

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04059

研究課題名（和文）腎機能低下によるサルコペニア発症の検証と老化抑制因子 Klothoの役割の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of uremic sarcopenia: the role of anti-aging protein alpha-Klotho

研究代表者

園生 智広（SONOU, Tomohiro）

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：70614866

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 8,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の成果として、骨格筋特異的klotho cKOマウスを作成し、その解析の結果、血中の分泌型 Klothoの濃度は、12週齢時では顕著な変化が認められなかったが24週齢において約30%有意に低値を示した。また、腎機能低下状態では血中の分泌型 Klothoの産生組織としての骨格筋の役割が増大する可能性が示唆された。培養細胞を用いた研究では、筋収縮や伸展刺激、インスリンなどの成長因子によって骨格筋での Klotho発現が増加することが明らかになった。これらの結果は、加齢・老化に対して骨格筋での Klothoの発現を高めること、すなわち運動の必要性をより強化する知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗老化タンパクとされている klothoは、高発現部位である腎臓での研究が大多数であるが、骨格筋においても発現していることが報告されているにもかかわらず、その発現調節機序および作用に関して殆ど明らかにされていなかった。さらに、合成タンパクの投与実験等で細胞保護作用を呈し、細胞障害に対する予防・治療薬としての可能性が高い分泌型に関しては、運動が増加刺激として働いている可能性が報告されている。すなわち骨格筋での klotho発現調節を明らかにすることは、加齢に伴う変化に対する予防・治療法確立につながるであろう。本研究成果は、その一端となる知見である。

研究成果の概要（英文）：We clarified the contribution rate of skeletal muscle to the production of secretory Klotho. We created skeletal muscle specific Klotho knock out mice (cKO mice) using cre-loxP gene targeting. As a result of analyzing the phenotype of the cKO mice, the concentration of secretory Klotho (sKlotho) in the blood did not change significantly in 12 weeks-old mice but showed a significant decrease of about 30% in 24 weeks-old mice. In addition, we indicated that the role of skeletal muscle as a tissue producing the blood sKlotho might be enhanced in the condition of decreasing renal function. Using cultured C2C12 cells, mice myoblast cell line, we revealed that Klotho expression in skeletal muscle is increased by muscle contraction, stretch stimulation, and growth factors such as insulin. These results suggested the potential value of exercise in enhancing the blood sKlotho against aging in skeletal muscle.

研究分野：適応生理学

キーワード：Klotho 骨格筋

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

老化および慢性腎臓病(CKD)によるサルコペニアは、様々な観点から問題視されその機序が研究されているが、未だ不明な点が多い。腎臓で主に主に発現している Klotho は、ノックアウトマウスの表現型が短命および老化様の特徴を呈し、腎機能の低下に伴い klotho も低下することから老化制御因子として考えられているが、骨格筋においても発現が認められる。Klotho は、1 回膜貫通型のタンパク質で、1997 年に老化抑制遺伝子として発見され(Kuro-o et al. Nature 1997)、線維芽細胞増殖因子 23(FGF23)受容体のコファクターとして、腎尿細管でのミネラルの排出および再吸収を調節していることが報告されている。また、Klotho は膜型タンパク質(以下、膜型と記す)のみならず、その細胞外の部分がタンパク分解酵素で切断されたもの、ならびに/もしくは、最初から分泌型として合成されたものが血液中に存在することが報告されており、可溶性 Klotho(同、分泌型)と呼ばれている。

膜型に関しては、腎臓での研究が大多数を占めており、急性・慢性を問わず腎障害によって発現量が低下することが明らかにされており、分泌型の作用もまだ完全に明らかにされていないが、合成タンパクを投与する実験において、障害の程度を軽減することが示され、細胞保護作用を有している可能性が示唆されている。また、いずれの型においても、増加する現象の報告は少ないが、ヒトおよび実験動物では持続的な運動トレーニングによって、分泌型の量が増加すること、実験動物においては骨格筋内での遺伝子発現量(タンパクレベルは不明)も増加する報告がなされている。しかしながら、運動トレーニングによって増加した(もしくはしているだろう)膜型の働きの詳細は不明であり、腎臓以外での作用に関する研究が多い分泌型の産生拠点とその作用機序の詳細もまだまだ明らかにされていない。

2. 研究の目的

我々は、『CKD に伴う Klotho 関連シグナルの低下が骨格筋萎縮の一因である』と仮説立て、骨格筋における Klotho の働きを解明したいと考えている。本研究の目的は、骨格筋特異的に Klotho タンパクの発現がノックアウトされるマウスを作成し実験することによって、(1)筋萎縮に対する膜型 Klotho の働きを明らかにする、(2)分泌型 Klotho(sKlotho)の産生組織を明らかにすること、および筋萎縮に対する sKlotho の働きを明らかにすること、であった。

3. 研究の方法

(1)骨格筋特異的 klotho KO マウスを用いた検討

当講座で所有している klotho^{flox/flox} マウスに、骨格筋特異的に Cre Recombinase を発現する Myf11-Cre マウスを購入・交配し、骨格筋特異的 klotho KO マウス(cK0 マウス)を作成する。その表現型(体重および組織重量)および血中 sKlotho を ELISA 法で測定し、sKlotho の産生組織としての骨格筋の寄与率を明らかにした。

さらに、小動物用トレッドミルを用い、骨格筋の Klotho の有無が持続的な走運動パフォーマンスに及ぼす影響を評価した。

また、作成した cK0 マウスを対し、Fig1 に示したスケジュールにて 0.2%のアデニン食を摂取させ腎機能低下状態にし、腎機能低下状態での骨格筋の Klotho の有無が、筋力(握力)および組織重量、sKlotho に及ぼす影響を評価した。

(なお、アデニン食を摂取させる多くの先行研究では、体重に顕著な差を認め、摂餌量も異なることが報告されており、それを考慮した色々なパターンでの研究がなされている。

それらを参考に、サルコペニアを正當に評価するために行った予備的な実験であり、実験期間の問題で再現性は確認できていない。)

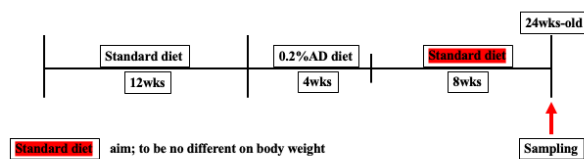


Fig1:アデニン食摂取実験のプロトコル

(2) 骨格筋培養細胞(マウス筋芽細胞 C2C12)を用いた検討

全ての培養細胞(C2C12)を使用した実験は、2%ウマ血清を含む培地で筋管細胞(myotube)へと分化させた状態で行った。伸展および電気刺激により収縮させることで運動を模した刺激を負荷し、膜型 klotho のタンパク発現量の増加動態をウェスタンブロット法にて検討した。さらに、運動による適応反応の機序を検討する際に用いられるインスリン(100nM)およびカフェイン(5mM)を添加した培地で7日間培養し、同様に klotho のタンパク発現量をウェスタンブロット法にて評価した。

4. 研究成果

(1) 骨格筋特異的 klotho KO マウスを用いた検討

本研究で作成した cKO マウスのサンプル解析の結果、12 週齢では体重および骨格筋を含む組織重量、血中の sKlotho も統計的な有意差を認めなかった。しかしながら、雄性マウスのみであるが、24 週齢時において血中の sKlotho 濃度の 30% 程度の有意な低値を認めた (Fig1)。雌性マウスではいずれの週齢においても、血中の sKlotho・体重・組織重量に変化を認めなかったこと、24 週齢の雄性マウスにおいて体重に伴った骨格筋・組織重量の増加を認めたこと (Table) から、骨格筋の Klotho が、エネルギー代謝に影響していることおよび性差がある可能性が考察された。

性差の有無や機序に関しては検討していないが、本研究の結論としては、雄性マウスにおいては、骨格筋の sKlotho 産生組織としての働きの割合は約 3 割程度であることが明らかになった。

アデニン食を用いた腎機能低下状況下での骨格筋 Klotho の有無の影響を評価した実験において、野生型群と cKO 群での体重、骨格筋重量に顕著な差は認められなかった。握力の評価では、群間に有意な差は認められなかったものの、回復期間 1 週ごとに評価した全てのタイミングで cKO 群が低値を示していたので、腎機能低下状態の期間が長くなれば統計的な有意差が認められる可能性は考えられる。また、血中 sKlotho 濃度においても、群間に有意差は認められなかったが、変動の分散が顕著に異なり、検体数や腎障害の程度などを調整することで十分に変化が観察されそうな結果を得た (Fig3)。実験期間の関係から 1 回しか実施できず、再現性および統計的な有意差を認めていないという問題点があるものの、これらの結果から、sKlotho の主たる産生組織である腎機能の低下した状況下においては、骨格筋の産生組織としての役割が増大する可能性を示唆するものであると考えられるが、今後の検討課題である。

持久的な運動パフォーマンスの評価も、十分に実施する期間がなかったために、週齢を揃えて検討する個体数が十分に確保できず、結論づけることは困難であるが、雄性マウスでは骨格筋 Klotho の有無は影響しない可能性が示唆された (Fig4)。しかしながら、雌性マウスでは差が認められる可能性が示唆され (Fig4)、やはりエネルギー代謝に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられるが、今後検討する予定である。

(2) 骨格筋培養細胞 (マウス筋芽細胞 C2C12) を用いた検討

マウス筋芽細胞株 C2C12 を用いた、身体運動様の刺激が骨格筋の klotho 発現量に及ぼす影響を検討する研究において、実験に使用したシリコンチャンバーとの接着細胞の相性の関係より、電気刺激および伸展刺激を数日に渡って複数回実施した場合、高頻度で細胞の剥離が認められた。色々検討したが、確実に剥離しないプロトコルの確立までには至らず、剥離せずに回収できたう

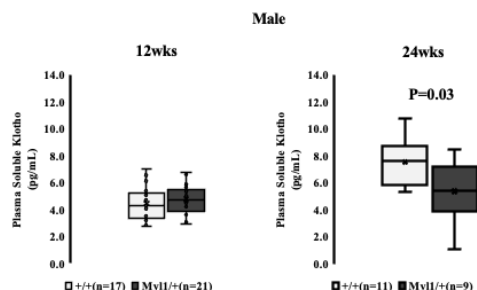


Fig2:骨格筋特異的klothoノックアウトマウスでの血中soluble klotho濃度

Table:骨格筋特異的klothoノックアウトマウスの体重および組織重量

	Klf/Klf,+/+(n=4)	Klf/Klf,My11/+(n=10)
BW(g)	27.1(4.7)	28.6(2.8) **
skeletal muscles(mg)	Quadriceps	415.3(76.3)
	Gastro+Pla+Sol	327.8(67.1)
	EDL	24.8(3.9)
	TA	110.3(25.6)
organs(mg)	Triceps	253.5(52.7)
	Heart	133.0(22.6)
	Kidney	339.8(43.7)
		141.3(21.3) **
		364.0(49.4) **

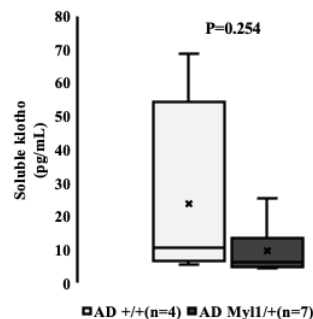


Fig3:腎不全状態下での分泌型klotho

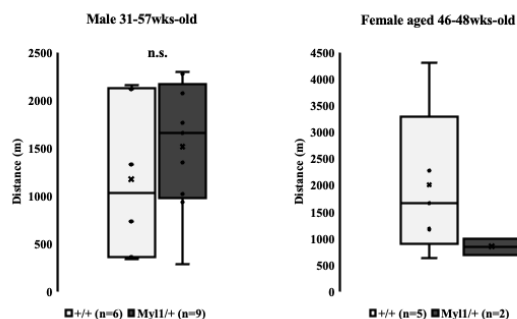


Fig4:骨格筋特異的klothoノックアウトマウスの疲労困憊運動走行距離

ち、それらの刺激がある程度負荷されたとみなせるサンプルを用いた結果を Fig5 に示した。持久的運動を模したこれらの刺激で増加することが知られている COX-IV のバンドが濃く見られた赤線で囲まれたサンプルでは、骨格筋量の指標として検出した MHC も濃くなっている様子であり、それらの検体では klotho も増加していそうではあった。統計処理が可能な状況ではないので結論づけることは困難であるが、筋収縮および物理的な伸展刺激は骨格筋での klotho 増加の因子であることが示唆された。

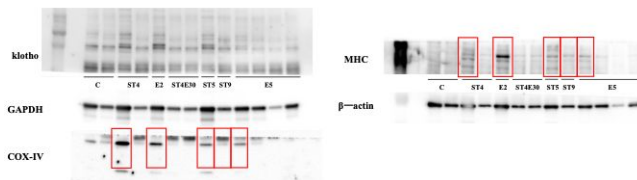


Fig5:ストレッチおよび電気刺激によるマウス骨格筋細胞C2C12の変化の検証

samples	n	1h-Stretch(Str) for 4 days (S4)	2	*Stretch 10%, 1 stretch / s.
CON (C)	2	1h-Str for 4 days + 30min-ES for 1 day (S4E30)	2	
2h-Electrical stimulation(ES) for 2 days (E2)	1	1h-Stretch(Str) for 5 days (S5)	1	*Electrical stimulation 1Hz, 2.0ms 15V
1h-Stretch(Str) for 5 days (S5)	1	2h-Electrical stimulation(ES) for 5 days (E5)	4	

物理的な変化が困難であるため、運動の適応に関連した薬理的な因子が骨格筋の klotho 発現に及ぼす影響を検討した結果、インスリン 100nM もしくは caffeine 5mM を添加して培養することで、骨格筋の klotho が増加することを確認した。運動による骨格筋での klotho 発現の機序を完全に明らかにできたわけではないが、運動による骨格筋でのエネルギー代謝の適応機序と同様に、筋の伸縮とそれに伴うカルシウムイオンの変動シグナルおよびインスリンシグナルが少なくとも骨格筋での klotho 発現増加に関与している可能性が示唆された。

しかしながら、これらの野生型およびノックアウトマウスの骨格筋、並びに骨格筋培養細胞、市販されているヒト骨格筋細胞での klotho タンパクの発現量を western blot 法で確認し(Fig6)、腎組織では 130kDa で検出されるタンパクが、同じ抗体を用いても骨格筋では 90kDa に検出され(他の先行研究でも骨格筋では 130kDa ではなく 95kDa 程度)、このバンドおよび骨格筋での klotho の状態(局在・修飾状況)をより明確にする研究計画を検討中である。

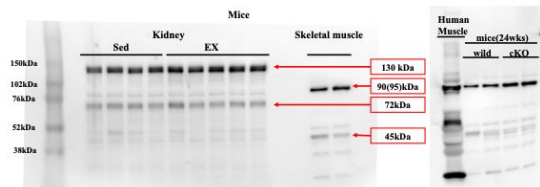


Fig6:腎臓および骨格筋での α klotho の検出

この研究計画を検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	河上 和紀 (KAWAKAMI Kazuki) (00805749)	和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員 (24701)	
研究分担者	大矢 昌樹 (OHYA Masaki) (90550301)	和歌山県立医科大学・医学部・准教授 (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関