

「生命活動のプログラム」
平成7年度採択研究代表者

鍋島 陽一

(京都大学大学院医学研究科 教授)

「個体老化の分子機構の解明」

1. 研究実施の概要

挿入突然変異によって早期老化症状を呈するKlothoマウスを樹立した。多彩な老化症状は単一遺伝子の欠損に起因しており、原因遺伝子Klothoを同定した。Klotho遺伝子は新規の1型膜蛋白質をコードしており、その発現は腎臓で高く、弱い発現が中枢神経系で観察された。骨、皮膚、胃などの強い変異症状が観察される臓器で、Klotho遺伝子の発現が観察されず、Klotho蛋白の機能を伝える液性因子の存在が示唆された。ヒト相同遺伝子は同様の1型膜蛋白質と分泌型蛋白質をコードしている。また、アミノ酸配列中にKKRK配列が認められ、蛋白合成後にプロセッシングにより分泌される可能性も考えられる。Klothoがターゲット組織、分子に結合し、機能していることが推定されるが、Klothoがb-Glucosidaseに相同性が高いことから、酵素活性によって不活性分子の活性化に関わる可能性が推定される。これらの事実からklothoマウスにおける老化関連症状、特に循環器、呼吸器、骨疾患についての詳細な解析と、Klotho蛋白の存在様式と機能の解明を課題として以下の課題を取り上げた。

- 1) Klotho蛋白の存在様式、結合蛋白について
- 2) Klotho蛋白の酵素活性について
- 3) Klotho蛋白の機能ドメインについて
- 4) nullノックアウトマウスの作製について
- 5) 老化疾患の発症に関連する遺伝子カスケード、遺伝子素因の解析について
- 6) klotho遺伝子の発現について
- 7) Klothoマウスの変異表現型をレスキューする食餌について
- 8) ヒトklotho遺伝子と多型と老化関連疾患について
- 9) 第2のklotho遺伝子；bklothoの分離について
- 10) Klotho変異マウスの新たな変異表現型の解析
- 11) Klotho変異マウスの肺の変化について
- 12) Klotho変異マウスの骨の異常について

2. 研究実施内容

変異マウスの解析を基礎として次の3つの方向の研究を展開した。第1は Klotho 蛋白の機能を解析し、関連分子を探索することであり、第2の課題は変異表現型の解析により、様々な老化症状の成り立ちを解析し、第3は得られた成果をヒト疾患の病態解明と診断、治療法の開発に結びつけることである。以下にその結果を概説する。

1. Klotho蛋白の存在様式、結合蛋白について

オリゴペプチド、大腸菌、培養細胞で合成したKlotho蛋白のN端側、C端側に対する抗体を作成し、免疫組織、ウェスタンブロット法により、腎臓、脳などを解析した。また、免疫沈降を利用してKlotho蛋白に結合する分子の同定を試みた。抗原の違いを反映した性質の異なる抗体を確立した。抗体による解析の結果、Klotho蛋白は腎臓の遠位尿細管のbaso-lateral siteとapical siteに存在し、脳では脈絡膜細胞に存在することが明らかとなった。腎臓の膜成分の解析により、遠位尿細管細胞膜には約130kdの全長型蛋白と、C端側を認識する抗体のみに反応する60kdの蛋白を同定した。後者はtruncated formである可能性を示唆し、その長さより切断配列としてKKRK配列が推定された。N末端側がプロセスされ、血中に移行する可能性が示唆されたことから、血清の解析を行っている。Klotho発現ベクターを導入した高発現細胞より抗体を用いた免疫沈降により、Klotho蛋白に結合している約70kdの蛋白を精製し、アミノ酸配列の決定によりシャペロンの一つであるGRP78が結合していることが明かとなった。GRP78の結合により蛋白の折りたたみと輸送が制御されている可能性が示唆されており、その性質を解析している。細胞膜上のKlotho蛋白を強く認識する抗体を用いて腎臓、脈絡膜細胞より結合蛋白の分離を進めている。

2. Klotho蛋白の酵素活性について

Klotho蛋白を発現する細胞、ならびに発現細胞よりKlotho蛋白を部分精製して、 β -Glucosidase活性を測定した。全ての既知の β -Glucosidaseの基質を集めるとともに、基質となりえる可能性のある分子を大量に収集し、あらゆる可能性を検討している。活性中心の構造から推定されることであるが、現時点ではKlothoが一般的に知られているような β -Glucosidase活性をもつことよりは、特殊な分子を基質とした時や特殊な条件下で活性をもつことが考えられる。

3. Klotho蛋白の機能ドメインの解析

全長型を発現するトランスジェニックマウス、アデノウイルスベクターはいずれも、変異表現型を改善すること、また、腎臓で発現しなくても機能できることを示唆した。その後、N末端側をもつ分泌型を発現するアデノウイルスベクターを調整し、機能回復実験を行っているが、少なくとも寿命の延長、体重の増

加などのマクロな変異表現型の回復が確認され、さらに組織学的な解析により、分泌型も一定の機能を保持している可能性が高いことを示す結果を得ている。

4. nullノックアウトマウスの作成について

E S細胞による相同組み換えを利用してKlotho遺伝子のエクソン1を欠失させたノックアウトマウス、lacZ遺伝子をエクソン1に挿入し、Klotho遺伝子を発現する細胞をマークすることのできるノックインマウスを作製し、変異表現型、発現細胞の挙動を解析した。Klotho遺伝子のエクソン1を欠失させたノックアウトマウス、相同組み換えによりlacZ遺伝子をエクソン1に挿入し、Klotho遺伝子を発現する細胞をマークすることのできるノックインマウスを作製した。2系統のマウスの成熟、寿命、外観、組織学的な変異表現型は、基本的にはオリジナルのKlotho変異マウスの変異症状と同一であった。また、ノックインマウスではKlothoを発現する細胞にlacZ遺伝子産物が発現することが確認され、これまでの解析では同定できなかった新たな発現部位と細胞種を解析している。また、lacZ遺伝子産物の発現を指標に発現細胞の分離を試みている。なお、ノックインマウスについては特許申請を準備している。

5. 老化疾患の発症に関連する遺伝子カスケード、遺伝子素因の解析について

老化疾患の成立に関わっている遺伝子を網羅的に解析するために、Klothoホモマウスと野性型マウスの腎臓、肝臓、皮膚、生殖器官などの各臓器よりmRNAを調製し、DNAアレイによる解析を行い、発現変化の顕著な遺伝子群を検討し、一連の機能に関連する遺伝子群を捕まえようとしている。現在、腎尿細管における再吸収に関する遺伝子群に注目している。また、発症の遺伝子素因を解析するために、Klothoマウス系統と遺伝的背景の大きく異なるmishimaマウス系統（日本で系統化されたマウス）と掛け合わせを行い、変異表現型の変化を検討しているが、遺伝子背景の影響を受けることを示す結果を得ており、次のステップとして遺伝子座の同定に向かおうとしている。

6. *klotho* 遺伝子の発現、腎不全における発現減少について

Klotho遺伝子上流を含む転写制御解析遺伝子を構築し、トランスジェニックマウスを作成し、発現を検討している。一方、培養細胞系による解析を進めるために、各種の培養細胞におけるKlotho遺伝子の発現を解析したが、発現を保持している培養細胞株を確認できていない。

ヒト疾患とKlotho遺伝子の発現について検討する目的で、腎不全患者におけるKlothoの発現を解析した。腎摘出患者より提供された腎組織におけるKlotho mRNA量、Klotho蛋白量を測定し、コントロールとして、摘出腎癌の健常部を解析した。Klotho遺伝子の発現は腎不全患者の腎組織では顕著に発現が低下しており、腎不全患者の合併症との関連が注目される（投稿中）。

7. Klothoマウスの変異表現型をレスキューする食餌について

klothoマウスの変異表現型を改善できる食餌条件を解析していたところ、リン酸の摂取量制限が効果があることが判明した。しかもこの現象はオスに特異的であり、さらに、リン酸の摂取量制限によりklotho遺伝子の発現上昇が引き起こされていることが明らかとなった。次にメスにおいて変異表現型の回復をもたらす食餌条件を検討したところ、リン酸の制限に加えてオロット酸亜鉛の添加が発育、寿命の延長をもたらすことが明かとなった。野生型マウスの食餌中のリン酸濃度を1.5倍にするとklotho遺伝子の発現が低下し、1/2にすると発現が上昇することから、血清中の電解質バランスを保つことにKlothoが重要な役割を担っており、そのために発現量が増加しているものと推定される。(投稿中)

8. ヒトklotho遺伝子と多型と老化関連疾患について

イギリスの遺伝子多型解析会社との共同で約2000名の双子のklotho遺伝子座の多型を解析したところ、9カ所の多型が発見された。そのうち、7カ所の多型が骨密度、空腹時血糖、脂肪代謝、皮膚症状などとリンクすることが明かとなった。

9. 第2のklotho遺伝子； β klothoの分離について

ホモロジー解析によりヒト及びマウスの第2のklotho遺伝子； β klothoを同定した。 β -klothoは1型膜蛋白であり、その蛋白構成はklothoにそっくりである。大部分を占める細胞外ドメインは β -Glucosidaseに類似性をもつ2つのくり返し配列よりなり、活性中心と推定される構造のアミノ酸配列の特徴はklothoにそっくりである。 β -klothoは肝臓、脾臓、皮膚、褐色脂肪細胞などで発現しており、脂肪、エネルギー代謝や糖代謝との関連が推定される。現在、ノックアウトマウスの作成を進めている。

10. Klotho変異マウスの新たな変異表現型の解析

基本的な変異表現型は既に報告済みであるが、新たに明らかになったことを記載する。B細胞の分化異常があり、PreB細胞で分化が止まる細胞が多い。血球系のstemにあたる細胞を分離し、試験管内で分化誘導すると分化が正常に進行することから、骨髄内の細胞環境の問題と推測している。難聴であることが確認され、聴覚に関連する神経細胞の減少が示唆されている。Klothoは神経系の変異に乏しいと考えられてきたが、詳細に解析する必要性を示唆していると判断している。Klothoマウスにおける骨密度の低下機構を解析するために、化骨、破骨機構、骨代謝関連遺伝子の解析を行ったところ、化骨、破骨細胞の減少、機能の低下が観察され、低回転性の骨密度の低下との結果をえた。BMPをはじめとする各種の骨代謝関連遺伝子の発現を解析したが、変化が観察されなかった。しかし、肝臓で合成、分泌されるOPG（破骨細胞の分化を抑制する）の顕著な発現増加が観察された。

ホモマウスで血清、尿のカルシウム、リンが顕著に高く、その制御系の破綻が推定され、PTH、ビタミンD受容体とそのターゲット遺伝子、カルシウム受容機構関連遺伝子などの解析を行ったが、いずれも、発現変化を示す結果は得られていない。また、成長ホルモン、性腺刺激ホルモン、T3など、変異表現型との関連が推定されるホルモン血清濃度を測定したが、ホルモン産生異常を示す結果は得られていない。

11. Klotho変異マウスの肺の変化について

klotho遺伝子欠損マウスにおける肺の生理学的、形態学的変化、遺伝子の発現状況を検討し、次いで肺培養線維芽細胞にアデノウィルスベクターを用いてklotho遺伝子を導入し、導入前後の細胞増殖能の変化を観察した。その結果、KL^{-/-}は生後4週より肺気腫を発現することが組織学的、生理学的に確認された。すなわち、生後4週以降のKL^{-/-}肺は肺胞壁破壊と末梢気腔の拡大を明らかに認めると共に、呼気時間の延長と動肺コンプライアンスの上昇を認めた。KL^{-/-}肺の電子顕微鏡による検討では、肺胞壁のⅠ型コラーゲン線維への石灰沈着とⅡ型肺胞上皮細胞の変性の所見が得られた。すでに肺気腫が認められる7～9週令のKL^{-/-}肺における遺伝子発現の検討では、基底膜の構成成分であるⅣ型コラーゲンとSP-AのmRNAが著明に増加していた。また、klotho遺伝子の肺培養線維芽細胞への導入は、飢餓による線維芽細胞の3H-Thymidine取り込み減少を抑制した。以上のことから、KL^{-/-}は肺気腫を早期に発症し、これには線維芽細胞をはじめとする結合組織細胞の機能障害が関与すると推測された。

12. klotho変異マウスにおける骨の異常について

4週齢の野生型マウスならびにKlotho遺伝子変異マウスに対し骨髄除去術を執行した結果、損傷後修復の過程における急激な骨形成とその後に続く骨の吸収過程において、Klotho遺伝子変異マウスにおけるOCIF/OPGの発現レベルが高値のまま持続し、破骨細胞の形態変化が部位特異的に起こっていることを明らかにした。

klotho遺伝子変異マウスとOCIFノックアウトマウスの掛け合わせを行い、klotho遺伝子/OCIF遺伝子二重変異マウスを作製した。klotho^(-/-)OCIF^(+/-)変異マウスの大腿骨遠位端における骨梁骨は、klotho^(-/-)OCIF^(+/+)よりも野生型と同じ骨量を示した。

4週齢の野生型マウスならびにKlotho遺伝子変異マウスに対し坐骨神経離断を行った結果、klothoマウスにおける術後13日目での骨量はヘテロ型同様に減少したが、術後30日目での骨梁骨及び皮質骨の骨量減少は抑制されていた。

MitfはbHLH-LZ型転写因子であり、その異常により破骨細胞の分化異常及び機能低下をおこし、骨大理石病症状を呈する。Mitfには組織特異性があることが知られており、メラノサイトに高発現するM型と、心臓に高発現するH型があり、

破骨細胞に分化し得るC7細胞ではH型が主に発現していることが確かめられた。そこでklothoミュータントマウスにおけるMitfの組織特異型に関してRT-PCRを用いて検討した結果、H型のMitfの発現が観察された。

4週齢の野生型マウスならびにKlotho遺伝子変異マウスの頸骨非脱灰組織像の観察から、肥大軟骨細胞の肥大化レベルの低下や軟骨細胞柱における偏平化した細胞の存在などの成長板軟骨細胞の形成異常がKlotho遺伝子変異マウスにおいて観察された。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- Yamashita T., Yoshitake H., Tsuji K., Kawaguchi N., Nabeshima Y., Noda M.
Retardation in bone resorption after bone marrow ablation in *Klotho* mutant mice.
Endocrinology 141, 438-445 (2000)
- Kato Y., Arakawa E., Kinoshita S., Shirai A., Furuya A., Yamano K., Nakamura K., Iida A., Anazawa H., Koh N., Iwano A., Fujimori T., Kuro-o M., Hanai N., Takeshige K., Nabeshima Y.
Establishment of the anti-Klotho monoclonal antibodies and detection of Klotho protein in kidneys.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 267, 597-602 (2000)
- Suga T., Kurabayashi M., Sando Y., Ohyama Y., Maeno T., Maeno Y., Aizawa H., Matsumura Y., Kuwaki T., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R.
Disruption of the klotho gene causes pulmonary emphysema in mice defect in maintenance of pulmonary integrity during postnatal life. *Am. J. Respir., Cell Mol. Biol.* 22, 26-33 (2000)

レビュー

- Nabeshima Y.
The biological importance of the discovery of klotho gene related aging
New Frontier in vascular Biology; Thrombosis and Hemostasis 161-177 ed. Suzuki K., Ikeda Y., Maruyama I. EIBUN PRESS (1999)
- 鍋島陽一
Klothoマウス
医学のあゆみ 188, 75 – 80, (1999) 医歯薬出版
- 鍋島陽一
個体老化研究のあらたな展開
医学のあゆみ 188, 819 – 823 (1999) 医歯薬出版
- 鍋島陽一
早期老化マウスKlothoの分子遺伝学的研究

- 日本内科学会雑誌 88、78－82、(1999)
- 鍋島陽一
 老化遺伝子クロトーの発見
 NHKスペシャル 驚異の小宇宙・人体 遺伝子DNA 16－17 (1999) NHK出版
- 鍋島陽一
 個体老化 Klothoマウスの老化機構
 老化と動脈硬化 岩波講座・現代医学の基礎12 79－81 (1999) 岩波書店
- 鍋島陽一
 多彩な老化症状に関連するklotho遺伝子の発見とその意義
 フリーラジカルの臨床 14、63－67、(1999)
- 鍋島陽一
 klotho遺伝子と老化の分子メカニズム
 CLINICAL NEUROSCIENCE 18、107 (2000)
- 鍋島陽一
 老化の動物モデルとその分子機構 日本老年医学会雑誌 37、30－33 (2000)
- 鍋島陽一
 老化マウスKlothoにおける内分泌異常
 内科 85、121－125 (2000)
- 須賀達夫;
 老化マウスklothoにおける肺の変化. 分子呼吸器病 3：54-56, 1999 先端医学社
- 須賀達夫, 黒尾誠
 老化抑制遺伝子klotho：新しい老化モデルklothoマウスにみられる肺気腫.
 呼吸 18:1313-1322,1999 Respiration Research Foundation
- 黒尾 誠、松村 穰、鍋島陽一、相澤宏樹、須賀達夫、大山良雄、宇都木敏浩、
 永井良三, 第39回日本脈管学会総会 シンポジウム9 (6)挿入突然変異により動脈
 硬化、早期老化をきたすトランスジェニックマウスklothoの確立とその原因遺伝
 子の同定、脈管学 38:399-403,1998
- 永井良三,
 老化抑制遺伝子klothoと血管病態, 東京女子医科大学雑誌 69:164-169,1999
- 斎藤勇一郎、黒尾誠、鍋島陽一、永井良三,
 血管病変における老化抑制遺伝子Klothoの意義 脈管学 39:237-241,1999
- 永井良三,
 老化抑制遺伝子klothoと血管病態, 大阪医学 33(2):41,1999
- 斎藤勇一郎、黒尾誠、鍋島陽一、永井良三,
 Klothoマウスは内皮細胞障害を来すか Thrombosis and Circulation 7(3):322-

323,1999

○黒尾誠、倉林正彦、永井良三

老化抑制遺伝子と動脈硬化 第25回日本医学会総会誌 I 廣川信隆編集
第25回日本医学会総会 p136,1999

○斎藤勇一郎、黒尾誠、鍋島陽一、永井良三

klotho遺伝子と血管病変形成 BIO Clinica 14(14): 1288-1291, 1999

○斎藤勇一郎、中村哲也、相澤宏樹、松村穰、大山良雄、倉林正彦、増田浩明、黒尾誠、鍋島陽一、永井良三

高血圧症におけるklotho遺伝子の役割 分子循環器研究会講演会講演記録集 分子循環器研究会編 日本心臓財団 pp13-14, 1999

○大山良雄、永井良三

klotho遺伝子 Clinical Calcium 10(2): 205-207, 2000

○斎藤勇一郎、黒尾誠、鍋島陽一、永井良三

老化制御遺伝子の働き BIO Clinica 15(3): 220-223, 2000

○斎藤勇一郎、黒尾誠、鍋島陽一、永井良三

老化抑制遺伝子klothoの血管保護作用 実験医学 18(5)(増刊): 696-700, 2000

○永井良三,

老化関連遺伝子 klotho と血管病態

第114回日本医学会シンポジウム 血管障害—発症機序の解明から治療まで—
日本医学会 p. 90-96, 2000

○野田政樹、二藤彰、辻邦和、山下照仁、川口奈奈子

骨再生と骨粗鬆症 医学のあゆみ 192(8):840-842 (2000)