

## 審査の結果の要旨

氏名 石井正紀

本研究は、肺の老化と *klotho* 蛋白における肺細胞保護効果との関係を明らかにするために、ヒトの老化徴候に類似した表現型を示すことで知られている *klotho* 遺伝子ホモ接合欠損(KL-/-)マウスを用いて、KL-/-マウスの肺組織変化の病態生理や肺機能、肺弾性収縮力や肺細胞におけるアポトーシスの解析、*klotho* 蛋白の液性因子としての機能の検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. KL-/-マウスにおける平均肺胞径および 肺胞破壊指数は、KL-/-マウスで4週齢以降増加した。KL-/-マウスの肺胞細胞は、TUNEL、PCNA 陽性率ともに増加したが、相対的に TUNEL 陽性率優位であった。また、肺圧-量曲線は、KL-/-マウスで、左上方へ移動し、FEV100/VC の低下、静肺コンプライアンスの増加を示した。ただし、気管支肺胞洗浄液 (BALF) におけるエラスターゼおよび過酸化脂質には有意な上昇は認められなかった。すなわち、KL-/-マウスでは、加齢により肺弾性収縮力の低下と比較的均質な気腔の拡大を示し、気道の肺組織変化は、炎症の関与の少ないアポトーシス優位の細胞動態が示された。
2. KL-/-マウスの肺細胞における炎症の関与の少ないアポトーシス優位の細胞動態の原因検索として、アポトーシス抑制効果をもつ MAPK の系の1つである p-ERK やその上流の成長因子で肺胞の分化・増殖にも重要である EGF について、免疫染色およびウエスタンブロッティングによる検討を行った。その結果、肺組織における EGF の発現量低下に伴う p-ERK の活性低下が示され、KL-/-マウスの肺細胞におけるアポトーシス亢進との関与が示唆された。
3. KL-/-マウスは、外来侵襲がない条件で比較的均質な気腔の拡大を示すが、実験的肺気腫を誘導することが知られているエラスターゼ負荷による影響は不明であり、*klotho* 遺伝子ヘテロ接合欠損 (KL+/-) マウスにおいてエラスターゼ負荷による肺の形態学的変化および肺機能変化について検討したところ、平均肺胞径および 肺胞破壊指数は、エラスターゼ負荷により KL+/-マウスで、KL+/+と比較して有意に高値を示した。KL+/-マウスでは、肺圧-量曲線は、左上方へ移動し、TLC および RV の増加、静肺コンプライアンスの増加を示した。

以上より、**klotho** 遺伝子の機能発現が不十分な個体は、エラスターゼ負荷における気腫性変化が生じやすいことが示唆された。

4. 肺胞上皮細胞における **klotho** 蛋白の抗細胞死効果について検討するために、ラット II 型肺胞上皮細胞 (L2) を用いて、ビタミンDもしくは過酸化水素存在下にて、**klotho**、**FGF-23**、**klotho+FGF-23** による添加刺激を行い、細胞死率を測定した。また、細胞死の原因として、カルシウム依存性システインプロテアーゼである  $\mu$ -calpain 活性およびその内在的阻害薬である **calpastatin** の変動に着目し、これらの蛋白発現量をウエスタンブロッティングにて評価した。さらに細胞内に **Fura-2** を導入し、**1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>** に対する細胞内カルシウム濃度増加を算出した。その結果、**Klotho** 蛋白は、**FGF-23** の有無に関わらず、**1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>** 誘導性細胞死を抑制し、細胞内カルシウム濃度上昇に伴う  $\mu$ -calpain 系の活性化制御効果を示した。

以上、本論文は、比較的均一な気腔の拡大を示す **KL**-ノマウスの肺組織変化は、炎症を伴わないアポトーシスの増加と関連している可能性があり、老人肺形成と関与していることを示唆した。また、**klotho** 遺伝子の機能発現が不十分な個体は、エラスターゼ負荷における気腫性変化が生じやすいことを示した。さらに、**klotho** 蛋白は、ビタミンDシグナリング誘導性の蛋白分解酵素活性の亢進に伴う細胞死を、液性因子として抑制する機能を持つことを示唆した。これらの知見により、老人肺と肺気腫の病態生理における相違点が明確に示され、いずれの病態においても **klotho** 蛋白が重要な役割を担っていることが明らかになった。さらに、液性因子としての **klotho** 蛋白の肺での機能の解明にも繋がる知見を得ている。本論文の成果はこれまで未知であった肺組織における **klotho** 蛋白の役割と肺の老化のメカニズムに重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。