のための複製」など)を除き禁じられています。研究活動、診療を含み業務上使用する目的で上記の行為を行うことは大学、病院、企業などにおける内部的な利用であっても、私的使用には該当せず、違法です。また私的使用のためであっても、代行業者等の第三者に依頼して上記の行為を行うことは違法となります。

**©copy** <(株)出版者著作権管理機構 委託出版物>本誌の無断複製は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつど事前に、(株)出版者著作権管理機構(FIL: 03-3513-6968、FAX 03-3513-6979、e-mail: info@copy.or.jp)の許諾を得てください。

## 4. $\beta$ Klotho による代謝恒常性制御

田中智洋, 鍋島陽一

副甲状腺、腎臓、脈絡叢に発現する膜タンパク質、 $\alpha$ Klothoは、カルシウム、リン、ビタミンDの恒常性維持に必須の分子であり、発見から10年余を経て代謝制御における生理機能の全貌が解明されつつある。 $\beta$ Klothoは、 $\alpha$ Klothoとアミノ酸配列、ドメイン構造上高い相同性を有するホモログで肝臓、膵臓、脂肪組織に高濃度の発現を認めることからエネルギー代謝制御における機能が示唆される。最近の研究により、 $\beta$ Klothoは肝細胞におけるFGF19シグナル伝達に必須であり、FGF19によるコレステロールからの胆汁酸合成の抑制に寄与することが示された。さらに結合分子からは、 $\beta$ KlothoがFGFシグナルの受容に留まらず、栄養分子の膜輸送やミトコンドリアのエネルギー産生と物理的、機能的に共役する可能性が示され、臓器連関に基づくエネルギー代謝恒常性維持機構における意義が解明されつつある。

### はじめに

$\alpha$  klotho 遺伝子変異マウスは、若齢より皮膚萎縮、

脱毛、骨密度の低下、性腺萎縮、動脈石灰化、血管内皮機能障害、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<sup>1)</sup>。このことから、 $\alpha$  Klothoは

#### 【キーワード&略語】

コレステロール、胆汁酸、エネルギー代謝、FGF19サブファミリー、プロテオーム

***Bkl* KO** :  *$\beta$ klotho* knockout mouse (ベータクロトノックアウトマウス)

**FGF** : fibroblast growth factor (線維芽細胞増殖因子)

**FGFR** : fibroblast growth factor receptor (線維芽細胞増殖因子受容体)

**FXR** : farnesoid X receptor (ファルネソイドX受容体)

**KLrP** : Klotho-related protein (クロトー関連タンパク質)

**LRH-1** : liver receptor homolog-1

**NaK** : Na, K-ATPase (ナトリウムカリウムATPアーゼ, ナトリウムポンプ)

**NaPi** : Na-dependent phosphate transporter (ナトリウム依存性リン酸トランスポーター)

**NCX** : Na/Ca exchanger (ナトリウムカルシウム交換体)

**SHP** : small heterodimer partner

**VDR** : vitamin D receptor (ビタミンD受容体)

**VLDL** : very low density lipoprotein (超低比重リポタンパク質)

### $\beta$ Klotho as a novel regulator of energy homeostasis

Tomohiro Tanaka<sup>1,2)</sup>/Yo-ichi Nabeshima<sup>1)</sup> : Foundation for Biomedical Research and Innovation<sup>1)</sup>/Medical Innovation Center, Kyoto University Graduate School of Medicine<sup>2)</sup> (公益財団法人先端医療振興財団先端医療センター<sup>1)</sup>/京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター<sup>2)</sup>)

初め老化を制御する分子と考えられた。しかし後の研究により、 $\alpha$ Klothoは腎尿細管上皮細胞におけるビタミンDの合成、副甲状腺細胞からの副甲状腺ホルモン分泌、腎尿細管や脈絡叢におけるカルシウム・リンの上皮輸送を制御することが示され<sup>2)</sup>、 $\alpha$ klothoノックアウトマウスにみられる老化様表現型は、カルシウムやリン、ビタミンDの恒常性破綻に起因する代謝異常の帰結であると考えられるに至った<sup>3)~5)</sup>。

一方、 $\alpha$ Klothoと一次、二次構造上高い相同性を有し、肝臓、腺外分泌腺組織、白色および褐色脂肪組織に高いレベルの発現を示す $\beta$ Klothoの機能については、最近まで多くが謎であった。本稿では、① $\beta$ Klothoの構造と分子機能、②FGF19(※1参照)- $\beta$ Klothoシステムが制御するコレステロールと胆汁酸※2の代謝、③ $\beta$ Klotho結合分子群から迫る新しい恒常性維持機構、についてKlothoファミリーのプロトタイプである $\alpha$ Klothoと比較しつつ最新のデータを踏まえて解説する。

## ■ $\beta$ Klothoの構造と分子機能

1型膜タンパク質である $\alpha$ Klothoの細胞外領域には、シグナル配列に続いてグリコシダーゼ※3に類似するアミノ酸配列がタンデムに繰り返す構造がある。これら2つのグリコシダーゼ類似配列(N末端側より順にKL1ドメイン、KL2ドメインと呼ぶ)においてはいずれも、グリコシダーゼの活性中心とされるグルタミ

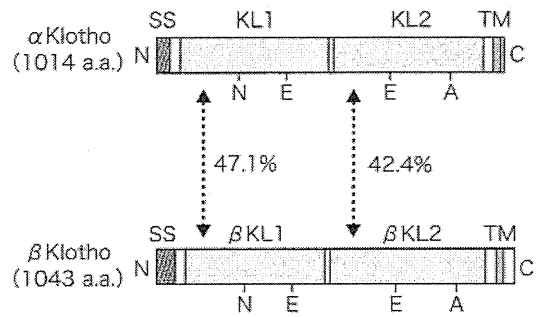


図1  $\alpha$ Klotho、 $\beta$ Klothoタンパク質の構造

$\alpha$ Klotho (1014アミノ酸)、 $\beta$ Klotho (1043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領域(TM)を有する1型膜タンパク質で、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末端側からそれぞれKL1、KL2ドメインないし $\beta$ KL1、 $\beta$ 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ことが知られる2カ所のグルタミン酸残基(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)へのアミノ酸置換変異が認められ、このアミノ酸変異は $\alpha$ Klothoと $\beta$ Klotho間で保存されている。KL1と $\beta$ KL1のアミノ酸配列上の相同性は47.1%、KL2と $\beta$ KL2の相同性は42.4%ときわめて高い。

ン酸残基に特徴的な変異が存在する(図1)。このため $\alpha$ Klothoの糖分解酵素としての活性はきわめて弱く、*in vitro*での検討ではわずかなグルクロン酸分解活性を示すのみである<sup>6)</sup>。この糖分解活性はグルクロン酸誘導体により競合的に阻害される<sup>6)</sup>。筆者らのグループは最近、 $\alpha$ KlothoがKL1、KL2ドメインを介してグルクロン酸を含む特徴的な糖鎖構造を認識し、標的タンパク質に特異的に結合することを明らかにした。これに基づき、筆者らは $\alpha$ Klothoによる糖鎖認識という、新しい標的分子認識のモデルを提唱しつつある。近い将来 $\alpha$ Klothoの立体構造が解明されれば、 $\alpha$ Klotho機能の構造生物学的裏付けが得られるものと期待される。 $\alpha$ Klothoは細胞外カルシウム濃度の低下

### ※1 FGF (fibroblast growth factor, 線維芽細胞増殖因子)

培養細胞の増殖活性を有することで発見されたが、現在は発生、創傷治癒などにおける広汎な生理機能が知られる。哺乳類では22種類が知られているがそのほとんどはヘパリン結合タンパク質であり、パラクリン因子として作用する。FGF受容体を介したシグナル入力には細胞表面のプロテオグリカンとの結合が必須である。しかし、本稿で取り上げるFGF19サブファミリーのようにヘパリンと結合せずエンドクリン因子として働くものや、分泌されずに細胞内で作用するものも最近では報告されている。

### ※2 胆汁酸

哺乳類の胆汁中に多量に含まれるステロール誘導体の総称。グリシンやタウリンなどのアミノ酸により抱合を受けた形で多く存在する。食物中の脂質をミセル化することにより、リパーゼ類による消化、腸管上皮からの吸収を容易にする機能を有することが古典的に知られるが、血液中にも微量に存在しエネルギー消費を増やす作用などが近年報告されている。

### ※3 グリコシダーゼ

グリコシド結合を加水分解する酵素の総称。バクテリアから哺乳類までほぼすべての生物に存在する。栄養源とするためにデンプン等の多糖類やスクロース、ラクトースのような二糖類を分解する酵素、糖タンパク質のプロセッシングを行う酵素など種々多様な酵素を含む。

により KL1, KL2 ドメインを含む細胞外領域が切断され可溶性  $\alpha$  Klotho として血液中に放出される<sup>7)</sup>。可溶性  $\alpha$  Klotho の生理機能は未解明である。また KL1, KL2 ドメインの C 末端側には 1 回の膜貫通領域とごく短い細胞内領域が存在するが、これら領域の機能も未解明である。

$\beta$  Klotho は  $\alpha$  Klotho のホモログとしてクローニングされた I 型膜タンパク質である<sup>7)</sup>。 $\beta$  Klotho には  $\alpha$  Klotho と同様、N 末端側からタンデムに並ぶグリコシダーゼ類似配列、 $\beta$  KL1,  $\beta$  KL2 と膜貫通領域、細胞内領域が存在する (図 1)<sup>7)</sup>。KL1 ドメインと  $\beta$  KL1 ドメイン、KL2 ドメインと  $\beta$  KL2 ドメインの比較では、それぞれ 47.1%, 42.4% とアミノ酸配列上高い相同性を有するのに加え、グリコシダーゼの活性中心に該当するグルタミン酸残基のアミノ酸置換変異も共通である (図 1)<sup>7), 8)</sup>。このことから  $\alpha$  Klotho と  $\beta$  Klotho は 1 つのファミリー、Klotho ファミリーを構成すると考えられる。アミノ酸配列上の相同性からは Klotho-related protein (KLRP) と呼ばれるタンパク質が存在するが、KLRP は KL 様のドメイン 1 個のみからなり KL ドメインのタンデムな反復も膜貫通領域や細胞内領域も欠失している<sup>9)</sup>。KLRP は細胞内で  $\beta$  グリコシルセラミダーゼ活性を有する可能性が示されている<sup>10)</sup>。われわれは細胞外領域に KL ドメインのタンデムな繰り返しを有する膜タンパク質であることを重要な特徴であると考へ、 $\alpha$  Klotho と  $\beta$  Klotho の 2 つを Klotho ファミリー分子と呼んでいる。

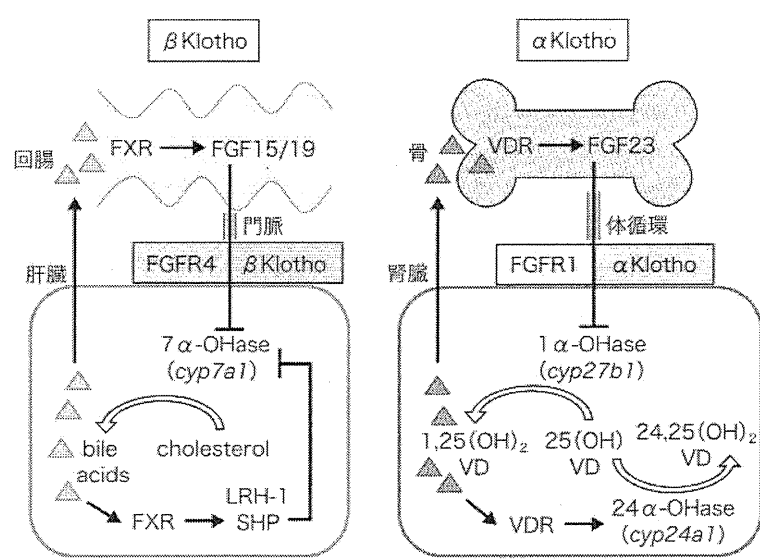
$\beta$  Klotho の酵素としての糖分解活性については、少なくとも  $\alpha$  Klotho が基質としたグルクロン酸は基質とはならないことがわかっている以外は現在全く不明であり、認識する糖鎖構造についても情報が得られていない。しかし、上述のような KL ドメインと  $\beta$  KL ドメインのアミノ酸配列上および配置上の高い相同性からは、 $\beta$  Klotho もやはり何らかの糖鎖認識を介して標的タンパク質と結合し、結合相手の分子機能を調節するものと考えられる。

## 2 FGF19- $\beta$ Klotho システムが制御するコレステロールと胆汁酸の代謝

$\alpha$  Klotho タンパク質が主に副甲状腺、腎尿管、脈絡叢に分布するのに対し、 $\beta$  Klotho は肝臓、腺外分泌

腺組織、白色および褐色脂肪組織に高レベルの発現を示す<sup>7)</sup>。早発性の老化様表現型を示す  $\alpha$  klotho ノックアウトマウスとは異なり、 $\beta$  klotho ノックアウトマウス ( $\beta$ kl KO) では、老化類似の表現型は認められず、代わりに胆嚢サイズの縮小と糞便中胆汁酸排泄量の増加が観察された<sup>8)</sup>。そこで肝臓における胆汁酸代謝酵素群の発現を検討したところ、 $\beta$ kl KO ではコレステロールから胆汁酸を合成する経路の律速段階を担う  $7\alpha$ -hydroxylase (*cyp7a1*) の遺伝子発現の亢進が認められた<sup>8)</sup>。胆汁酸への代謝・胆汁中への排泄は、コレステロールの最大かつほぼ唯一のクリアランス経路であり、*cyp7a1* の遺伝子発現の亢進は胆汁酸のみならず、体内のコレステロール動態にも大きな影響を及ぼすと考えられる。しかし  $\beta$ kl KO と対照野生型同胞との間の血清コレステロール値の差はわずかであり、 $\beta$ kl KO の肝臓では HMG-CoA reductase の発現が亢進することにより、*de novo* のコレステロール合成が増加し、コレステロール欠乏が代償されるものと考えられる<sup>8)</sup>。一方、 $\beta$ kl KO を高脂肪食下で飼育すると、血清のカイロミクロンや VLDL (very low density lipoprotein) が高脂肪食下の野生型マウスと比較して低い傾向を示し、トリグリセライド代謝の異常が示唆される。筆者らは現在、肝細胞特異的  $\beta$  klotho トランスジェニックマウスとの交配により、肝臓での  $\beta$  Klotho 発現をレスキューした  $\beta$ kl KO を作製し、高脂肪食下の脂質代謝に関する詳細な解析を行っている。

$\beta$ kl KO を解析していた筆者らのグループとは独立に研究が進んだのが FGF15/FGF19 の機能解析である (齧歯類の FGF15 はヒト FGF19 のオルソログと考えられている<sup>11)</sup>)。稲垣らは、①マウスに対する FGF15 の投与やアデノウイルスによる過剰発現が肝臓での *cyp7a1* 発現を強力に抑制すること、② FGF15/19 の受容体とされる *fgfr4* のノックアウトマウスにおいては、そもそも *cyp7a1* 発現が亢進しており、また FGF15 による発現抑制が全くみられないこと、を報告した<sup>12)</sup>。筆者らは *cyp7a1* の発現亢進が *fgfr4* ノックアウトマウスと  $\beta$ kl KO の肝臓で共通して認められることから、FGF15/19 シグナル伝達における  $\beta$  Klotho の意義を解明するために  $\beta$ kl KO に対する FGF19 の投与と実験を行った。FGF19 を野生型マウスに投与すると肝臓における *cyp7a1* 発現が著明に抑制されたが、 $\beta$ kl KO で



**図2 Klotho-FGFシステムによる代謝制御—βKlothoとαKlothoの制御世界**  
胆汁酸は回腸においてFXR依存性にFGF15/19を発現誘導する。FGF15/19は門脈を介して肝臓に到達し、FGFR4、βKlothoからなる受容機構を介してシグナルを伝達し、7α-hydroxylase (7α-OHase, *cyp7a1*) の遺伝子発現を抑制することで、コレステロールからの胆汁酸の*de novo*合成を阻害する。このような小腸-肝臓間の臓器間情報伝達を介したネガティブフィードバック制御に加えて、胆汁酸は直接肝臓内においてFXR依存性にSHPの発現を増加させることで7α-OHase発現を抑制するという臓器自律的なネガティブフィードバック制御機構を持っている。一方、活性型ビタミンDである1,25(OH)<sub>2</sub>VDはVDR依存性に骨においてFGF23の発現を誘導する。FGF23は循環血中を介して腎臓に到達し、FGFR1、αKlothoからなる受容機構を介してシグナルを伝達し、1α-hydroxylase (1α-OHase, *cyp27b1*) の遺伝子発現を抑制することにより低活性前駆体25(OH)VDからの活性型1,25(OH)<sub>2</sub>VD合成を阻害する。このような骨-腎臓の臓器連関によるネガティブフィードバック制御に加えて、1,25(OH)<sub>2</sub>VDは直接腎臓内においてVDR依存性に24α-hydroxylase (24α-OHase, *cyp24a1*) の遺伝子発現を増加させる。24α-OHaseは25(OH)VDを活性の低い24,25(OH)<sub>2</sub>VDに変換することで活性型の1,25(OH)<sub>2</sub>VDの産生に阻害的に働く。このようにβKlotho-FGF15/19システムとαKlotho-FGF23システムとはきわめて整った生理機能上の相同性を示す

はもともと *cyp7a1* 発現が亢進しており、FGF19投与によっても全く変化を示さなかった<sup>13)</sup>。以上よりFGF15/19による *cyp7a1* 発現抑制にはFGFR4とともにβKlothoが必須であることが個体レベルで証明された(図2)<sup>13)</sup>。

FGF15/19は遠位回腸において胆汁酸受容体FXR (farnesoid X receptor) 依存性に発現誘導される<sup>14)</sup>。つまり肝臓から胆汁酸が分泌されると、回腸でFGF15/19の産生が誘導され、FGF15/19は門脈を介してFGFR4・βKlotho依存性に肝臓に作用し、コレステロールからの*de novo*の胆汁酸合成を抑制する<sup>13)</sup>。このことは、FGF15/19が、胆汁酸合成のネガティブフィードバック制御を担うホルモンとして作用することを意味する<sup>12)</sup>。胆汁酸合成のネガティブフィードバック制御としては、胆汁酸産生臓器である肝臓での

FXR, LRH-1 (liver receptor homolog-1), SHP (small heterodimer partner) を介する臓器自律的な機序がすでに知られている<sup>15)</sup>。FGF15/19やβKlothoの研究から明らかとなった*cyp7a1* 制御機構は、回腸のFXR・FGF15/19と、肝臓のFGFR4・βKlothoから構成される小腸-肝臓間の臓器連関に基づく新しい制御システムである<sup>13)</sup>。胆汁酸の合成が臓器内および臓器間という2つの異なるレベルのネガティブフィードバック制御を受けていることはきわめて興味深い(図2)。

Klothoを介するコレステロール誘導体産生のネガティブフィードバック制御は、実はβKlothoだけではなくαKlothoでも明らかとなっている。FGF15/19は①アミノ酸配列の類似性、②受容体への結合にヘパラン硫酸を必要としないこと、の2点に基づきFGFファ



ミリーの中ではFGF21, FGF23と併せてFGF19サブファミリーに分類される<sup>11)</sup>。FGF19サブファミリーに属するFGF23は $\alpha$ Klothoと結合する。また株化細胞への遺伝子導入実験によればFGF23による細胞内シグナルの活性化は $\alpha$ Klotho依存性である<sup>10) 17)</sup>。さらに、*Igf23*ノックアウトマウスと $\alpha$ klothoノックアウトマウスの表現型は高い類似性を示すことから<sup>18)</sup>、FGF23作用における $\alpha$ Klothoの重要性が示唆された<sup>17)</sup>。FGF23はVDR (vitamin D receptor) 依存性に骨で産生され、血液中を循環して腎尿管上皮細胞に作用して活性型ビタミンDの合成酵素、1 $\alpha$ -hydroxylase (*cyp27b1*) の発現を抑制する。筆者らは $\alpha$ klothoノックアウトマウスにFGF23を投与し、腎臓における*cyp27b1*の発現変化を検討した。 $\alpha$ klothoノックアウトマウスではもともと*cyp27b1*の発現が亢進しており、野生型マウスで認められるFGF23誘導性の*cyp27b1*発現の抑制が全く認められなかった<sup>19)</sup>。

以上より、胆汁酸のネガティブフィードバック制御を担うFGF19- $\beta$ Klothoシステムに対して、FGF23- $\alpha$ Klothoシステムは骨と腎臓の臓器連関に基づくビタミンDのネガティブフィードバック制御を司っていることが明らかとなった(図2)。FGF19の受容体であるFGFR4や、FGF23の受容体であるFGFR1は、多数の臓器や細胞に広く発現している。そのため産生細胞の局所でヘパラン硫酸にトラップされることなく血液中を循環し得るFGF19サブファミリーのFGFが、遠隔臓器の正しい標的細胞にのみシグナルを入力できるのは、 $\beta$ Klothoや $\alpha$ Klothoが体内で限局した発現パターンを示すからである、と考えられる。この意味でKlothoファミリー分子は、FGFによる遠隔臓器間の正確な情報伝達を担保する分子マシナリーであるといえることができる<sup>10)</sup>。

### 図3 $\beta$ Klotho結合分子群から迫る新しい恒常性維持機構

$\beta$ KlothoによるFGF15/19の特異的認識、あるいは $\alpha$ KlothoによるFGF23の特異的認識はいかなる分子機序により実現されるのか。FGF15/19, FGF23,  $\beta$ Klotho,  $\alpha$ Klothoはいずれも糖鎖修飾を受けるタンパク質である。筆者らのグループでは、FGFに付加された特殊な糖鎖構造をKlothoが認識することにより

表 免疫共沈物のプロテオーム解析から明らかとなった $\beta$ Klotho結合分子

① FGF受容体およびFGFシグナル伝達分子
② プロテオグリカン
③ 細胞膜での物質輸送に関わる膜輸送分子
④ ミトコンドリアでの酸化・ATP産生に関わる分子
⑤ タンパク質の糖鎖修飾に関わる分子
⑥ 細胞膜の裏打ちタンパク質
⑦ 細胞内小胞輸送関連分子
⑧ その他

FGF-Klotho複合体が形成されると考えている。例えばFGF23がFGFR1に結合するためには、あらかじめFGF23- $\alpha$ Klotho複合体が形成されていることが必要である。FGF23- $\alpha$ Klotho間の結合には、タンパク質骨格と特異的糖鎖の両方が寄与すると考えられ、特に糖鎖により規定される特異的な分子認識には $\alpha$ Klothoのグリコシダーゼ類似配列が重要な働きをすることが示されつつある。

Klothoが糖鎖認識分子であるならば、FGF以外の糖タンパク質とは結合しないのであろうか。筆者らは $\beta$ Klothoタンパク質を発現する肝臓、脾臓、脂肪組織における新しい $\beta$ Klotho結合分子の探索を行った。これら臓器のライセートを抗 $\beta$ Klotho抗体で免疫沈降し、免疫共沈物のプロテオーム解析を行った。その結果、臓器間で共通の分子、臓器特異的な分子など多数の共沈物のアノテーションの決定に成功した。この解析により $\beta$ Klotho結合分子は多くの機能群に分類されるタンパク質にわたることが示され、これらは表に示すグループに大別することができる。では種々の分子と $\beta$ Klothoの相互作用はどのような生理的機能を有するのだろうか。

$\alpha$ KlothoはFGF23以外に、副甲状腺、腎臓、脈絡叢のいずれの発現臓器においてもNa, K-ATPase (NaK) と結合している<sup>21)</sup>。 $\alpha$ Klothoは、細胞外カルシウム濃度の低下に応答したNaKの速やかな細胞膜表面へのリクルートに必要である<sup>21)</sup>。細胞生物学的なメカニズムは完全には解明されていないが、この $\alpha$ Klotho依存性のNaKの細胞膜移行、その結果としてのATP依存性Na/K輸送活性の増加は、低カルシウム刺激に

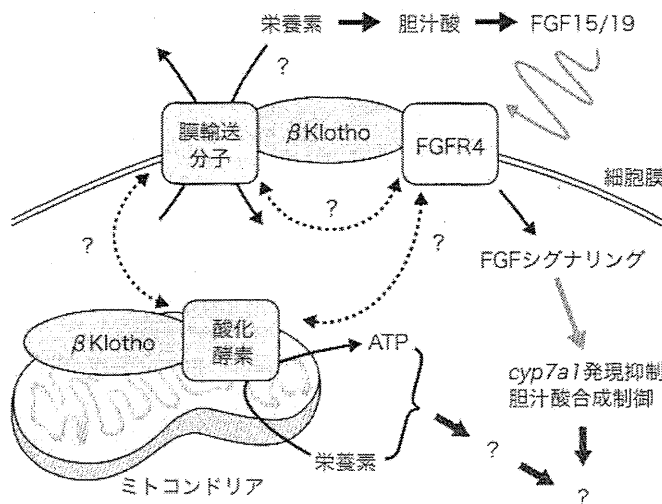


図3 タンパク質間相互作用を介した  $\beta$  Klotho の代謝制御機能 (仮説)

$\beta$  Klotho の結合分子には FGF15/19 のシグナル受容に関わる分子群、膜表面での物質輸送に関わる分子群、ミトコンドリアにおける酸化等の代謝酵素群、などがある (表)。 $\beta$  Klotho は  $\alpha$  Klotho と同様、糖鎖認識を介したタンパク質間相互作用分子であると考えられることから、これら分子群との結合を介して標的分子の機能を調節するものと考えられる。  $\beta$  Klotho が複数の種類の結合パートナー分子と同時に結合できるのか、結合は相互排他的なのか、あるいは、それぞれのパートナーとの結合は独立して制御されているのかは、現在のところ不明である。  $\alpha$  Klotho は FGF23, FGFR1 との結合を介してビタミン D の合成を制御する一方、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制御し、全体として体液カルシウム・リン恒常性を維持する。このことから  $\beta$  Klotho も結合分子群との相互作用を介した、FGF シグナル伝達以外の生理機能を有するものと考えられ、今後の研究の進展が期待される。

よる副甲状腺ホルモンの分泌誘導に必須であることが示されている<sup>2)</sup>。例えば  $\alpha$  klotho ノックアウトマウスの副甲状腺、あるいは NaK 阻害薬である ouabain の存在下では、低カルシウム刺激による副甲状腺ホルモンの分泌が著しく障害される<sup>2) 19)</sup>。また、低カルシウム誘導性、 $\alpha$  Klotho 依存性の Na/K 輸送活性の増加は NCX (Na/Ca exchanger), NaPi (Na-dependent phosphate transporter) 等を介した脈絡叢や腎尿管でのカルシウム・リンの上皮輸送にも必要であると考えられる。糖尿病性腎症の腎臓における  $\alpha$  Klotho の発現低下はこの  $\alpha$  Klotho 依存性のカルシウム再吸収の障害をもたらす、糖尿病における尿中へのカルシウム喪失の一因となっている可能性が示唆される<sup>20)</sup>。単一の分子である  $\alpha$  Klotho が、分子進化上、FGF シグナル制御と NaK 活性制御の2つの独立した分子機能を獲得するに至った理由、また異なった分子メカニズムでありながら最終的にはビタミン D 制御や副甲状腺ホルモン分泌等の個体のカルシウム・リン恒常性維持に必須の

プロセスに関与していることの必然性は大きな謎である。

翻って  $\beta$  Klotho の結合分子群を俯瞰するとき、 $\alpha$  Klotho と同様に細胞膜近傍における FGF シグナル受容と、細胞膜内外の物質輸送の両方に関与していることが示唆される。加えて  $\beta$  Klotho はミトコンドリア膜にも存在する可能性が示唆され、ミトコンドリアにおける栄養分子の酸化や ATP 産生における機能も示唆される。糖鎖修飾に関連する分子群や細胞膜の裏打ちタンパク質群、細胞内の小胞輸送関連分子との相互作用は、これら細胞生理機能を発揮するための分子基盤を担うものと考えられる。これらの分子との結合により  $\beta$  Klotho は、①小腸から肝臓への栄養情報のメッセンジャー、FGF15/19 のシグナル受容、②栄養分子等の細胞膜内外の物質輸送制御、③ミトコンドリアにおけるエネルギー産生制御、の3つの機能を果たす、エネルギー代謝情報のインテグレーターであると考えられる (図3)。

## おわりに

$\beta$  Klotho の分子機能の本質は、糖鎖認識を介した糖タンパク質間相互作用と、その結果としての膜上での複合体形成にあると考えられる。細胞レベルにおいては、FGFのシグナル受容、膜内外の物質輸送、さらにはミトコンドリアでのエネルギー産生の3つの機能制御を相互に連携させる役割を果たすと考えられる。しかし、これを裏付ける実験データは未だ不十分であり、今後の大きな研究課題である。個体レベルの代謝恒常性における意義として特筆に値するのは、FGF15/19のシグナル伝達に必須の分子として、小腸からの栄養情報を肝細胞に限定して伝えることにより、小腸-肝臓間の臓器連関を可能とすることである。肝臓での胆汁酸合成制御に加え、脂肪細胞や腺外分泌細胞における新しい結合分子群を介した $\beta$  Klothoの機能が解明されれば、個体レベルのエネルギー代謝恒常性を担う臓器間ネットワークの動的安定性の本質に迫ることができると期待される。

$\beta$  Klotho免疫共沈物のプロテオーム解析においては、北海道大学大学院生命科学院の小布施力史教授にご協力いただきました。感謝申し上げます。

## 文献

- 1) Kuroi, M. et al. : Nature, 390 : 45-51, 1997
- 2) Imura, A. et al. : Science, 316 : 1615-1618, 2007
- 3) Yoshida, T. et al. : Endocrinology, 143 : 683-689, 2002
- 4) Tsujikawa, H. et al. : Mol. Endocrinol., 17 : 2393-2403, 2003
- 5) Nabeshima, Y. & Imura, H. : Am. J. Nephrol., 28 : 455-464, 2008
- 6) Tohyama, O. et al. : J. Biol. Chem., 279 : 9777-9784, 2004
- 7) Ito, S. et al. : Mech. Dev., 98 : 115-119, 2000
- 8) Ito, S. et al. : J. Clin. Invest., 115 : 2202-2208, 2005
- 9) Yahata, K. et al. : J. Mol. Med. (Berl), 78 : 389-394, 2000
- 10) Hayashi, Y. et al. : J. Biol. Chem., 282 : 30889-30900, 2007
- 11) Itoh, N. & Ornitz, D. M. : Dev. Dyn., 237 : 18-27, 2008
- 12) Inagaki, T. et al. : Cell Metab., 2 : 217-225, 2005
- 13) Tomiyama, K. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107 : 1666-1671, 2010
- 14) Stroeve, J. H. et al. : Lab. Invest., 90 : 1457-1467, 2010
- 15) Lu, T. T. et al. : Mol. Cell, 6 : 507-515, 2000
- 16) Kurosu, H. et al. : J. Biol. Chem., 281 : 6120-6123, 2006
- 17) Urakawa, I. et al. : Nature, 444 : 770-774, 2006
- 18) Shimada, T. et al. : J. Clin. Invest., 113 : 561-568, 2004
- 19) Brown, E. M. et al. : Metabolism., 36 : 36-42, 1987
- 20) Asai, O. et al. : Kidney Int., 81 : 539-547, 2012

### <筆頭著者プロフィール>

田中智洋：1992年大阪教育大学附属平野高校卒業、'98年京都大学医学部卒業、京大病院、岡山附興風会北野病院における臨床研修後、2001年～'05年、京都大学・医・内科学講座臨床病態医学（中尾一和教授）博士課程在学、肥満病態におけるレプチン作用不全に関する研究により学位を取得、'06年より京都大学・医・腫瘍生物学講座（鍋島陽一教授）にてエネルギー恒常性における $\beta$  Klothoの分子機能の研究に従事、'11年～鍋島研究室の移動に伴い、先端医療センター主任研究員、'12年～同客員主任研究員と京都大学・医・メディカルイノベーションセンター特定准教授を兼任、中枢神経系、脂肪組織、肝臓、膵臓、骨格筋等の臓器間ネットワークの理解に立脚した代謝制御研究にあふれる情熱を燃やしている。

# 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

PART ④

# 心腎連関解明の 新しい分子標的 $\alpha$ 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

*αklotho* 遺伝子変異マウスは石灰化や内膜肥厚などの動脈硬化病変, 内皮機能障害, 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  $\alpha$  Klotho の分子機能との関係は完全には解明されていない。  $\alpha$  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。  $\alpha$  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,  $\alpha$  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

$\alpha$  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 (Lakheisis), 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<sup>1)</sup>。 *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<sup>1)</sup>。 *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  $\beta$  *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  $\alpha$  *klotho* と呼ぶ。 *kl/kl* も、後に作製された  $\alpha$  *klotho* 遺伝子欠損マウス ( $\alpha$  *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<sup>1, 2)</sup>。 *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  $\alpha$  promoter により

全身で  $\alpha$  *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  $\alpha$  *Klotho* の欠失であることが証明された<sup>1)</sup>。

マウスの  $\alpha$  *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<sup>1)</sup>。KL1, 2は  $\beta$  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<sup>3)</sup>。  $\alpha$  *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、 $\alpha$  *Klotho* 研究における最大の謎であった。

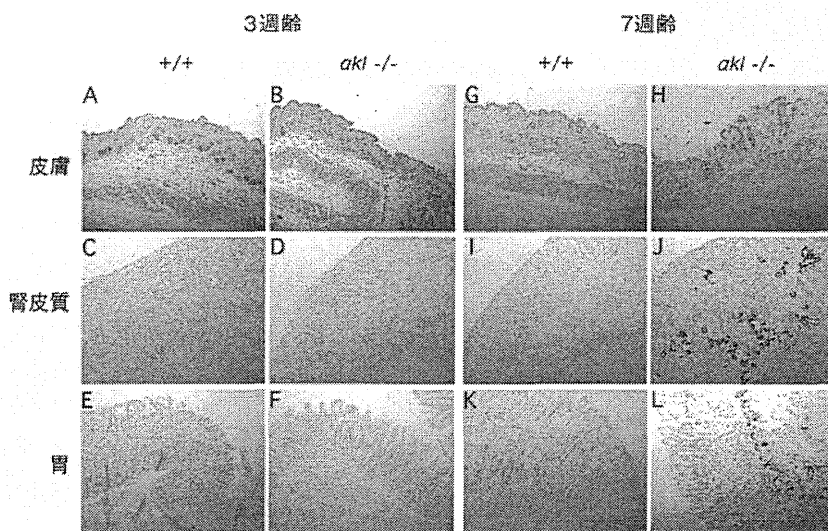


図1  $\alpha$  *klotho* 遺伝子欠損マウスの組織像

3週齢の  $\alpha$  *klotho* 遺伝子欠損マウス ( $\alpha$  *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  $\alpha$  *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  $\times 20$ )。

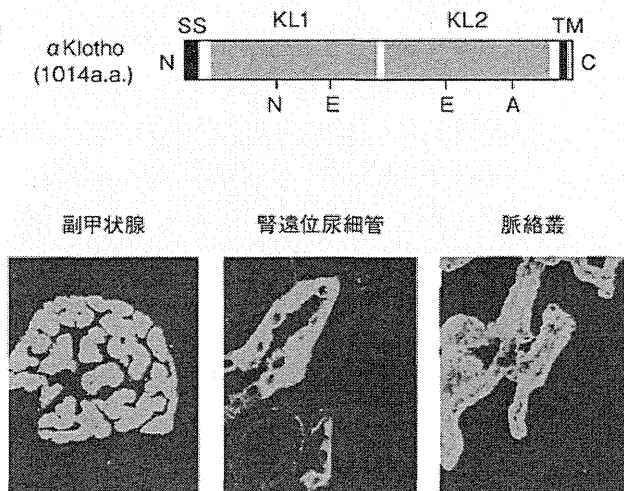


図2 マウス  $\alpha$  Klotho の  
1次構造(上段)と免疫染色像(下段)

$\alpha$  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。 $\alpha$  Klothoとアミノ酸配列上高い相同性を示すホモログ,  $\beta$  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。 $\alpha$  Klotho蛋白質は主として副甲状腺の主細胞, 腎臓の遠位尿管上皮細胞の一部, 脈絡叢上皮細胞に発現が認められる。

2

$\alpha$  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<sup>1)</sup>。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)<sup>1)</sup>。

$\alpha$  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,  $\alpha$  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<sup>4)</sup>。  $kl/+$ 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  $\alpha$  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<sup>4, 5)</sup>。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<sup>6)</sup>。これらの所見は, 少なくとも血管病変については  $\alpha$  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<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> EPC(endothelial precursor cells)の減少の関与も示唆されている<sup>7)</sup>。

一方、 $\alpha$ 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<sup>8)</sup>。 $kl/kl$ 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<sup>9)</sup>。腎臓における $\alpha$ 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<sup>9)</sup>。 $\alpha$ 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<sup>10)</sup>。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 $\alpha$ 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<sup>11)</sup>。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 $\alpha$ 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<sup>11)</sup>。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 $\alpha$ Klothoの発現低下が認められる。このように $\alpha$ Klotho発現低下は慢性的の障害機転に起因すると考えられる<sup>11)</sup>。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 $\alpha$ 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 $\alpha$ Klotho発現に影響を及ぼさないと考えられる<sup>9)</sup>。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 $\alpha$ Klotho発現変化に大いに興味もたれ、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

$aklotho$ 変異マウスの心臓における形態変化は軽微といえよう<sup>11)</sup>。しかし、 $aklotho$ 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 $aklotho$ 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、 $aklotho$ は心臓内では洞房結節に局限した発現を示した<sup>12)</sup>。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<sup>12)</sup>。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<sup>12)</sup>。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 $\alpha$ Klothoとの関連は興味深い、詳細は未解明である。

### 3 $\alpha$ 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、 $\alpha$ 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)<sub>2</sub>ビタミンD<sub>3</sub>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<sup>13)</sup>。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体内で*de novo*に合成されるか、肝臓で25位が水酸化されて25(OH)ビタミンD<sub>3</sub>となったあと、最終的には腎臓において1 $\alpha$ -hydroxylase(CYP27B1)により活性型の1,25(OH)<sub>2</sub>ビタミンD<sub>3</sub>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<sup>13)</sup>。 $kl/kl$ の血清1,25(OH)<sub>2</sub>ビタミンD<sub>3</sub>



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<sup>13)</sup>。

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<sup>14)</sup>。以上のことから、 $\alpha$ 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)<sup>14)</sup>。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 $\alpha$ 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。 $\alpha$ 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 $\alpha$ KlothoとFGF23との関係に注目が集まった<sup>15)</sup>。その後 $\alpha$ 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

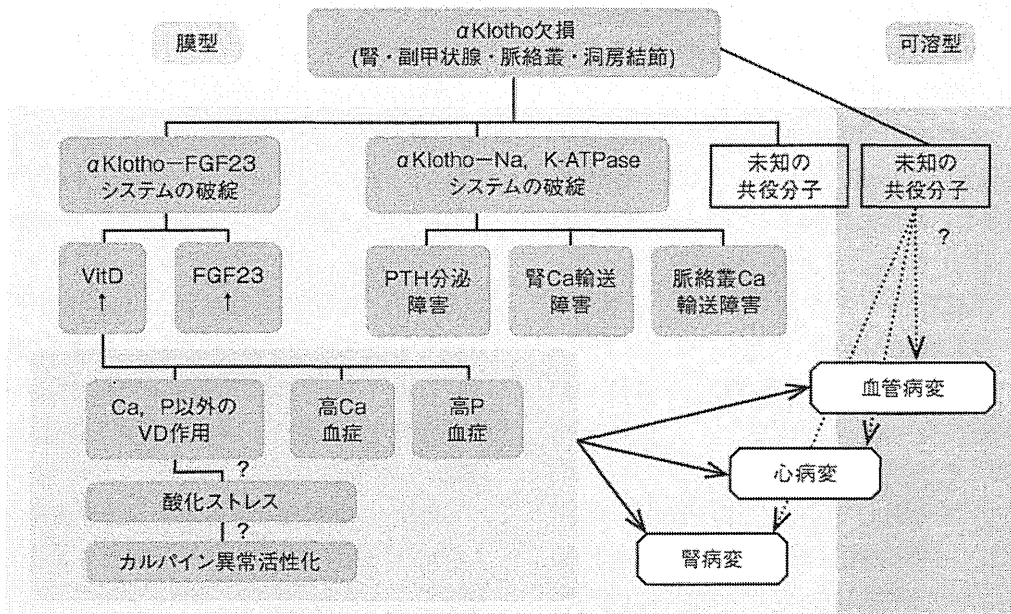


図3  $\alpha$ klotho 遺伝子欠損マウスにおける腎・心・血管病変発症のメカニズム (仮説)

$\alpha$ Klotho の欠損は  $\alpha$ 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、 $\alpha$ 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・心表現型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していない。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うるカルパインの異常活性化<sup>27)</sup>が重要であると考えている。さらに、膜型の $\alpha$ Klotho 以外に可溶型(分泌型) $\alpha$ 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 $\alpha$ 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<sup>16,17)</sup>。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*<sup>-/-</sup>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<sup>18)</sup>。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<sup>19)</sup>。

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<sup>19)</sup>。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細管・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<sup>20)</sup>。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)<sup>20)</sup>。

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 注目される可溶型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、ヒト血清中の可溶型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<sup>21)</sup>。膜蛋白質である可溶型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、腎静脈側に可溶型αKlothoが大量に流出する<sup>19)</sup>。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型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常状態での血清中αKlothoの意義はいまだ不明であり、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、可溶型の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*<sup>+/+</sup>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<sup>9)</sup>。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<sup>22)</sup>。さらにOLETFラットにインスリン抵抗性改善薬であるPPAR $\gamma$ アゴニスト、Troglitazoneを投与すると腎臓における $\alpha$ 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<sup>23)</sup>。これらの結果は、体内のいずれかの部位に $\alpha$ 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、 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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<sup>24)</sup>。最近では可溶性 $\alpha$ Klothoが2型VEGF受容体、TRPC-1(transient-receptor potential canonical Ca<sup>2+</sup> 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<sup>25)</sup>。しかし、膜型から可溶性 $\alpha$ Klothoへの変換のダイナミクスや正確な切断部位、切断酵素、可溶性 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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<sup>26)</sup>。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、可溶性 $\alpha$ 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、 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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。

可溶性 $\alpha$ 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、可溶性 $\alpha$ 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、可溶性 $\alpha$ 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)。 $\alpha$ 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  $\alpha$ -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 $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 Ca<sup>2+</sup> channel to maintain endothelial integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 19308-19313, 2010
  - 26) Bernheim J, Benchetrit S : The potential roles of FGF23 and Klotho in the prognosis of renal and cardiovascular diseases. *Nephrol Dial Transplant* **26**: 2433-2438, 2011
  - 27) Manyá H, Inomata M, Fujimori T et al : Klotho protein deficiency leads to overactivation of  $\mu$ -calpain. *J Biol Chem* **277**: 35503-35508, 2002