OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Klotho gene delivery suppresses oxidative stress in vivo
Author(s)	太田, 淳介
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47555
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

氏　　名	太田淳介（おおたじゅんすけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　２０９２０　号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Klotho gene delivery suppresses oxidative stress in vivo **（クロトー遺伝子導入は生体内で酸化ストレスを抑制する）**
論文審査委員	（主査） 教　授　荻原　俊男 （副査） 教　授　金田　安史　　教　授　下村伊一郎

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

Klotho 変異マウスは、皮膚萎縮、骨粗鬆症、動脈硬化といった様々なヒトの老化に似た症状を示し、一方で Klotho を過剰発現させたマウスは長寿となる。klotho 遺伝子は腎臓の遠位尿細管、脳の脈絡叢、副甲状腺に主に発現している。klotho 遺伝子が老化を抑制する機能としては、insulin/IGF 経路の抑制や MnSOD（manganese superoxide dismutase）の発現誘導による抗酸化ストレス作用が原因として考えられている。

生体内への klotho 遺伝子導入の研究は、これまでにアデノウイルスを用いていくつか行われている。例えば動脈硬化発症マウスにおいては、klotho の導入により、血管内皮機能障害、NO 産生低下、血圧上昇を抑制するという結果が得られており、またアンジオテンシンⅡ注入によるラットの腎障害を軽減するという報告もある。

本研究において、通常のマウスと高血圧発症ラット（SHR）の尾静脈から klotho 過剰発現プラスミドを導入し、血管や臓器に対する抗酸化ストレス作用や血圧への影響に関しての研究を行った。

〔　方法ならびに成績　〕

pCAGGS プラスミドにマウス klotho 遺伝子の cDNA を挿入し、klotho 過剰発現プラスミドを作成し、コントロールとしては pCAGGS ベクターを用いた。４週齢の MCH-ICR マウスを 10 匹ずつ２群に分け、各々50μg の klotho プラスミド及びコントロールプラスミドを 0.1 ml/ｇ体重のリンゲル液に溶解し、尾静脈より５秒間で急速に静注した。検体採取は 48 時間後に行った。また 14 週齢の雄 SHR 24 匹を klotho プラスミドとコントロールプラスミド投与の２群に分け、それぞれの群の半数に NO 合成酵素阻害薬である L-NAME の経口投与を行い、７日後に検体採取をした。

Klotho プラスミドの遺伝子導入の効果を確認するために、Western blotting 法により、血清及び肝臓での klotho 蛋白発現を定量した所、コントロール群では見られなかった klotho 蛋白の発現が検出された。

次に klotho 遺伝子導入による抗酸化ストレス効果を明らかにするために、マウス大動脈での Mn-SOD 蛋白発現、SOD 活性、血清における NO 産生、過酸化脂質（LPO）濃度の測定を行った，その結果、klotho 群において有意に、大動脈 Mn-SOD 蛋白発現及び SOD 活性、血清 NO 産生の上昇が見られ（SOD 活性/コントロール群：94±12、klotho

群：204±13）（NO/コントロール群：28±2.9、klotho 群：66±5.7）、血清 LPO 濃度は低値を示した（LPO 濃度/コントロール群：1.1±0.18、klotho 群：0.53±0.08）。

同様に高血圧発症ラット（SHR）において、肝臓と腎臓での SOD 活性及び LPO 濃度の測定を行った。いずれの臓器においても、klotho 群において有意に SOD 活性が高く、LPO 濃度は低値であった。klotho による SOD 活性の上昇は、L-NAME 投与群においても認められた。しかしながら L-NAME 投与の有無に関係なく、klotho 遺伝子導入による血圧に対する影響は明らかでなかった。

〔 総　　括 〕

本研究においては、klotho 遺伝子の経尾静脈での導入を行い、klotho 遺伝子による抗酸化ストレス作用を血清、血管、肝臓、腎臓において、確認する事ができた。これまで klotho の生体への遺伝子導入としては、アデノウイルスによる方法が用いられてきたが、静脈への直接注入でも効果が得られる事が明らかになり、今後、異なるより臨床応用に近い遺伝子導入法での効果が期待される。

Klotho が NO 産生を増加させるにも関わらず、SHR での血圧に対する影響は明らかではなかったが、この理由としては、SHR の血圧を低下させるに十分な量の NO 産生ではなかった、観察期間が短かったなどの理由が考えられる。また変異マウスでは血圧の上昇は見られないため、klotho の血圧に対する影響は現時点では明らかではない。

Klotho の導入によって NO 産生が上昇し、また SOD 活性の上昇は、L-NAME 投与群においても見られた。klotho による SOD 活性の上昇と NO 産生の関係については、NO 産生を L-NAME 投与で阻害しても SOD 活性の上昇が見られる事から、klotho が Mn-SOD を上昇させる事により、動脈での内皮機能が改善して NO 産生がもたらされたと考えられた。

論文審査の結果の要旨

klotho 遺伝子は、その変異がヒトの老化に似た症状を示し、一方で、過剰発現マウスは長寿を示す。本研究は、生体内へ経尾静脈的に klotho 遺伝子導入を行い、その酸化ストレス及び血圧への影響を検討したものである。

その結果、通常マウス及び高血圧発症モデルラットにおいて、大動脈での Mn-SOD 蛋白発現、SOD 活性の上昇、血清 NO 産生上昇、血清 LPO 濃度低下、肝臓と腎臓での SOD 活性の上昇などの抗酸化ストレス効果が示された。

以上の知見は本研究で初めて得られたものであり、得られた知見は今後の klotho あるいは抗酸化、抗老化の検討に有用であるばかりでなく、その作用機序の解明にも寄与する情報を提供するものと考えられるため、学位に値するものと認める。