

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670358

研究課題名(和文) FGF23、及び klothoを分子標的とした摂食 老化関連の解明

研究課題名(英文) Role of alpha-Klotho, an anti-aging gene, and its ligand, FGF23, in the regulation of food intake in the hypothalamus

研究代表者

森川 吉博 (Morikawa, Yoshihiro)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60230108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗老化遺伝子として知られる  $\alpha$ -Klothoの発現が、絶食により視床下部において増加し、その発現増加は、弓状核で摂食促進性に働くNPY/AgRPニューロンにおいて顕著であった。そこで、 $\alpha$ -Klothoヘテロ欠損マウスにおける摂食行動について検討したところ、野生型マウスと比較して絶食後の再摂食量が低下していた。また、絶食時の視床下部におけるNPYやAgRPの発現増加が、野生型と比較して  $\alpha$ -Klothoヘテロ欠損マウスでは軽度であった。以上の結果より、 $\alpha$ -Klothoは、視床下部において絶食時のNPYやAgRPの発現を誘導し、摂食促進作用を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is well-known that  $\alpha$ -Klotho is an anti-aging gene. The expression of  $\alpha$ -Klotho was induced by fasting in the hypothalamus, especially in NPY/AgRP neurons of the arcuate nucleus. In heterozygous  $\alpha$ -Klotho-deficient ( $\alpha$ -Klotho $^{+/-}$ ) mice, fasting-induced food intake was attenuated compared to that in wild-type (WT) mice. Although the expressions of NPY and AgRP were increased by fasting in the hypothalamus of both  $\alpha$ -Klotho $^{+/-}$  and WT mice, the effects of fasting on their expressions in  $\alpha$ -Klotho $^{+/-}$  mice were lower than those in the WT mice. These results suggest that  $\alpha$ -Klotho is important to the increase in fasting-induced food intake through the up-regulation of the expressions of NPY and AgRP in the hypothalamus.

研究分野：神経解剖学、神経病理学

キーワード：Klotho FGF23 絶食 視床下部

1. 研究開始当初の背景

(1)  $\alpha$ -Klotho は、1997 年に発見され、そのミュータントマウスが多彩な老化症状(短命、動脈硬化、骨粗鬆症、異所性石灰化、及び皮膚の萎縮など)を示すことから“抗老化遺伝子”として注目を集めている。

(2)  $\alpha$ -Klotho 遺伝子は、1 型膜蛋白質をコードしており、機能的には、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor; FGF) 23 の受容体サブユニットとして腎臓におけるビタミン D の活性抑制などに関わる、NaPi-IIa、NaPi-IIc、TRPV5、及び Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase に作用し、細胞内外のイオン濃度を調節する、IGF-1 シグナルや Wnt シグナルを抑制する、などが知られている。

(3) 1997年に報告された $\alpha$ -Klothoミュータントマウスは、 $\alpha$ -Klotho挿入突然変異マウスであり、低リン食などにより $\alpha$ -Klothoの発現が部分的に回復する。そこで、2004年に $\alpha$ -Klotho遺伝子をノックアウトした系統が作製され、そのホモ欠損マウスは、 $\alpha$ -Klothoミュータントマウスと同様の変位表現型を示すことが分かっている。

(4) 中枢神経系においては、 $\alpha$ -Klotho は脈絡叢に強く発現しており、さらにラットでは大脳皮質や海馬、摂食中枢である視床下部にも発現しているという報告がある。海馬では、 $\alpha$ -Klotho の機能として、記憶の向上に関与しているという報告があるが、視床下部における  $\alpha$ -Klotho の機能については未だ不明である。

2. 研究の目的

我々はこれまで、視床下部における摂食・エネルギー代謝調節機構を解明するために、視床下部において絶食時に活性化される分子や遺伝子発現の変化に着目し研究してきた (Ueyama E et al., Neurosci Lett, 2004; Morikawa Y et al., J Neuroendocrinol, 2004; Komori T, et al. Neuroscience, 2006; J Biol Chem, 2010; J Biol Chem, 2011)。その研究において、絶食時の視床下部で c-fos 発現や CREB のリン酸化などが誘導されていたことから、絶食時の視床下部ではそれら転写因子の下流で何らかの遺伝子発現がおこっている可能性が考えられた。そこで、絶食により視床下部において誘導される遺伝子を cDNA マイクロアレイにより網羅的に検討したところ、絶食による  $\alpha$ -Klotho の発現増加が観察された。このことは、 $\alpha$ -Klotho が、これまで報告されている機能に加え、視床下部における摂食・エネルギー代謝調節に関わっている可能性を示唆している。本研究は、視床下部における摂食・エネルギー代謝

調節機構に対し、 $\alpha$ -Klotho がいかなる役割を担っているのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 絶食時のマウスの視床下部における  $\alpha$ -Klotho の発現とその局在を、リアルタイム PCR 法、ウエスタンブロット法、及び免疫染色法を用いて検討する。

(2) 絶食時のマウスの視床下部における FGF 受容体 (FGFR) と  $\alpha$ -Klotho の共発現を、二重免疫染色法を用いて検討する。

(3) 絶食時のマウスの視床下部における FGF23 の発現を、ウエスタンブロット法、及び免疫染色法を用いて検討する。

(4)  $\alpha$ -Klotho の視床下部における機能を検討するために、 $\alpha$ -Klotho ヘテロ欠損マウスの表現型を解析する。

4. 研究成果

(1) 絶食時のマウスの視床下部における  $\alpha$ -Klotho の発現の検討

絶食時の視床下部における  $\alpha$ -Klotho の遺伝子発現と蛋白発現を、リアルタイム PCR 法とウエスタンブロット法を用いてそれぞれ検討した。自由摂食群と比較して絶食群の視床下部において、 $\alpha$ -Klotho 遺伝子(図1左)と蛋白(図1右)の有意な発現増加が認められた。

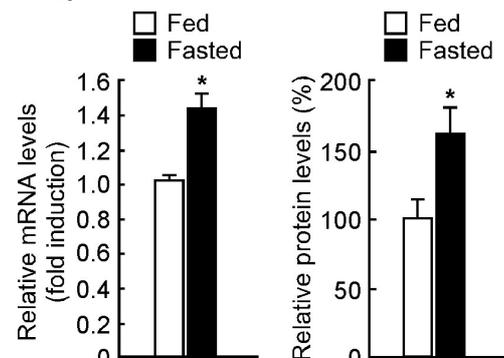


図1 自由摂食下 (Fed) と絶食下 (Fasted) のマウス視床下部における  $\alpha$ -Klotho の遺伝子 (左) と蛋白 (右) の発現

$\alpha$ -Klotho 蛋白の視床下部内での局在を免疫染色法により検討した。視床下部の中でも弓状核において  $\alpha$ -Klotho 蛋白の強い発現増加を認めた (図2)。

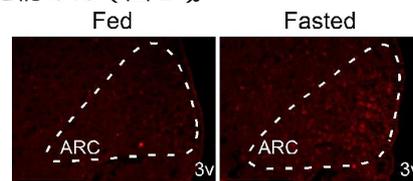


図2 自由摂食下 (Fed) と絶食下 (Fasted) のマウス視床下部弓状核における  $\alpha$ -Klotho 蛋白の発現 ARC, arcuate nucleus; 3v, third ventricle Scale bars = 200  $\mu$ m

視床下部弓状核には、摂食促進性に働く神経ペプチドであるニューロペプチド Y (NPY) やアグーチ関連蛋白 (AgRP) を含むニューロン群 (NPY/AgRP ニューロン) と、摂食抑制性に働く神経ペプチドをコードする遺伝子であるプロオピオメラノコルチン (POMC) が発現しているニューロン (POMC ニューロン) が存在する。α-Klotho が視床下部弓状核においていずれのニューロン群に発現しているのかを二重免疫染色法を用いて検討した。視床下部弓状核の NPY/AgRP 陽性のニューロンに α-Klotho の発現が認められたが、POMC 陽性のニューロンに α-Klotho の発現は認められなかった (図 3)。

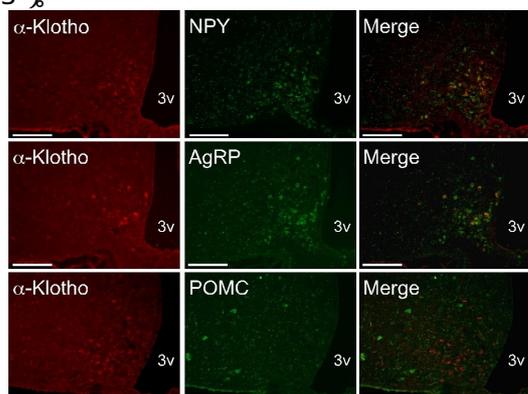


図 3 絶食時のマウス視床下部弓状核における α-Klotho 蛋白と NPY、AgRP、及び POMC との共存 3v, third ventricle Scale bars = 200 μm

以上の結果より、α-Klotho の発現は絶食により視床下部弓状核の NPY/AgRP ニューロンにおいて増加することが明らかとなった。

### (2) 絶食時のマウスの視床下部における FGFR と FGF23 の発現の検討

α-Klotho は、FGFR とヘテロダイマーを形成し、FGF23 の機能的受容体として作用することが報告されている。絶食時の視床下部において、α-Klotho が FGFR との複合体を形成している可能性を検討するために、α-Klotho と FGFR の視床下部における発現パターンについて二重免疫染色法を用いて検討した。絶食時の視床下部弓状核において、α-Klotho は、FGFR1、及び FGFR2 と同一細胞内での共存が認められた (図 4)。

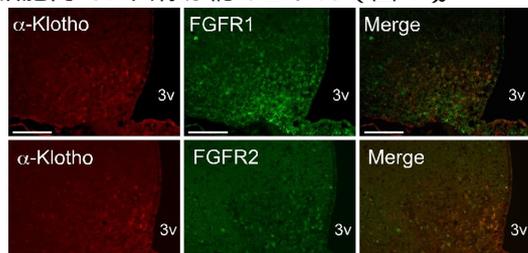


図 4 絶食時の視床下部弓状核における α-Klotho と FGFR1、及び FGFR2 との共存 3v, third ventricle Scale bars = 200 μm

α-Klotho と FGFR の複合体のリグランドである FGF23 の視床下部における発現を、ウェスタンブロット法を用いて検討したところ、絶食により、その発現が増加していた (図 5 左)。また、視床下部内における FGF23 の局在を免疫染色法により検討したところ、視床下部弓状核にその発現が認められた (図 5 右)。

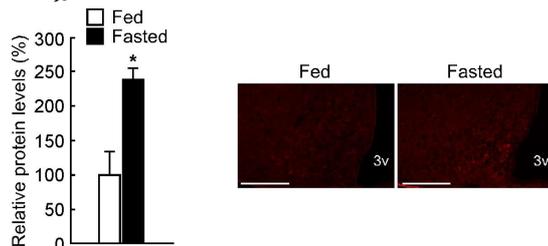


図 5 自由摂食下 (Fed) と絶食下 (Fasted) のマウスの視床下部における FGF23 蛋白の発現 3v, third ventricle Scale bars = 200 μm

以上の結果より、α-Klotho は、視床下部において FGFR と結合し、FGF23 の機能的受容体として作用している可能性が示唆された。

### (3) α-Klotho ヘテロ欠損マウスの解析

視床下部における α-Klotho の機能を明らかにするために、α-Klotho 遺伝子欠損マウスを解析した。α-Klotho のホモ欠損マウスは病的老化症状が強く、摂食やエネルギー代謝の解析が困難なため、α-Klotho ヘテロ欠損マウスを用いた。α-Klotho ヘテロ欠損マウスは、視床下部における α-Klotho の発現が約 1/2 に低下しており、絶食による有意な増加は認められなかった (図 6)。

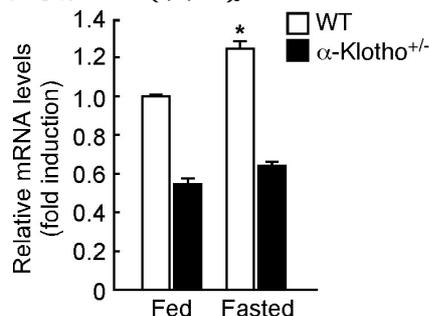


図 6 自由摂食下 (Fed) と絶食下 (Fasted) の野生型と α-Klotho ヘテロ欠損マウスの視床下部における α-Klotho の発現

α-Klotho ヘテロ欠損マウスの自由摂食下と絶食下における体重や、自由摂食下における 1 日あたりの摂食量を測定したところ、野生型と比較して有意な差は認められなかった (図 7)。

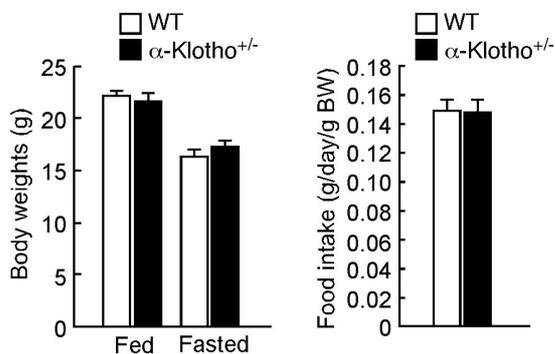


図7 自由摂食下 (Fed) と絶食下 (Fasted) の野生型と  $\alpha$ -Klotho ヘテロ欠損マウスにおける体重 (左) と自由摂食下における 1 日あたりの摂食量 (右)

$\alpha$ -Klotho ヘテロ欠損マウスの絶食後の再摂食量について検討したところ、 $\alpha$ -Klotho ヘテロ欠損マウスにおいて野生型と比較して再摂食量の減少が認められた (図 8)。

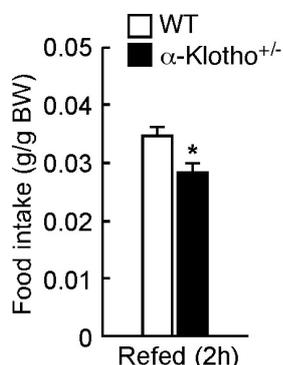


図8 野生型と  $\alpha$ -Klotho ヘテロ欠損マウスにおける絶食後の 2 時間再摂食量

$\alpha$ -Klotho ヘテロ欠損マウスの再摂食量減少の原因を検討するために、絶食時の視床下部における摂食関連遺伝子の発現を検討した。野生型マウス、及び  $\alpha$ -Klotho ヘテロ欠損マウスの視床下部で、絶食により NPY や AgRP の発現が増加したが、 $\alpha$ -Klotho ヘテロ欠損マウスの視床下部での増加の程度は野生型に比べて低下していた (図 9)。また、POMC の発現パターンは、野生型マウスと  $\alpha$ -Klotho ヘテロ欠損マウスの間で差は認められなかった (図 9)。

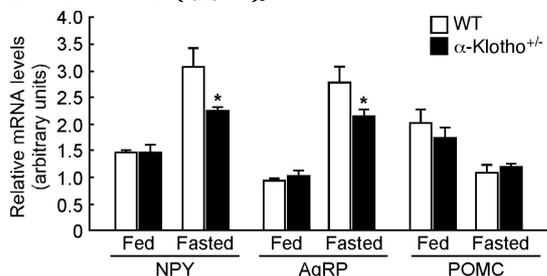


図9 自由摂食下 (Fed) と絶食下 (Fasted) の野生型と  $\alpha$ -Klotho ヘテロ欠損マウスの視床下部における摂食関連遺伝子の発現

以上の結果より、 $\alpha$ -Klotho は絶食時の視床下

部において NPY や AgRP の発現を誘導し、絶食後の再摂食量の増加に関与している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1件)

小森 忠祐、森川 吉博 Klotho is a fasting-induced gene in the hypothalamus. 第 44 回北米神経科学会 2014 年 11 月 17 日 ワシントン DC (アメリカ合衆国)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森川 吉博 (MORIKAWA YOSHIHIRO)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 60230108

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

小森 忠祐 (KOMORI TADASUKE)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 90433359

久岡 朋子 (HISAOKA TOMOKO)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 00398463

板東 高功 (BANDO TAKAYOSHI)  
和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員  
研究者番号: 00423963