

氏名	辻 芳 仁
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第3166号
学位授与の日付	平成20年1月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科脳統御医科学系専攻
学位論文題目	Alpha-Klotho as a regulator of calcium homeostasis (カルシウム代謝制御における Alpha-Klotho の役割)

論文調査委員 (主査) 教授 野間昭典 教授 福田和彦 教授 芹川忠夫

### 論文内容の要旨

*klotho* 遺伝子変異マウスは、ビタミンD過剰症の結果、多彩な老化様症状を呈する。I型膜蛋白質である Klotho は、体液カルシウム濃度を決定する脳脈絡膜、副甲状腺、遠位尿細管に強く発現しており、カルシウム制御に重要な役割を果たしていることが予想された。本研究では、Klotho の分子機能を検証し、どのような様式でカルシウム代謝にかかわるのかを探索した。

まず、マウス脈絡膜を用いた免疫沈降により、Klotho に結合する分子として  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase を同定した。Klotho と  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase との結合は、マウス腎臓、ヒト副甲状腺でも認められた。マウス脈絡膜と EGFP 結合型  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase alpha subunit を強制発現させた HeLa 細胞を用いて、ショ糖密度勾配遠心分画と免疫沈降を行い細胞内局在を調べたところ、Klotho は形質膜上には殆ど発現しておらず、両分子は細胞内小胞で結合していると推定された。次に、Klotho が  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase の機能を制御している可能性を検証するために、マウス摘出脈絡膜を用いて、細胞外カルシウム濃度を変化させ、細胞膜表面の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase の発現量の変化を観察した。野生型マウス脈絡膜では、細胞外カルシウム濃度が低い時には、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase の細胞膜表面量は速やかに上昇したのに対し、高カルシウム濃度では減少した。Klotho 変異マウス脈絡膜では、そのような変化は見られなかった。即ち、Klotho は細胞外カルシウム濃度の変化に素早く応答して  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase の細胞表面への移動を制御する事で、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase の機能を調節することが推定された。では  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase がリクルートされる時、Klotho にどのような変化が起きるのであろうか。申請者は、Klotho が低カルシウムに応答して膜結合部位近傍で切断を受け、体液中に分泌されるという現象を見いだした。併せて考えると、細胞外カルシウム濃度変化によって、Klotho は分泌され、同時に  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase は細胞表面にリクルートされるというモデルが成り立つ。

それでは、Klotho と  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase は、個体レベルでどのようにカルシウム制御に関るのであろうか。申請者は副甲状腺における PTH 分泌機能を観察した。野生型マウスでは、血清カルシウム濃度を低下させると、PTH の分泌が速やかに誘導されるが、*klotho* 遺伝子欠失マウスでは PTH 分泌応答能が顕著に低下していた。野生型マウスに  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase 阻害剤である ouabain を投与すると PTH 分泌量は *klotho* 変異マウスレベルにまで低下した。すなわち、Klotho/ $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase システムは、PTH 分泌に必須であることが示された。

本研究により Klotho は、細胞外カルシウム濃度に反応して  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase のリクルートを制御しており、脈絡膜、尿細管においてはカルシウム輸送、副甲状腺においては PTH 分泌を行うために必要であることが判明した。以上のことから Klotho は、これらの機能を介して個体カルシウム恒常性に関与していることが推定された。

### 論文審査の結果の要旨

*klotho* 遺伝子変異マウスは、ビタミンD過剰症の結果、多彩な老化様症状を呈する。I型膜蛋白質である Klotho は、体液カルシウムイオン濃度を決定する脳脈絡膜、副甲状腺、遠位尿細管に強く発現しており、カルシウム制御に重要な役割を果

たしていることが予想された。

ヒト副甲状腺を用いた実験で、*Klotho* と  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase が結合していることが判明した。マウス副甲状腺ホルモン分泌機能を観察したところ、野生型マウスでは、血清カルシウムイオン濃度を低下させると、副甲状腺ホルモンの分泌が速やかに誘導されるが、*klotho* 遺伝子欠失マウスでは副甲状腺ホルモン分泌応答能が顕著に低下していた。野生型マウスに  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase 阻害剤であるウアバインを投与すると副甲状腺ホルモン分泌量は *klotho* 変異マウスレベルにまで低下した。*klotho* 変異マウスにウアバインを投与すると副甲状腺ホルモン分泌抑制を認めなかった。すなわち、*Klotho* と  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase は共同して、PTH 分泌に関与することが示された。

本研究により *Klotho* と  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase は、副甲状腺が細胞外カルシウムイオン濃度の低下に反応して、PTH 分泌を行うために必要であることが判明した。以上のことから *Klotho* は、個体カルシウム恒常性に関与していることが推定された。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 19 年 11 月 26 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。