

老化マウス *klotho* における皮膚変化の検討

群馬大学 医学部第2内科

倉林 正彦

The *klotho* mouse is a novel presenile mouse strain developed by insertional mutagenesis. The homozygous mutant *klotho* mice ($KL^{-/-}$), which have a defect in *klotho* gene expression, present a short life span and a syndrome resembling human aging. Skin atrophy and hair loss are observed in $KL^{-/-}$, in addition to pulmonary emphysema, arteriosclerosis, osteoporosis, and ectopic calcifications.

The goal of the present study is to understand the pathogenesis of the skin changes observed in $KL^{-/-}$, and to develop a new strategy to prevent the skin change during aging. We have generated some experimental tools for the study: (1) Adenovirus has been generated, which expresses the mouse *klotho* cDNA, has been generated. (2) Two transgenic rat strains have been established, which overexpress the *klotho* gene. Regarding the function of the *klotho* gene, we have shown that apoptosis of the type II pneumocytes is much more frequently observed in the $KL^{-/-}$ lung when compared with that in the wild-type lung. Further study is now under progress to show the pathogenesis of the skin lesion in the *klotho* mutant mice, with special reference to the apoptosis of the epidermal cells.

1. 緒言

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、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²⁾、7~9週令の $KL^{-/-}$ 肺では、型コラーゲンと SP-A 遺伝子の発現が増強していること²⁾、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³⁾ 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組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、皮膚老化の予防法を開発することである。

2. 実験

2.1 創傷治癒過程の観察

$KL^{-/-}$ および野生型マウス (以下 $KL^{+/+}$) を用いる。それぞれの背部を剃毛後、同部位にパンチ生検を行い、皮膚に全層性の創傷を与える。その治癒過程を観察する。

2.2 $KL^{-/-}$ 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

まず第一に、*klotho* 遺伝子を発現するアデノウイルスを作製する。アデノウイルスベクターにマウスの *klotho* 遺伝子 (膜貫通ドメインを含む全長の cDNA) を組み込む。

2.3 *klotho* 遺伝子過剰発現ラットにおける皮膚傷害の検討

準備として、*klotho* 遺伝子過剰発現ラットの系を確立する。本ラットの系の中で、導入 *klotho* 遺伝子の発現量が多いと考えられる系を選択する。さらに導入 *klotho* 遺伝子に関してホモ接合体である個体を選別し、その個体同士を交配することによって、*klotho* 遺伝子の発現量の多い個体を安定して利用できるような系を確立する。

2.4 線維芽細胞の培養実験

細胞は $KL^{-/-}$ および $KL^{+/+}$ から採取する。それぞれの皮膚および肺を摘出し細切したのち、細胞培養用プレートに固着させる。これに 10% FBS 加 DMEM 培地を加えて培養し、線維芽細胞を培養する。この線維芽細胞を利用し、各種の実験に用いる。

2.5 肺組織におけるアポトーシスの解析

2週齢の $KL^{-/-}$ および $KL^{+/+}$ から肺を取り出し、10%



Investigation on the Skin Change of the aging model mouse "klotho".

Masahiko Kurabayashi

Second Department of Internal Medicine,
Gunma University School of Medicine

ホルマリンを用いて定圧固定したのちパラフィン包埋する。この肺組織を TACS™ 2 TdT-DAB In Situ Apoptosis Detection Kit を用いて TUNEL 染色する。さらに細胞レベルの酸化ストレスの指標としてベルリン青染色を行う。それぞれ陽性細胞の比率を $KL^{-/-}$ と $KL^{+/+}$ とで比較する。

3. 結果

3.1 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。

3.2 $KL^{-/-}$ 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（膜貫通ドメインを含む全長の cDNA）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。

3.3 *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 系統得ることができた。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 (Fig.1)。現在、導入 *klotho* 遺伝子に関してホモ接合体である個体を選別し、交配を行っている。

3.4 線維芽細胞の培養実験

$KL^{-/-}$ および $KL^{+/+}$ の皮膚および肺から線維芽細胞を培養した (primary culture)。しかしながら、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。このため、 $KL^{-/-}$ 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。

3.5 肺組織におけるアポトーシスの解析

3.4 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 (in vivo) を用いた病態解析を行うことにした。まず始めに、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。

$KL^{+/+}$ 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 (Fig.2)。組織学的な特徴から、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 (Fig.3)。

4. 考察

本研究を進めていく上で重要なツールとなる (1) マウス *klotho* 遺伝子（膜貫通ドメインを含む全長の cDNA）を発現するアデノウイルス、(2) *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。これらのツールは、 $KL^{-/-}$ 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にみられる変化の病態に *klotho* 遺伝子がどのように関与しているかを解明するうえで非常に重要であり、今後これらのツールを用いた研究を行う予定である。

一方、当初実験計画の柱として期待した $KL^{-/-}$ および $KL^{+/+}$ を用いた創傷治癒過程の観察、あるいは同マウスか

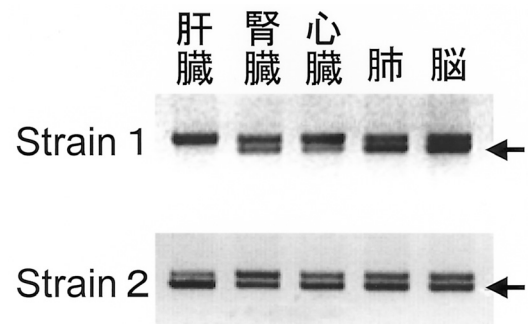


Fig.1 *klotho* 遺伝子過剰発現ラットの作製。2 系統で導入 *klotho* 遺伝子の発現が認められる (矢印、RT-PCR 法)

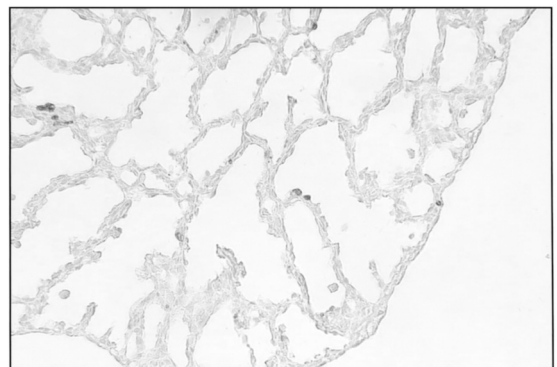


Fig.2 $KL^{+/+}$ の肺では、II 型肺胞上皮細胞のアポトーシスが認められる (2 週齢、TUNEL 染色)。

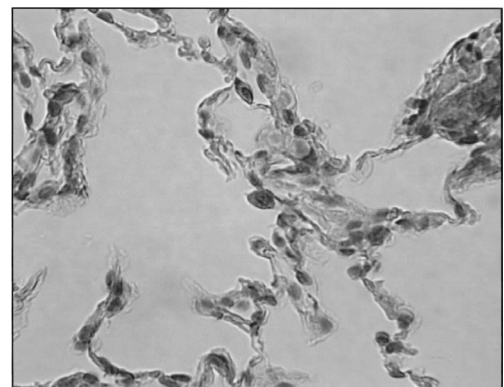


Fig.3 $KL^{+/+}$ の肺では、ベルリン青染色陽性細胞が認められる (5 週齢)。

らの線維芽細胞の培養 (primary culture) 実験は、残念ながら実験系として機能しなかった。このため著者らは、*KL^{-/-}*において肺気腫と皮膚の萎縮・脱毛所見が認められることに着目し、それらに共通する病態としてアポトーシスが関与するという仮説をたてた。これまでの検討から、*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となった。今後、*KL^{-/-}*の皮膚組織におけるアポトーシスの関与を解析していく予定であり、本実験計画の一つの柱として、*klotho*遺伝子がアポトーシスの抑制を介して皮膚の老化を抑制している可能性を追究していくことにしている。

これまでの解析によって、*klotho*マウスは外界からのストレスに対する反応が異常であることが明らかとなっている。*klotho*遺伝子ヘテロ欠損マウスは、若年では肺気腫を発症しないが、タバコ主流煙曝露やブレオマイシン肺傷害に対して気腫化しやすい⁴⁾。今回のベルリン青染色の結果からは*klotho*マウスの肺は野生型マウスに比べて酸化ストレス環境下にあることが示唆された。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、本マウスにみられるヒト老化に類似した皮膚病変 (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。

(参考文献)

- 1) Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. : Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 390: 45-51,1997.
- 2) Suga T, Kurabayashi M, Sando Y, et al. : Disruption of the *klotho* gene causes pulmonary emphysema in mice. Defect in maintenance of pulmonary integrity during postnatal life. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 22: 26-33,2000.
- 3) 田島俊児、須賀達夫、山洞善恒、ほか : *klotho* 遺伝子は細胞増殖の調節に関与している可能性がある。日呼吸会誌. 37 (増刊号) :253, 1999.
- 4) Maeno Y, Suga T, Sando Y, et al. : The heterozygous *klotho* mice develop pulmonary emphysema after exposure to cigarette smoke and intratracheal instillation of bleomycin. *Am J Respir Crit Care Med*. 159: A447, 1999.