

ミネラル栄養連関抗老化調節 —マグネシウムが関与する新規メカニズムを解明—

瀬川 博子

徳島大学大学院医歯薬学研究部応用栄養学分野

概要 慢性腎臓病(CKD)における高リン血症は、異所性石灰化や二次性副甲状腺機能亢進症を招き、心血管疾患死亡の増悪因子として問題視されている。現在は、血中リン濃度のみならず、リン利尿因子 Fibroblast growth factor (FGF) 23 や parathyroid hormone (PTH) が各臓器、細胞に悪影響を与えると考えられている。特に全身の様々な臓器損傷、老化進行に FGF23 の関与が報告されている。一方、低マグネシウム血症は CKD のいかなるステージにおいても死亡の予測因子となること、高リン血症に伴う血管石灰化に対しマグネシウムが抑制的に作用することなども報告されている。このように、リン代謝の破綻状態においてマグネシウムの存在は、非常に重要である。 α -Klotho は、FGF23 の共受容体として作用する。 α -Klotho ノックアウト(KO)マウスは、高リン血症、高ビタミン D 血症、成長遅延、短命を示すことからミネラル調節を介して抗老化因子として働く。最近我々は、このシステムに関連する分子 α Klotho-regulatory factor (KRF) を同定した。KRF KO は、血中 FGF23 が α Klotho KO マウスに匹敵するほどに高値を示す。また KRF と関与する分子の探索を行ったところ、マグネシウムに関与する分子が検出されたことより KRF が、マグネシウム代謝と関与する可能性が示唆された。本研究では、FGF23/ α Klotho-KRP—マグネシウム代謝システムを明らかにすることを目的に KRF KO マウスにおけるマグネシウムに関する基本解析を検討した。

KRF KO マウスは、野生型マウスと比較してカルシウム、リン酸、マグネシウム血中濃度、糞中および尿中排泄量に有意な差は認められなかったが、血中 FGF23 および PTH 濃度は、KRF KO マウスにおいて非常に増加していた。腎臓 Trpm6 mRNA 発現は有意な低下を示していたが、血管石灰化や炎症などの臓器障害は KRF KO マウスにおいて観察されなかった。

今回 KRF とマグネシウム代謝の関連性を明らかにすることができなかったが、今後は、食事調節および CKD モデル等を使用し腎外臓器や細胞内マグネシウム含量などの検討を進める予定である。

1. 研究目的

「食事」や「栄養」のコントロールにより、老化・寿命を制御する考えは、古くから知られている。近年、老化制御に関わる糖質・脂質・蛋白・エネルギー代謝に加え、ミネラルにおいても、老化制御との関係で新しい研究が展開されている¹⁾。 α Klotho 遺伝子は、ミネラル調節を介する抗老化因子として同定された。 α Klotho ノックアウト(KO)マウスは、ミネラル恒常性の破綻(高リン血症、高ビタミン D 血症等)、成長遅延、短命を示す²⁾。 α Klotho は、腎臓で最も発現が高く、膜型および分泌型が存在する。膜型

α Klotho は、ビタミン D やリンを調節するホルモンである Fibroblast growth factor (FGF) 23 の共受容体として作用する。一方、分泌型 α Klotho の作用は、ホルモン様に遠隔臓器に働き、内向き整流性カリウムチャネル (ROMK1)、上皮性 Na^+ チャネル (ENaC)、カルシウムチャネル (TRPV5 および 6) または、受容体等の糖鎖の修飾により機能や膜局在の調節を行う³⁻⁵⁾。特にミネラルの中でもリンと老化制御の関係は展開されている。上述のように、高リン血症 (14 mg/dl 以上) を呈する α Klotho 変異マウスまたは α Klotho KO マウスの平均寿命は5~6週間と非常に短い。

我々は、それら高リン血症、短命であるマウスの血中リン濃度を低下させることで表現型の改善および寿命が延長することを報告した^{6,7)}。このように、血中リン濃度、もしくは生体におけるリン含量は、寿命に関して強く関連することが示された。さらに慢性腎臓病(CKD)における高リン血症は、異所性石灰化や二次性副甲状腺機能亢進症を招き、心血管疾患死亡の増悪因子として問題視されている⁸⁾。現在は、血中リン濃度のみならず、リンを低下させるために増加したリン利尿因子である FGF23 や parathyroid hormone (PTH) を介して各臓器、細胞に悪影響を与えると考えられている⁸⁾。特に近年高濃度の FGF23 は、臓器の繊維化、血管内皮細に対するアテローム性動脈硬化、免疫、炎症、中枢神経系(認知症)も FGF23 のターゲットとして考えられており、全身の様々な臓器損傷、老化進行に FGF23 の関与が報告されている^{9,10)}。

近年、CKD 時におけるマグネシウムの重要性が支持されている¹¹⁾。低マグネシウム血症は CKD のいかなるステージにおいても死亡の予測因子となることが報告されており、CKD 患者において血清マグネシウムは血管石灰化と逆相関する。また CKD 患者の高リン血症に伴う血管石灰化に対しマグネシウムが抑制的に作用することなども報告されている。さらに最近 α Klotho KO マウス(血中マグネシウム正常)に高マグネシウム餌を与えることにより、 α Klotho KO マウスに認められる大動脈内の炎症や血管石灰化の消失が報告された。高マグネシウム餌投与は、血中 PTH、活性型ビタミン D またはカルシウム濃度に影響せず、 α Klotho KO における血中 FGF23 およびリン濃度のさらなる上昇を引き起こすにも関わらず改善する。

Klotho/FGF23 システムは、全身の老化を制御するが、このシステムには、そのスイッチを On/Off にするシステムの存在が想定されている。最近我々は、 α Klotho/FGF23 システムとリン代謝研究の解析から新規調節分子 α Klotho-regulatory factor (KRF) を同定した¹¹⁾。KRF は、2 回膜貫通型タンパク質であり、 α Klotho と同様に腎臓に高発現するが、骨をはじめとする様々な臓器にも発現を認める。KRF KO の予備解析から次の様な興味深い結果を得た。1) 高リン血症を呈しないにも関わらず、2) 血中 FGF23 が α Klotho KO マウスに匹敵するほどに高値を示す、3) 短命や臓器傷害は確認されていない(途中経過)。KRF は、FGF23 分泌と生体への作用において鍵となる分子である

可能性が考えられた。また KRF と関与する分子を *in silico* 解析(NCBI Gene Expression Omnibus 等のデータベースを探索)を行ったところ、マグネシウムチャネル TRPM6 が関与する分子の1つとして挙がってきた。このように KRF が、マグネシウム代謝と関与する可能性が示唆された。

本研究では、KRF KO マウスにおける高 FGF23 の悪影響(血管石灰化を含む全身の様々な臓器損傷、老化進行)のレスキューにマグネシウム代謝が関与すると仮説をたて、FGF23/ α Klotho-KRP とマグネシウム代謝システムの関連を明らかにすることを目的に検討した。

2. 研究方法

2.1 動物

動物実験は徳島大学動物実験委員会の許可の下、徳島大学動物実験指針に従い行った。C57BL/6J 系統の野生型(wild type: WT)マウスは、日本チャールズリバー株式会社よりを購入した。ジーンターゲット法により作製した動物はプラスチックゲージ内で恒温恒湿の飼育部屋で明暗サイクル(8:00 - 20:00)のもと、飼育した。実験開始までは実験動物用試料 MF(オリエンタル酵母, Osaka, Japan)と水道水の自由摂取で飼育した。

KRF KO マウスは、ヘテロマウスを交配することで得た¹²⁾。KRF $-/-$ マウスゲノム判定は、マウス片耳に 50 mM NaOH 180 μ L を加え、95°Cにて 10 分間インキュベートした。1 M Tris-HCl (pH 8.0) 20 μ L を加え攪拌後、20,600 \times g、室温にて 10 分間遠心した。上清を回収し、ゲノム DNA サンプルとした。KRFKO のゲノム判定は、ゲノム DNA サンプル 0.5 μ L を KOD FX Neo enzyme (TOYOBO., LTD, JAPAN) 0.5 μ L, 2 \times KOD FX Neo buffer 7.5 μ L, 2 mM dNTP mix 1.6 μ L, 10 pM の wild allele 及び mutation allele プライマー 0.5 μ L, 滅菌水 2.8 μ L と混合し、94°C 2 分 / 98°C 10 秒 / 60°C 15 秒 / 68°C 30 秒を 30 サイクル条件下にて、PCR 反応をおこなった。得られた PCR 産物は 2% アガロースゲルにて電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、ゲノム判定をおこなった。

2.2 生化学検査

マウスより得られた下大静脈血漿、24 時間尿、24 時間糞灰化物および大腿骨灰化物についてカルシウム濃度、無機リン濃度、マグネシウム濃度を測定した。カルシウム濃度はメチルキシレノールブルー発色法を用いたカルシウム E テスト(Wako, Osaka, Japan)、無機リン濃度は p-メチ

ルアミノフェノール還元法を用いたホスファ C テスト (Wako), マグネシウム濃度はキシリジブルー発色法を用いたマグネシウム B テスト (Wako) で測定した。

2. 3 腎臓病理組織学的標本作成

マウスをエーテル麻酔下で開腹・採血後, 腎臓を摘出し, 4%パラホルムアルデヒド溶液にて一晩浸漬固定した。固定した組織を 1×PBS で洗浄し, 80% EtOH に浸漬してから 100% EtOH で完全に脱水し, レモゾール (Wako, Osaka, Japan) で透徹後にパラフィン (Wako, Osaka, Japan) 浸漬および封埋を行った。パラフィン切片は, ミクロトーム (Leica) で 5 μm 厚に薄切し, MAS コート付き MATSUNAMI MICRO SLIDE GLASS (MATSUNAMI) に貼付した。石灰化観察は, Von-Kossa 染色を行った。パラフィン切片は, キシレンによる脱パラフィンを行った後, 蒸留水にて水和させ, 5%硝酸銀溶液を添加し, 室温 UV 下で1時間反応させた。次に蒸留水で洗浄後, 5%チオ硫酸 Na 溶液にて室温で3分間反応させた。その後ヘマトキシリンによる核染色を行い, 脱水後, 封入し観察した。

2. 4 Total RNA 抽出, cDNA 合成 および定量 PCR

解剖により採取した腎組織に, 組織重量の約 10 倍量の ISOGEN (Wako) を加え, ポリトロンでホモジナイズした。ISOGEN 1 ml に対しクロホルムを 0.2 ml 加え, 白濁するまでボルテックスをおこなった。室温で 2 分静置後, 15,000 rpm, 4°Cにて15分間遠心し, 分離した水層を回収した。水層に等量の 2-プロパノールを加え, ボルテックスにてよく混合し, 室温で 10 分間静置後, 15,000 rpm, 4°Cにて20分間遠心した。生じた沈殿を 80%エタノールで洗浄後, 真空乾燥させた。これを滅菌水に溶解し, Total RNA とした。Total RNA は DNase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で処理した後, マウス白血病ウイルス由来逆転写酵素 (Invitrogen) を用いて cDNA 合成をおこなった。腎臓 cDNA, 2×SYBR Premix Ex Taq および ROX Reference DyeII (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて, 95°C 30 秒 95°C 5 秒 60°C 30 秒を 40 サイクルの条件下で, Applied Biosystems® StepOnePlus™リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) によりリアルタイム PCR を行なった。内部標準として GAPDH を用いて各データを補正した。使用したプライマーを表1に示した。

Table 1 Primer for quantitative PCR

GAPDH	Sense	CATCCACAGTCTTCTGGGTG
	Anti-sense	CTGCACCACCAACTGCTTAGC
Claudin16	Sense	CGAACCTGCGATGAGTACGA
	Anti-sense	CCAAGGAGCAGGGTGATGAA
TRPM6	Sense	GAGGAAAATCTGGACAGTTGGAA
	Anti-sense	GTTTAGCGTGTTGAGCTTGCT

3. 研究結果

3. 1 KRF ノックアウトマウス生化学データ

KRF^{-/-}マウスの表現型を検討するために, 代謝ケージを用いて摂食量および血中, 尿中の生化学データを解析した。KRF^{+/+}および KRF^{+/-}マウスと比較し, 摂食量, 腎機能マーカーとなる血漿 Cre 濃度および血中尿素窒素に変化は見られなかった (Figure 1A-C)。さらに血中イオン化 Ca 濃度, 24 時間尿中 Ca 排泄量, 24 時間糞中 Ca 排泄量, 血漿 Pi 濃度, 24 時間尿中 Pi および, 24 時間糞中 Pi 排泄量に WT マウスおよび hetero マウスと比較し KRF^{-/-}マウスにおいて変化はみられなかった (Figure 2A-F)。次に, ミネラル代謝において主要な調節因子である活性型ビタミン D, 副甲状腺ホルモン PTH, および FGF23 濃度を測定したところ, 血中活性型ビタミン D 濃度に変化はみられなかったが, 血中 PTH 濃度および血中 FGF23 濃度に有意な上昇が認められた (Figure 2G-I)。

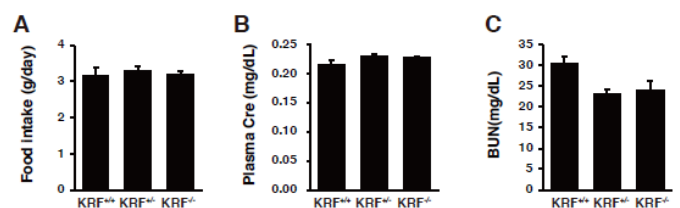


Figure 1 Biochemical data in KRF knockout mice

Metabolic cages were used for measurement of 24-h food intake (g/day), and collection of urine, and feces from mice. (A) Food intake, (B) plasma creatinine, (C) plasma blood urea nitrogen. Male KRF^{+/+}, KRF^{+/-}, and KRF^{-/-} mice at 8–9 weeks of age (n = 30 – 50). Values are mean ± SE.

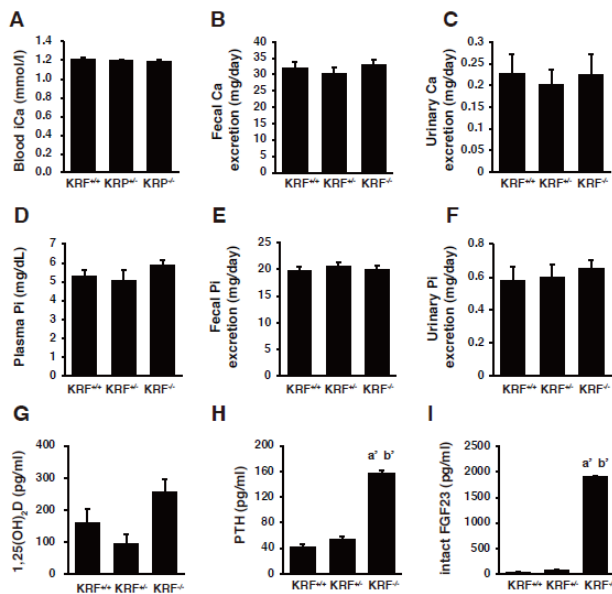


Figure 2 Calcium and phosphate metabolism in KRF knockout mice

(A-I) blood ionized Ca, fecal Ca excretion, urinary Ca excretion, plasma Pi, fecal Pi excretion, urinary Pi excretion, plasma 1,25(OH)₂D, plasma intact PTH, serum intact FGF23 levels of Male KRF^{+/+}, KRF^{+/-}, and KRF^{-/-} mice at 8-9 weeks of age. Values are mean ± SE (n = 10 - 20). a' p<0.01 vs. KRF^{+/+} mice. b' p<0.01 vs. KRF^{+/-} mice.

3. 2 KRF ノックアウトマウスにおける臓器障害

KRF^{-/-}マウスは、過剰な血中 PTH 濃度および FGF23 濃度を示したことから生体に悪影響を示していることが示唆されたため、ミネラル排泄に重要な腎臓の石灰化および心肥大マーカー等を確認した (Figure 3A)。KRF^{-/-}マウスと同様に過剰な血中 FGF23 濃度が認められる klotho ノックアウトマウスはすでに報告されているように腎臓に顕著な石灰化が認められた (Figure 3A)。しかしながら KRF^{-/-}マウス腎臓において石灰化は認められなかった。また過度の FGF23 は心肥大や炎症、繊維化などに関連する報告があることからそれぞれのリアルタイム PCR にてマーカー発現を検討したところ心機能マーカーである ANP, BNP, 繊維化マーカーcollagen1a1 mRNA 発現は KRF^{-/-}マウスにおいて KRF^{+/+}マウスと比較して有意な変化はみられなかった (Figure 3B-D) が、炎症マーカーである TNF および IL6 mRNA 発現は有意な低下が認められた (Figure 3E, 3F)。

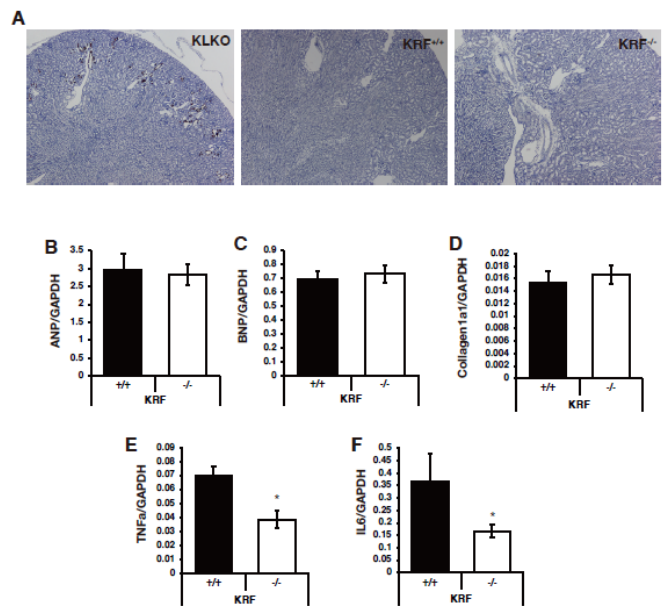


Figure 3 Renal calcification and Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis of hypertrophy, inflammation, and fibrosis markers in KRF knockout mice.

3. 3 KRF ノックアウトマウスにおけるマグネシウム代謝観察

KRF^{-/-}マウスのマグネシウム代謝に関する表現型を検討するために、代謝ケージを用いて血中、尿中データを解析した (Figure 4A-C)。KRF^{+/+}および^{-/-}マウスにおいて血中マグネシウム濃度、糞および尿中マグネシウム排泄量に有意な差は認められなかった。また腎臓マグネシウム排泄関連分子である Claudin16 および Trpm6 mRNA を確認したところ KRF^{+/+}マウスと KRF^{-/-}マウスを比較して Claudin16mRNA 発現に有意な差が認められなかったが、Trpm6 mRNA 発現は TRAP^{-/-}マウスにおいて有意な低下が認められた (Figure 4D, 4E)。

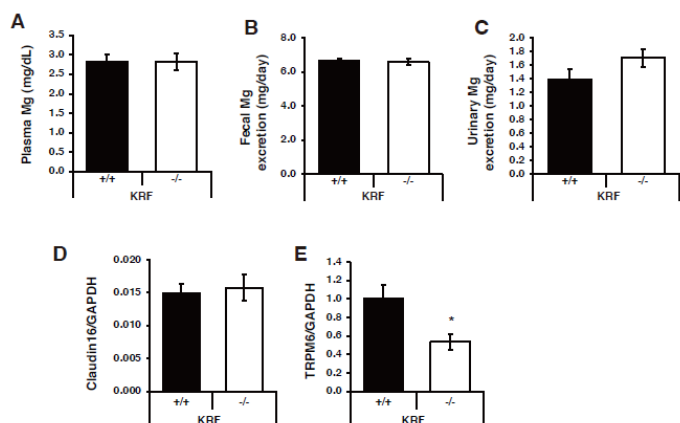


Figure 4 Magnesium metabolic parameters in KRF knockout mice.

(A-C) Plasma Mg, fecal Mg excretion, urinary Mg excretion levels of Male KRF^{+/+}, and KRF^{-/-} mice at 8-9 weeks of age. Values are mean ± SE (n = 5 - 10). (D, E) Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis of claudin 16 and Trpm6 expression in renal tissue. GAPDH was used as an internal control. Values are mean ± SE (n = 5). #p<0.05.

4. 考察

最近我々は、 α Klotho/FGF23 システムとリン代謝研究の解析から新規調節分子 KRF を同定した¹²⁾。KRF は、2 回膜貫通型タンパク質であり、 α Klotho と同様に腎臓に高発現するが、骨をはじめとする様々な臓器にも発現を認める。KRF KO マウスは 1) 高リン血症を呈しないにも関わらず、2) 血中 FGF23 が α Klotho KO マウスに匹敵するほどに高値を示す、3) 短命や臓器傷害は確認されていない(途中経過)。これらのことから KRF は、FGF23 分泌と生体への作用において鍵となる分子である可能性が考えられた。また KRF と関与する分子を *in silico* 解析を行ったところ、マグネシウムチャネル TRPM6 が関与する分子の1つとして挙がってきた。このように KRF が、マグネシウム代謝と関与する可能性が示唆された。しかしながら KRF とマグネシウム代謝、 α Klotho/FGF23 システムとマグネシウム代謝、さらにリン代謝とマグネシウム代謝との詳細は明らかではない。本研究では、KRF- α Klotho/FGF23 システムにおけるマグネシウム代謝調節系の関与を明らかにすることを目的として検討した。

著しい高 PTH 血症および高 FGF23 血症を呈する KRF KO マウスを解析しマグネシウム代謝変動を確認したが、血中マグネシウム濃度、糞中および尿中マグネシウム排泄量に異常は認められなかった。今回は、マグネシウム

代謝に関連する分子の発現検討は、PTH や FGF23 のターゲット臓器である腎臓に注目し検討した。しかしながら野生型と比較して体内マグネシウム含量を微調節することに重要な腎臓 Trpm6 mRNA 発現のみ KRF KO マウスで発現低下が観察されたが、尿中マグネシウム排泄量に変動は認められていない。今回のデータに詳細は示していないが、野生型マウスにおいて FGF23 により Trpm6 の発現は有意に低下することを確認している。このことから KRF KO マウスでその調節破綻が起こっている可能性が示唆された。またデータには示していないが、リン代謝とマグネシウム代謝との関連を、*in silico* によりデータベース解析したところ、リン酸トランスポーターである slc34a2 との関連において Trpm6 が上位にランクしていることを見出している。slc34a2 は、様々な臓器やがん細胞にその mRNA 発現が認められている¹³⁾。リン代謝破綻におけるマグネシウムによる保護作用を確認するためには腎外臓器における検討を確認する必要がある。

今回 KRF システムとマグネシウム代謝との関与が示唆されたが、KRF KO マウス解析のみでは証明できなかった。本研究の結果を踏まえ、引き続きミネラルの老化制御を明らかにし、効率よく老化を制御するミネラル栄養システムの確立を目指す。

5. 今後の課題

今回 KRF とマグネシウム代謝の関連性を詳細に明らかにすることができなかった。食事に含まれるミネラルの形態、つまり無機に含まれる状態またはタンパク質に含まれる状態では生体の応答は異なる。例えば、リン代謝においては食餌に含まれるリンをタンパク質に含まれる有機リンとして摂取する場合と同量が無機リン酸として添加する場合では、血中リン濃度変化を示さないにも関わらず、PTH や FGF23 の分泌、尿中リン排泄、生体に対するダメージを含む応答が異なる。本研究では、市販通常食を与えた KRF KO マウスにおける血中マグネシウム濃度等生化学データを測定した。今後は、精製食などを使用し検討する予定である。マグネシウムはミトコンドリアの機能や、酸化ストレスに関与することが報告されている。そのため、高 FGF23 血症に対する保護作用に関しては、細胞内マグネシウムの機能も検討すべきであると考え、ミトコンドリアの酸化的リン酸化に関与するマグネシウムの影響や、細胞内でのリンとマグネシウムの関係性についての検討も進めていく予定とする。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり研究助成をいただいた公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に厚く御礼申し上げます。

7. 文献

1. Kuro-o M: Klotho, phosphate and FGF-23 in ageing and disturbed mineral metabolism. *Nat Rev Nephrol* 9: 650-60. 2013
2. Kuro-o M: Klotho in health and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 21: 362-8. 2012
3. Dalton G, An SW, Al-Juboori SI, Nischán N, Yoon J, Dobrinskikh E, Hilgemann DW, Xie J, Luby-Phelps K, Kohler JJ, Birnbaumer L, and Huang CL: Soluble klotho binds monosialoganglioside to regulate membrane microdomains and growth factor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 752-7. 2017
4. Xie J, Yoon J, An SW, Kuro-o M, and Huang CL: Soluble Klotho Protects against Uremic Cardiomyopathy Independently of Fibroblast Growth Factor 23 and Phosphate. *J Am Soc Nephrol* 26: 1150-60. 2015
5. Dalton GD, Xie J, An SW, and Huang CL: New Insights into the Mechanism of Action of Soluble Klotho. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8: 323. 2017
6. Hanazaki A, Ikuta K, Sasaki S, Sasaki S, Koike M, Tanifuji K, Arima Y, Kaneko I, Shiozaki Y, Tatsumi S, Hasegawa T, Amizuka N, Miyamoto KI, and Segawa H: Role of sodium-dependent Pi transporter/Npt2c on Pi homeostasis in klotho knockout mice different properties between juvenile and adult stages. *Physiol Rep* 8: e14324. 2020
7. Segawa H, Yamanaka S, Ohno Y, Onitsuka A, Shiozawa K, Aranami F, Furutani J, Tomoe Y, Ito M, Kuwahata M, Imura A, Nabeshima Y, and Miyamoto K: Correlation between hyperphosphatemia and type II Na-Pi cotransporter activity in klotho mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F769-79. 2007
8. Sprague SM, Martin KJ, and Coyne DW: Phosphate Balance and CKD-Mineral Bone Disease. *Kidney Int Rep* 6: 2049-58. 2021
9. Haffner D, and Leifheit-Nestler M: Extrarenal effects of FGF23. *Pediatr Nephrol* 32: 753-65. 2017
10. Rroji M, Figurek A, Viggiano D, Capasso G, and Spasovski G: Phosphate in the Context of Cognitive Impairment and Other Neurological Disorders Occurrence in Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci* 23: 2022
11. Sakaguchi Y: The emerging role of magnesium in CKD. *Clin Exp Nephrol* 26: 379-84. 2022
12. Sasaki S, Shiozaki Y, Hanazaki A, Koike M, Tanifuji K, Uga M, Kawahara K, Kaneko I, Kawamoto Y, Wiriyasermkul P, Hasegawa T, Amizuka N, Miyamoto KI, Nagamori S, Kanai Y, and Segawa H: Tmem174, a regulator of phosphate transporter prevents hyperphosphatemia. *Sci Rep* 12: 6353. 2022
13. Hernando N, Gagnon K, and Lederer E: Phosphate Transport in Epithelial and Nonepithelial Tissue. *Physiol Rev* 101: 1-35. 2021

Mineral Nutrient Linked Anti-aging Regulation: A Novel Mechanism Involving Magnesium

Hiroko Segawa

Department of Applied nutrition Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School

Summary

Hyperphosphatemia in chronic kidney disease (CKD) leads to ectopic calcification and secondary hyperparathyroidism and is considered an aggravating factor in cardiovascular mortality. Currently, not only blood phosphorus levels but also the phosphorus diuretic factor Fibroblast growth factor (FGF)23 and parathyroid hormone (PTH) are thought to have adverse effects on various organs and cells. FGF23 has been reported to be involved in various organ damage and aging progression throughout the body. On the other hand, hypomagnesemia is a predictor of death in any stage of CKD, and magnesium has been reported to have an inhibitory effect on vascular calcification associated with hyperphosphatemia. Thus, the presence of magnesium is very important in a state of disrupted phosphorus metabolism. Klotho acts as a co-receptor for FGF23. α -Klotho knockout (KO) mice show hyperphosphatemia, hypervitaminosis D, growth retardation, and short life span, thus acting as an anti-aging factor via mineral regulation. We recently identified a molecule involved in this system, α Klotho-regulatory factor (KRF), and KRF KO mice show elevated levels of FGF23 in blood, comparable to α Klotho KO mice. In addition, KRF and related molecules were searched for, and magnesium-related molecules were detected, suggesting that KRF may be involved in magnesium metabolism. In this study, we examined the basic analysis of magnesium in KRF KO mice to clarify the FGF23/ α Klotho-KRF-magnesium metabolic system.

Although there were no significant differences in calcium, phosphate, magnesium blood levels, fecal and urinary excretion in KRF KO mice compared to wild-type mice, blood FGF23 and PTH levels were highly increased in KRF KO mice. Kidney *Trpm6* mRNA expression was significantly decreased, but no organ damage such as vascular calcification or inflammation was observed in KRF KO mice.

Although we were unable to clarify the relationship between KRF and magnesium metabolism in this study, we plan to examine extrarenal organs and intracellular magnesium content using dietary modulation and CKD models in the future.