

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590895

研究課題名（和文） 糖尿病での骨・カルシウム代謝異常における Klotho 蛋白の意義の解明

研究課題名（英文） The significance of Klotho in bone and mineral metabolism disorders in diabetes

研究代表者

中谷 公彦 (NAKATANI KIMIHIKO)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：80398445

研究成果の概要（和文）： $\alpha$ -Klotho( $\alpha$ -KL)蛋白は、遠位尿細管に発現する膜蛋白で、カルシウム(Ca)代謝に関与する。糖尿病性腎症(DN)では、早期より尿中Ca排泄が増加するが、その発症機序は不明である。われわれは、早期DN例で腎臓での $\alpha$ -KL蛋白発現が有意に低下、尿中Ca排泄が有意に上昇することを明らかとした。また、尿中Ca排泄と腎臓でのKL発現量は有意な負の相関関係を示していた。一方、DNモデルマウスを用いた検討でも、尿中Ca排泄の増加に腎臓でのKL発現量に関与することを明らかとした。さらに早期DNで誘導される尿中Ca排泄増加が、骨代謝マーカー（骨型アルカリフォスファターゼ活性(BAP)とTRACP-5B)に与える影響について検討したが、今回の検討では有意な結果は得られなかった。

研究成果の概要（英文）：Renal  $\alpha$ -Klotho expression was significantly lower and urinary calcium excretion significantly higher in diabetic nephropathy than in IgA nephropathy with an eGFR greater than 60 ml/min per 1.73m<sup>2</sup>. Multiple regression analyses indicated that  $\alpha$ -Klotho mRNA was inversely correlated with calcium excretion. We also confirmed a reduction of renal  $\alpha$ -Klotho mRNA down to almost 50% and enhanced calcium excretion in mice with STZ-induced diabetic nephropathy in comparison with nondiabetic mice. Hypercalciuria was exacerbated in heterozygous  $\alpha$ -Klotho knockout mice in comparison with wild-type mice, each with STZ-induced diabetic nephropathy. Thus,  $\alpha$ -Klotho expression was decreased in distal convoluted tubules in diabetic nephropathy in humans and mice. Renal loss of  $\alpha$ -Klotho may affect urinary calcium excretion in early diabetic nephropathy. However, we cannot confirm the direct associations of renal  $\alpha$ -Klotho deficiency with bone metabolism abnormalities in diabetic nephropathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード： $\alpha$ -Klotho・糖尿病性腎症・尿中カルシウム排泄・骨代謝マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

$\alpha$ -Klotho( $\alpha$ -KL) 蛋白は、腎遠位曲尿細管、上皮小体、脈絡膜に発現する I 型膜蛋白であり、近年、最近の研究により、 $\alpha$ -KL は、副甲状腺ホルモンの分泌制御、ビタミンDの合成制御、脳脊髄液へのカルシウム (Ca) の輸送や腎臓における Ca の再吸収の制御に関与し、Ca 代謝の中心的な制御分子であることが明らかとされてきた。また、 $\alpha$ -KL 蛋白は膜貫通ドメイン近傍で切断され、分泌蛋白として血中・尿中に存在していることも明らかとされたが、実際の生体における分泌型  $\alpha$ -KL 蛋白の詳細な分子機能は未だ不明である。

近年、糖尿病の罹患率の増加とともに、糖尿病罹患の長期化に伴い、多彩な糖尿病の合併症の発生が大きな臨床的問題となっている。糖尿病の多彩な合併症の一つに骨代謝異常があげられ、糖尿病患者では、骨折頻度の上昇や骨折後の治癒遅延が報告されている。糖尿病の骨病変に関与する機構に関して、骨形成低下に関与しているはずで確立された事実である。骨形成低下に複数の要因が関与していることが示唆されているが、その一つの重要な要因として、尿中 Ca 排泄の増加による負の Ca バランス状態があげられる。負の Ca バランスは、二次性副甲状腺機能亢進症・骨吸収亢進を来すと考えられている。しかし、糖尿病で尿中 Ca 排泄が増加する詳細な分子機構は未だ解明されていない。そのなかで腎臓における  $\alpha$ -KL が Ca 再吸収に重要な役割を果たす新たな Ca 生体調節分子として注目されているが、臨床的意義に関してはまだ不明な点が多い。

今回、腎臓における  $\alpha$ -KL 蛋白が、早期糖

尿病性腎症における高 Ca 尿症の発症に関与するという仮説を設定し、本研究を展開することにした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病例での尿中 Ca 排泄増加および骨代謝異常に対する腎臓での  $\alpha$ -KL の意義を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### ① 臨床サンプルを用いた検討

当院で腎生検を施行した糖尿病性腎症および慢性腎臓病 (CKD) 例 (246例) を対象に、腎臓での膜型  $\alpha$ -KL 発現量と血中分泌型  $\alpha$ -KL 量を測定し、尿中 Ca 排泄量と  $\alpha$ -KL との関係を明らかにした。一方で、糖尿病性腎症例で、血中骨マーカーを測定し、血中分泌型  $\alpha$ -KL 量との相関関係を解析し、糖尿病での骨病変発症における  $\alpha$ -KL 蛋白の意義を解析した。なお、今回の臨床的研究の実施については、奈良県立医科大学臨床研究審査委員会の承諾を得ている。さらに、奈良県立医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究委員会の審査を受け、許可されている。

### ② モデルマウスを用いた検討

$\alpha$ -Klotho 遺伝子欠損マウス (KL<sup>-/-</sup>)、Hetero-type マウス (KL<sup>+/-</sup>)、および Wild-type マウス (KL<sup>+/+</sup>) (鍋島陽一教授に供与頂いた。) にストレプトゾシン (STZ) を投与、糖尿病性腎症を惹起し、各々尿中 Ca 排泄量を測定、比較検討した。また、同時に腎臓での Ca 輸送因子

の動態についても検討し、糖尿病性腎症におけるCa排泄機構異常における $\alpha$ -KLの意義を詳細に検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 臨床サンプルを用いた検討

腎機能の低下に伴い腎臓での $\alpha$ -KL発現量は有意に低下した(図1)。そこで、糖尿病性腎症例と腎機能を合致させたIgA腎症例で腎臓での $\alpha$ -KL発現量を比較したところ、有意に糖尿病性腎症例で有意に低下していた(図2)。特に、早期の段階(eGFR値が60ml/分/1.73m<sup>2</sup>以上)では、糖尿病性腎症例はIgA腎症例に比して腎臓での $\alpha$ -KL発現量は有意に低下していた(図2)。一方で、早期の段階では、糖尿病性腎症例はIgA腎症例に比して有意に尿中Ca排泄量が多く、また尿中Ca排泄量は、腎臓での $\alpha$ -KL発現レベルと有意な負の相関関係を示した。一方で、血中の分泌型 $\alpha$ -KL量は、腎臓での $\alpha$ -KL発現量と有意な正の相関関係を示し、早期の糖尿病性腎症例では、非糖尿病性腎症のCKD例に比べ有意に血中の分泌型 $\alpha$ -KL量が低下していた。また、尿中Ca排泄量は、血中の分泌型 $\alpha$ -KL量とも有意な負の相関関係を示したが、その相関の程度は、腎臓での $\alpha$ -KL発現レベルと相関の程度に比べ著明に弱いものであった。このことから、尿中Ca排泄の調節には腎臓での $\alpha$ -KL蛋白が、血中分泌型 $\alpha$ -KL蛋白より重要であることが示唆された。

一方で、腎臓 $\alpha$ -KLおよび血中の分泌型 $\alpha$ -KL量と骨代謝マーカーは有意な相関関係は認められず、また尿中Ca排泄量とも有意な相関関係を認めなかった。骨代謝マーカーへの影響は、 $\alpha$ -KL量や尿中Ca排泄量の経時的な変化も加味して検討する必要があると考えら

れる。

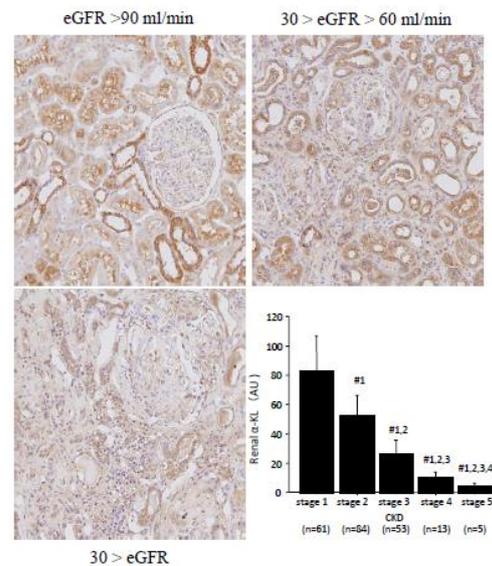


図1. 腎臓での $\alpha$ -Klotho免疫染色像とmRNA発現量

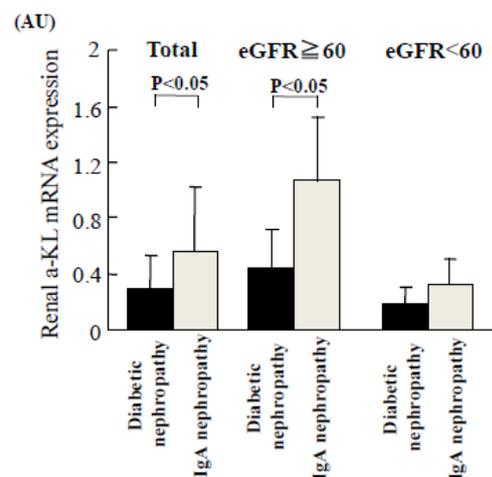


図2. 腎臓での $\alpha$ -Klotho mRNA発現量

##### (2) モデルマウスを用いた検討

KL+/-マウスでは、腎臓での $\alpha$ -KL発現量はKL+/+マウスの約半量であったが、糖尿病性腎症が誘導されない場合は、尿中Ca排泄量はKL+/+マウスと有意な差はなかった。しかし、KL+/-マウスにSTZを投与し、糖尿病性腎症を誘導すると、尿中Ca排泄増加量はKL+/+マウスに比べ有意に上昇した(図3)。一方、KL-/-マウスでは、KL+/+マウスに比して有意に尿中Ca排泄は増加していたが、糖尿病性腎症を誘導しても、尿中Ca排泄量の増加は、KL+/+マウ

スと同程度であった。つまり、腎臓での $\alpha$ -KL発現量は、糖尿病性腎症による尿中Caは排泄に重要な因子であることを示した。

そこで、腎臓でのCa輸送因子、とくにTRPV5(calcium-permeable transient receptor potential cation channel, subfamily V, member5)に焦点をあて、その動態に対する $\alpha$ -KL蛋白の関与について解析した。TRPV5を発現させたHuman Embryonic Kidney 293 cells (HEK細胞)に様々な濃度で $\alpha$ -KL遺伝子を導入し、各々Caの取り込みについて解析した。その結果、 $\alpha$ -KL発現量に依存してTRPV5を介したCaの取り込みが増加した(図4)。一方で、ヒト検体および糖尿病モデルマウスでの検討では、他のCKD例に比べて糖尿病性腎症での腎臓におけるTRPV5発現量に有意な差はなかった。

以上のことから、糖尿病性腎症では、早期から腎臓での $\alpha$ -KL発現量が低下、その結果、TRPV5を介したCaの再吸収が低下し、尿中Ca排泄が増加する可能性が示唆された。

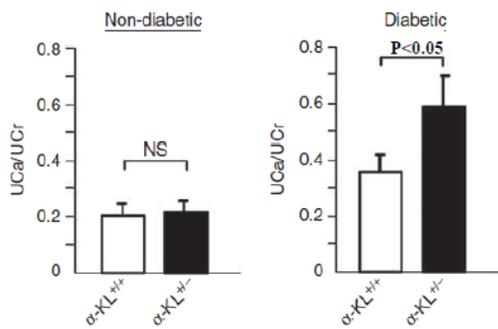


図3.糖尿病性腎症モデルマウスにおける尿中Ca排泄量

今後、早期より糖尿病性腎症における $\alpha$ -KL発現低下の発症機序やそれに関連する骨代謝異常につき経時的な検討も加え詳細に解析する予定である。

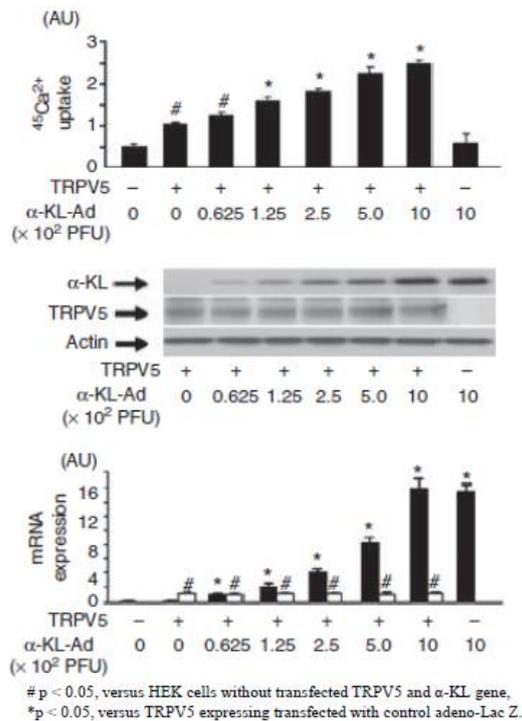


図4.HEK細胞でのCa取り込み

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- Asai O, Nakatani K, Tanaka T, Sakan H, Imura A, Yoshimoto S, Samejima K, Yamaguchi Y, Matsui M, Akai Y, Konishi N, Iwano M, Nabeshima Y, Saito Y. Decreased renal  $\alpha$ -Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion. *Kidney Int.* 査読有. 81(6):539-47, 2012
- Samejima K, Nakatani K, Suzuki D, Asai O, Sakan H, Yoshimoto S, Yamaguchi Y, Matsui M, Akai Y, Toyoda M, Iwano M, Saito Y. Clinical significance of fibroblast-specific protein-1 expression on podocytes in patients with focal segmental

- glomerulosclerosis. *Nephron Clin Pract.* 査読有 120(1):c1-7, 2012
- ③ Iwano M, Yamaguchi Y, Iwamoto T, Nakatani K, Matsui M, Kubo A, Akai Y, Mori T, Saito Y. Urinary FSP1 is a biomarker of crescentic GN. *J Am Soc Nephrol.* 査読有 23(2):209-14, 2012
- ④ Kawata H, Uesugi Y, Soeda T, Takemoto Y, Sung JH, Umaki K, Kato K, Ogiwara K, Nogami K, Ishigami K, Horii M, Uemura S, Shima M, Tabata Y, Saito Y. A new drug delivery system for intravenous coronary thrombolysis with thrombus-targeting and stealth activity recoverable by ultrasound. *J Am Coll Cardiol.* 査読有 60(24):2550-2557, 2012
- ⑤ Somekawa S, Imagawa K, Hayashi H, Sakabe M, Ioka T, Sato GE, Inada K, Iwamoto T, Mori T, Uemura S, Nakagawa O, Saito Y. Tmem100, an ALK1 receptor signaling-dependent gene essential for arterial endothelium differentiation and vascular morphogenesis. *PNAS.* 査読有 109(30):12064-12069, 2012
- ⑥ Saito Y, Morimoto T, Ogawa H, Nakayama M, Uemura S, Doi N, Jinnouchi H, Waki M, Soejima H, Sugiyama S, Okada S, Akai Y. Low-dose Aspirin Therapy in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Reduced Glomerular Filtration Rate: Subanalysis from the JPAD Trial. *Diabetes Care.* 査読有 34(2):280-285, 2011
- ⑦ Takeda Y, Costa S, Delamarre E, Roncal C, Leite de Oliveira R, Squadrito ML, Finisguerra V, Deschoemaeker S, Bruyere F, Wenes M, Hamm A, Serneels J, Magat J, Bhattacharyya T, Anisimov A, Jordan BF, Alitalo K, Maxwell P, Gallez B, Zhuang ZW, Saito Y, Simons M, De Palma M, Mazzone M. Macrophage Skewing by PHD2 Haploinsufficiency Prevents Ischemia by Inducing Arteriogenesis. *Nature.* 査読有 479(7371):122-126, 2011
- ⑧ Nakatani K, Yoshimoto S, Iwano M, Asai O, Samejima K, Sakan H, Terada M, Hasegawa H, Nose M, Saito Y. Fractalkine expression and CD16+ monocyte accumulation in glomerular lesions: association with their severity and diversity in lupus models. *Am J Physiol Renal Physiol.* 査読有 299(1):F207-16, 2010
- ⑨ Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Shimada T, Murakami J, Aono Y, Hasegawa H, Yamashita T, Nakatani K, Saito Y, Okamoto N, Kurumatani N, Namba N, Kitaoka T, Ozono K, Sakai T, Hataya H, Ichikawa S, Imel EA, Econs MJ, Nabeshima Y. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 30;398(3):513-518, 2010

[学会発表] (計 3 件)

- ① 中谷公彦、他. 早期糖尿病性腎症での尿中カルシウム排泄増加に  $\alpha$ -Klotho 発現低下を介した TRPV5 活性の低下が関与する. 第 55 回日本腎臓学会学術総会 平成 24 年 6 月 1 日 横浜
- ② 左官弘和、中谷公彦 他. 慢性腎臓病 (CKD) 例での血中  $\alpha$ -Klotho(s  $\alpha$ -KL) 濃

度の検討. 第 54 回日本腎臓学会学術総会  
平成 23 年 6 月 15 日 横浜

- ③ 浅井 修、中谷公彦 他. 糖尿病性腎症では  
早期腎症より尿中カルシウム排泄が増加する  
が、腎臓でのKlotho遺伝子発現低下が関与す  
る. 第53回日本腎臓学会学術総会 平成22年  
6月16日 神戸

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
なし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中谷 公彦 (NAKATANI KIMIHIKO)  
奈良県立医科大学・医学部・学内講師  
研究者番号：80398445

### (2) 研究分担者

斎藤 能彦 (Saito Yoshihiko)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20390227

### (3) 連携研究者

研究者番号：  
なし