

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870253

研究課題名(和文) klotho/megalin/NaPi2aの相互関係による新規リン代謝調節機構

研究課題名(英文) Interaction of klotho/megalin/NaPi2a, a novel regulating mechanism of phosphate homeostasis.

研究代表者

桑原 頌治 (Kawahara, Shoji)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・特任助教

研究者番号：70645209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：予備検討で可能性が示唆されていた、メガリンノックアウトマウスでklothoタンパク質の産生が増加するデータは再現が得られなかった。しかし、メガリンノックアウトマウスの尿中にklothoタンパク質は検出されることから、klothoもメガリンを介して近位尿細管細胞細胞に取り込まれることを明らかにした。さらに合成したklothoタンパク質をklothoノックアウトマウスに投与するレスキュー実験により、その効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：In our pilot study, we revealed that serum klotho levels were increased in our novel kidney specific megalin knock out (KO) mice, but we failed to reconfirm it. On the other hand, klotho was detected as cleaved form in urine only in megalin KO mice. And we found the interaction of klotho with megalin by use of quartz crystal microbalance. These results mean klotho is one of the ligand of megalin and taken up by megalin into the proximal tubule cells. Moreover, we investigated whether exogenous klotho can rescue phosphate excretion in klotho KO mice. Then, we found not only single administration of extracellular domain but also combined administration of KL1 and KL2 domain had phosphaturic effect.

研究分野：腎臓学

キーワード：リン代謝 klotho メガリン エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性腎臓病患者における血中リン濃度管理は生命予後に関与する重要な因子であるため、リン代謝調節機構の解明は医学的に重要な課題の1つである。腎臓はリン代謝調節において最重要臓器であり、生体の最終的なリン出納を司る。なかでも近位尿細管が重要な役割を担っており、リンの輸送体である NaPi2a、NaPi2c が管腔側に存在している。このリン輸送体によるリン輸送、すなわちリン再吸収は副甲状腺ホルモン (PTH)、活性型ビタミン D、線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) そして近年同定された老化関連因子である klotho などが関与することが知られている。

(2) NaPi2a によるリン輸送は細胞膜から細胞内へ取り込まれるエンドサイトーシスにより調整される。その際に同じ近位尿細管に発現するエンドサイトーシス受容体であるメガリンと複合体を形成して細胞内へ取り込まれる。つまりメガリン (megalin) とリン代謝には関連があることが示唆されていたが、リン代謝調節機構におけるメガリンの果たす役割についてこれまで詳細に検討されていない。

(3) 我々の研究グループでは新規に腎特異的メガリンノックアウトマウスの開発に成功している。この新規腎特異的メガリンノックアウトマウスを用いた予備検討において、老化関連因子でありリン代謝とも関連がある klotho タンパク質が尿中に検出されており、すなわちメガリンにより klotho タンパク質がエンドサイトーシスされる可能性を見出している (図 1)。さらにこのメガリンノックアウトマウスの血中における klotho タンパク質を検討したところ、コントロールマウスと比較して著明なタンパク質量の増加が示唆されており、メガリンと klotho タンパク質の代謝に関連がある可能性が示唆された (図 1)。

2. 研究の目的

本研究では以下の目的の解明を目的とした。

(1) 新規腎特異的メガリンノックアウトマウスにおける klotho タンパク質の動態およびリン代謝調節因子の検討
メガリンが NaPi2a のエンドサイトーシスをはじめ、リン代謝に影響を与えているかメガリンノックアウトマウスを用いて検討する。

(2) 新規腎特異的メガリンノックアウトマウスにおけるリン輸送体 NaPi2a 調節機構の解析
メガリンノックアウトマウスにおける NaPi2a の発現量、局在を評価し、メガリンが NaPi2a に与える影響を検討する。

(3) klotho/メガリン/NaPi2a の 3 者が相互作用する、新規リン代謝調節機構の解明
メガリンによりエンドサイトーシスされる可能性の示唆された klotho と klotho による調節機構が示唆されている NaPi2a の相互作用を検討し、これまでにない近位尿細管細胞における新規リン代謝調節機構の解明を試みる (図 2)。

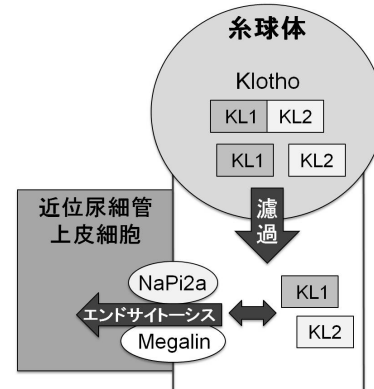


図2. Klotho/Megalin/NaPi2aの相互関係

3. 研究の方法

(1) メガリンノックアウトマウスにおける klotho タンパク質ならびに他のリン代謝調節因子の解析

我々の作成したタモキシフェン誘導型新規腎特異的メガリンノックアウトマウスを用いて、血中および尿中 klotho タンパク質を検討する。尿検体の回収はマウスを代謝ケージにて飼育し、24 時間蓄尿を回収する。また 24 時間蓄尿後、コントロールマウスおよびノックアウトマウスの解剖を行い、血液サンプルや腎臓をはじめとする各種臓器サンプルの採材を行う。

予備検討でノックアウトマウスの血中および尿中 klotho タンパク質の量と、タモキシフェン投与後の時間経過に関連が考えられたため、投与タイミングを変更したノックアウトマウスの検討も行う。

klotho タンパク質発現の評価は特異抗体を用いたウエスタンブロッティングにて行う。血中 klotho タンパク質増加のメカニズムを明らかにするために、klotho 遺伝子発現増加の評価を特異的プライマーを用いた定量 PCR 法にて検討する。

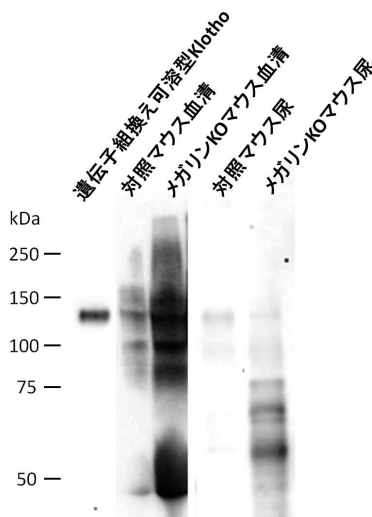


図1. Klothoのウエスタンブロット

klotho タンパク質以外のリン代謝調節因子は各タンパク質の血中濃度を ELISA 法にて測定し、評価する。

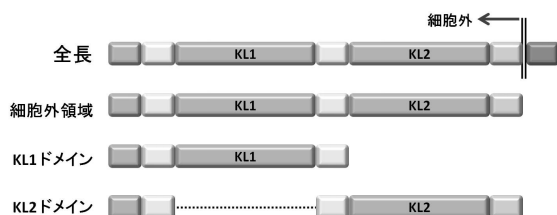
(2) メガリンノックアウトマウスにおける NaPi2a 調節機構の解析

NaPi2a がエンドサイトーシスされる際にメガリンと複合体を形成することが報告されていることから、メガリンノックアウトマウスにおける NaPi2a のエンドサイトーシスをはじめとする制御機構が機能しているか評価する。上記メガリンノックアウトマウスの腎臓において、NaPi2a タンパク質量をウエスタンブロッティングにより確認し、また局在については免疫組織化学染色を行い評価する。メガリンと NaPi2a の複合体形成に関しては、免疫沈降法や Native-PAGE を用いた検討を行う。

通常飼育環境下において明らかなメガリンノックアウトの影響が認められない場合は、リン代謝調節に負荷をかけ NaPi2a のエンドサイトーシス亢進を誘導する目的で、高リン食負荷を実施し、上記を検討する。

(3) klotho/メガリン/NaPi2a の 3 者が相互作用する新規リン代謝調節機構の検討

予備検討においてメガリンノックアウトマウスの尿中から検出された klotho タンパク質は、1 部切断された形態であることが示唆されている。この切断された klotho タンパク質がメガリンノックアウトマウスの尿でのみ検出されたことは、klotho タンパク質がメガリンに依存して近位尿細管細胞に作用する可能性を示唆する。この仮説を検討するために、組換え体 klotho タンパク質を合成する。下記に示す各種組換え体 klotho タンパク質精製は、過去に我々研究グループにて実績のある Invitrogen 社の FreeStyle Expression System を用いて行う。



精製した組換え体 klotho タンパク質を用いて、メガリンを介した取り込みを評価するため、メガリンとの結合を水晶発振子マイクロバランス法にて検討する。メガリンと klotho タンパク質の結合が確認された後、培養近位尿細管細胞ないし実験動物の腎臓におけるメガリン/klotho/NaPi2a の 3 者が複合体形成しうる可能性を証明するため、免疫沈降法や Native-PAGE 法を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) メガリンノックアウトマウスにおける、血中および尿中 klotho タンパク質増加

予備検討で得られていた、メガリンノックアウトマウスにおいて血中 klotho タンパク質が増加する可能性について検討した。コントロールマウス (タモキシフェン投与なし) とメガリンノックアウトマウスを同時期に作成し、24 時間蓄尿と採血を行いウエスタンブロッティングにより klotho タンパク質の検出を行ったが、予備検討結果と異なり血中 klotho タンパク質の増加は認められなかった。本ノックアウトマウスはタモキシフェン誘導型であるため、タモキシフェンの影響による違いを想定し、投与タイミングなどを変更したメガリンノックアウトマウスも追加で作成し、検討したが、血中 klotho タンパク質が増加するマウスを認めなかった。

メガリンノックアウトマウスの血中 klotho タンパク質に変化は認められなかったが、尿中 klotho 排泄は明らかとなった (図 3)。コントロールマウスの 24 時間蓄尿サンプルではほとんど klotho タンパク質は検出されず、ノックアウトマウスでは明確に klotho タンパク質がウエスタンブロッティングにて検出された。また、予備検討同様に切断されたと考えられる小さなサイズで尿中に検出されることも明らかとなった。血中を循環する klotho タンパク質の産生臓器は未だに不明な部分ではあるが、klotho 遺伝子を高いレベルで発現する腎臓で、遺伝子発現量を検討したが、メガリンノックアウトによる klotho 遺伝子発現量に変化は認められなかった。これはすなわち、血中を循環する klotho タンパク質が糸球体を濾過し、メガリンに依存して近位尿細管細胞細胞で再吸収されていることを意味しており、重要な発見である。

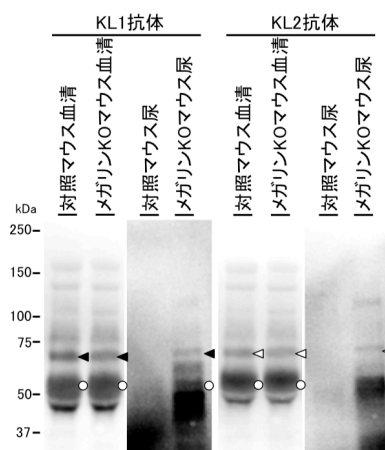


図3. 血中・尿中klothoの検出

(2) メガリンノックアウトにおけるリン代謝調節の評価

ノックアウトマウスとコントロールマウスを通常飼料による飼育を行い、24 時間蓄尿後、解剖し採血および腎臓サンプルの回収を行った。血中リン濃度、尿中リン排泄を 2 群で比較したが、メガリンノックアウトによる

影響は認められなかった。この結果は定常状態における生体内リン代謝調節にはメガリンの関与が大きい事を明らかにした。またリン代謝調節因子である、血中活性型ビタミンD濃度、血中FGF23濃度も検討したが、メガリンノックアウトマウスとコントロールマウスで差は認められなかった。

(3) メガリンノックアウトにおける高リン食負荷時のリン代謝調節

上記の結果を考慮し、研究計画通り、メガリンノックアウトマウスとコントロールマウスに高リン食負荷を短期間(10日間)行った。高リン食負荷後、24時間蓄尿サンプルと血液サンプルのリン濃度を検討したが、高リン負荷群で著明なリン濃度、ないしリン排泄の増加が確認できなかった。

そこで高リン食負荷の期間を延長し、12週間の負荷モデルを作成し解析した。コントロールマウスの高リン食負荷群で、通常リン食群と比較して血中リン濃度の上昇と、尿中リン排泄増加を認め、高リン負荷モデルの確立が確認できた。メガリンノックアウトマウスに対する影響では、まず通常リン食群ではまったくコントロールマウスと比較して差はなく、定常状態のリン代謝にはメガリンノックアウトの影響が強く現れないことが再確認された。しかし一方の高リン食負荷群では、コントロールマウスと比較し、血中リン濃度がより高く、かつ尿中リン排泄がコントロールマウスと比較し定値であることが明らかになった。すなわちメガリンノックアウトマウスでは過剰なリンを排泄する、つまりリン再吸収を減少させる機序に障害が起きている可能性がある。

マウスの腎近位尿細管におけるリン再吸収はその大部分がリン輸送体、NaPi2aに依存することから、上記高リン食負荷モデルの腎臓におけるNaPi2aタンパク質の発現を検討した。結果、高リン食負荷を行ったコントロールマウスでは近位尿細管細胞冊子縁膜上からNaPi2aが細胞内へエンドサイトーシスされているが、メガリンノックアウトマウスでは冊子縁膜上に局在したままであることを明らかにした。

この高リン食負荷モデルにおける血中活性型ビタミンD濃度やFGF23濃度を検討したが、コントロールマウスとノックアウトマウスに有意差はなく、NaPi2aタンパク質の制御そのものに障害が起きていることが想定された。

(4) 組換え体 klotho タンパク質の作成

NaPi2a 制御に関与する、そしてメガリンのリガンドであることを本研究で示した klotho タンパク質の組換え体作成を行った。動物種としてマウス、ラット、ヒトの組換え体 klotho の作成を試みたが、マウスとヒトは3'末端側の遺伝子配列に極端な偏りがあり、人口遺伝子合成を試みたが成功していな

い。一方、ラットでは組換え体 klotho の作成に成功した。研究計画を立てた通り膜タンパク質である klotho の細胞外領域全長、KL1 領域、KL2 領域のそれぞれを作成することができた。この3種類ともタンパク質サイズ、特異抗体による確認を行い、目的とする klotho タンパク質であることをウエスタンブロッティングにて確認済みである。

(5) QCM 法によるメガリンと組換え体 klotho タンパク質の結合性の検討

メガリンノックアウトマウスの尿中から klotho タンパク質を検出しており、これは klotho タンパク質がメガリンを介して近位尿細管細胞細胞にエンドサイトーシスされる可能性を示唆している。これを検証するため、水晶共振子マイクロバランス法(QCM)を用いてメガリンと作成した3種の組換え体 klotho タンパク質の結合性を評価した。この目的のため、ラットの腎臓よりメガリンを精製している。精製メガリンをQCMセンサーにアミンカップリング法を用いて結合させ、klotho タンパク質を添加しその結合性を評価した。結果、いずれの組換え体 klotho タンパク質もメガリンと結合することが示された。また従来メガリンのリガンドであることが示されている分子同様に、カルシウムイオン依存的な結合様式であることも明らかにした。

(6) 組換え体 klotho タンパク質投与による klotho ノックアウトマウスのレスキュー実験

本研究で作成した組換え体 klotho タンパク質を klotho 遺伝子のノックアウトマウスに投与し、いずれの klotho タンパク質が作用するのか、さらにそのメカニズムを検討した。klotho ノックアウトマウスに各種組換え体 klotho タンパク質を投与し24時間蓄尿サンプルにおいて、リン排泄の回復・改善効果を検討した結果を図4に示す。単独投与でリ

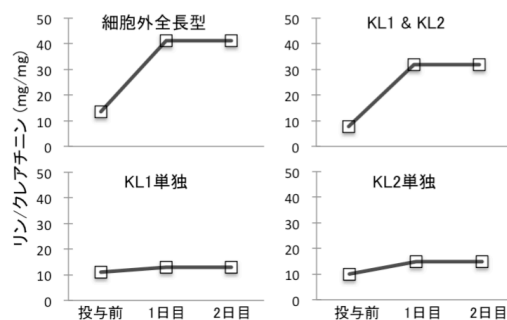


図4. klotho投与による尿中リン排泄の変化

ン排泄増加を認めたものは細胞外領域全長型だけであり、KL1 と KL2 領域は単独では効果を発揮しなかった。しかし一方で、KL1 領域と KL2 領域を同時に投与した場合、細胞外領域全長型と同程度の効果を認めることを明らかにした。

この結果は糸球体を濾過する klotho は KL1 と KL2 の形態になるものの、生理作用を發揮

する際にはそれぞれ両者が必要である可能性が示唆された。なお、本実験は再実験が進行中であり再現性の確認を行っている。

(7) メガリン/klotho/NaPi2a、3者の複合体形成の可能性についての検討

上記の結果では、リン利尿作用を発揮するためにはKL1領域とKL2領域の両方が必要である可能性が明らかになった。本研究課題であるメガリン/klotho/NaPi2aの相互作用について、まずメガリンとNaPi2aの結合について免疫沈降法にて検討を現在行っている。

本研究課題の仮説では、可溶化した腎臓サンプルではklothoタンパク質存在下でメガリンとNaPi2aの結合性が増加することを想定しているため、組換え体klothoタンパク質の量、組み合わせを検討している。また、FGF23の関与も想定し添加群を設定している。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 頌治 (Kawahara Shoji)

新潟大学・医歯（薬）学総合研究科・特任助教

研究者番号：70645209