

クローターによるミネラル代謝システムにおける CD13 の機能解明

伊村 明浩

公益財団法人先端医療振興財団医薬品開発グループ

概要 (背景、目的) クローター(α Kl)分子はミネラル代謝の中核的役割を担っており、それは Na,K-ATPase や FGF23 をはじめ、複数の結合分子との相互作用により可能となっている事実が解明されつつある。しかし、どのようにしてミネラル濃度を感知するのか、また、どのようにして Ca 輸送や PTH 分泌などを行うのか、という問題ははるまで解明されていない。 α Kl 発現細胞が担当しているミネラル代謝機構を理解するため、新たな構成因子と想定される CD13 の機能を解析することが本研究の目的である。

(方法) 脈絡叢を抗原としてモノクローナル抗体を多数作製し、そのうち副甲状腺と尿細管を認識する事を指標に複数の抗体を樹立した。それらの抗体のうち、抗原の発現様式がミネラル代謝と強く関連すると考えられる抗体 Rx116 を選び、抗原を同定した。加えて抗体染色、遺伝子発現の解析に供した。

(結果) Rx116 が認識する抗原は CD13 であることが判明した。膜分子である CD13 は糖鎖修飾により少なくとも5つのサブタイプより構成される事が判っているが、Rx116 はそのうちのマイナーな一つのタイプを認識していると考えられた。ミネラル代謝異常のモデルと考えられる α Kl 遺伝子欠損マウスおよび VDR 遺伝子欠損マウスの副甲状腺を染色すると、Rx116 抗原は発現が上昇している事が示唆された。また、遺伝子発現情報から、FGF23 過剰発現マウスで CD13 発現は有意に低下している事、腎臓で CD13 とクローター分子は結合している事を示した。 α Kl 分子と CD13 の分子間直接作用が明らかとなったので、最近 CD13 遺伝子欠損マウスを作成した。

(まとめ) CD13 はこれまで血管新生や myeloid 細胞のマーカーと考えられて来たが、ミネラル代謝関連の機能を有する可能性を指摘できたと考えている。作成した遺伝子欠損マウスは部位特異的ノックアウトが可能であり、おもに尿細管と副甲状腺の機能に焦点を当てて解析する予定である。

1. はじめに

α Kl 遺伝子は副甲状腺主細胞、脳脈絡叢、腎臓尿細管上皮細胞に発現している。これらの細胞は細胞外 Ca イオン変動(低下)を感知する能力があり、 α Kl 依存性 Na,K-ATPase リクルートを引き起こし、結果として Ca 輸送および PTH 分泌を行う⁽¹⁾。PTH 上昇はビタミン D 活性化を引き起こし、血中カルシウムとリン酸濃度が上昇する。過度のミネラル濃度上昇を抑えるため、骨組織から FGF23 が分泌されビタミン D 活性化酵素 CYP27B1 の発現抑制が起こる。FGF23 の受容体への結合において、 α Kl が必須である⁽²⁾。すなわち、 α Kl はミネラル制御のほぼ全てのステップに直接間接に関与していることが明らかとなった

(**図 1**)^(3,4)。それゆえ、 α Kl の特異的発現部位、すなわち脈絡叢、遠位尿細管、副甲状腺の細胞群は、ミネラルの感知や制御に関する中核的な機能が備わっていると考えられる。クローター発現部位の特異性は、遠位尿細管におけるカルシウム輸送分子群 NCX1、Calbindin D28K、TRPV5 との共染色からも示唆される。現在まで、体液 Ca を感知する分子として calcium sensing receptor (CaR) が報告されているものの、CaR は脈絡膜には発現しておらず、Ca 感知の全体像を説明することはできない。また、副甲状腺細胞がリン酸濃度を感知する能力があること⁽⁵⁾、あるいは破骨細胞がカルシウムとリン酸両方の濃度依存性に活性が変化することが報告されているが、リン酸に対するセ

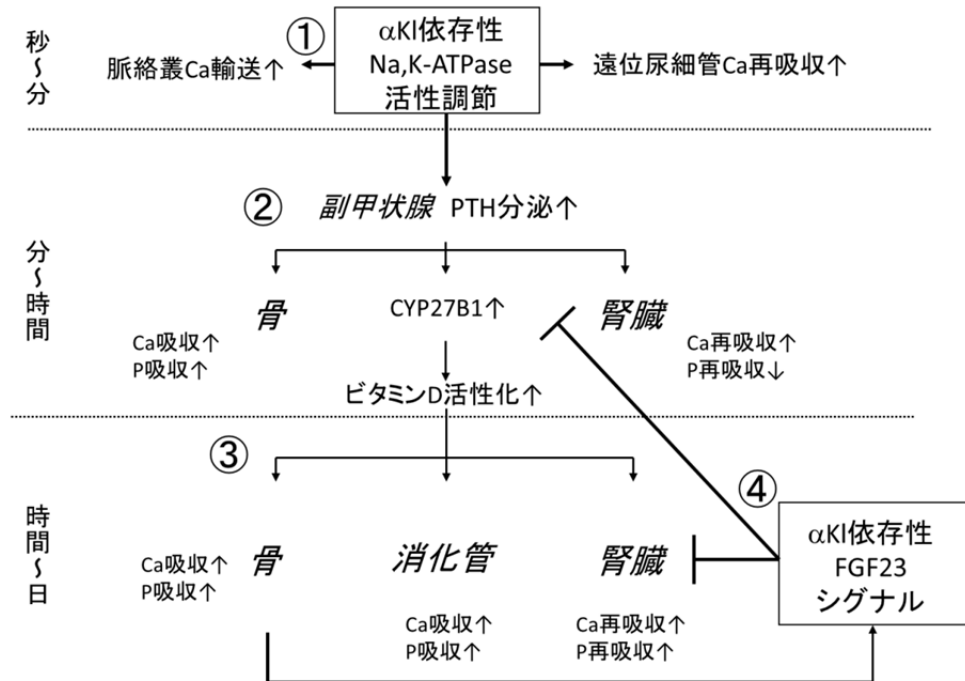


図 1. α Klotho 依存性 Na,K-ATPase リクルートにより、PTH の分泌が秒から分の単位で起こり、PTH は骨吸収および腎臓でのカルシウム再吸収を引き起こす。同時にビタミン D 活性化酵素の転写促進を引き起こし、増加した活性型ビタミン D が骨、消化管、腎臓に作用してカルシウム、リン酸の再吸収を増大させる。リン酸濃度の増加は骨からの FGF23 分泌を促し、 α Klotho 依存性 FGF23 シグナルによるビタミン D 活性化酵素およびリン酸再吸収の抑制を招く。このカスケードを構築する鍵分子である事から、 α Klotho は Ca 恒常性を維持する機構の全カスケードに関与するといえる。①細胞自律的作用 (秒単位), ②PTH (分単位), ③ビタミン D (時間単位), ④FGF23 (日単位)

ンサー分子の実在はいまだ明らかではない。また、 α Kl は一回膜貫通型分子であるうえ Ca 結合ドメインを有しないため、 α Kl 分子自身のミネラル感知能力については想定できない。

以上の経緯から、「 α Kl 発現細胞に特異的に発現する分子群」を同定することにより、ミネラル感知および代謝システムを総合的に理解できると期待して以下の実験を行った。副甲状腺、脈絡叢、遠位尿細管に発現する膜分子の抗体ライブラリを作成する目的で、マウス脈絡叢に対する抗体を約 2 万個作成した。そのうち、「少なくとも脈絡叢と尿細管を認識するもの」で、且つ「副甲状腺を認識するが甲状腺は認識しないもの」という基準でスクリーニングした。その結果、3 器官の上皮細胞を特徴的に認識するモノクローナル抗体を複数樹立することに成功した。中でも特に興味深い抗体が Rx116 であった。Rx116 は、 α Kl 発現臓器である脈絡叢、副甲状腺、尿細管での発現パターンは α Kl とよく似ていた。また上記以外に、消化管、脂肪、

血管、骨髄に染色陽性細胞が認められた。現在まで、ミネラル代謝関連で、このような分布を示すものは知られていない。そこで、この抗原の annotation を同定し、Rx116 抗原の機能を解析することによりミネラル代謝についての理解を進めることを目的として、本研究を開始した。

2. 研究・実験方法

2.1 実験動物ならびに飼育条件

日本 SLC より C57/B6J 雄マウスを購入し、本研究施設の規定に従って飼育した。また各種遺伝子改変マウスは、理化学研究所 CDB の規定に基づいて飼育の上、実験、観察に供した。

2.2 抗体作成

マウス脈絡叢をパラホルムアルデヒドによって固定した後、界面活性剤 TritonX-100 で処理し、ホール臓器のままラットに免疫した。ラットリンパ節細胞を用いてハイブリドーマを作成後、「少なくとも脈絡叢と尿細管を認識するもの」

で、且つ「副甲状腺を認識するが甲状腺は認識しないもの」という基準で組織染色によるスクリーニングを実施し、結果として 23 個の抗体を樹立した。

3. 結果

3.1 Rx116 抗体を用いた解析

これらの抗体は、発現部位の特性から、ミネラル代謝に関わる分子を認識していると期待された。そこで、ハイブリドーマ上清を用いて VDR-遺伝子欠損 (KO) マウスおよび α KI-KO マウスの副甲状腺について、組織染色を行った。VDR-KO マウスは、ビタミン D からの抑制的フィードバックが欠損しているため、副甲状腺が過形成し、PTH の発現と分泌が上昇している系統である。また α KI-KO は、ビタミン D 過剰症のため副甲状腺の形成と PTH 産生分泌が抑制されている系統である。この 2 系統を「ミネラル代謝異常モデル」と仮定して検討することにした。23 抗体で副甲状腺を染色し、それぞれ野生型マウスと比較したところ、「VDR-KO マウスにおいて発現が上昇しており、 α KI-KO マウスでは発現が低下している」ことを示す抗体を見いだ

し、Rx116 と命名した。VDR-KO マウスの副甲状腺における α KI、Rx116 の染色態度を示す (図 2)。主として細胞内に局在し、 α KI と Rx116 がほぼ完全に merge していることが観察された。

3.2 Rx116 抗原の同定

抗原 annotation のため、免疫沈降精製と MS 同定を実施した。免疫組織染色法では、脂肪細胞に Rx116 抗体が強く反応したので、脂肪から免疫沈降を行うことに決定した。マウス脂肪組織からライセートを調整した後、ビオチン化 Rx116 抗体をstreptavidinコート磁気ビーズに結合させて免疫沈降を行い、SDS-PAGE 後ゲルを銀染色で解析した (図 3)。その結果、約 150 kDa のバンドが抗原と考えられた。バンド切り出し後インゲルでトリプシン消化し、MALDI-TOF-MS 解析を行った。その結果、抗原は CD13 (alanyl-aminoendopeptidase, ANPEP) であることが示された。そこでマウス CD13 発現ベクターを用いて HeLa 細胞に CD13 を再構成し Rx116 抗体を作用させたところ特異的に認識したので、Rx116 抗体は CD13 を認識することが確定した。

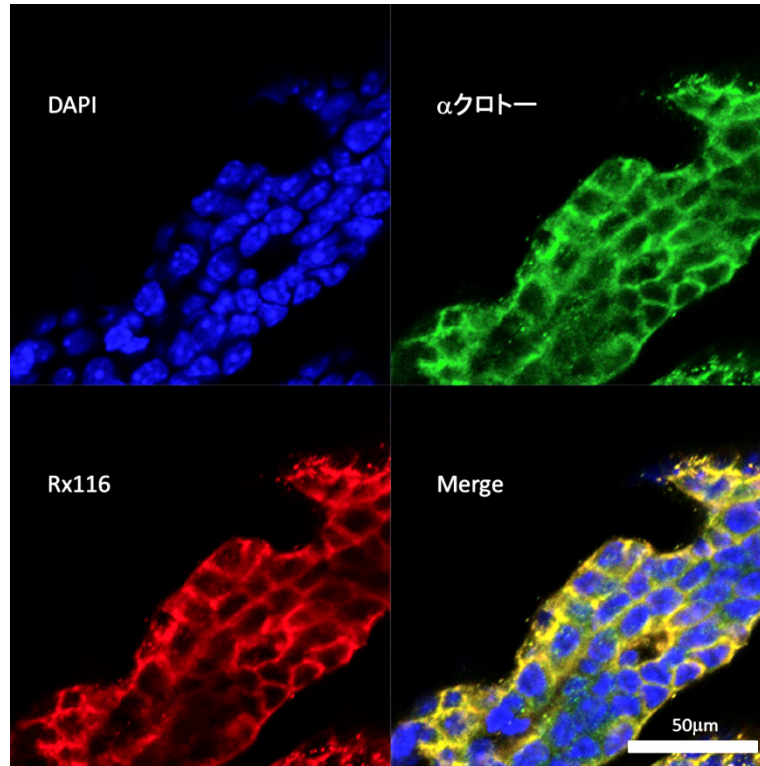


図 2. 副甲状腺における alpha Klotho (緑)、Rx116 (赤)、核 (青) の共染色像、x20。ほぼ CD13 と alpha Klotho が共局在している。

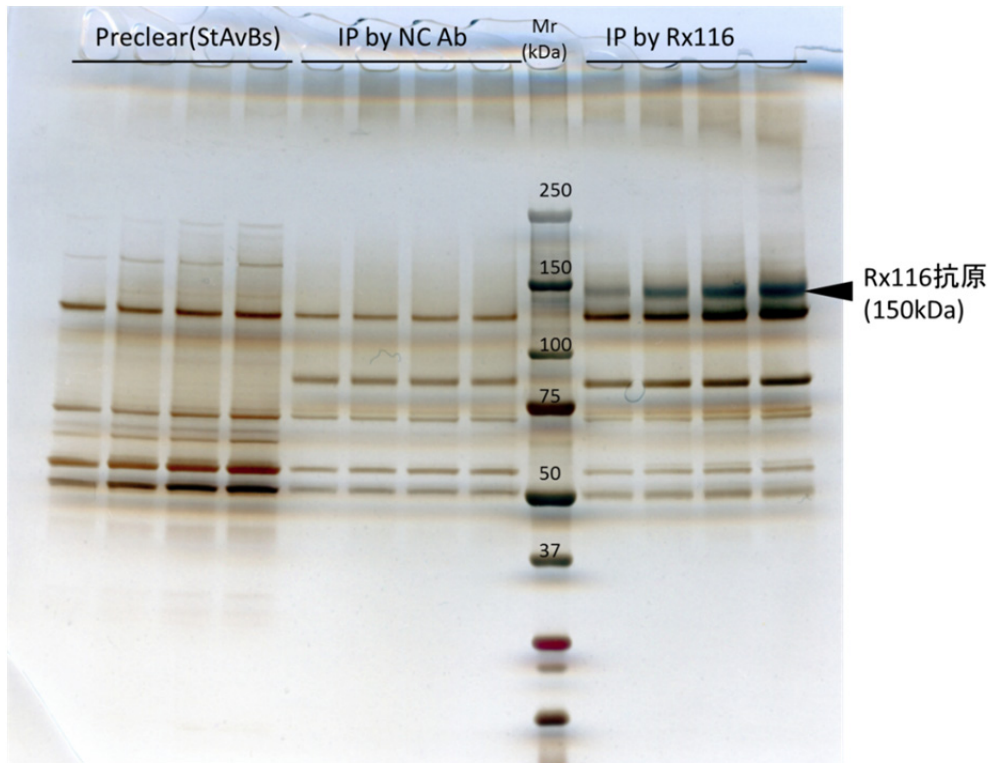


図 3. Rx116 抗原が発現している脂肪組織から蛋白質を抽出して、免疫沈降を行った。矢印のバンドが抗原と判断された。MALDI-TOF-MS 解析により、CD13 であると判明した。

3. 3 CD13 に関する既知の記載

CD13 は Cluster of Differentiation (CD) に登録された細胞表面マーカーであり、一般に myeloid 細胞に発現していることが知られる、974aa の II 型膜タンパク質である。祖先遺伝子はバクテリアで見いだされる aminopeptidase N であり、哺乳類の消化管絨毛や尿細管上皮細胞における CD13 の発現は、消化酵素としてペプチド切断を行うためと理解されている。mRNA にスプライスフォームは存在しないと言われている。SDS-PAGE 上 150 kDa にバンドが見いだされることから、約 50 kDa 分の糖鎖修飾を受けていると考えられている。CD マーカーとしての複数の抗体が樹立されており、抗体間で認識に差異があることが指摘されてきた経緯がある。糖鎖修飾の違いに基づくサブタイプが少なくとも 5 種類は存在すると考えられている。しかし、サブタイプ間の機能的な分別はついていない。CD13 は α KI 発現組織以外にも、消化管絨毛上皮、血管内皮細胞に発現している⁽⁶⁻¹³⁾。既報の分子機能として、1992 年にコロナウイルスの受容体として機能する事が報告されている⁽¹⁴⁾。特にノックアウトマウス樹立と表現型の記載では、血管新生形成に異常が観察されると報告されている⁽¹⁵⁾。

3. 4 遺伝子改変マウスにおける CD13 遺伝子発現情報

CD13 とミネラル代謝との関連を探索するために、NIH GEO-profile を用いて発現影響の解析を行った⁽¹⁶⁾。その結果、FGF23-トランスジェニックマウス(肝臓で過剰発現させたマウス)において、腎臓での CD13 発現が低下していることを見いだした。 α KI-KO マウス、VDR-KO マウスのデータを加えると、それぞれ表 1 のような発現プロファイルとなり、CD13 がミネラルを決定する諸因子と関連づけられる事が示唆された(表 1)。

3. 5 CD13 は α KI と結合する

それでは、CD13 は α KI 発現細胞において、どのような役割を持っているのであろうか？ CD13 の発現部位は主に、腎臓、副甲状腺、消化管、脂肪、血管内皮細胞、骨髄球系細胞である。本研究により、副甲状腺に CD13 が高発現していることが初めて示された。加えて副甲状腺の α KI 発現細胞では、CD13 が α KI と極めて似た染色態度を示すことから、我々は両者の結合を疑い免疫沈降とウエスタンブロットを用いて検証した。その結果、腎臓と脈絡叢のライセートから、両方向性の免疫沈降で CD13、 α KI が結

合していることが示された(図 4)。興味深いことに、CD13 を認識する抗体はサブタイプにより数種類存在するが、汎用される CD13 抗体 (Rx119) を用いた免疫沈降では α Kl は沈降しないのに対して、Rx116 抗体を用いた共沈では α Kl が沈降する。これは、CD13 分子のすべてではなく、Rx116 抗体が特異的に認識するサブタイプの一つが特異的に α Kl に結合することを示している。

3. 6 CD13 欠損マウスの作出

KO マウスを観察することにより、CD13 のミネラル代謝における生理的な役割を解明できると期待して、作出を開始した。既報の CD13-KO マウスの解析では、ミネラル代謝の切り口で解析されていない。本研究では、 α Kl 発現細胞における CD13 の機能に焦点を当てており、組織部位別に CD13 の発現を制御できる観察システムが望ましい。我々は「ミネラル代謝に関連する臓器」すなわち、尿細管

および副甲状腺に特異的な Cre 発現マウスと掛け合わせることで、臓器別に機能解析する予定である。現在 KO マウスを作成し、解析を開始したところである。まずはトータルノックアウトマウスを観察するため、Cre 発現マウス卵を用いて体外受精させ、標的遺伝子トータルノックアウトマウスを作出した。今後、このマウスを用いてミネラル代謝関連の表現型を見いだして行く予定である。

4. 考 察

現在まで提出されている α Kl 分子機構に関する仮説は、

- i) リン酸抑制ホルモンである FGF23 に結合し、受容体複合体の一部 (共受容体) として必須である (浦川ら)
- ii) Na,K-ATPase と細胞内エンドソームで結合し、体液 Ca の変化に反応して、細胞内リクルートを起こすシステム

表 1. ミネラル異常を示す遺伝子変異マウスにおける CD13 の発現

遺伝子型	Ca	Pi	PTH	ビタミン D	FGF23	CD13
VDR-KOM	↓	↓	↑↑	↑↑	↓	↑(PTG) ↓(kid)
クロトー-KOM	→	↑	↓	↑↑	↑↑	↓(PTG)
FGF23-TGM	→	↓	↑	↓	↑↑	↓(Kid)

KOM=knockout mouse, PTG=parathyroid gland, Kid=kidney

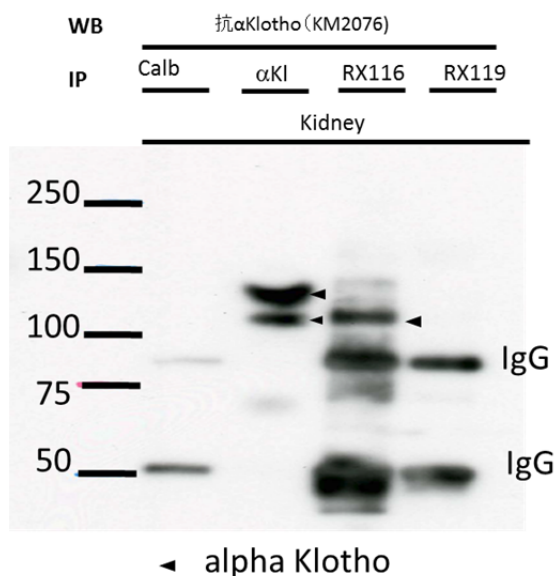


図 4. α Klotho と CD13 は結合している。マウス腎臓ライセートを用い、 α Klotho 抗体および Rx116 抗体で免疫沈降し、 α Klotho 抗体でウエスタンブロットすると、矢印のバンドが描出される。135、120 kDa の 2 本バンドで存在する α Klotho のうち、120 kDa の α Klotho のみが CD13 に結合している事が示唆される。Rx119 は、一般的な CD13 抗体であり、Rx116 が「 α Klotho と親和性がある特異的なサブタイプ」の CD13 を認識している事が推測される。Calb (calbindin D-28K) は、negative control。

- を構成する(伊村ら)
- iii) 遠位尿細管に発現する transient receptor potential vanilloid channel 5 (TRPV5) の修飾シアル酸を加水分解し、Ca 輸送活性を調節する(Chan, Qら)
 - iv) Wnt に結合してシグナルを修飾する(Liuら)
 - v) 膜結合部位で切断され、分泌型クロトーとして血管内皮細胞に結合し、抗酸化作用を発揮して保護的に働く(草場ら)

など、多岐にわたる。しかしながら、現段階で信頼すべき情報は(機能 i, ii) であると考えられ、2つの機能のいずれかに CD13 がコミットする可能性が高いと考えられる。これらの知見をもとにミネラル代謝における CD13 モデルの可能性を検証すべきであろう。今後、本研究で作出した CD13-KO マウスを用いて、解析を進める。作業仮説としては、

- 1) CD13 の存在下では、 α KI 依存性 FGF23 受容体結合ないし FGF23 シグナルに影響を受けるかどうか？(CD13 が α KI に結合する事で、FGF23 の結合を競合的に阻害するモデル)
- 2) CD13 の存在下では α KI 依存性 Na,K-ATPase 調節性リクルート能に影響を受けるかどうか？(CD13 が α KI に結合する事で、Na,K-ATPase リクルート経路への干渉がおきるモデル)
- 3) 既報の CD13 の機能(ウイルス受容体、血管形成と維持)に対して、 α KI が何らかの機能修飾をするのではないか？(CD13-KO マウス、および α KI-KO マウスにおける表現型の比較解析)

の3点を検証する必要がある。本プロジェクトによって作出された CD13-KO マウスによって検証し、新たな α KI の機能に迫る必要がある。

全動物細胞には Na,K-ATPase が存在しており、動物細胞の基礎代謝エネルギーの約半分は Na,K-ATPase によって消費されるという。Na,K-ATPase によって引き起こされる膜電位調節や物質輸送の巧みさは進化の妙であろう。これは生命が海から創成されたことを考えれば、ナトリウムが生命現象、分子現象に深く関わる事は不思議ではない。ミネラルイオンの調節は人類の健康と長寿にとって欠かせない要因である。カルシウムやリン酸も Na を基本として制御されていることが、クロトー研究により再発見された。近年、クロトーや FGF23 を中心としたミネラル制御の新規メカ

ニズムの発見とミネラル制御機構の捉え直しの時代に入り、いままで制御困難であった、未知のくる病や腎不全におけるミネラル病態の解明と治療への挑戦が行われている。そのような中、ミネラル制御システムの全体像を把握する必要が高まっており、本研究で示すような新規のミネラル調節分子の理解が必要となっている。本研究が一助になれば幸いである。

謝 辞

本研究は、ソルトサイエンス研究財団研究助成の援助を受けて実施したものであり、この場を借りて深く御礼申し上げます。

参考文献

1. alpha-Klotho as a regulator of calcium homeostasis. Imura A, Tsuji Y, Murata M, Maeda R, Kubota K, Iwano A, Obuse C, Togashi K, Tominaga M, Kita N, Tomiyama K, Iijima J, Nabeshima Y, Fujioka M, Asato R, Tanaka S, Kojima K, Ito J, Nozaki K, Hashimoto N, Ito T, Nishio T, Uchiyama T, Fujimori T, Nabeshima Y. *Science*. 2007 Jun 15; 316(5831): 1615-8
2. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. *Nature*. 2006 Dec 7; 444(7120):770-4.
3. alpha-Klotho: a regulator that integrates calcium homeostasis. Nabeshima Y, Imura A. *Am J Nephrol*. 2008; 28(3): 455-64.
4. Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression. Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, Honjo H, Tsujikawa H, Yasui K, Lee JK, Kamiya K, Kitaichi K, Yamamoto K, Ito M, Kondo T, Iino S, Inden Y, Hirai M, Murohara T, Kodama I, Nabeshima Y. *Circulation*. 2004 Apr 13; 109(14): 1776-82.
5. A direct effect in vitro of phosphate on PTH release from bovine parathyroid tissue slices but not from dispersed parathyroid cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*, Vol 11, 9, Pp. 1762, 2007
6. Identification of a cell surface glycoprotein involved in

- cell aggregation in *D. discoideum*. Geltsky JE, Weseman J, Bakke A, Lerner RA. *Cell*. 1979 Oct; 18(2): 391-8.
7. Cell surface antigens of human malignant melanoma: definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies. Dippold WG, Lloyd KO, Li LT, Ikeda H, Oettgen HF, Old LJ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Oct;77(10): 6114-8.
 8. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the gene encoding a human myeloid membrane antigen (gp150). Look, A.T., Peiper, S.C., Rebentisch, M.B., Ashmun, R.A., Roussel, M.F., Lemons, R.S., Le Beau, M.M., Rubin, C.M., Sherr, C.J. *J. Clin. Invest.* (1986)
 9. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH, Peiper SC. *J Clin Invest.* 1989 Apr; 83(4): 1299-307.
 10. Functional and phenotypic upregulation of CD13 /aminopeptidase-N on precursor-B acute lymphoblastic leukemia after in vitro stimulation. Makrynikola V, Favaloro EJ, Browning T, Bianchi A, Bradstock KF. *Exp Hematol.* 1995 Oct; 23(11): 1173-9.
 11. Structure and function of aminopeptidase N. Sjöström H, Norén O, Olsen J. *Adv Exp Med Biol.* 2000; 477: 25-34.
 12. Subcellular fractionation and subcellular localization of aminopeptidase N in the rabbit enterocytes. Muktari S, Feracci H, Gorvel JP, Mishal Z, Rigal A, Maroux S. *J Membr Biol.* 1986; 89(1): 53-63.
 13. Temporal association of the N- and O-linked glycosylation events and their implication in the polarized sorting of intestinal brush border sucrase -isomaltase, aminopeptidase N, and dipeptidyl peptidase IV. Naim HY, Joberty G, Alfalah M, Jacob R. *J Biol Chem.* 1999 Jun 18; 274(25): 17961-7.
 14. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. Yeager, C.L., Ashmun, R.A., Williams, R.K., Cardellichio, C.B., Shapiro, L.H., Look, A.T., Holmes, K.V. *Nature* (1992)
 15. Impaired angiogenesis in aminopeptidase N-null mice. Rangel R, Sun Y, Guzman-Rojas L, Ozawa MG, Sun J, Giordano RJ, Van Pelt CS, Tinkey PT, Behringer RR, Sidman RL, Arap W, Pasqualini R. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 13; 104(11): 4588-93.
 16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles>

The Role of CD13 in Alpha Klotho-Dependent Mineral Metabolism

Akihiro Imura

Foundation for Biomedical Research and Innovation

Summary

Alpha Klotho mediates mineral homeostasis by regulating both PTH secretion and active vitamin D synthesis. In order to understand how alpha Klotho drives the systems, we attempted to analyze alpha Klotho-expressing cells of choroid plexus, kidney tubules and parathyroid glands. By immunization using mouse choroid plexus, we established a number of monoclonal antibodies recognizing these three organs. Antigen of an antibody, named Rx116, was revealed as CD13. Although CD13 has been credited as a membrane-bound alanyl-aminopeptidase, we hypothesized that CD13 may contribute to mineral regulation. We found the correlation between the expression levels of CD13 and alpha Klotho in genetic manipulated mice with mineral impairments. Moreover, CD13 binds alpha Klotho in kidney. Therefore, CD13 is now emerging component of mineral metabolism. To elucidate the physiological role of CD13 in mineral homeostasis, we have established CD13 knockout line recently.