

クロトーによるミネラル代謝システムにおけるCD13の機能解明

先端医療振興財団 医薬品・先制医療 開発部門
伊村 明浩

1. はじめに

緒言

カルシウム(Ca)とリン酸(Pi)は、神経と筋肉の活動に必須であるだけでなく、骨の形成維持にとって重要である。これらミネラルが、体液中で均衡を保つことはよく知られている。我々のグループは、クロトー分子が体液ミネラル制御に必要であることを明らかにして来た。クロトーがミネラル恒常性に関わる第一の機構として、Na,K-ATPase(Na ポンプ)との結合に基づいて尿細管 Ca 再吸収および副甲状腺ホルモン(PTH)の分泌を行い、結果として体液 Ca 上昇に働く。第二の機構として、骨由来ホルモン FGF23 の尿細管受容体としてナトリウム依存性リン酸トランスポーター(NaPi)のエンドサイトシスを介して、体液 Pi 濃度を低下させる(添付図 1) (Science07 伊村ら, PNAS10 富山ら)。ミネラルバランスを決定する因子は PTH, ビタミン D のホルモン群であるが、クロトーは両者に働き、相互のバランスを調節する。Na は体液中最大量の陽イオンなので、ミネラル調節のため Na を利用するクロトー機構は合理的な生体戦略と考えられた。

目的

クロトー依存性のNa,K-ATPaseリクルート機構およびFGF23シグナル機構を可能にする細胞内マシナリーを明らかにすることを旨とし、鍵を握る分子と考えられるCD13の生物学的役割を解明する

背景

受賞者は、クロトー依存性のNa,K-ATPaseリクルート機構がどのようにして駆動されているのか、また、この機構を起動するインプットシグナルは何か、という疑問を持った。そこで、クロトーが発現している細胞に有意に局限して発現する膜分子、特に副甲状腺において発現しクロトーシステムに関連する局在を示す点に留意してスクリーニングした(図2)。その中で、CD13がクロトー分子と結合する膜分子であるうえ(図3)、クロトー機構と関連する候補分子であることを見いだした。CD13はmyeloid cell、血管、近位尿細管などに発現するII型膜分子である。従来、多くの抗体が樹立されており、膜分子マーカーとして使用されて来た。しかしながら、myeloid cell の発生や細胞機能におけるCD13の役割に焦点を当てて作製されたKOマウスでは、それらの欠損は発見されなかった。

序論

CD13 は尿細管、副甲状腺、脳脈絡叢に発現していることから、クロトー機構に関与する可能性があるかと推定した。実際、Geo-Profile(NCBI)を利用して検討すると、ミネラル異常を示す3系統のマウス(FGF23-Tg, AQP11-KO, CLDN16-KO)の各腎臓におけるクロトーとCD13の遺伝子発現変動の方向は、

完全に一致している。以上の情報、すなわち局在、分子間結合、遺伝子改変マウスにおける相関傾向の3つを根拠に、CD13 ノックアウトマウスを作製し、ミネラル恒常性機構における CD13 の役割を解明し、クロトーシステムにおける関係性を明らかにしようと考えた。

2. 方法

CD13 ノックアウトマウスを作製し、血液、骨などミネラル関連指標を解析した。腎臓におけるクロトー遺伝子発現や局在を解析した。また、ビタミン D を投与した時の腎臓発現遺伝子 (Calbin D 9k, Calbin D 28k, TRPV5, クロトー) の変動を解析した。

3. 結果 研究成果

このマウスは外観上問題がないように見え、繁殖率も野生型と同等であった。現在まで、CD13 をミネラル関連因子として解析した報告はない。そこで CD13-KO マウスの血液成分を解析したところ、Ca, Pi, PTH, FGF23 濃度は正常範囲であり、また、骨の概観も正常であった。また、クロトー遺伝子の発現レベルも正常であり、通常飼育下では、顕著なミネラル代謝異常は検出されなかった。加えて、ビタミン D を投与した時の腎臓発現遺伝子 (Calbin D 9k, Calbin D 28k, TRPV5, クロトー) の変動を解析したところ、野生型に比較して、特異な反応を見いだす事はできなかった。しかしながら、CD13 ノックアウトマウスでは、血中ビタミン D 濃度が低下していた (図 4)。この表現型をもとに推定すると、ビタミン D 産生 (活性化) 機構が障害されているか、ビタミン D の低下によりミネラル上昇を代償しているか、の二つの可能性が考えられる。前者の場合は、FGF23/クロトー依存性のビタミン D 抑制シグナル系を減弱する方向に CD13 は働いていると考えられる (仮説 A)。しかしながら、この仮説の場合は、くる病の病態に近い表現型が予想されるので、血中ミネラル値データと必ずしも整合しない可能性がある。一方後者の場合は、CD13 欠損によってミネラル濃度が上昇傾向に偏るために、代償的にビタミン D が抑制されたと考えるべきである (仮説 B)。この分別のために、腎臓を摘出してビタミン D 活性化酵素 CYP27B1 の発現レベルを解析した。すると、CYP27B1 発現レベルは低下しており、これがビタミン D 低下の理由であると推定された。

4. 考察 まとめ

CD13 ノックアウトマウスでは、CYP27B1 発現レベル低下によるビタミン D 濃度の減少が表現型として見いだされた。一方、血中 Ca, Pi は正常値を示す。これらを併せ考えると、初期的な機能不全は、血中濃度を含めた体内ミネラル量が過剰になる事態を防ぐために、代償的にビタミン D が低下していると考えられる理路が妥当であろう。すなわち、何らかの原因で Ca, Pi が過剰に摂取されるか、あるいは、僅かしか排出されないという障害が隠されていると推定される。CD13 が腸管、尿細管に発現している事を考えると、過剰摂取の場合は腸管の、また、排泄 (再吸収) 障害の場合は尿細管の、それぞれミネラルトランスポーター分子群の特性に影響を与えているという仮説が最も考えやすい。

あるいは、消化管、尿細管の両方で機能している事も考えうる。これを臓器ごとに検証する必要がある、現在臓器特異的な Cre 発現マウスとの掛け合わせにおいて、CD13 部位特異的ノックアウトマウスを作成中である。以上の結果から、CD13 は消化管、尿細管において、ミネラル輸送分子の活性ないし局在に対して抑制的な機能を用いる事が示唆された。

5. 発表論文、参考文献

1. Plasma soluble α -klotho protein levels in premature and term neonates: correlations with growth and metabolic parameters. Sihanidou , Garatzioti M, Lazaropoulou C, Kourlaba G, Papassotiriou I, Kino , Imura A, Nabeshima Y , Chrousos G.

Eur J Endocrinol. 2012 Sep;167(3):433-40

2. Serum soluble α -klotho in hemodialysis patients.

Yokoyama K, Imura A, Ohkido I, Maruyama, Yamazaki Y,, Hasegawa H, Urae J, Sekino H, Nabeshima YI , Hosoya T.

Clin Nephrol. 2012 May;77(5):347-51.

3. Decreased renal α -Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion.

Asai O, Nakatani K, Sakan H, Imura A, Yoshimoto S, Samejima K, Yamaguchi Y, Matsui M, Akai Y, Konishi N, Iwano M, Nabeshima Y, Saito Y. *Kidney Int. 2012 Mar;81(6):539-47*

4. Circulating levels of soluble alpha-Klotho are markedly elevated in human umbilical cord blood. Ohata Y, Arahori H, Namba N, Kitaoka T, Hirai H, ada K, Nakayama M, Michigami , ImuraA, Nabeshima Y, Yamazaki Y, Ozono K. *J Clin Endocrinol Metab. 2011 Jun;96(6):E943-7.*

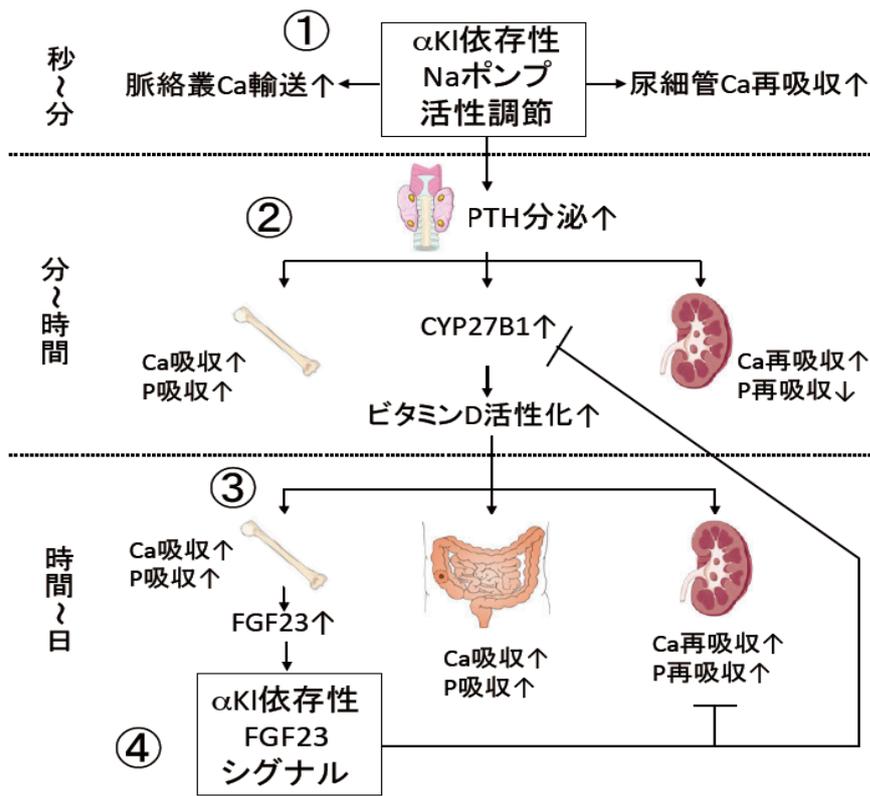


図1

クローターによるミネラル代謝マップ

①クローター(α KI)によるNaポンプのリクルート活性調節により、秒から分の速さでCaが輸送ないし再吸収される

②クローター(α KI)によるNaポンプのリクルート活性調節により、低Caに反応して秒から分の速さで副甲状腺からPTHが分泌される PTHは骨、腎臓からCaを動員する

③PTHによりビタミンD活性化酵素 CYP27B1が転写され、数時間後に活性化ビタミンDが増加する これにより、骨、腎臓、腸管からCa、Piが動員される ビタミンDの半減期は10時間である

④上昇したPiに反応して骨から FGF23が分泌され血中濃度が上昇する 尿細管でのクローター(α KI)依存性のシグナル受容により、10時間から1日の単位で、NaPiのエンドサイトーシスとCYP27B1の抑制が起こり、体液Pi濃度が下降する

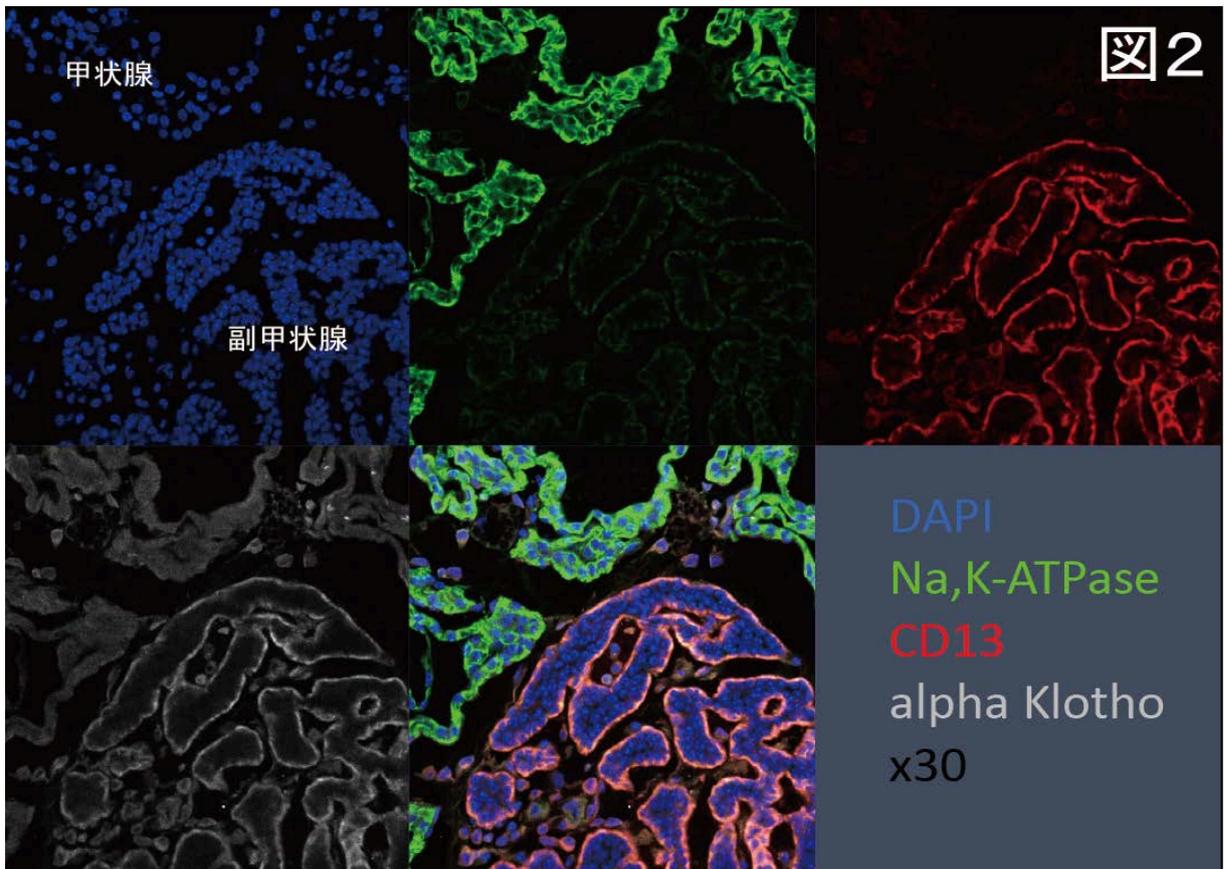
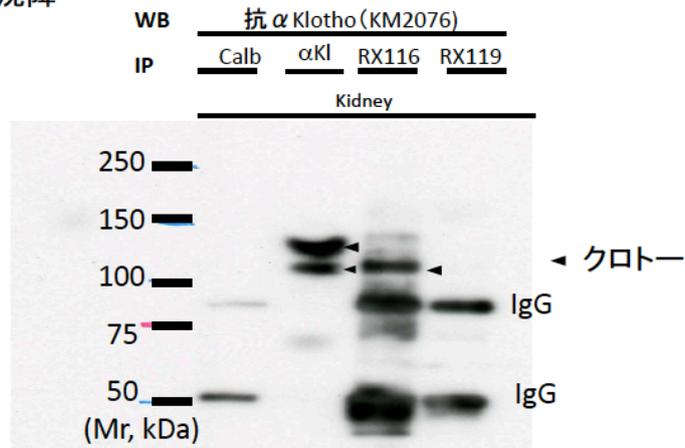


図2

マウス副甲状腺の組織編縁に沿って、Na,K-ATPase, CD13, aKlotho が近似の局在を示す。aKlotho は Na,K-ATPase と CD13 の両方に結合している事が判った。

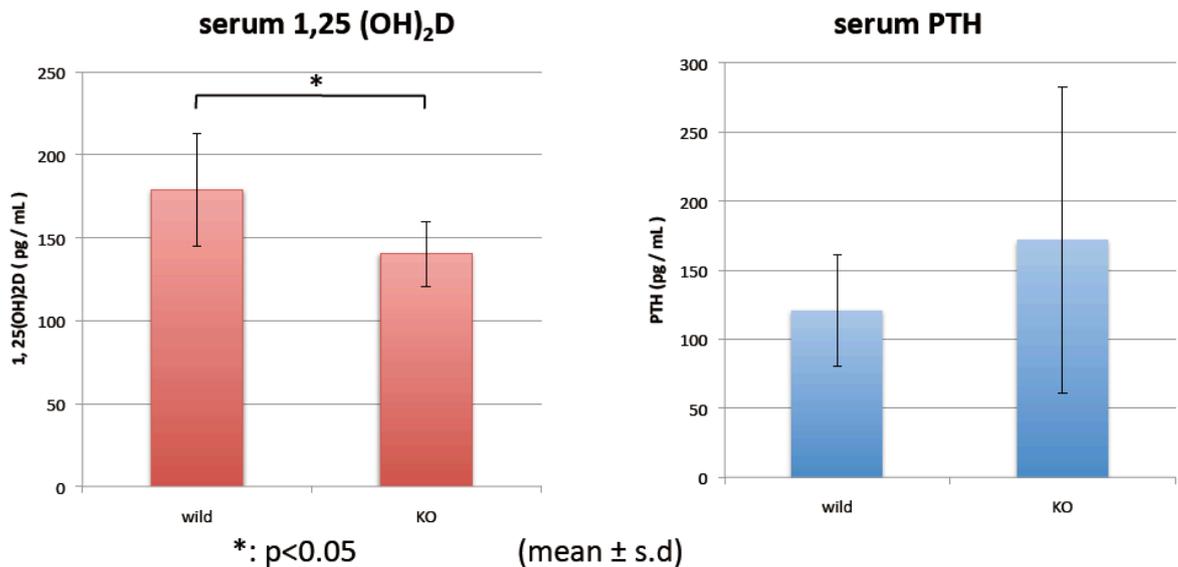
図3

マウス腎臓からの免疫沈降



CD13には糖鎖修飾のパターンにより少なくとも5種類のサブタイプが報告されている。申請者は抗CD13抗体として、Rx116, Rx119という独立の2種類の抗体を樹立した。マウス腎臓膜画分のライセートからそれぞれを用いて免疫沈降を行い、クロー抗体でウエスタンすると、Rx116の免疫沈降物(共沈物)として125kDa付近にクロー分子(◀印)が見いだされた。Rx119抗体では共沈しない。クロー分子は通常、120, 130kDaの2本のバンドが見られる事から(α Klのレーン参照)、Rx116抗原に特異な α Klが結合している事が判る。(註: Calbはnegative control抗体)

図4 CD13 KOマウス血液データ



CD13KOマウスの血中活性型ビタミンDは2~3割低下している。PTHは上昇している可能性がある。それに関わらず、血中Ca, Piは正常であり、ミネラルバランスの変動が示唆される。