

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能の制御に関する基盤技術の創出」  
平成 18 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

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

$\alpha$ -Klotho、 $\beta$ -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、in vivo における $\alpha$ -Klotho、 $\beta$ -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、 $\alpha$ -Klotho、FGF23、1, 25(OH)2D, PTH から成る電解質代謝の全体像、 $\beta$ -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、 $\beta$ -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。

$\alpha$ -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 2、3)。血清 $\alpha$ -Klotho 濃度が顕著に増加している患者を見出した (論文 1)。一方、 $\alpha$ -klotho ミスセンス変異 (H193R) により顕著な $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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た。Klotho の血清値の測定も開始されており、ヒトに於ける Klotho 研究の進展している。これら結果をまとめて、カルシウム、リン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 2、3)。

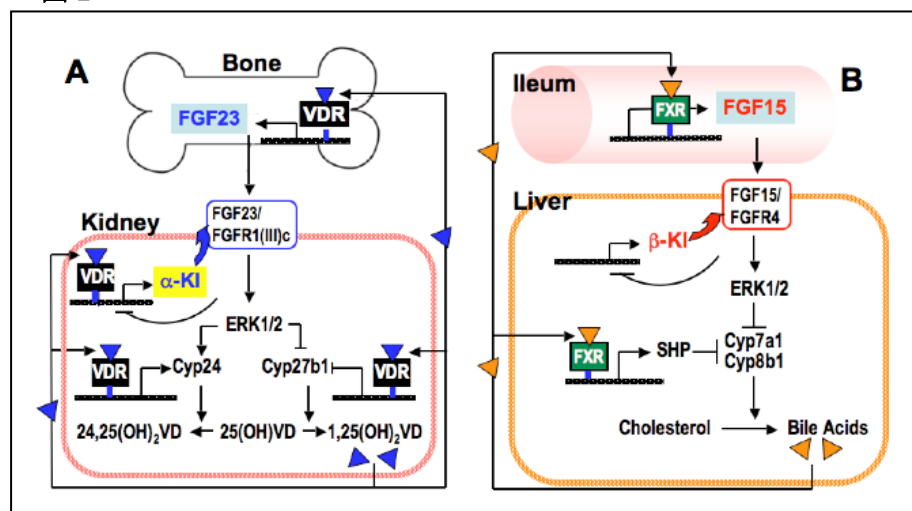
これらの成果を基盤に、それぞれのステップの分子メカニズムの解明、 $\alpha$ -Klotho、 $\beta$ -Klotho の機能制御に関連する新たな分子の同定、電解質、コレステロール／胆汁酸代謝、糖代謝を制御する新たな分子機構の解析へと展開している。最終的には、これらを統合して代謝応答制御を介した動物個体の生存戦略を明らかにしたいと考えている。

## 2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

$\alpha$ -Klotho、 $\beta$ -Klotho、FGF19 subfamily (FGF19, FGF21, FGF23) による生体恒常性維持機構の全体像の解明を目的として研究を進め、以下の結果を得た。Peak Rapid 細胞に $\alpha$ -Klotho を発現させ、FGF23 を投与すると Egr-1(immediate early gene)の発現が誘導され、 $\beta$ -Klotho を発現させ、FGF19、あるいは FGF2 を投与すると Egr-1 の発現が誘導されたことから、FGF23 シグナル伝達、FGF 19、21 のシグナル伝達は、それぞれ、 $\alpha$ -Klotho、 $\beta$ -Klotho に依存していることが示唆された(PNAS, revised)。

そこで、FGF19, FGF21, FGF23 を大量に合成し、野生型マウス、 $\alpha$ -Klotho、 $\beta$ -Klotho ノックアウトマウスに投与し、その機能と $\alpha$ -Klotho、 $\beta$ -Klotho の役割を解析した。また、FGF19, FGF21, FGF23、および、FGF 受容体と $\alpha$ -Klotho、あるいは $\beta$ -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 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、in vivo に於いても $\alpha$ -Klotho が FGF23 と結合し、FGFR1 と複合体 (リン酸化 FGFR1) を作ることで、FGF23 の投与により野生型マウスでは ERK のリン酸化がおこるが、 $\alpha$ -Klotho ノックアウトマウスでは起こらないことが確認され、 $\alpha$ -Klotho は 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)。FGF23 を投与すると Cyp27b1 の発現が抑えられ、Cyp24 の発現が増加する。また、 $\alpha$ -Klotho の発現が抑えられる。これらを総合して $\alpha$ -Klotho と FGF23 は代謝産物である 1,25(OH)<sub>2</sub>D からなるビタミンD 合成制御の全体像、相互作用の全容が明らかとなった(図1A) (PNAS revised)。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、 $\beta$ -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 $\beta$ -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、 $\beta$ -Klotho ノックア

図 1



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  $\beta$ -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 (図 1 B) (PNAS revised)。

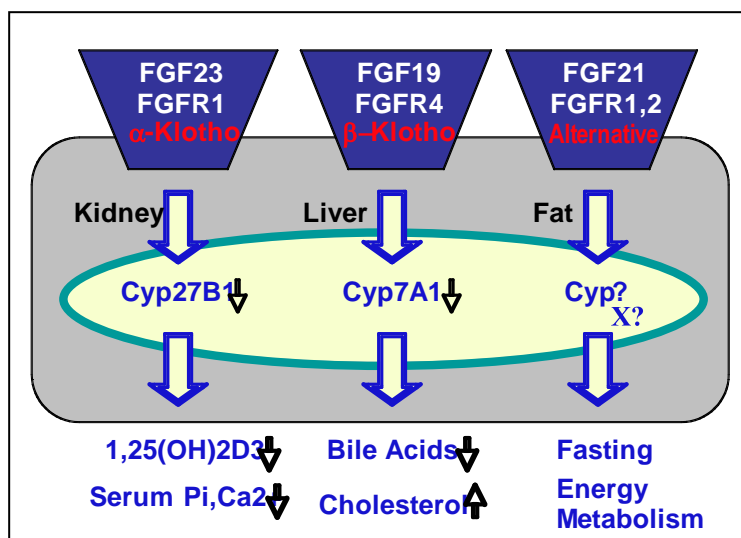
この 2 つの仕組みは担当する分子は、一方は  $\alpha$ -Klotho、FGF23、1, 25(OH)<sub>2</sub>D であり、他方は  $\beta$ -Klotho、FGF19、胆汁酸であるが、その分子機構、仕組みは共通である。要約すると以下のようなになる。End-product である 1, 25(OH)<sub>2</sub>D、および胆汁酸は合成部位において Cyp27b1 (ビタミン D 合成の律速酵素)、Cyp7A1 (胆汁酸合成の律速酵素) の発現を負に制御する (End-product mediated local negative feedback circuit)。また、1, 25(OH)<sub>2</sub>D、胆汁酸はターゲット組織である骨、小腸において FGF23、FGF15/FGF19 の発現を誘導する。誘導された FGF23、FGF15/FGF19 はそれぞれ、 $\alpha$ -Klotho、 $\beta$ -Klotho に依存して Cyp27b1、Cyp7A1 の発現を抑える (Target tissue derived negative feedback loop)。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といえる。

次いで、代謝制御に関わる FGF19 サブファミリーの第 3 の因子である FGF21 の機能解析を試みた。上記の Peak Rapid 細胞を用いた解析系では、そのシグナル伝達に  $\beta$ -Klotho が機能してい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、 $\beta$ -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  $\beta$ -Klotho ノックアウトマウスでも観察され、FGF21 シグナル伝達に  $\beta$ -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  $\beta$ -Klotho の発現に影響がなく、一方、 $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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

図 2

／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 (図 2) (PNAS revised)。更に、上記の結果を相補する為に京大薬学研究科、伊藤教授のグループが作成した



FGF21 ノックアウトマウスを恵与頂き、解析した結果、FGF21 ノックアウトの変異表現型は $\beta$ -Klotho ノックアウトマウスの変異表現型とは重複しないことが示され、この点からも $\beta$ -Klotho が FGF21 のシグナル伝達に必須であることは支持されなかったことから、第3の Klotho 分子の同定が次の課題として浮かび上がっている。

FGF23、FGF15 の新たなシグナルの行き先を探しており、ビタミン D、胆汁酸に次ぐ新たな脂溶性分子の代謝制御に関わる可能性が浮かび上がっており、関連する酵素の発現制御、及び、脂溶性分子のメタボローム解析の両面から解析を開始した。ターゲット分子とその代謝物に焦点を当てたメタボローム解析を進めることにより、関連する代謝経路の生物学的意義を明らかにしたいと考えている。

## (2) カルシウム代謝の全体像と新たなコンセプトの提唱

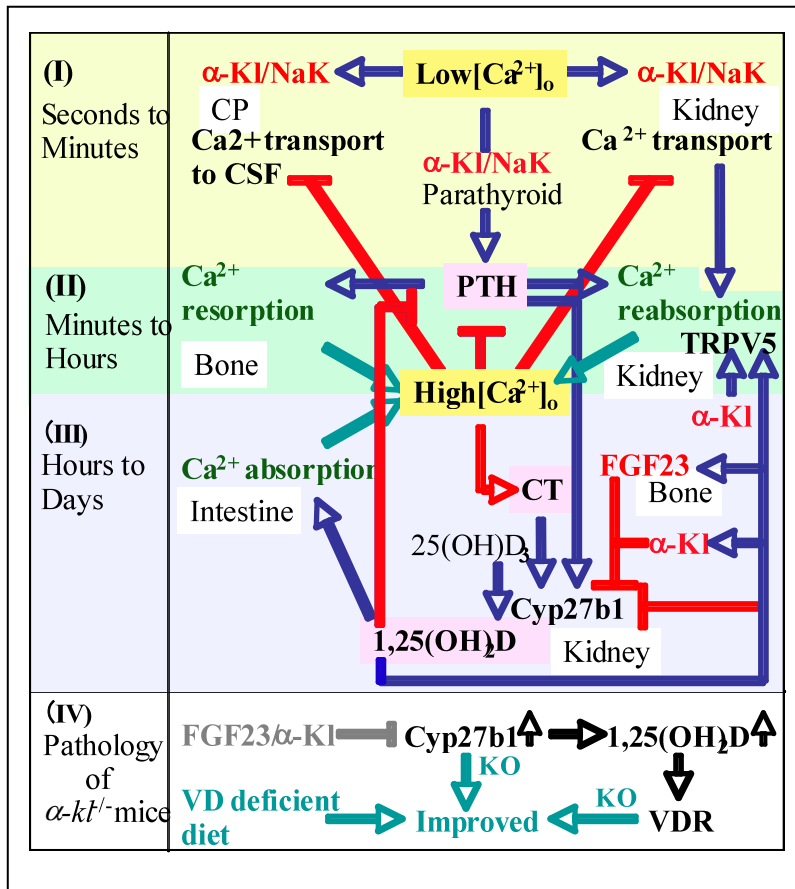
$\alpha$ -klotho 変異マウスの発見以来、 $\alpha$ -klotho 変異と多彩な変異表現型がどのように結びつくのか大きな謎であったが、全容が明らかになった。得られた結果をこれまで知られているカルシウム制御機構のスキームの中に位置づけた (図3)。カルシウムホメオスタシスの制御は時間軸にそって大きく次の3つのステップに分けられる。(1) 第1は瞬時の応答であり、細胞外カルシウム濃度の低下に伴うカルシウムの再吸収、脳脊髄液への輸送、PTH の分泌がこれに相当する。次いで、(2) 分泌された PTH が骨からカルシウムを放出させる反応、腎尿細管でのカルシウム再吸収、ビタミンD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、 $\alpha$ -Klotho は、細胞外カルシウム濃度の低下に素早く応答して  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -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 $\alpha$ -Klotho 量の増加が起こる。すなわち、 $\alpha$ -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  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -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 $\alpha$ -Klotho は FGF23 が尿細管で  $1\alpha$ -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、 $\alpha$ -Klotho は全体を統御する役割を果たしており、“ $\alpha$ -Klotho: a regulator that integrates calcium homeostasis”と位置づけることができる (論文2、3)。なお $\alpha$ -Klotho 変異マウスで観察される老化疾患類似症状の多くは $\alpha$ -Klotho の欠失に伴う  $1\alpha$ -hydroxylase の発現亢進、亢進した活性型ビタミンDの toxic effects によってもたら

されている。

なぜなら、ビタミンD 欠乏餌で  $\alpha$ -klotho 変異マウスを飼育し、過剰なビタミン D 合成を抑えると多くの症状は改善し、また、 $\alpha$ -Klotho あるいは FGF23 と  $1\alpha$ -hydroxylase のダブルノックアウトを作り、過剰なビタミン D 合成を抑えると症状の改善が観察され、変異マウスと野生型マウスの区別がつかない程になるからである。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

図 3



過剰産生が  $\alpha$ -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 (図 3)。次の課題は活性型ビタミン D の過剰が老化関連症状をもたらす機構の解明であるが、血清ビタミン D 活性の亢進が酸化ストレス増大、エネルギー代謝の変化を誘導することを示唆する結果が得られ、思わぬ方向から老化、老化関連変異表現型と  $\alpha$ -Klotho の機能との関係が浮かび上がっている。

### (3) $\alpha$ -Klotho によるリンホメオスタシスの制御

腎臓は血清リン酸レベルの制御の中心的役割を担っている。リン酸の再吸収の大部分は近位尿細管において行われており、尿管側膜表面 (apical membrane) にリクルートされた NaPi-IIa (一部は NaPi-IIc) によって担われている。PTH は apical membrane 上の NaPi-IIa、及び NaPi-IIc の量を制御する最大の因子 (膜からの遊離と分解を促進) と考えられている。血清リン酸濃度が上昇するとフィードバック機構として上皮小体細胞の増殖、PTH の分泌促進、PTH mRNA の安定性の亢進をもたらし、NaPi-IIa (一部は NaPi-IIc) の細胞表面量が減少し、リンの再吸収が低下し、リン酸濃度が正常化される。第二の血清リン酸濃度の制御因子は Familial tumoral calcinosis 患者が異所性の石灰化、高リン血症を示し、その原因遺伝子として FGF23、GALNT3 が同定されたことから見出された。FGF23 は腎におけるリンの再吸収を抑え、リンの排泄を促進するホルモン

として機能している。GALNT3はFGF23のC端側に存在する furin-like convertase 認識配列に O-linked 糖鎖を付加することによって FGF23 の蛋白分解酵素による分解を抑えており、結果として血清に分泌された FGF23 を増加させ、リンの排出を促進する。一方、1,25(OH)<sub>2</sub>D は NaPi-IIa (一部は NaPi-IIc の細胞表面へのリクルートを促進し、近位尿細管におけるリンの再吸収の増加、血清リン値の上昇をもたらす。重要なことにリン再吸収の 2 つの負の制御経路、PTH 経路、FGF23 経路の制御に  $\alpha$ -Klotho は必須であり、同時にリン再吸収を促進するビタミン D 合成の調節も担っている。すなわち、 $\alpha$ -Klotho はリンホメオスタシスを統合的に制御している (論文 2、3)。

### ヒト $\alpha$ -klotho 遺伝子の研究

アメリカのグループと共同で  $\alpha$ -klotho 遺伝子近傍にブレー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  $\alpha$ -Klotho 濃度が顕著に増加している患者を見出した (論文 1)。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。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)<sub>2</sub>D の上昇を示す患者の中から  $\alpha$ -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。 $\alpha$ -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  $\alpha$ -Klotho の不安定性をもたらし、結果として顕著な  $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 (論文 2、3)。

### $\alpha$ -Klotho の血清値測定キットの開発

抗ヒト  $\alpha$ -Klotho モノクローナル抗体を多数分離し、エライザキットを開発した。新生児から老人に至る各年齢層の血清  $\alpha$ -Klotho 値、FGF 2 3、ビタミン D、カルシウム、リン等の測定を行い、正常値を決定した。新生児、乳幼児、幼少時代に高く、成人になると一定値を保つようになる。成人以後は加齢に伴う減少は明瞭ではない。また、この解析からも FGF23 との逆相関を示唆する結果が得られた (投稿準備中)。なお、このキットはラット血清値の測定にも使える。

## 3. 研究実施体制

### (1)「京大」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

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

#### 概要

$\beta$ -Klotho、 $\alpha$ -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、 $\beta$ -Klotho、 $\alpha$ -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。

#### (2)「北大」グループ

①研究分担グループ長：小布施 力史(北海道大学、教授)

#### ②研究項目

- $\beta$ -Klotho 結合蛋白、代謝制御に関わる細胞表面分子の同定についての研究

#### 概要

本研究では (1)  $\beta$ -Klotho の分子機能の解明、(2) 代謝応答を制御するシグナル伝達システムの解明を目指しており、そのためには、 $\beta$ -Klotho 結合蛋白、並びに細胞膜においてシグナルを受容し、伝達する分子を同定する必要があり、そのための質量分析を行う。

### 4. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表 (原著論文)

1. 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)
2. Nabeshima Y. The discovery of  $\alpha$ -Klotho and FGF23 unveiled new insight into calcium and phosphate homeostasis. Cell. Mol. Life Sci. 65(20), 3218-3230 (2008)
3. Nabeshima Y. Discovery of  $\alpha$ -Klotho unveiled new insights into calcium and phosphate homeostasis. Proc. Jpn. Acad. Sci. B 85, 125-141 (2009)

#### (2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)