

老化抑制遺伝子 *klotho* の結合組織細胞老化における病態生理学的意義の解明と治療法開発への応用

1) 東京大学医学部循環器内科 2) 群馬大学医学部第二内科

永井良三¹⁾、須賀達夫²⁾、山洞善恒²⁾、倉林正彦²⁾

Homozygous mutant *klotho* ($KL^{-/-}$) mice exhibit multiple phenotypes resembling human aging. In the present study, we focused on examining the pathology of the lungs of *klotho* mice and found that it closely resembled pulmonary emphysema in humans both histologically and functionally. Histology of the lung of $KL^{-/-}$ mice was indistinguishable from those of wild-type littermates up to 2 wk of age. The first histological changes appeared at 4 wk of age, showing enlargement of the air spaces accompanied by destruction of the alveolar walls, and progressed gradually with age. In addition to these changes, we observed calcium deposits in type I collagen fibers in alveolar septa and degeneration of type II pneumocytes in 8- to 10-week-old $KL^{-/-}$ mice. Pulmonary function tests revealed prolonged expiration time in $KL^{-/-}$ mice, which is comparable with the pathophysiology of pulmonary emphysema. The expression level of messenger RNA for type IV collagen, surfactant protein-A was significantly increased in $KL^{-/-}$ mice, which may represent a compensatory response to alveolar destruction. The starvation of human lung fibroblast cells (MRC-5) for 96 hours decreased their ^3H -thymidine uptake up to 75%. The transfection of the *klotho* gene into MRC-5 cells using adenovirus vector, however, prevented their decline in ^3H -thymidine uptake. These results implied that connective tissue including fibroblasts played an important role in the pathogenesis of pulmonary emphysema in $KL^{-/-}$ lung.

1 緒言

現在、日本は高齢社会へと急速に変貌しつつある。個体の老化機構の解明は、医学的のみならず社会的にも最も重要な課題のひとつとなっている。個体の老化は、全身の諸臓器における老化のインテグレーションとも考えられるが、各臓器の老化はある程度、歩調を合わせて進行するのが普通である。この臓器間の老化の同時進行性には結合組織が深く関与していると考えられる。なぜなら、線維芽細胞をはじめとする結合組織細胞は、全身臓器に遍く存在し、形態の維持ばかりでなく、器官形成、炎症、創傷治癒機転などにおいて中心的な役割を果たしているからである。したがって、個体老化機構の解明には、結合組織細胞の老化を細胞生物学的に解明することが不可欠である。

我々は黒尾・鍋島らと共同で、個体老化に密接に関わる *klotho* という新規遺伝子を発見した⁽¹⁾。*klotho* 遺伝子は分子量が約 14kDa で、 β -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、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。

肺は皮膚と同様に、直接外気と接し、しかも結合組織の老化が肺泡破壊 (肺気腫) として形態的・機能的に敏感に反映されうる臓器である。そこで、本研究では *klotho* 遺伝子欠損マウスにおける肺の変化を生理学的、形態学的にまず検討した。次に、肺培養線維芽細胞にアデノウイルスベクターを用いて *klotho* 遺伝子を導入し、導入前後の細胞増殖能の変化を観察した。

2 実験

2.1 *klotho* 遺伝子欠損マウス肺の容積測定

肺気腫では気管支を外側に引っ張る elastic recoil の力が減少するため、胸腔内が陽圧になる呼気時に気道は狭窄・閉塞してしまう。そのため air trapping が起き、肺は過膨張所見を呈する。そこで、*klotho* 遺伝子欠損マウスの肺容積を測定し、過膨張所見があるか否かを検討した。

対象は 6 - 8 週令の *klotho* 遺伝子ホモ欠損マウス ($KL^{-/-}$)、*klotho* 遺伝子ヘテロ欠損マウス (以下 $KL^{+/-}$ と記載)、野生型マウス (以下 $KL^{+/+}$ と記載) を用いた。マウスをウレタンで麻酔後、脱血屠殺した。気管内に 4% パラフォルムアルデヒドを 20 cm 水柱の一定圧で 24 時間注入し、肺を進展固定した。進展固定後の肺を水没させ、肺容積を測定した。

2.2 *klotho* 遺伝子欠損マウス肺の組織学的検討

対象は 2、4、8 - 10 週令の $KL^{-/-}$ 、 $KL^{+/+}$ である。2.1 と同様の方法で肺の進展固定を行った。進展固定した肺標本はパラフィンに包埋し、4 μm の厚さの切片を作成、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。また、連続切片にコッサ染色を行い、石灰化病変を確認した。肺泡の破壊の程度の指標である Destructive index (D.I.) を Saetta らの方法⁽²⁾



Biological Role of Klotho Protein in Ageing of Connective Tissue and Its Therapeutic Application to Skin Diseases (Ryozo Nagai 1), Tatsuo Suga 2),

Yoshichika Sando 2), Masahiko Kurabayashi 2)

1) The Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

2) The Second Department of Internal Medicine, Gunma University, School of Medicine

に準じて計算した。さらに、隣接する肺胞間の平均距離である Mean linear intercept を計測し、肺胞腔の拡大の程度を評価した⁽³⁾。

2.3 *klotho* 遺伝子欠損マウス肺の電子顕微鏡による検討

8週令の *KL^{-/-}* と *KL^{+/+}* を対象とした。サンプル肺は4℃の2%グルタルアルデヒドで前固定を、室温の1%オスミウム酸で後固定を行った。緩衝液で洗浄後、エタノールで脱水し、エポキシレジンに包埋した。厚さ60nmの超薄切片を作成し、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色をした後に電子顕微鏡で観察した。

2.4 *klotho* 遺伝子欠損マウスの肺機能検査

6-8週令の *KL^{-/-}*、*KL^{+/-}*、*KL^{+/+}* を対象とし、ウレタン (1.5g/kg) を腹腔内注射した麻酔状態で自発呼吸下に肺機能を測定した。すなわち、短いポリエチレン製チューブを気管内に挿入し、Lilley型ニューモタコグラフ (日本光電社製 TV-241T と TP-602T) を用いて呼吸気流を測定した。胸腔内圧は下部食道内圧を代用し、肺容積はコンピュータを用いて気流を電氣的に積算し求めた^(4,5)。実験中のマウス体温は37℃の一定に保ち、呼吸状態が10分以上安定するのを待って、呼吸回数、一回換気量、分時換気量、呼気時間、動的コンプライアンス、総肺抵抗を測定した。動脈血液ガス分析も併せて行った。

2.5 *klotho* 遺伝子欠損マウス肺における肺気腫関連遺伝子の発現状況の検討

7-9週令の *KL^{-/-}*、*KL^{+/-}*、*KL^{+/+}* 肺における以下の遺伝子の発現をノーザンブロット法により検討した。これらはいずれも肺気腫発症と関連すると考えられている遺伝子である；マンガン superoxide dismutase (Mn-SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼ、transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1)、Early growth response-1 (Egr-1)、IV型コラーゲン、サーファクタント蛋白 A (SP-A)、specificity protein 1 (Sp1)。すなわち、標本肺より全 RNA (ribonucleic acid) を抽出し、1レーンあたり20μgのRNAをホルムアルデヒド-1%アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレン (Hybond-N; Amersham, Arlington Heights, IL) に転写し、紫外線固定した。18Sと28SリボソームRNAをメチレンブルーで染色し、RNAの量と質を評価した。メンブレンは50%ホルムアミド、5×saline sodium phosphate ethylenediaminetetraacetic acid、10×Denhardt's solution、1% sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.1mg/mL herring sperm DNAを含む液でプレハイブリダイズした後、^[32P]deoxycytidine triphosphate (dCTP) (Amersham) でラベルしたDNAプローブで42℃で20時間ハイブリダイズした。メンブレンは2×saline sodium

citrate (SSC) (0.15M NaCl and 0.015 M sodium citrate, pH7.0) /0.1% SDS で二度室温で10分間洗浄した後、0.1×SSC/0.1% SDSで二度42℃で10分間洗浄し、Kodak XR film に-80℃で48時間オートラジオグラフィを行った。

2.6 線維芽細胞への *klotho* 遺伝子導入による細胞増殖の変化

klotho 遺伝子が線維芽細胞の増殖能に及ぼす影響について検討した。*klotho* 遺伝子の発現が予め確認されているヒト肺線維芽細胞 (MRC-5) に、adenovirus vector を用いて *klotho* 遺伝子または LacZ 遺伝子を導入・過剰発現させた。導入24時間後より飢餓状態とし、96時間後に³H-Thymidine 取り込みを測定し、*klotho* 遺伝子導入群、LacZ 遺伝子導入群、コントロール群で比較した。

2.7 統計処理

各測定値は、平均 ± 標準偏差の形式で記載した。また群間の有意差の検出には analysis of variance (ANOVA) 分析を用いた。

3 結果

3.1 *klotho* 遺伝子欠損マウス肺の容積

6-8週令における *KL^{-/-}*、*KL^{+/-}*、*KL^{+/+}* の平均体長はそれぞれ、68.3 ± 4.7mm、91.8 ± 2.4mm、91.5 ± 1.0mmで、*KL^{-/-}* は他に比べ有意に体長が短かった (p < 0.05)。*KL^{-/-}*、*KL^{+/-}*、*KL^{+/+}* の平均肺容積はそれぞれ、703 ± 306μL、653 ± 180μL、663 ± 122μL で3群間に有意差はなかった。したがって、*KL^{-/-}* は *KL^{+/-}*、*KL^{+/+}* に比較し体長が短いにもかかわらず肺容積は不変で、*KL^{-/-}* 肺は過膨張状態であると推測された。

3.2 *klotho* 遺伝子欠損マウス肺の組織変化

生後2週では *KL^{-/-}* の肺 (Fig.1A) は *KL^{+/+}* の肺 (Fig.1B) と組織学的に全く区別不能であった。肺胞破壊の程度を指標する Destructive index (D.I.) にも差がなかった (*KL^{-/-}* 1.7 ± 0.8 vs. *KL^{+/+}* 1.5 ± 0.8)。しかし生後4週になると *KL^{-/-}* 肺は肺胞腔の拡大と肺胞壁の破壊所見が認められるようになった (Fig. 1C)。この週令における *KL^{-/-}* の D.I. (12.0 ± 1.5) は、*KL^{+/+}* (2.7 ± 0.5) に比べ有意に大きかった。明らかな炎症細胞浸潤や間質の線維化の所見は認めず、4週令の *KL^{-/-}* の肺は組織学的に肺気腫と診断できた。8-10週令になると *KL^{-/-}* 肺の気腫性変化は更に進行し、肺胞壁の石灰化所見も認められるようになった (Fig.1D)。肺胞腔の拡大の指標である Mean linear intercept は、8週令の *KL^{-/-}* では 104.8 ± 28.1μm であり、同週令の *KL^{+/+}* の 58.3 ± 24.2μm と比較して有意に大きかった。*KL^{+/+}* 肺の組織像は生後2週、4週、8-10週の間で大きな変化は無かった。

3.3 *klotho* 遺伝子欠損マウスの電子顕微鏡像

8週令の *KL*^{-/-} 肺の電子顕微鏡による観察では、肺胞壁のI型膠原線維へのカルシウム沈着を認めたが (Fig. 2)、肺胞基底膜の主要構成成分であるIV型膠原線維には異常を認めなかった。また、いくつかのII型肺胞上皮細胞の変性所見を認めた。8週令の *KL*^{+/+} 肺では明らかな電顕的異常を認めなかった。

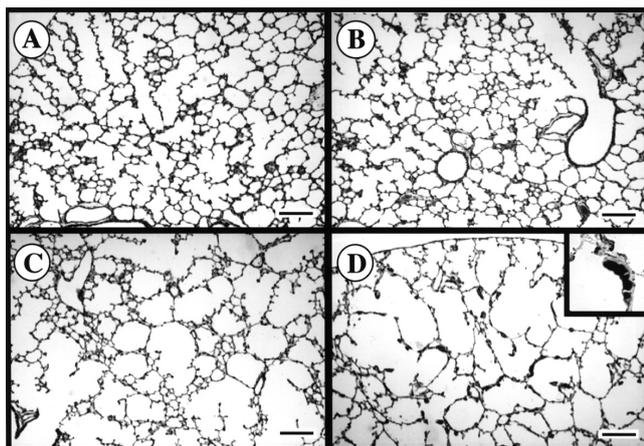


Fig.1 A 生後2週の *KL*^{-/-} 肺 (ヘマトキシリン・エオジン染色)
 B 生後2週の *KL*^{+/+} 肺 (ヘマトキシリン・エオジン染色)
 C 生後4週の *KL*^{-/-} 肺 (ヘマトキシリン・エオジン染色)
 D 生後10週の *KL*^{-/-} 肺 (ヘマトキシリン・エオジン染色、
 右上挿入図は Kossa 染色 (強拡大))

2週令では *KL*^{-/-}、*KL*^{+/+} とも肺胞の破壊は認められない。しかし4週令になると *KL*^{-/-} 肺には肺胞壁の破壊と気腔の拡大を認めた。10週令の *KL*^{-/-} 肺は気腫性変化が更に進行性し、肺胞壁の石灰化も認めた。(石灰化は Kossa 染色で黒色に染色される)

(Scale bar=100 μm)

3.4 *klotho* 遺伝子欠損マウスの肺機能

6~8週令のマウスの肺機能解析結果を Table1 にまとめた。*KL*^{-/-} では呼気時間 (Te) の延長 (p<0.01) と動肺コンプライアンス (Ctb) の増大傾向 (p=0.09) を認めた。*KL*^{-/-} の一回換気量 (TV) は *KL*^{+/+} の TV より小さかったが (p<0.01)、呼吸数や、体重あたりの分時換気量 (Ve) には *KL*^{-/-} と *KL*^{+/+} の間に差を認めなかった。*KL*^{-/-} マウスの動脈血ガス所見は WT マウスと差を認めず、酸素分圧の低下も二酸化炭素分圧の上昇もみられない。したがって、*KL*^{-/-} マウスの直接死因は呼吸不全とは考えにくい。

3.5 *klotho* 遺伝子欠損マウス肺における肺気腫関連遺伝子の発現状況

すでに著明な肺気腫が認められる7~9週令の *KL*^{-/-} マウス

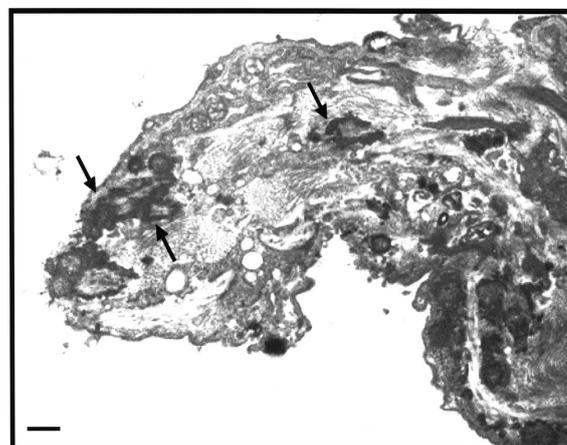


Fig.2 8週令の *KL*^{-/-} 肺の電子顕微鏡 眞
 肺胞壁のI型膠原線維へのカルシウム沈着を認めた (矢印)
 (Scale bar=1 μm)

Table 1 6~8週令のマウスの肺機能検査所見

KL^{-/-} マウスでは呼気時間 (Te) の延長所見と動肺コンプライアンス (Ctb) の増加傾向を認めた。

Pulmonary function tests of *klotho* mice

	Body weight, g	Respiratory rate, per min.	Tidal volume, μl	Ve, ml/min/g	Te, msec	Ctb, μl/cmH ₂ O	Rrs/BW, cmH ₂ O/ml/sec/kg
<i>KL</i> ^{-/-}	8.4 ± 1.0 ^{*†}	229 ± 45	130 ± 30 ^{*†}	3.5 ± 0.6	141 ± 9 ^{*†}	67 ± 35	54.4 ± 16.7
<i>KL</i> ^{+/-}	16.3 ± 2.1	258 ± 28	260 ± 30	4.1 ± 0.6	113 ± 4	31 ± 6	50.2 ± 15.2
WT	17.2 ± 2.2	238 ± 26	240 ± 70	3.3 ± 1.1	119 ± 4	46 ± 9	38.9 ± 11.3

**KL*^{-/-} mice versus *KL*^{+/-} mice; †*KL*^{-/-} mice versus WT mice. ANOVA, P < 0.01.

ウスの肺における Mn-SOD、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼ、TGF- β 1、Egr-1 の mRNA 発現は、WT マウスと差を認めなかったが、基底膜の構成成分である IV 型コラーゲンと SP-A の mRNA 発現が増加していた (Fig. 3)。反対に転写因子 Sp1 の発現は明らかに減少していた。

3.6 線維芽細胞への *klotho* 遺伝子導入による細胞増殖の変化

非飢餓状態における ^3H -Thymidine 取り込みは、コントロール群、LacZ 遺伝子導入群、*klotho* 遺伝子導入群で差を認めなかった。飢餓状態 96 時間後の ^3H -Thymidine 取り込みは、コントロール群では非飢餓状態の約 25% に減少した。この ^3H -Thymidine 取り込みを 1 とした場合、LacZ 遺伝子導入群では 0.8 ± 0.3 と差を認めなかったが、*klotho* 遺伝子導入群では 2.5 ± 0.3 と有意に取り込みが多かった。この値は非飢餓状態の約 80% に相当することから、*klotho* 遺伝子導入が飢餓状態による細胞増殖能の低下を抑制している可能性が示唆された。

4 考察

老化抑制遺伝子 *klotho* のホモ欠損マウスに肺気腫の発症を確認した。肺気腫は肺結合織の不可逆的な損傷により生じると考えられること、また、*klotho* 遺伝子の強制発現は飢餓による肺線維芽細胞の細胞増殖能低下を抑制することから、*klotho* は結合織細胞の老化抑制に重要な役割を果たしていると考えられた。

klotho 遺伝子は我々が黒尾・鍋島らと共同で発見した新しい老化抑制遺伝子である⁽¹⁾。*klotho* 遺伝子をただ一つだけ欠損したマウスは、ヒトの老化に類似した多彩な兆候を呈する。すなわち *klotho* 遺伝子ホモ欠損マウス (*KL*^{-/-})

は生後約 3 週までは野生型マウス (*KL*^{+/+}) と同様に発育するが、以後発育が停止し、平均寿命は 60 日で非常に短命である。加えて、生後 3~4 週頃より動脈硬化、異所性石灰化、骨粗鬆症、皮膚の萎縮、性腺の萎縮などが出現する。*klotho* 遺伝子は分子量が約 14kDa で、 β -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している。その発現は主に腎と脳に局限し、肺での発現は認められていない。

肺気腫は高齢者の慢性呼吸不全・死亡の主要原因であり、社会の高齢化に伴いその重要性は増している。医学的には肺気腫は、肺胞壁が破壊された結果末梢気腔が病的に拡張する疾患で明らかな肺線維化は伴わないと定義されている⁽⁶⁾。軽い肺障害では肺胞上皮の変性・脱落が生じるものの肺胞壁の修復は可能であるが、肺胞基底膜などの結合織が障害される強い肺傷害では、肺胞壁の修復は最早不可能となり、肺胞壁は破壊され末梢気腔の病的な拡張が出現する。一般には、過度の喫煙が肺胞壁破壊の原因であり⁽⁷⁾、非喫煙者における肺気腫の発症は例外的である⁽⁸⁾。

今回の組織学的検討から、生後 4 週以降の *KL*^{-/-} 肺は肺胞壁破壊と末梢気腔の拡大を明らかに認め、肺気腫の発症が確認された。また、生理学的にも肺気腫に矛盾しない肺機能検査結果であった。すなわち、*KL*^{-/-} は呼吸時間の延長と動肺コンプライアンスの上昇を認めた。しかしながら、動脈血ガス分析では明らかな酸素分圧や二酸化炭素分圧の異常を認めず、*KL*^{-/-} の寿命短縮は呼吸不全以外の原因によるものと考えられた。

KL^{-/-} 肺の電子顕微鏡による検討では、肺胞壁の I 型コラーゲン線維への石灰沈着と II 型肺胞上皮細胞の変性の所見が得られた。II 型肺胞上皮細胞は、障害された肺胞の修復に中心的な役割をすることが明らかにされており⁽⁹⁾、II 型肺胞上皮細胞の変性は *KL*^{-/-} における肺修復機能の減弱の可能性を示唆した。

すでに肺気腫が認められる 7~9 週令の *KL*^{-/-} 肺における遺伝子発現の検討では、基底膜の構成成分である IV 型コラーゲンと SP-A の mRNA が著明に増加していた。この二つの蛋白は肺損傷に対し防御的に作用するため^(9,10)、これらの遺伝子発現の増加は肺損傷に対する代償的反応であると推測された。また、IV 型コラーゲンと SP-A 遺伝子のプロモーター領域には両遺伝子の発現を促進する多数の Sp1 結合部位を有している^(11,12)。しかし、*KL*^{-/-} 肺における Sp1 遺伝子の発現は減少していたため、*KL*^{-/-} 肺における IV 型コラーゲンと SP-A の遺伝子発現増強は Sp1 以外の経路を介して行われると考えられた。

klotho 遺伝子の導入は、飢餓による線維芽細胞の ^3H -Thymidine 取り込み減少を抑制した。したがって *KL*^{-/-} における肺気腫発症には、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している可能性がある。しかし、

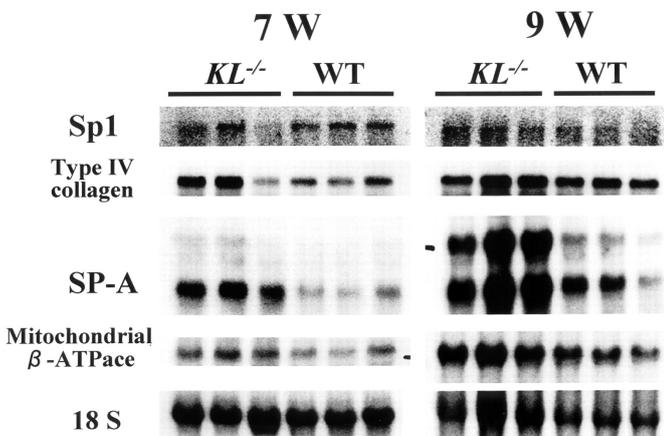


Fig.3 7~9週令のマウス肺における Northern blot 解析
この週令の *KL*^{-/-} 肺にはすでに著しい気腫性変化が認められる。*KL*^{-/-} 肺では IV 型コラーゲンとサーファクタント蛋白の mRNA 発現の増加を認めた。

ヒト肺気腫における結合組織細胞の関与についてはいまだ明らかでなく、今後の検討課題である。

5 総括

klotho 遺伝子ホモ欠損マウス *KL^{-/-}* は生後4週より肺気腫を発現することが組織学的、生理学的に確認された。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おり、これはSp1以外の経路を介していると考えられた。*klotho* 遺伝子の導入は、飢餓による線維芽細胞の³H-Thymidine取り込み減少を抑制したことから、*KL^{-/-}* における肺気腫発症には、線維芽細胞をはじめとする結合組織細胞の機能障害が関与すると推測された。

以上の概略は Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2000 ; 22 (1) :26-33 に報告した。

(文 献)

1. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390 (6655) :45-51.
2. Saetta M, Shiner RJ, Angus GE, Kim WD, Wang N, King M, Ghezzi H, Cosio MG. Destructive index: a measurement of lung parenchymal destruction in smokers. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131:764-9.
3. Dunnill MS. Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. *Thorax* 1962; 17:320-328.
4. Palecek F. Measurement of ventilatory mechanics in the rat. *J Appl Physiol* 1969; 27 (1) :149-56.
5. Onodera M, Kuwaki T, Kumada M, Masuda Y. Determination of ventilatory volume in mice by whole body plethysmography. *Jpn J Physiol* 1997; 47 (4) :317-26.
6. Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133 (1) :149-69.
7. Snider GL. Chronic obstructive pulmonary disease: risk factors, pathophysiology and pathogenesis. *Annu Rev Med* 1989; 40 (411) :411-29.
8. Bascom R. Differential susceptibility to tobacco smoke: possible mechanisms. *Pharmacogenetics* 1991; 1 (2) :102-6.
9. Lwebuga MJ. Matrix-driven pneumocyte differentiation. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144 (2) :452-7.
10. Otto VC, Ten HOA, Franken C, Hermans J, Dijkman JH. Protective effect of pulmonary surfactant on elastase-induced emphysema in mice. *Eur Respir J* 1992; 5 (10) :1223-30.
11. Young PP, Mendelson CR. A GT box element is essential for basal and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulation of the human surfactant protein A2 gene in alveolar type II cells: evidence for the binding of lung nuclear factors distinct from Sp1. *Mol Endocrinol* 1997; 11 (8) :1082-93.
12. Pollner R, Fischer G, Poschl E, Kuhn K. Regulation of divergent transcription of the genes coding for basement membrane type IV collagen. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 580 (44) :44-54.