

## ナトリウムが駆動するクロー依存性ミネラル恒常性システムにおける CD13 の役割

伊村 明浩, 前田 良太

先端医療振興財団医薬品開発研究グループ

**概要 (背景、目的)** クロー( $\alpha$ Kl)分子は、複数の結合分子、たとえば Na,K-ATPase、FGF 受容体、FGF23 などとの相互作用により、ミネラル代謝の中核的役割を担っている。その後応募者が発見した事実として、 $\alpha$ Kl 発現細胞は、必ず CD13 (ANPEP) が発現しており、GEO-profile による遺伝子発現プロファイル検索では、FGF23 過剰発現マウス、AQP11KO マウスなどの各種のミネラル異常を示す遺伝子変異マウスで、 $\alpha$ Kl 遺伝子発現と正の相関を示すことが判った。これらの観察に基づき、ミネラル代謝機構を理解するため、新たなミネラル因子と想定される CD13 (ANPEP) の機能を解析することを目的とした。

**(方法)** CD13 (ANPEP) ノックアウトマウスを作製し、表現型を解析した。

**(結果)** 膜分子である CD13 は血管内皮細胞にも発現しており、血管新生、修復維持に関わるという報告がある (PNAS, 2010)。しかしながら、CD13 がミネラル代謝に関わるという報告はない。ミネラル代謝異常の表現型を示す  $\alpha$ Kl 遺伝子欠損マウスおよびビタミン D 活性化酵素 CYP27B1 遺伝子欠損マウスの副甲状腺を、我々が樹立した抗 CD13 抗体 Rx116 で染色すると、CD13 分子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を明らかにした。このことを裏打ちするように、Basal diet を与えて飼育すると、Ca、Pi、PTH の血中濃度に異常は見られないものの、ビタミン D が低く FGF23 が高い、という表現型を示した。つまり、CD13 欠損マウスでは、ミネラル恒常性の代償機構にバランス不全が起きているらしい。ただし、この原因臓器は、尿細管、副甲状腺、小腸、骨のいずれでも起こりうることから、現在解析中である。

**(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。作成した CD13 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、実際にミネラル代謝恒常性に対して、異常を示した。この分子機構を明らかにするため、さらに検討中である。

### 1. はじめに

現在まで提出されている  $\alpha$ 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, 文献 1)
- 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を構成する (伊村ら, 文献 2, 3, 4)
- 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)

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、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。CD13 は以前より知られていた膜抗原で、血管内皮、顆粒球、腎臓、脂肪など広範囲な臓器に発現するエンドペプチダーゼのホモログである (文献 5-14)。本研究では CD13 のミネラル代謝における生理機能を解析するために作出した CD13-KO

マウスを用いて、解析を進めた。当初の作業仮説としては、

- 1) CD13 の存在下では、 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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、血管新生と維持)に対して、 $\alpha$ 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 $\alpha$ KI KO マウスにおける表現型の比較解析)

の3点を検証する計画で研究を開始した。

## 2. 研究・実験方法

### 2.1 実験動物ならびに飼育条件

日本 SLC より野生型 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 CD13-loxP 挿入遺伝子改変マウス(図 1)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3個の CD13 抗体を樹立した。

### 2.3 遺伝子改変マウスにおける遺伝子発現変動プロファイル(表 1)

「<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/?term=anpep>」のとおりに解析を行った。

## 3. 結果

### 3.1 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。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

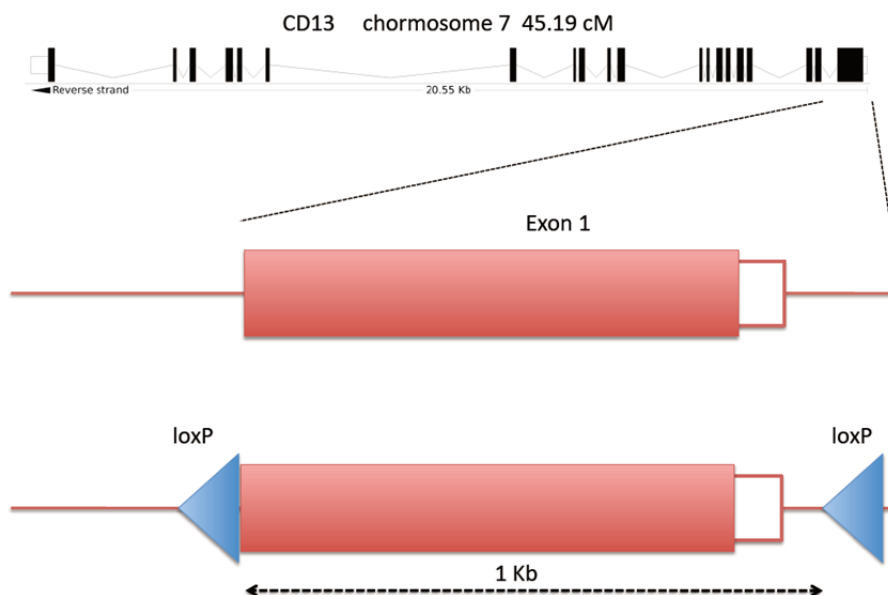


図 1. CD13 ノックアウトマウス作製のスキーム。部位特異的ノックアウトを計画し、図のような loxP 挿入を行って ES 細胞を樹立した。副甲状腺、小腸、尿細管特異的 Cre-Tg マウスとの交配により、臓器特異的な CD13-KO マウスを得る予定である。

ことを見いだした。αKl-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。

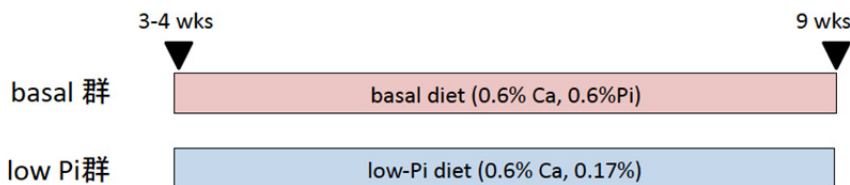
### 3. 2 CD13 欠損マウスの作出とミネラル異常の解析

KO マウスを観察することにより、CD13 の生理的な役割を解明できる。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かった。本研究では、αKl 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によって、臓器別に機能解析を計画した。そのために、loxP を CD13 遺伝子アリルにノックインした変異マウスを作成し、まずトータル CD13 欠損マウス個体を

樹立し解析を開始した。通常飼育の状況では Ca、Pi、PTH、ビタミン D の血中濃度に異常は見られなかった。遺伝子変異マウスの GEO プロファイルから、FGF23 ないしリン酸代謝機構との関連を疑い、血中ミネラル関連因子の濃度を測定した。CD13 ノックアウトマウスに Basal diet を与えて飼育すると、Ca、Pi、PTH の血中濃度に異常は見られないものの、ビタミン D が低く FGF23 が高い、という表現型を示した(図 2)。すなわち、CD13 欠損マウスでは、ミネラル恒常性の代償機構にバランス不全が起きているらしい。しかし CD13 はミネラル代謝を司る重要な臓器、副甲状腺、尿細管、小腸絨毛上皮に発現しているため、この表現型の責任臓器は分別できていない。従って、各臓器に発現する Cre-Tg マウスとの交配により、責任臓器を特定し、分子メカニズムの解析を行う計画を継続中である。

表 1. GEO profile による遺伝子発現変動の相関性。Alpha Klotho と CD13 の発現は同一の向きに変動する。

gene expression	FGF23-Tg	CLDN16-KO	AQP11-KO
CD13	↓	↑	↓
alpha Klotho	↓	↑	↓



#### ●長期間Basal餌飼育マウスの血液(離乳後 ~9週)

	Pi	Ca	ALB	Mg	1,25 (OH) <sub>2</sub> D	PTH	FGF23
WT	7.9 ± 0.7	10.5 ± 0.3	2.7 ± 0.1	2.3 ± 0.3	201 ± 21	47 ± 19	26 ± 15
CD13 KO	6.9 ± 0.7	10.4 ± 0.2	2.7 ± 0.1	2.2 ± 0.2	124 ± 15	94 ± 60	95 ± 11

#### ●長期間低リン餌飼育マウスの血液(離乳後 ~9週)

	Pi	Ca	ALB	Mg	1,25 (OH) <sub>2</sub> D	PTH	FGF23
WT	5.2 ± 0.8	11.8 ± 0.6	2.8 ± 0.2	2.4 ± 0.3	126 ± 20	4.7 ± 1.9	2.6 ± 4.2*
CD13 KO	4.9 ± 0.9	11.3 ± 0.5	2.8 ± 0.3	2.5 ± 0.3	105 ± 25	7.8 ± 2.2	32.5 ± 22

\*定量性下限レベル

図 2. ミネラル恒常性破綻の発見。基本的な栄養素が含まれる Basal diet を与えると、野生型に比較して CD13-KO マウスでは、血中 Ca、Pi、PTH は変化がないが、VD は低く、FGF23 が高いという表現型を示す。

#### 4. 考 察

CD13は血球や血管に発現している事、ウイルス受容体として有名になったことにより、却ってその生理的役割が追求されてこなかった。一方、研究者らはクロトー分子機構の研究から、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概念刷新を行ってきた。その中で、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関心が高まっている。そのような中、ミネラル制御システムの全体像を新規に理解する必要がある。我々は、多様な標的分子をもつクロトーの結合相手の一つである CD13 の役割に着目した。今回行った KO マウスの解析により、CD13 がミネラル代謝に対して何らかの寄与をしている事が証明された。しかし、その分子機構はいまだ不明である。このデータから出発し、未知のミネラル調節機構の発見に結びつく事を期待して研究を継続している。

#### 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. 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.
2. 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
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. Identification of a cell surface glycoprotein involved in cell aggregation in *D. discoideum*. Geltosky JE, Weseman J, Bakke A, Lerner RA. *Cell*. 1979 Oct; 18(2): 391-8.
6. 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.
7. 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)
8. 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.
9. 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.
10. Structure and function of aminopeptidase N. Sjöström H, Norén O, Olsen J. *Adv Exp Med Biol*. 2000; 477: 25-34.
11. 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.
12. 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.
13. 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)
14. 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.

## Role of CD13 in Alpha-Klotho-Dependent Mineral Homeostasis

Akihiro Imura

Foundation for Biomedical Research and innovation

### Summary

We have reported that CD13 binds alpha Klotho in kidney tubules through glucuronide-modification recognition. In parathyroid gland and choroid plexus as well, CD13 associates alpha Klotho. It has been also found that CD13 expression is altered in 3 mutant mice lines, that are FGF23-Tg, CLDN16-KO and AQP11-KO mice. Interestingly, in all the lines,  $\alpha$ Klotho expressions were altered for the same direction as CD13 gene expression. Thus, we established CD13-KO mouse line and analyzed mineral parameters. As a result, we found that serum Ca levels were significantly elevated compared with those of WT mice when fed with low phosphorus containing diet. This fact demonstrated that mineral homeostasis was impaired in CD13-KO mice.