

論文の内容の要旨

論文題目

老化抑制遺伝子 *klotho* のアンジオテンシン II による発現調節とその生理的影響

氏名 三谷 治夫

マウスの挿入突然変異によって発見された *klotho* 遺伝子は、その欠損により短命、不妊、動脈硬化、皮膚萎縮、骨粗鬆症、肺気腫などの様々な老化類似の表現型を呈する。この遺伝子は主に腎臓で発現しており、慢性腎不全患者や糖尿病、高血圧動物モデルにおいて、その発現が低下していることが報告されており、これらの動物モデルではレニン・アンジオテンシン系の亢進が報告されている。しかしながらこれらの病的状態で *klotho* がどのようにコントロールされているのか、またそれはどのような生理的働きをもっているのかは明らかではない。

酸化ストレスは老化の原因として重要な因子であるが、アンジオテンシン II は心臓、腎臓、血管平滑筋などの様々な臓器、細胞で酸化ストレスを亢進させている。またアンジオテンシン II は血圧非依存的に様々な機序で *klotho* の重要な発現部位である腎臓を障害する。本研究においてまずこのアンジオテンシン II と *klotho* の腎臓での発現の関連について検討した。

アンジオテンシン II 高血圧モデルラットは浸透圧ポンプを用いてアンジオテンシン II 0.7 mg/kg/day を持続的に投与することにより作成した。別の高血圧モデルとしてはノルエピネフリンを使用し、同様に浸透圧ポンプを用い 2.8 mg/kg/day 投与することにより作成した。同等の昇圧効果、心拍数増加効果を認めた。降圧剤としてはアンジオテンシン II タイプ 1 受容体特異的阻害薬であるロサルタンと、非特異的血管拡張薬であるヒドララジン投与し、コントロールと同レベルの降圧効果を得た。mRNA は Northern blot analysis と *in situ* hybridization にて確認した。タンパクは Western blot analysis にて確認した。アンジオテンシン II の持続的投与により *klotho* は mRNA レベル、タンパクレベルともに発現の低下を認めた。ところが同等の高血圧を呈するノルエピネフリン高血圧モデルではこのような発現の低下は認めなかった。また昇圧効果のない低容量のアンジオテンシン II 投与でもこの発現低下を認めた。このことよりこの *klotho* の発現低下が血圧非依存的であることがわかる。さらにこの発現低下はアンジオテンシン II タイプ 1 受容体特異的拮抗薬であるロサルタンによつては打ち消されるが、非特異的血管拡張剤であるヒドララジンでは抑制されなかった。このことよりさらにこの発現調節はアンジオテンシン II タイプ 1 受容体を介する特異的な現象であることが示された。

アンジオテンシン II による腎障害は抗酸化作用をもつヘムオキシゲナーゼ 1 を誘導することにより抑制され、その一部は酸化ストレスによるものと考えられている。次にこのアンジオテンシン II による腎障害に対し、*klotho* がどのように作用するか検討した。*klotho* 遺伝子が組み込まれたアデノウイルス(ad-*klotho*)をベクターとして使用した。対照としては β -ガラクトシダーゼの遺伝子をもつアデノウイルス(ad-lacZ)を使用した。アンジオテンシン II の浸透圧ポンプ埋込みと同時に、 3.3×10^{10} plaque forming units のアデノウイルスを尾静脈より投与し、遺伝子導入を行った。ad-*klotho* 群における *Klotho* タンパクの発現は、ほぼ肝臓に限られ、腎臓にはほとんどその発現を認めな

かった。この肝臓での発現はウイルス投与後4日後をピークに14日でも認められた。これら ad-klotho、ad-lacZ のウイルス投与は体重、血圧、心拍数等の諸数値には影響を与えなかった。ad-klotho 群では腎臓で *klotho* が発現しなかったにも関わらず、アンジオテンシン II による腎障害はクレアチニンクリアランス、蛋白尿、組織学的変化全ての面において改善を認めたが、ad-lacZ 群ではアンジオテンシン II のみの群と比較して明らかな変化を認めなかった。このことから *klotho* の遺伝子導入によりアンジオテンシン II による臓器障害を改善させる可能性が示唆された。

今回の検討から

- 1) アンジオテンシン II の持続的投与により *klotho* の腎での発現は減少し、これは血圧非依存的な、AT1 受容体を介する特異的な作用である。
- 2) アデノウイルスによるラットへの *klotho* の遺伝子導入はアンジオテンシン II による機能的、形態的腎障害を緩和する。

ことがわかった。

これらからアンジオテンシン II による腎障害の一因に *klotho* がなっている可能性が示唆され、また *klotho* の遺伝子導入によりレニン・アンジオテンシン系を介する多臓器障害を改善させる可能性が示唆された。