

原 著

マウス腎由来培養細胞における klotho の発現検討

東京女子医科大学 医学部 第四内科学 (主任: 二瓶 宏教授)

ミトベ ミチヒロ スギウラ ヒデカズ ヨシダ タクミ ツチヤ ケン ニヘイ ヒロシ
三戸部倫大・杉浦 秀和・芳田 工・土谷 健・二瓶 宏

(受理 平成 16年 10月 5日)

Analysis of Klotho Expression in the Mouse Kidney Cell Line

Michihiro MITOBE, Hidekazu SUGIURA, Takumi YOSHIDA, Ken TSUCHIYA and Hiroshi NIHEI

Department of Medicine IV, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine

Defects in klotho gene expression in the mouse result in a syndrome that resembles human aging. However, the precise properties of klotho protein, the mechanism regulating its expression, etc., have not been clarified. First, using specific antibody we identified klotho expression in mouse kidney as mainly localizing in the distal and collecting duct cells. Based on this information we examined the expression of klotho in a murine inner medullary collecting duct cell line (mIMCD3). We then explored the physiological relevance of regulation of klotho expression under oxidative stress condition. Expression of klotho in mIMCD3 cells was identified by real-time PCR, immunoprecipitation-Western blotting, and immunocytochemical staining. Cells were transfected with recombinant klotho adenovirus and overexpression of klotho gene was induced to confirm the expression of internal klotho. Oxidative stress injury produced by adding hydrogen peroxide to the culture medium dose-dependently reduced klotho expression maximally 24 hours, and it also diminished klotho staining. The results of this study demonstrated that klotho expressed in cultured mIMCD3 cells and that the klotho gene may be involved in the process of oxidative stress injury in these cells.

Key words: adenovirus, collecting duct, hydrogen peroxide, klotho, oxidative stress

緒 言

挿入変異により生じた短命, 動脈硬化症, 骨粗鬆症, 皮膚萎縮, 肺気腫など老化兆候と類似する表現型を呈するマウスから, その原因遺伝子が特定され klotho と命名された¹⁾. 興味深い点は, klotho 遺伝子が腎臓, 脳に特異的に発現し, また, mRNA の splicing によって分泌型蛋白と膜型蛋白が産生されて, 特に分泌型蛋白により遠隔の臓器の機能に影響を与えていると推測されていることである^{2,3)}. しかしながら, klotho 遺伝子発現の意義や調整メカニズムはいまだに不明な点が多い. この点に関しては, klotho の検討が可能 cell line が明らかでなく, *in vivo* の系に頼らざるを得ないことが, 一つの大きな要因である.

このため, 今回我々は, 腎臓における klotho 発現の局在を観察し, 発現部位に由来する cell line での実際の発現を観察した. さらにその発現調節に関し

ては, 最近, 持続的なストレス下の動物モデルにおいて腎臓での klotho 遺伝子発現が抑制され^{4,5)}, また, ヒトの慢性腎不全時にも発現が抑制されていることが報告されている⁶⁾. これらの報告はストレスによる klotho 遺伝子発現の低下と, 老化類似の表現型を示す細胞・組織機能障害が関連することを示唆している.

一方, reactive oxygen species (ROS) は虚血や toxin, 免疫機序による組織障害のメディエーターとしての役割が明らかにされており^{7,8)}, この酸化ストレスはまた, 老化の促進因子としても認識されている. このため, 発現を確認したマウス腎由来の培養細胞である mouse inner medullary collecting duct cell (mIMCD3 細胞) において酸化ストレスによる発現への影響を検討した.

対象および方法

1. 対象

7~8 週齢, 雄性の Balb/c マウスから pentobarbital を用いて麻酔下に腎臓を摘出し, 組織学的検討を行った. 全ての動物実験は東京女子医科大学動物実験倫理委員会の承認を得て (No 03-7), NIH の実験動物の使用ガイドラインに準拠して施行した.

培養細胞は, マウス腎集合管上皮細胞 (mouse inner medullary collecting duct cell: mIMCD3 cell), (ATCC number: CRL-2123) を用いた⁹⁾. mIMCD3 細胞の培養には, FBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, 最終濃度: 10%), penicillin-streptomycin (Invitrogen, 最終濃度 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) を添加した DMEM/F12 (Invitrogen) 液体培地を用い, 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した. 継代 18~22 代の細胞を実験に使用した.

2. 方法

1) パラフィン免疫組織染色

腎臓は, 4°C 16 時間, 4% paraformaldehyde で固定し, パラフィンに包埋した. 3 µm のパラフィン切片を脱パラフィンし, 0.3% H₂O₂ メチルアルコールで 30 分間反応させた. 免疫組織染色に Vectastain ABC Kit Rat IgG (Vector Laboratories, CA, USA) を用い, 20 分間 0.15% rabbit serum (20 mM Tris, 225 mM NaCl) でブロックした. 一次抗体として KM2076¹⁰⁾ (協和発酵より供与) で 30 分間反応させ, 洗浄後, 30 分間ビオチン化二次抗体で反応させ, Vectastain ABC reagent で 30 分間反応させた. その後 peroxidase substrate solution DAB substrate kit (Vector Laboratories) で発色させた.

2) 細胞免疫染色

PP (poly-L-lysine) コートのカバーガラス (岩城ガラス, 船橋, 千葉) 上に mIMCD3 細胞を培養した. 培養細胞を室温 30 分間, 4% paraformaldehyde で固定した. PBS で洗浄後, 腎臓と同様に免疫染色を行った.

3) RNA 抽出, reverse transcription (RT), real-time PCR

基本的には Yoshida ら¹¹⁾ の方法に準じて行ったが, 要約すると, total RNA は TRIZOL (Invitrogen) を用いて細胞より抽出した. 発現の確認および相対的な発現量の定量のため, real-time, one step reverse-transcriptase PCR 法を用いた.

real-time PCR は SYBER Green PCR 反応液による Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City,

CA, Sequence Detection Systems 1.6.3) を用いて分析した. 1.0 µl RNA (100 ng/µl) を用いて, 48°C 30 分間反応後, 続けて PCR を 95°C 10 分間の初期反応の後, 95°C 15 秒間, 60°C 1 分間で 40 サイクル施行した. mRNA のレベルは GAPDH により補正した.

マウス特異的な PCR primer は以下を使用した. klotho では forward primer: 5'-TCCATCTGGGCACTTTTCAC-3', reverse primer: 5'-TAACTATCGCTGGCCA CATC-3' を, GAPDH では forward primer: 5'-CATGGCCTCCAAGGAGTAAG-3', reverse primer: 5'-CCTAGGCCCTCCTGTTAT T-3' を用いた. また対照として rodent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA を用いた.

4) Immunoprecipitation-Western blotting

培養細胞をサンプルとして, RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP 40, 0.5% sodium deoxycholic acid, 0.1% SDS, 1 mM DTT, 1 mM sodium orthovanadate) でホモジナイズした後, 5,000 rpm 10 分間遠心し上清を分離した. 蛋白濃度を測定して 100 µg 相当と 15 µl protein A agarose (Roche Molecular Biochemicals) を混和しプレクリアーを行った. また klotho 抗体と 15 µl protein A agarose を混合し, 4°C over night でインキュベートした. その後, プレクリアーした蛋白と klotho 抗体の付着した protein A agarose を加えて, さらに 4°C 1 時間インキュベートし, 15,000 回転 1 分間遠心して pellet を作製した. RIPA lysis buffer で洗浄後, 10 µl の RIPA lysis buffer と 15 µl の 2× SDS サンプルバッファーを加え, 96°C 5 分間インキュベートした. その後 10,000 回転 1 分間遠心し上清液を, 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE: Readygels J, BIO-RAD) で電気泳動を行った. ゲルを PVDF 膜に転写後, 一次抗体液 anti-klotho antibody を 2,000 倍希釈して使用した. PBS で洗浄後, バンドは ECL (Amerham Biosciences, Piscataway, NJ) を用いて可視化し, densitometry を用いて比較的定量化した.

5) アデノウイルスと遺伝子導入

Adenovirus Expression Vector kit (Takara, 大津) で作製した, マウス klotho 遺伝子 (adKL) と前述した対照として beta-galactosidase (adLacZ, 協和発酵から供与) を実験に用いた. 293 細胞を用いて titration を行った後, DNA-terminal protein complex 法により mIMCD3 細胞に遺伝子導入を行った¹²⁾.

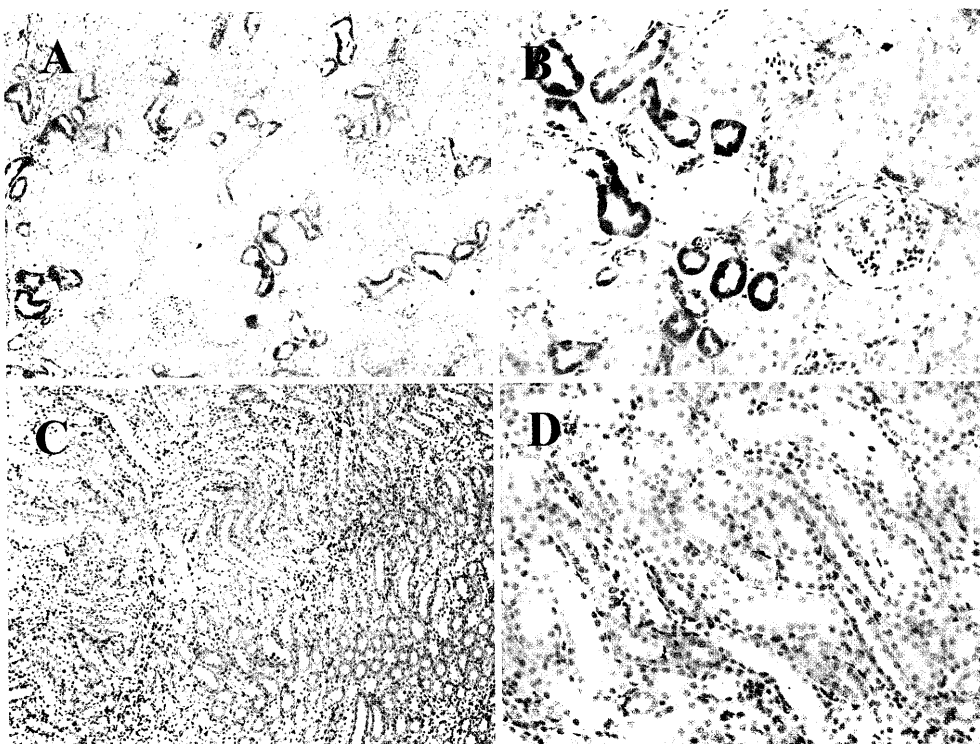


図1 マウス腎の klotho 染色
A, B: 皮質部, C, D: 髄質部, A, C ($\times 100$), B, D ($\times 200$).

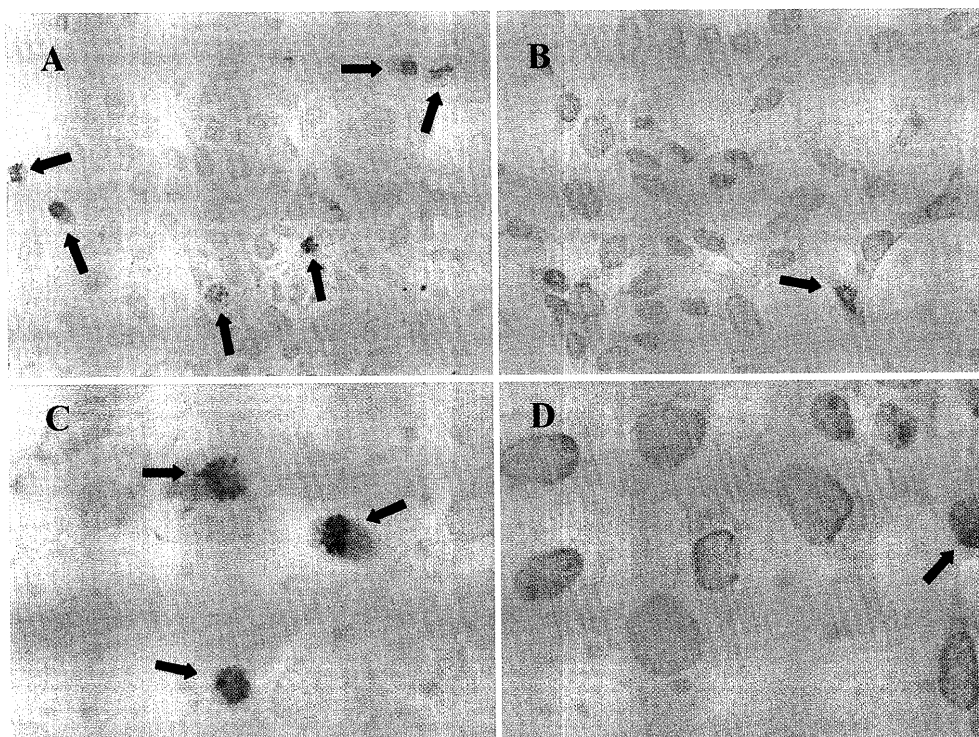


図5 mIMCD3 細胞のパラフィン免疫組織染色
A, C: コントロール, B, D: H_2O_2 負荷群, A, B: 低倍率 ($\times 200$), C, D: 高倍率 ($\times 400$).
矢印は染色された細胞.

遺伝子導入前日に 60mm 径の培養ディッシュに 1.8×10^5 個の mIMCD3 細胞を播き, $37^\circ C$, 5% CO_2

条件下でインキュベートした. 3.3×10^6 plaque forming units のアデノウイルスを 500 μ l の DMEM/F12

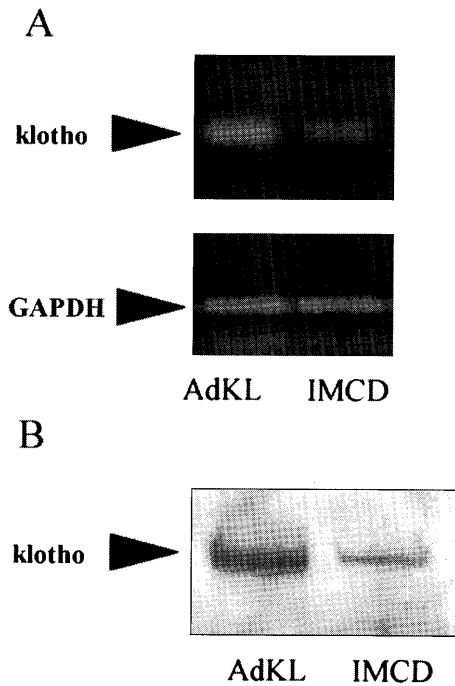


図2 mIMCD3細胞におけるklotho発現の確認
A: mIMCD3細胞およびアデノウイルスを遺伝子導入した細胞でのmRNA発現, B: 両細胞におけるimmunoprecipitation-Western blottingの結果.

液体培地に添加し、50%コンフルエントになったmIMCD3細胞の培養ディッシュから培養液を吸引除去し、滅菌PBSで細胞を洗浄し、均一に分布するように添加し、遺伝子導入した。37°C、5% CO₂条件下でインキュベートし、遺伝子導入から24時間後に培養細胞を採取した。培養細胞の採取は、ディッシュの液体培地を吸引除去しPBSで洗浄後、TRIzol (Invitrogen)を加えて攪拌した後チューブに回収し、mRNAを抽出する時まで-80°Cで保存した。

6) 過酸化水素負荷によるmIMCD3細胞でのklothoの発現

過酸化水素 (H₂O₂) 添加前日に60mm径の培養ディッシュに2.6×10⁵個のmIMCD3細胞を播き、37°C、5% CO₂条件下でインキュベートした。80~90%コンフルエントのmIMCD3細胞にH₂O₂ (最終濃度100μM)を添加し、培養細胞を0、3、6および24時間後に採取した (n=6)。また、濃度変化による影響を検討するため、0、50、100、200μM濃度のH₂O₂を負荷して、24時間後に採取した (n=6)。培養細胞の採取は、ディッシュ内の液体培地を吸引除去しPBSで洗浄後、TRIzol (Invitrogen)を加えて攪拌した後チューブに回収し、mRNAを抽出する時まで-80°Cで保存した。

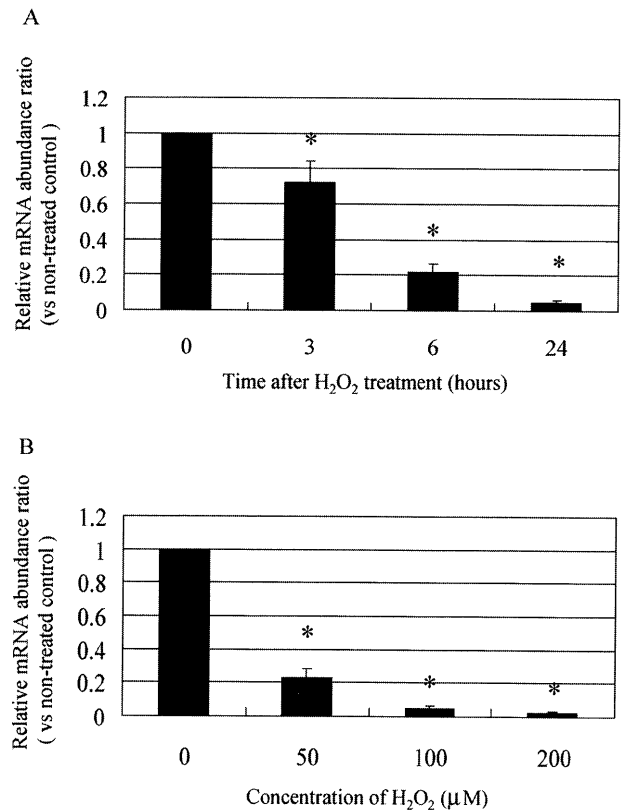


図3 H₂O₂負荷によるklotho mRNAの抑制
A: mRNA発現の経時的発現, B: mRNA発現の濃度依存性の抑制, *p<0.05はtime 0もしくはdose 0との比較.

7) 統計

データは平均値±標準誤差で示した。統計的分析は、群間の変化にunpaired t-testを用い、経時的変化は重複測定分散分析法 (repeated measure ANOVA)によった。p値<0.05を統計学的に有意とした。

結果

マウス腎組織を用いて、免疫染色でklothoの局在を検討した。パラフィン免疫組織染色 (図1)に示すように皮質遠位尿細管とともに、髓質部でも集合尿細管に染色が認められた。局在は細胞質に認められ、膜、核内などでの特定はできなかった。血管系、糸球体、近位尿細管などの他部位には染色されなかった。

続いて腎臓の集合尿細管由来とされるmIMCD3細胞での発現を検討した。mRNAレベルでは、real time PCRで発現が認められ、また確認の目的で、adKLを遺伝子導入した細胞からのmRNAを用いたreal time PCRでも同じサイズにbandingが認められた (図2)。klothoに対する特異的抗体を用いて、

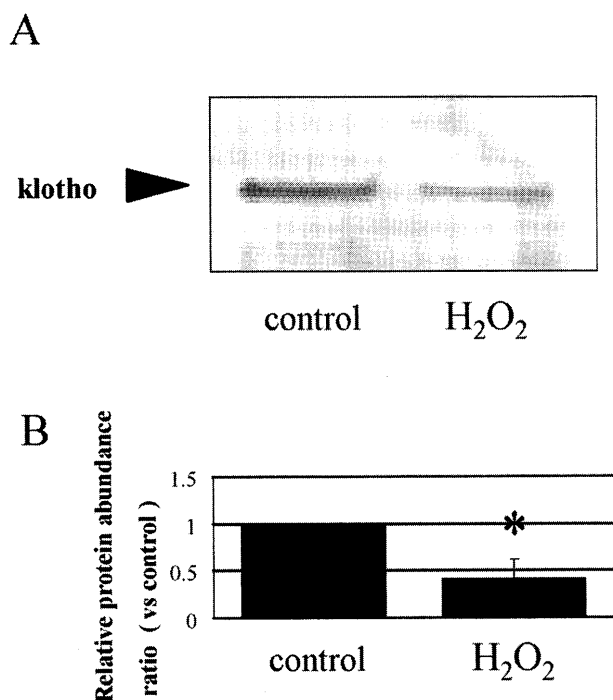


図4 H₂O₂ 負荷による klotho 蛋白発現の抑制

A: 代表的な Western blotting, B: klotho 蛋白発現の半定量.

klotho 蛋白発現は, 有意に負荷群において減少した.

* $p < 0.05$ は負荷前との比較, 数値は平均値 \pm 標準誤差.

immunoprecipitation-Western blotting により蛋白発現を観察したが, 130kd サイズの banding を確認した. さらに先の adKL を導入した細胞では, その発現量の増加が認められた.

H₂O₂ 負荷による klotho mRNA の発現への影響について, 100 μ M 濃度負荷による時間経過と 0 から 50, 100, 200 μ M の濃度変化による影響を図 3 に示した. 3, 6, 24 時間後の経過とともに, それぞれ 70, 20, 5% と発現が抑制された (図 3A). また, 50, 100, 200 μ M の濃度変化とともに, 23, 5, 2% と発現量の低下が観察された (図 3B).

Immunoprecipitation-Western blotting では, 100 μ M 濃度の 24 時間負荷で, 蛋白発現量は 35% まで低下した (図 4).

培養細胞を用いた免疫染色では, 抗体は細胞質および強拡大で核にも染色された (図 5A, C). 一方, 100 μ M 濃度の H₂O₂ 24 時間負荷により, その染色性は著明に減弱が認められた (図 5B, D).

考 察

挿入変異によりマウスで見出された klotho 遺伝子は, その表現型が老化の所見に酷似することから, 老化関連遺伝子として注目された. 特に高度に腎臓

に発現すること, また, ヒト腎不全患者の腎での発現が著明に抑制されていることから, 腎不全時に臨床経験する合併症の要因をなす可能性が推測されている. しかしながら, その生物学的活性, 生理的意義, 調節機序など不明な点が多い. 今後, こうした点を明らかにしていく上では, *in vivo* の系に加えて *in vitro* での検討が不可欠であると考えられる.

腎には, klotho mRNA が高度に発現することが指摘されており, 当初は, 腎組織の局在では, 皮質尿細管に局在することが報告されている¹⁰⁾. 今回の検討では, 免疫組織染色で髓質尿細管にも klotho の発現を認め, 遠位系から集合尿細管を中心とした局在が推測された (図 1). 今までは, プライマリーな細胞やプラスミドなどにより過剰発現させた細胞が実験には供与されてきた. いわゆる cell line では 3T3-L1 脂肪細胞での発現が報告されているのみである¹³⁾. 今回, 腎での遠位系の尿細管, 特に集合尿細管にも染色性が認められたことから, 同部位由来の培養系細胞である mIMCD3 細胞に着目した. この細胞を用いて, klotho の発現を, mRNA レベルでは real time PCR で, 蛋白は immunoprecipitation-Western blotting で確認した. さらにアデノウイルスで klotho 遺伝子を遺伝子導入すると, 同じサイズのシグナルが real time PCR でも Western blotting でも過剰の発現が確認された.

次に, この発現が実際的に生理的な変化を反映するものであるかどうかを検討した. 今まで, 腎臓における klotho mRNA の発現低下は, 自然発症高血圧ラット, deoxy corticosterone acetate-salt 高血圧ラット, angiotensin II 負荷ラットのような高血圧動物モデルにおいて報告され⁵⁾¹⁴⁾¹⁵⁾, また, 実験的糖尿病¹⁶⁾, 慢性腎不全⁶⁾のような血圧以外のストレスや疾患でも, klotho mRNA, 蛋白が減少することが報告されている. さらに, このような持続的ストレス下での klotho 発現低下に加えて, lipopolysaccharids 投与のような急性ストレスによっても klotho 発現量が変化することが報告されている⁴⁾.

そこで我々は, 典型的な細胞のストレス負荷である H₂O₂ を用いて, klotho の発現を観察した. 結果として, H₂O₂ は濃度依存的に, 経時的に klotho の発現を mRNA レベルにおいても, 蛋白レベルにおいても抑制し, 酸化負荷による klotho の down regulation が明らかにされた. 細胞でのストレス実験では, 細胞の viability の低下を反映した非特異的な発現低下も否定できないが, 従来の *in vivo* での報告や,

また real time PCR を用いた幾つかのストレス関連の発現遺伝子 profile の比較でも, klotho の発現抑制は顕著であり(未発表データ), 病態生理学的意義が推測された。

一方, 細胞での染色性においても, 細胞質に染色が確認されたが, 負荷後はその染色性が低下した(図5)。さらに, 核に染色される細胞が目立つ傾向があったが, 以前の *in vivo* の報告では細胞質が中心であり, 負荷後の培養細胞で核に染色性がみられることの意義は不明である¹⁰⁾。未確定なデータながら, アデノウイルスを用いて klotho 蛋白を過剰発現させた IMCD 細胞を flowcytometry を用いて細胞周期を解析すると, M 期の細胞の増加がみられ, 細胞分裂との関連が示唆された。このため, H₂O₂ 負荷による細胞死により, 増殖の turnover が速いことも一要因としては考えられたが, 今後の検討が必要である。

血管の内皮細胞では, klotho が抗ストレス作用, 組織保護作用を有する可能性を示唆した報告があるが¹⁶⁾¹⁷⁾, このストレス下での尿細管由来細胞での klotho 発現の動態が, いかなる病態生理に関わるかは特定しがたい。以前の我々の腎臓虚血再還流モデルを用いた検討では, やはり腎組織の klotho 発現は低下した。klotho を組み込んだアデノウイルス処置により, 腎機能, 組織障害の程度が軽減され, また, 組織上ではアポトーシスの発現も低下した¹⁸⁾。虚血, 再還流モデルでは, その組織障害の過程に, 酸化ストレスが関与することは周知のことで, 細胞のアポトーシスと壊死が認められる^{19)~22)}。klotho の過剰発現により, この過程が抑制されたことは, klotho が酸化ストレスに対して防御的作用を持つ可能性がある²³⁾。これらの結果は, 酸化ストレスが klotho 変異マウスの老化兆候を示す表現型に関与し, そして, klotho 蛋白が抗酸化作用の調整に関連していることを示唆している。

klotho 蛋白の生物学的活性については, いまだに不明な点が多い。血管内皮細胞での NO 産生の障害や²⁴⁾, カルシウム, リンのなどの調節を含む骨代謝への関わり²⁵⁾²⁶⁾など, 多様な生理活性を持つ可能性が推測され, それが, 生体の老化という表現型に関与していることが推測される。老化の過程では, 酸化ストレスが病態生理に重要な役割を演じていることは明らかで, 抗酸化ストレス作用は, klotho 蛋白の一つの基本的な生理作用である可能性がある²⁷⁾。

結 論

老化抑制作用が注目される klotho の発現を cell line である mIMCD3 細胞で確認した。また, この培養細胞での klotho の発現は H₂O₂ により著明に抑制され, 酸化ストレスと klotho 発現との関連が示唆された。今後, さまざまな病態生理への関与, 細胞内シグナルの検討などへの応用が可能であると考えられる。

本研究に協力をいただいた坪井真由子研究員, 寺岡敦子研究員に深謝いたします。

文 献

- 1) Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H et al: Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling aging. *Nature* **390**: 45-51, 1997
- 2) Shiraki-lida T, Aizawa H, Matsumura Y: Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Lett* **424**: 6-10, 1998
- 3) Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-lida T et al: Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun* **232**: 626-630, 1998
- 4) Ohyama Y, Kurabayashi M, Matsuda H et al: Molecular cloning of rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. *Biochem Biophys Res Commun* **251**: 920-925, 1998
- 5) Aizawa H, Saito Y, Nakamura T et al: Down-regulation of the klotho gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats. *Biochem Biophys Res Commun* **249**: 865-871, 1998
- 6) Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S et al: Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochem Biophys Res Commun* **280**: 1015-1020, 2001
- 7) Kelly KJ, Molitoris BA: Acute renal failure in the new millennium: time to consider combination therapy. *Semin Nephrol* **20**: 4-19, 2000
- 8) Nath KA, Norby SM: Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med* **109**: 655-678, 2000
- 9) Rauchman MI, Nigam SK, Delpire E et al: An osmotically tolerant inner medullary collecting duct cell line from an SV40 transgenic mouse. *Am J Physiol* **265**: F416-F424, 1993
- 10) Kato Y, Arakawa E, Kinoshita S et al: Establishment of the anti-klotho monoclonal antibodies and detection of klotho protein in kidneys. *Biochem Biophys Res Commun* **267**: 597-602, 2001
- 11) Yoshida T, Tang SS, Hsiao LL et al: Global analysis of gene expression in renal ischemia-reperfusion in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* **291**: 787-794, 2002
- 12) Shiraki-lida T, Iida A, Nabeshima Y et al: Improvement of multiple pathophysiological pheno-

- types of klotho (kl/kl) mice by adenovirus-mediated expression of the klotho gene. *J Gene Med* **2**: 233–244, 2000
- 13) **Mizuno I, Takahashi Y, Okimura Y et al**: Upregulation of the klotho gene expression by thyroid hormone and during adipose differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *Life Sci* **68**: 2917–2923, 2001
 - 14) **Mitani H, Ishizuka N, Aizawa T et al**: In vivo klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension* **39**: 838–843, 2002
 - 15) **Saito K, Ishizaka N, Mitani H et al**: Iron chelation and a free radical scavenger suppress angiotensin II-induced downregulation of klotho, an anti-aging gene, in rat. *FEBS Lett* **551**: 58–62, 2003
 - 16) **Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y et al**: In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* **267**: 767–772, 2000
 - 17) **Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T et al**: Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 324–329, 1998
 - 18) **Sugiura H, Yoshida T, Tsuchiya K et al**: Klotho reduces apoptosis in experimental ischemic acute renal failure. *Kidney Int* in revision
 - 19) **Shumer M, Colombel MC, Sawczuk IS et al**: Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol* **140**: 831–838, 1992
 - 20) **Chien CT, Lee PH, Chen CF et al**: De novo demonstration and co-localization of free-radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol* **12**: 973–982, 2001
 - 21) **Saikumar P, Venkatachalam MA**: Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. *Semin Nephrol* **23**: 511–521, 2003
 - 22) **Padanilam BJ**: Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**: F608–F627, 2003
 - 23) **Yu BP**: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* **74**: 139–162, 1994
 - 24) **Nakamura T, Saito Y, Ohyama Y et al**: Production of nitric oxide, but not prostacyclin, is reduced in klotho mice. *Jpn J Pharmacol* **89**: 149–156, 2002
 - 25) **Kawaguchi H, Manabe N, Miyaura C et al**: Independent impairment of osteoclast differentiation in klotho mouse exhibiting low-turnover osteopenia. *J Clin Invest* **104**: 229–237, 1999
 - 26) **Yoshida T, Fujimori T, Nabeshima Y**: Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1 alpha hydroxylase gene. *Endocrinology* **143**: 683–689, 2002
 - 27) **Nagai T, Yamada K, KIM H-C et al**: Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. *FASEB J* **17**: 50–52, 2002