

## 老化マウス *klotho* における皮膚変化の検討

倉 林 正 彦

群馬大学 医学部第2内科

### 【目的・背景】

皮膚の老化防止はコスメトロジーの最も重要な課題の一つである。著者らは黒尾・鍋島らと共同で、老化に密接に関わる *klotho* という新規遺伝子を発見した。*klotho* 遺伝子は分子量が約14kDa で、 $\beta$ -glucosidase と40%のホモロジーを示す膜蛋白または分泌蛋白をコードする。*klotho* 遺伝子ホモ欠損マウス (以下  $KL^{-/-}$  と記載) は、寿命の短縮、動脈硬化、異所性石灰化、骨粗鬆症、肺気腫、皮膚真皮層の菲薄化、皮下脂肪層の消失、脱毛などヒト老化に見られる多彩な変化を早期に表現する。著者らはコスメトロジー研究振興財団の第9回 (平成10年度) 助成により、 $KL^{-/-}$  は生後4週より肺気腫を発現すること、7-9週令の  $KL^{-/-}$  肺ではIV型コラーゲンとSP-A 遺伝子の発現が増強していること、飢餓状態の線維芽細胞に *klotho* 遺伝子を導入することにより、その飢餓によるDNA合成能の低下を抑制しうることを明らかにし、 $KL^{-/-}$  における老化徴候の早期発現には、線維芽細胞をはじめとする結合織細胞の機能障害が関与すると推測した。本研究の目的は、*klotho* マウスにおける老化類似の皮膚変化の出現機構を明らかにし、その新しい予防法を開発することである。

### 【結果・考察】

#### 1 創傷治癒過程の観察

$KL^{-/-}$  は皮膚損傷を与えた直後に死亡する個体が多かった。 $KL^{-/-}$  がストレスに非常に弱いことは良く知られており、本法を用いて皮膚に全層性の傷害を与えて創傷治癒過程を観察するのは困難と考えられた。

#### 2 $KL^{-/-}$ の皮膚へのアデノウイルスベクターを用いた *klotho* 遺伝子の局所導入

マウスの *klotho* 遺伝子を発現するアデノウイルスを作製した。このアデノウイルスをCHO細胞に感染させ、Western blot 法を用いて *klotho* 蛋白が発現していることを確認した。

#### 3 *klotho* 遺伝子過剰発現ラットにおける皮膚傷害の検討

*klotho* 遺伝子過剰発現ラットを2系統確立した。RT-PCR 法を用いた解析では、導入 *klotho* 遺伝子は Strain1 においては肺・腎・心・脳で、Strain2 においては肝・肺・腎・心・脳で、mRNA 発現を認めた。

#### 4 線維芽細胞の培養実験

$KL^{-/-}$  および野生型マウス (以下  $KL^{+/+}$  と記載) の皮膚および肺から線維芽細胞を培養した。しかし、培養の条件によって細胞の生育状態にばらつきが生じることが明らかとなった。 $KL^{-/-}$  由来の線維芽細胞と  $KL^{+/+}$  由来の線維芽細胞の増殖などを単純に比較することは困難であると考えられた。

## 5 肺組織におけるアポトーシスの解析

4 に示した培養実験系が機能しなかったことから、 $KL^{-/-}$  のヒト老化類似病変形成のメカニズムを解明する別の方法として組織を用いた病態解析を行った。まず、肺にみられる気腫化病態におけるアポトーシスの関与を検討した。その結果、 $KL^{+/+}$  と比較して  $KL^{-/-}$  の肺では TUNEL 染色陽性細胞が高頻度に認められた。陽性細胞は II 型肺胞上皮細胞と考えられた。ベルリン青染色陽性細胞は  $KL^{-/-}$  では認められたが、 $KL^{+/+}$  では指摘できなかった。

本研究では、マウス *klotho* 遺伝子を発現するアデノウイルスおよび *klotho* 遺伝子を過剰に発現するラットの系統、を確立することができた。さらに  $KL^{-/-}$  の肺組織においては II 型肺胞上皮細胞のアポトーシスが高頻度に認められることが明らかになり、酸化ストレスがその病態に関与していることも示唆された。皮膚は外界からのストレスに直接さらされ続ける部分であることから、 $KL^{-/-}$  に認められる皮膚真皮層の菲薄化、皮下脂肪層の消失、脱毛などのヒト老化類似の病態（皮膚老化）の発症メカニズムを解明することが、コスメトロジーに大きな貢献をしていくものと信じている。