

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」
平成 18 年度採択研究代表者

鍋島 陽一

京都大学医学研究科・教授

代謝応答を統御する新たな分子機構の研究

1. 研究実施の概要

(文中にある参照番号は 4. (1)に対応する)

(1) α -Klotho、 β -Klotho、FGF19 subfamily による生体恒常性維持機構の全体像を解明する為に、(1) in vivo における α -Klotho、 β -Klotho と FGF19, FGF21, FGF23、FGF 受容体との結合、リン酸化カスケード、ターゲット遺伝子の発現を解析、Klotho family、FGF19 subfamily のフィードバック作用の検討を行い、 α -Klotho、FGF23、1, 25(OH)2D, PTH から成る電解質代謝の全体像、 β -Klotho、FGF19、胆汁酸からなるコレステロール/胆汁酸代謝の全体像を明らかにした。なお、 β -Klotho は FGF21 のシグナル伝達に必須ではなく、第 3 の未知の因子の存在が推定された(投稿中)。 α -Klotho、 β -Klotho と FGF19, FGF21, FGF23、FGF 受容体の分子間相互作用の解析を目指して、研究が進行している。

(2) NIH から帰国したポストドクがメタボローム解析を継続するシステムを立ち上げ、血液、尿、糞、肝臓、膵臓、脂肪、筋肉、小腸、大腸等のメタボローム解析系を立ち上げた。

(3) α -Klotho 蛋白は細胞外カルシウム濃度の低下に素早く応答して Na^+ , K^+ -ATPase の細胞表面へのリクルートを制御しており、 Na^+ の濃度勾配、膜電位の変化に応答して腎臓でのカルシウムの再吸収、脈絡膜を介した脳脊髄液のカルシウム濃度の制御、上皮小体での PTH の分泌を制御していると結論された(論文 5)。これら結果をまとめて、カルシウムホメオスタシス制御機構の新たなコンセプトを提案した(論文 3)。細胞外のカルシウム濃度の変化を感知する分子の同定が次の課題であり、進行中である。

(4) 血清 α -Klotho 濃度が顕著に増加している患者を見出した(論文 2)。一方、 α -klotho ミスセンス変異 (H193R) により顕著な α -Klotho の機能低下を示す患者が見いだされた。マウス、ヒトの結果をまとめると、 α -Klotho 遺伝子の機能欠損変異はいずれも高

リン、高ビタミンD、高カルシウムを示し、機能獲得変異はまさにミラーイメージの症状である低リン、低ビタミンD、低カルシウムを示しており、これらの事実は α -Klotho はまぎれもなくカルシウム、リン代謝制御因子であることを示している。Klotho の血清値の測定も開始されており、ヒトに於ける Klotho 研究の進展が期待される。

2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1)に対応する)

(1) Klothoファミリーと循環するFGF群によってコレステロール/胆汁酸、カルシウム代謝が制御される機構

α -Klotho、 β -Klotho、FGF19 subfamily (FGF19, FGF21, FGF23) による生体恒常性維持機構の全体像を解明する為に以下の実験をおこなった。 α -Klotho を発現させると FGF23 のシグナルが入り、 β -Klotho を発現させると FGF19, FGF21 のシグナルが伝わる解析システムを確立した。 α -Klotho が FGFR1 と複合体を作り、FGF23 のシグナル伝達に必須であることを確認した(キリンビールチームとの共同研究)。一方、FGF19, FGF21, FGF23 を大量に合成し、野生型マウス、 α -Klotho、 β -Klotho ノックアウトマウスに投与し、その機能と α -Klotho、 β -Klotho の役割を解析した。また、FGF19, FGF21, FGF23、および、FGF 受容体と α -Klotho、あるいは β -Klotho との結合、その結果としてのシグナル伝達を *in vivo* で解析するシステムを開発した。更に、FGF19, FGF21, FGF23 と α -Klotho、 β -Klotho 間の相互フィードバック作用の解析、FGF19, FGF21, FGF23 シグナルのターゲット遺伝子の解析、FGF19, FGF21, FGF23 が制御する代謝回路の最終産物によるフィードバック制御機構を解析した。結果として、 α -Klotho、FGF23、代謝産物である 1, 25(OH)2D からなるカルシウム代謝の全体像、相互作用の全容が明らかとなった(投稿中)。次いで、FGF19 を投与し、Cyp7A1 の発現抑制(肝臓)、Egr1 の発現誘導(各種臓器)を解析したところ、野生型では Cyp7A1 の発現が抑制され、Egr1 の発現が肝臓でのみで顕著に誘導されるが、 β -Klotho ノックアウトマウスでは Cyp7A1 の発現抑制、Egr1 の発現誘導が起こらないことを確認した。これらの結果から FGF19 のシグナル伝達には β -Klotho が必須であることが示された。又、このシグナル伝達は FGFR4, JNK のリン酸化カスケードを介していた。更に、 β -Klotho ノックアウトマウスでは小腸における FGF15 (ヒト FGF19 のマウスホモログ)の発現が更新していた。この解析により β -Klotho、FGF19、代謝産物である胆汁酸からなるコレステロール/胆汁酸合成制御機構の全体像が明らかとなった(投稿中)。

この2つの仕組みは担当する分子は、一方は α -Klotho、FGF23、1, 25(OH)2D であり、他方は β -Klotho、FGF19、胆汁酸であるが、その分子機構、仕組みは共通である。反応時間が異なる2つのフィードバックシステムが協調して制御することによって生体恒

常性を保持していることが明らかとなった。

FGF21 がグルコース代謝の制御に関わるとの報告があり、培養細胞を用いた解析系では、そのシグナル伝達に β -Klotho が必須であるとの結果を得たので、野生型、ノックアウトマウスを用いて血糖値の制御における FGF21, β -Klotho の役割を解析した。

FGF21 を投与し、各種臓器における Egr1 の発現誘導を解析したところ、白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞で、その発現亢進が観察された。しかし、この発現は β -Klotho ノックアウトマウスでも観察され、FGF21 シグナル伝達に β -Klotho は必須ではないことが明らかとなった。また、FGF21 を投与しても β -Klotho の発現に影響がなく、一方、 β -Klotho ノックアウトにおける FGF21 の発現も変化がなかった。更に β -Klotho は FGFR4, FGF19 とは複合体を作るが、FGF21 とは複合体を形成しないことも明らかになり、FGF21 のシグナル伝達に β -Klotho は必須ではないとの結論が補強された。なお、FGF21 が GLUT1 の制御を介してグルコース代謝を制御するとの報告についても再現されていない。

とはいえ、FGF21 は血液を循環しているホルモン様分子として機能しており、また、FGF 受容体は広く各種の細胞で発現しており、リガンド/受容体の関係からだけでは FGF21 が脂肪細胞特異的にシグナルを伝達することが説明できない。この結果は、第3の因子が脂肪細胞に存在することを強く示唆しており、新たな展開と成っている。

(2) カルシウム代謝の全体像と新たなコンセプトの提唱

α -klotho 変異マウスの発見以来、 α -klotho 変異と多彩な変異表現型がどのように結びつくのか大きな謎であったが、全容が明らかになった (論文5)。得られた結果をこれまで知られているカルシウム制御機構のスキームの中に位置づけた。カルシウムホメオスタシスの制御は時間軸にそって大きく次の3つのステップに分けられる。(1) 第1は瞬時の応答であり、細胞外カルシウム濃度の低下に伴うカルシウムの再吸収、脳脊髄液への輸送、PTH の分泌がこれに相当する。次いで、(2) 分泌された PTH が骨からカルシウムを放出させる反応、腎尿細管でのカルシウム再吸収、ビタミンD合成を促進する反応が起こるが、これは数時間にわたる応答である。(3) 第3の反応はビタミンDによる小腸からのカルシウムの吸収や腎尿細管でのカルシウム再吸収の促進であり、数時間から一日を超える反応である。この複雑な仕組みにおいて、 α -Klotho は、細胞外カルシウム濃度の低下に素早く応答して Na^+ , K^+ -ATPase の細胞表面へのリクルートを制御することによって腎臓でのカルシウムの再吸収、脈絡膜を介した脳脊髄液のカルシウムの輸送を促進し、上皮小体での PTH の分泌亢進をもたらす。また、亢進した PTH は活性型ビタミンDの合成を誘導する。これらの一連の反応によって細胞外カルシウム濃度が上昇し、同時に細胞外に分泌された α -Klotho 量の増加が起こる。すなわち、 α -Klotho はカルシウム濃度の低下にすばやく応答してカルシウム濃度の上昇をもたらす引き金を引く。次いで、増加したカルシウムは Na^+ , K^+ -ATPase の細胞表面へのリクルートを低

下させ、腎臓でのカルシウムの再吸収、脈絡膜を介した脳脊髄液のカルシウムの輸送を抑える。同時に上皮小体での PTH の分泌を抑制する。一方、細胞外の α -Klotho は FGF23 が尿細管で 1 α -hydroxylase の発現を抑える仕組みに関与しており、血清の活性型ビタミン D 濃度の低下を誘導して、カルシウム濃度の上昇を抑える。

カルシウム制御は時間軸にそった多段階の反応からなっており、複雑な相互作用、フィードバック機構によって制御されており、全体として血液・体液、脳脊髄液のカルシウム濃度は極めて狭いレンジに保持される仕組みとなっている。この複雑な仕組みにおいて、 α -Klotho は全体を統御する役割を果たしており、“a central regulator of calcium homeostasis”と位置づけることができる（論文 1、3）。なお、活性型ビタミン D は極めて多面的な生物現象の制御に関わる重要な分子であり、更に、活性型ビタミン D の作用は長時間にわたって継続することから、その過剰産生が α -klotho ノックアウトマウスの変異表現型の主要な要因であったことはうなずける。

（3）ヒト *klotho* 遺伝子の研究

アメリカのグループと共同で α -klotho 遺伝子近傍にブレイクポイントを持つ染色体転座があり（おそらく発現が増加し）、血清 α -Klotho 濃度が顕著に増加している患者を見出した。この患者は低リン血症、顕著な副甲状腺肥大、血清ビタミン D の低下を主症状とする「くる病」であった（論文 2）。一方、Ichikawa らにより高リン血症、高カルシウム血症、軟部組織の石灰化、1,25(OH)₂D の上昇を示す患者の中から α -klotho ミスセンス変異 (H193R、193 番目のヒスチジンがアルギニンに変異) が発見された。 α -Klotho のホモログである植物の myrosinase は立体構造が解明されており、この構造を参考に H193R 変異の影響を類推し、H193R 変異は α -Klotho の不安定性をもたらし、結果として顕著な α -Klotho の機能低下をもたらすことを突き止めた。マウス、及びヒトの結果をまとめると、 α -Klotho 遺伝子の機能欠損変異はいずれも高リン、高ビタミン D、高カルシウムを示し、機能獲得変異はまさにミラーイメージの症状である低リン、低ビタミン D、低カルシウムを示しており、これらの事実は α -Klotho はまぎれもなくカルシウム、リン代謝制御因子であることを示している。

ヒト血清 α -Klotho 濃度を測定するキットを開発し、健常人の正常値を確定した。

3. 研究実施体制

(1)「研究代表者」グループ

①研究分担グループ長: 鍋島 陽一 (京都大学、教授)

②研究項目

α -Klotho、 β -Klotho と FGF19,21,23 による新たな代謝応答システムの研究

概要

β -Klotho、 α -Klotho が (1) その発現細胞における独自の作用と (2) 循環する FGF19、21、23 との協調作用によってコレステロール、カルシウム、グルコース、エネルギー代謝を制御する機構をを解明する。また、コレステロール/胆汁酸代謝異常によって生体内で生成される分子のメタボローム解析とそれらの生理、薬理作用を解析する。同時に、 β -Klotho、 α -Klotho、FGF19、21、23 の異常が、動脈硬化、糖尿病、骨粗鬆症などの加齢関連疾患にどのように関わるかを解析する。

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- 1) Nabeshima Y. The discovery of α -Klotho and FGF23 unveiled new insight into calcium homeostasis **Cellular and Molecular Life Science** in press
- 2) Brownstein CA, Adler F, Nelson-Williams C, Iijima J, Li P, Imura A, Nabeshima Y, Reyes-Mugica M, Carpenter TO, Lifton RP. A translocation causing increased alpha-klotho level results in hypophosphatemic rickets and hyperparathyroidism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 105(9); 3455-3460 (2008)
- 3) Nabeshima Y., Imura H. α -Klotho: a regulator that integrate calcium homeostasis. **Am. J. Nephrology (Review)** Am. J. Nephrol. 28(3) 455-464 (2007)
- 4) Tanaka T., Nabeshima Y. Preview: Nampt/PBEF/visfatin: A new player in b cell physiology and in metabolic disease? **Cell Metabolism (Preview)** 6, 341-343 (2007)
- 5) Imura A., Tsuji Y., Murata M., Maeda R. Kubota K., Iwano A., Obuse C., Togashi K., Tominaga M., Kita N., Tomiyama K., Iijima J., Nabehsima Y., Fujioka M., Asato R., Tanaka S., Kojima K., Ito J., Nozaki K., Hashimoto N., Ito T., Nishio T., Uchiyama T., Fujimori T., Nabehsima Y. α -Klotho as a regulator of Calcium homeostasis. **Science** 316, 1615-1618 (2007)
- 6) Sato A., Hirai T., Imura A., Kita A., Iwano A., Muro S., Nabeshima Y., Suki B., Mishima M. Morphological mechanism of the development of pulmonary emphysema in klotho mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 104(7), 2331-2336 (2007)