

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	中山 慎也
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ①・2 項該当		
論文題目 Klotho protects chromosomal DNA from radiation-induced damage (Klotho は放射線障害から染色体 DNA を保護する)			
論文審査担当者			
主査	教授	永田 靖	印
審査委員	教授	栗井 和夫	
審査委員	准教授	笹谷 めぐみ	
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>一回膜貫通型タンパク Klotho は腎臓で発現しており、リンの排泄を促進し血管石灰化の抑制などを通じた抗老化作用を有することが報告されている。しかしながら、Klotho の抗老化作用については未だ不明な点が多い。老化には DNA 損傷も密接に関わっており、特に電離放射線は老化を促進することが知られている。しかし、Klotho と DNA 損傷およびその修復との関連については未だ解明されていない。</p> <p>そこで本研究では、ヒトの腎臓由来細胞とマウスの腎臓組織を用いて、電離放射線 (IR) に特徴的な DNA 二本鎖切断 (DSB) を中心に Klotho と DNA 損傷およびその修復との関連を検討した。</p> <p>ヒト近位尿細管上皮細胞 (HK-2 細胞) に対して siRNA を導入し、Klotho の発現抑制モデルを作製した。またヒト胎児由来腎臓上皮細胞 (293 細胞) に Klotho を過剰発現させるために、Klotho-GFP を導入した。両者に対して電離放射線照射を行い、生存率の評価と、<math>\gamma</math>-H2AX の核内フォーカス形成を評価した。また Klotho 発現抑制 HK-2 細胞を用いて中性 Comet Assay を行い、DSB を直接定量化した。DNA との関連を調べるために、細胞分画を行い Klotho の局在を解析した。</p> <p>ノックアウトマウス群を作製し電離放射線照射後に、Klotho と <math>\gamma</math>-H2AX を免疫組織染色し、解析した。</p> <p>Klotho ノックダウン群で細胞生存率が有意に低下した。Klotho を過剰発現させた 293 細胞では、コントロール群と比較して有意に生存率の上昇を認めた。</p> <p>Klotho ノックダウン群は IR 後に <math>\gamma</math>-H2AX の核内フォーカスの上昇を認めた。反対に Klotho 過剰発現群では、IR 後に <math>\gamma</math>-H2AX の核内フォーカスの低下を認めた。中性 Comet Assay による DNA 損傷の直接評価では、HK-2 細胞の Klotho ノックダウン群で有意に Tail Moment の上昇を認め、DSB の入力が大きいたことが確認された。HK-2 細胞を分画したところ、核内に Klotho シグナルを検出し、クロマチン分画を含む全分画で検出された。</p> <p>Klotho ホモノックアウトマウス群では IR 0.5 時間後に <math>\gamma</math>-H2AX のシグナルが有意に上昇していた。</p> <p>本論文は抗老化作用をもつ Klotho タンパクと DNA 損傷との関連について検討した。ヒト腎臓由来細胞株を用いた実験では、Klotho ノックダウン群で放射線照射後の生存率が低下し、照射直後の DSB が増加していることから、Klotho は放射線被ばくに対して DNA 保護作用がある可能性が示された。このことは、放射線照射後 8、24 時間の時点で <math>\gamma</math>-H2AX フォーカス数がコントロールと有意差がないこと、さらに中性 Comet Assay を用いた DSB 定量化でもコントロール群と比較し Klotho 発現低下群では照射直後の DSB 量が有意に高いこと、これまで Klotho 一回膜貫通型タンパクとして知られていた Klotho が核内のクロマチン結合分画でも検出されたことから支持された。またマウスモデルでも、Klotho の放射線被ばくに対する DNA 保護作用を有する可能性が支持された。</p> <p>細胞膜で Klotho と共受容体を形成しリンの排泄を促進する FGFR や FGF23 を発現低下させても、電離放射線照射後の DSB 量に変化は認めなかった。このため、電離放射線照射</p>			

後の DNA 保護作用には、これまで報告されてきた Klotho-FGFR 共受容体を介したリン排泄促進とは異なる機序が働いていると考えられた。このことは、Klotho が核内のクロマチン分画にも存在することから、支持されている。DNA 修復には様々なタンパクが関与しており、その多くは DNA 損傷の修復を促進することで細胞保護作用を示す。一方、Klotho 発現抑制細胞では放射線照射直後の DSB 量は多いが、修復スピードは遅くなかった。このため、Klotho は、ヒトで同定されている多くの DNA 損傷修復タンパク質とは異なり、染色体 DNA に直接結合し保護している可能性が示されている。

以上の結果から、本論文は Klotho の核局在を示し、放射線照射による染色体 DNA の DSB 誘導を抑制することを示した。Klotho の抗老化作用には DNA 保護作用も関わっていることを示唆したものであり、高く評価される。

よって、審査委員会委員全員は、本論文が中山慎也氏に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。