

氏名(生年月日)	ミトベ 倫 大
本 籍	
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学位授与の番号	乙第 2309 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当 (博士の学位論文提出者)
学位論文題目	マウス腎由来培養細胞における Klotho の発現検討
主論文公表誌	東京女子医科大学雑誌 第 74 卷 第 12 号 673-679 頁 2004 年
論文審査委員	(主査) 教授 二瓶 宏 (副査) 教授 内山 竹彦, 宮崎 俊一

論 文 内 容 の 要 旨

〔緒言〕

Klotho は腎臓に発現する老化関連遺伝子として注目されているが, klotho の検討が可能な cell line が明らかでないこともあり, その発現調節など不明な点が多い. 今回我々は, cell line であるマウス腎集合管上皮培養細胞 (mIMCD3) でその発現を確認し, 酸化ストレスによる影響を検討した.

〔方法〕

Balb/c マウスの腎臓を用いて klotho の局在を組織学的に観察し, その発現部位に由来する mIMCD3 細胞において mRNA, 蛋白の発現を検討した. さらに, klotho の cDNA を組み込んだアデノウイルス (adKL) を mIMCD3 に遺伝子導入し, klotho 発現を確認した. 続いて培養液に過酸化水素 (H_2O_2) を添加することで, 酸化ストレスによる影響を観察した. mRNA は real-time PCR 法で測定し, 蛋白は特異的抗体を用いた免疫沈降ウエスタンブロットリング法および免疫染色により観察した.

〔結果〕

マウスの腎組織では, 皮質遠位尿細管と髄質部集合尿細管の細胞質に klotho の局在を認めた. mIMCD3 細胞で klotho mRNA, 蛋白の存在を観察し, adKL 導入により増幅された. H_2O_2 負荷により, 用量, 時間依存性に klotho の発現が抑制された. 免疫染色では, 細胞質の染色性が負荷により低下し, 核が染色される細胞が散見された.

〔考察〕

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. これまでの *in vivo* でのさまざまなストレス実験と同様, mIMCD3 細胞においても klotho の発現は H_2O_2 負荷により抑制され, 老化の重要な要因と考えられる酸化ストレスと klotho との関連が示唆された.

〔結論〕

Klotho の発現を確認し得た mIMCD3 細胞は, 今後 *in vitro* でのさまざまな病態生理, 細胞内シグナルの検討などへの応用が可能である.

論文審査の要旨

腎不全患者における老化の進行が知られている。他方、腎臓に発現する klotho は老化関連遺伝子として注目されているが、検討可能な cell line が明らかでないこともあり発現調節や蛋白機能など解明すべき点が多く残されている。

Balb/c マウスの腎で klotho の局在を確認し、相当する組織由来の mIMCD3 細胞を用いて mRNA、蛋白の発現を検討した。Klotho の cDNA を組み込んだアデノウイルス (adKL) の遺伝子導入により発現が増強された。H₂O₂ 負荷により、用量・時間依存性に klotho 発現が抑制された。免疫染色で、負荷により細胞質の染色性が低下し、核が染色される細胞が散見された。

Klotho の発現を検討できる cell line として mIMCD3 細胞を確認した。老化の要因とされる酸化ストレス、腎不全例ではカルボニルストレス、と klotho との関連を示唆する結果が得られた。

mIMCD3 細胞が klotho 細胞のシグナル、機能の検討に有用であることを示した学術的に有意義な論文である。