



Title	Klotho Protein Activates the PKC Pathway in the Kidney and Testis and Suppresses 25-Hydroxyvitamin D3 1 α -Hydroxylase Gene Expression
Author(s)	今井, 道生
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45531
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照ください 。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	いま い みち お 今 井 道 生
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 19278 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学 位 論 文 名	Klotho Protein Activates the PKC Pathway in the Kidney and Testis and Suppresses 25-Hydroxyvitamin D ₃ 1 α -Hydroxylase Gene Expression (クロート蛋白は腎臓および精巣において PKC 経路を活性化し、25-ヒドロキシビタミン D ₃ 1 α アルファ-ヒドロキシラーゼ遺伝子発現を抑制する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 荻原 俊男 (副査) 教 授 下村伊一郎 教 授 大菌 恵一

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕：Klotho 変異マウスは、動脈硬化、不妊、皮膚萎縮、骨粗鬆症、短命など、ヒトの老化に近い症状を来すことから老化モデル動物として知られている。Klotho 遺伝子の機能に関しては不明な点が多いが、Klotho 変異マウスにおいて血中カルシウムおよびリン濃度が高値であり、異所性石灰化を来すことからカルシウム代謝を調節していると考えられている。腎臓において 25-ヒドロキシビタミン D₃ 1 α -hydroxylase (1 α -hydroxylase) 酵素は、不活性型ビタミン D である 25-ヒドロキシビタミン D₃ を、活性型ビタミン D である 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ へと変換する。Klotho 遺伝子は腎臓や精巣に多く発現しており、また Klotho 変異マウスの腎臓において血中カルシウム濃度の上昇に関わらず、1 α -hydroxylase 遺伝子の発現が亢進していることから、Klotho 蛋白が 1 α -hydroxylase の調節に関与している可能性が示されている。本研究では細胞を用いて Klotho 蛋白による 1 α -hydroxylase 遺伝子の調節および細胞内シグナルの変化を調べることを目的とした。

〔方法〕：Klotho 蛋白を過剰発現させるために、pCAGGS ベクターに膜型 Klotho 遺伝子の cDNA を組み込み、Klotho プラスミドを作成した。次に、COS-1 細胞（サル腎臓近位尿細管細胞）へリポソーム法により Klotho プラスミドを遺伝子導入し、そのメディウムを Klotho 蛋白を含むコンディショニングメディウム（Klotho メディウム）として用いた。コントロールとしては pCAGGS ベクターの導入によるメディウムを用いた。Klotho メディウムにおける膜型 Klotho 蛋白はウェスタンブロット法により確認した。細胞はコンディショニングメディウムによりインキュベートし、RNA を回収した後、リアルタイム PCR 法により遺伝子発現を調べた。

〔成績〕：Klotho メディウムはコントロールに比し LLC-PK1 細胞（ブタ腎臓近位尿細管細胞）における 1 α -hydroxylase の発現を濃度依存的に抑制した。また Klotho メディウムは LLC-PK1 細胞において cAMP および PKC 経路を活性化した。さらに、IBMX (cAMP 分解阻害薬)、Rp-cAMP (cAMP 阻害薬)、forskolin (cAMP 増強薬)、staurosporine (PKC 阻害薬)、PMA (PKC 増強薬) を添加し、Klotho メディウムの 1 α -hydroxylase 遺伝子発現抑制に対する効果を調べたが、1 α -hydroxylase の発現抑制に変化はなかった。

次に、各細胞において Klotho 蛋白による cAMP、PKC 活性の変化を調べた。cAMP 濃度は LLC-PK1 細胞、HUVEC（ヒト血管内皮細胞）、HELA（ヒト子宮頸癌細胞）、3T3L1（マウス線維芽細胞）、COS-1 細胞などにおいて上昇した。一方、PKC 活性は RPTEC（ヒト腎臓近位尿細管細胞）、LLC-PK1 細胞、TM3（マウスライディッシュ細胞）といった Klotho 遺伝子を発現している臓器の細胞においてのみ上昇した。

〔総括〕：Klotho 蛋白によって腎臓における 1α -hydroxylase 遺伝子の発現は抑制された。この結果は、Klotho 変異マウスにおける 1α -hydroxylase 遺伝子発現の亢進と合致するものであった。しかし、その調節は cAMP、PKC 経路に非依存的であり、non-cAMP、non-PKC 経路による調節機構の存在が示唆された。また、Klotho 蛋白は多くの細胞において cAMP 経路を活性化したが、それに対して PKC 経路は腎臓と精巣においてのみ活性化された。以上、Klotho 蛋白は循環ホルモンとして多くの細胞に cAMP 経路活性化による作用を及ぼしている一方、Klotho が発現している腎臓と精巣においては PKC 経路を通じて異なる臓器特異的機能を発揮している可能性がある。

論文審査の結果の要旨

Klotho 変異マウスは、動脈硬化、骨粗鬆症・短命などヒトの老化に近い症状をきたす。また腎臓における 1α -hydroxylase 発現上昇により血中の活性型ビタミン D や Ca の上昇など、Klotho は老化及び Ca 代謝に関与する。本研究は膜型 Klotho 蛋白を過剰発現させるプラスミドを作成し、細胞に遺伝子導入して Klotho 蛋白の機能を調べた。まず近位尿細管細胞への Klotho プラスミド導入によって 1α -hydroxylase の発現が抑制されることが明らかとなった。 1α -hydroxylase の調節経路として cAMP と PKC が知られているが、Klotho によるこれらの阻害剤や増強薬は 1α -hydroxylase の抑制に影響を与えなかった。よって Klotho による 1α -hydroxylase の抑制には cAMP や PKC 以外の経路が作用していると考えられた。次に各細胞での Klotho による cAMP および PKC 活性を見たところ、cAMP が殆どの細胞において上昇を示したが、PKC は Klotho が発現する腎臓と精巣においてのみ上昇を示した。よって Klotho 蛋白は循環ホルモンとして多くの細胞に cAMP 経路活性化による作用を及ぼしている一方、Klotho が発現している腎臓と精巣においては PKC 経路を通じて異なる臓器特異的機能を発揮している可能性が示された。本研究により、Klotho 蛋白の Ca 代謝における細胞内シグナルの一部が明らかになり、この結果は、今後老化における Klotho 蛋白の機能解明につながる可能性を示しており、学位の授与に値するものと考えられる。