

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590418

研究課題名（和文） クロトーによる脳の過興奮性防御機構の解明

研究課題名（英文） Klotho-dependent protective mechanisms of hyperexcitability of the brain

研究代表者

村田 宮彦 (MURATA MIYAHIKO)

京都大学 再生医科学研究所 教務補佐員

研究者番号：50222435

研究成果の概要（和文）：

体液カルシウム恒常性は従来はホルモン性の制御によると考えられていた。しかしながら、実験的にひきおこされたカルシウム低下ではそれらのホルモン性制御に先立ってカルシウム濃度の上昇が始まっていた。低下した血液カルシウム濃度は腎臓を通り抜ける間に急速に、秒単位で、正常化されていることが示された。この反応は PTH や活性型ビタミン D には依らず、組織自律的なものである。この恒常性効果は  $\alpha$ -klotho のホモ/ヘテロノックアウトマウスで減弱する。

研究成果の概要（英文）：

Calcium homeostasis of body fluid is now recognized to be maintained by hormonal regulation. However, prior to these hormonal regulations, the calcium elevation occurred in response to artificial calcium decrease. The measurement of calcium revealed that low concentration of calcium in the blood was normalized during the passage of the kidney rapidly, in a second-order. This response was independent of PTH and vitamin D secretion and was therefore tissue-autonomous. This homeostatic effect is impaired in the  $\alpha$ -klotho homo and hetero knockout mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：動物

## 1. 研究開始当初の背景

当時、抗老化分子として考えられていたオリジナル Klotho ( $\alpha$ -Klotho) の分子レベルでの本当の機能が、体(whole body)のカルシウム (Ca) 恒常性維持に複数の経路で関与することが研究代表者を含めた複数の研究

グループで明らかになったところだった。それらは (1) FGF23 が受容体に結合してシグナルを伝える際に必須の co-factor として働くということであり、このシグナルは最終的に活性型ビタミン D 産生を抑制して Ca を低下させる方向に働く。(2) 腎臓の尿細管

での Ca 再吸収の入り口である TRPV5 チャンネルと結合してこのチャンネルを細胞表面に蓄積させることで Ca 再吸収効率を高め、尿に Ca 漏れることを防ぐことで、Ca を高める方向に働くことであった。さらに加えて、研究代表者のグループでは (3) Klotho が分子レベルでナトリウム (Na) ポンプと結合して、そのポンプ活性を制御していることを明らかにした。これは、細胞外の Ca 低下に非常に素早く (~秒) 反応して、細胞表面の Na ポンプ量を増加させ、結果的にポンプ活性を高めることである。このポンプ活性の上昇は Klotho の強発現組織である副甲状腺で、副甲状腺ホルモン (PTH) 分泌に促進的に必須であることを明らかにすることができた。PTH は血中 Ca 低下時に分泌され、Ca を上昇させる働きを持つホルモンで、従来の考え方では Ca 恒常性制御システムの中で、もっとも速い時点で働き始めるものである。ここで、興味深いことに Klotho の数少ない強発現部位は前記副甲状腺以外に脳脈絡叢と腎遠位尿細管という、それぞれ脳脊髄液と血液の Ca 濃度調整に能動的な輸送を通じて関わる組織が含まれる。この二つの組織で Klotho が Na ポンプ活性の制御を通じてどんな機能を果たしているのかが、次の解明すべき問題として残されていたのが当時の背景である。

## 2. 研究の目的

血液・体液 Ca 濃度の恒常性維持は、常に Ca 不足に曝される陸棲生物で非常に発達した。Ca 不足の方が、過剰よりもより切迫していることもあり、Ca を上昇させる仕組みは複数存在し、既知のものとしては 1) 血中カルシウム濃度低下に反応して数分~時間の経過で副甲状腺から副甲状腺ホルモン (PTH) が分泌されることによって引き起こされる反応、2) 同じくカルシウム低下に反応して数時間~数日の経過で腎臓において活性型ビタミン D (VD) が産生、分泌されることによって引き起こされる反応、の 2 つがある。

研究代表者らは Klotho 分子が発現細胞外の Ca 低下に非常に素早く (~秒) 反応して、細胞表面の Na ポンプ活性を高めることを既に示しており、そのポンプ活性の上昇が Klotho の強発現組織である副甲状腺で PTH 分泌に促進的に必須であることも示している。そこから、副甲状腺以外の主な Klotho 発現組織である脳脈絡叢と腎遠位尿細管でも、細胞外である脳脊髄液と血液の Ca 低下に素早く反応した Na ポンプ活性上昇が、共役した Ca 輸送の増加となり、結果的にそれぞれの体液の Ca 濃度を押し上げ、Ca 恒常性の維持機構として働いているのではないかと仮説を立てた。この仮説を検証して行くのが目的である。この Ca 恒常性維持機構は、既知の Ca 恒常性維持機構よりも迅速である

ことが予想され、特に短時間の Ca 変動を抑制する点で、他の Ca 恒常性維持機構と機能的に棲み分けていると考えられた。つまり Ca 恒常性は日~単位の長時間性にも、~秒単位の短時間性にも保たれるべく既知のもの以外にも制御機構が存在することになると考えられた。さらに、脳脈絡叢が関与していることは、この短時間性の Ca 恒常性について、示唆的である。脳脊髄液は血液を元として殆どが脈絡叢で分泌されて作られることから、上記仮説に基づくと、脳脊髄液は血液の Ca 恒常性と血液/脳脊髄液間の Ca 恒常性の二重の恒常性維持機構により守られていることとなる。これは、神経系の興奮性が細胞外 Ca 濃度の影響を強く受けるという事実と、神経系では非常に短時間に情報処理が行われるため、興奮性の極めて短時間の変化がその情報処理過程に与える影響の大きさ、と考え合わせると、脳の興奮性を安定化させるために合理的なしくみともいえる。

## 3. 研究の方法

今回取り扱う Ca 恒常性制御システムは腎臓と脳脈絡叢に存在するものであり、かつ急速に反応することが予想されるため、それを検証する実験系をマウスを使用する in vivo 実験系として組み立てた。

まず、循環血液の Ca 濃度を人為的に急速低下させる方法として、Ca キレートである EGTA の静脈投与方法、および、新たな方法として血中にバッファーを大量注入する希釈法を用いた。後者は Ca 以外の主要成分が血漿成分とほぼ一致し、Ca のみ含まないバッファーを大量に血管内に注入することで、Ca を選択的に希釈する方法である。

Ca は二価のイオンで、体液中のタンパクや陰イオンと結合した結合フォームと、イオン化したフリーフォームとが共存する。このため、定量においては、イオン選択制電極を用いた、イオン化 Ca 濃度と、色素反応を用いた総 Ca 濃度の両方を用いた。ここで、EGTA のようなキレート剤の使用は、イオン化 Ca 濃度の測定には影響しないが、総 Ca 濃度の測定には強いかく乱因子となって測定が不能となる。このため、希釈法を考案した。希釈法は、液量を増やすことで、濃度を下げる方法であることから循環血液量が非常に増加するという問題がある。その為、EGTA 静脈投与と併用した。

上記の方法で血中 Ca 濃度を急速に低下させることによって、血液と脳脊髄液の Ca を中心としたミネラル濃度がどのような変化を示すかを、少量サンプルを採取しての分析、および、微小イオン選択制電極によるリアルタイム計測によって明らかにした。

カニューレーションによってサンプルを採取する血管を腎臓を挟んでの入出力動静脈

それぞれから2カ所にすることで、それぞれのサンプル間の差分をとることで、腎臓の寄与を抽出することが出来た。

#### 4. 研究成果

(1) 全身血液系 研究代表者は上記方法で血中 Ca 濃度を急速に低下させたマウスで、既知の Ca 上昇機構が働くよりもっと早い時間経過で血中 Ca 濃度の低下が回復して Ca 濃度が上昇していくことを突き止めた。つまり、血中 Ca 恒常性維持のシステムには新たな短時間性の機構が存在することがあきらかになった。さらにこの現象に腎臓が関与し、組織自律的に Ca 濃度を正常化させている仮説を検証するため、麻酔下マウス腎臓の輸入動脈と出力静脈から同時に血液を採取し、それぞれの血中 Ca 濃度を比較したところ、腎臓への入力血液の Ca 濃度が充分低くても、腎臓からの出力血液では Ca 濃度がほぼ正常に近い所まで上昇していることがわかった。データ採取は、Ca 低下操作から様々な時点で行なっており、この Ca 上昇現象は腎臓の中に残っていた Ca 低下前の血液の「ところてん式」の押し出しではなく、腎臓を通り抜ける間に非常に迅速に(～秒の経過で)血中 Ca 濃度低下に抗する Ca 上昇現象であることが明らかに出来た。しかも、この Ca 濃度を押し上げる強さは、Klotho の発現量が少ない klotho+/-マウスでは減弱しており、この Klotho 依存性から、Klotho が Ca 低下に反応して Ca 輸送制御を行い Ca 恒常性に寄与するという、最初の仮説を指示する結果となった。

この時点で腎臓自体が Ca 濃度を押し上げるのは間違いないが、全身循環血に対する寄与はどのくらいかを見積もるため、Ca 低下からほぼ正常に復した時点(6分)の腎臓の総 Ca 含量を原子吸光度法で定量し、コントロールと比較した。血中 Ca 濃度がほぼ正常濃度に復した時点なので、腎臓内の血管内 Ca は最初と同じと看做せ、ここでコントロールと比較することは、腎臓の細胞内 Ca と組織間液の Ca が血中 Ca 正常化の為に供出された見積もることになり、その結果は血漿の Ca 濃度上昇の1割程度を腎臓が供出しているということだった。

結局、全身の血液において急速に低下した Ca 濃度を上昇させる機序は今回見いだした腎臓内の機構だけではなく、さらに未知の機構がふくまれていることになる。しかも、その Ca 正常化の「強さ」は強い。おそらくそれは骨など体内のカルシウムストアからの受動的な拡散によるのであろうと予想されるが、この点の解明は今後の課題である。

(2) 脳脊髄液系 (1)と同じく血中 Ca を低下させたマウスで、低下の前で脳脊髄液の Ca 濃度を連続測定したところ、安定した Ca 濃度を示した。ただし、脈絡叢への輸

入血管レベルでの Ca 低下の程度は未確認であり、この安定性の強さを定量的に評価するには至っていない。また、この安定性が Klotho 依存的かどうかはまだわからないままである。

#### 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)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計1件)

発表者名: 村田 宮彦

発表標題: alpha-Klotho を介した、急速な体液カルシウム恒常性維持制御

学会名: 第 88 回日本生理学会大会 (震災の為、Journal of Physiological Sciences 誌上開催)

発表年月日: 2011年3月29日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 宮彦 (MURATA MIYAHIKO)

京都大学・再生医科学研究所・教務補佐員  
研究者番号: 50222435

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：