

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

柴胡剤・熊胆剤による胆汁酸代謝制御の
分子機構の解明と非アルコール性
脂肪肝炎（NASH）治療への展開

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田 中 智 洋

平成24(2012)年3月

目 次

I. 総括研究報告

柴胡剤・熊胆剤による胆汁酸代謝制御の分子機構の解明と 非アルコール性脂肪肝炎（NASH）治療への展開 －非アルコール性脂肪肝炎（NASH）病態モデル動物を用いた解析－ 田中 智洋	----- 1
--	---------

II. 分担研究年度終了報告

柴胡剤・熊胆剤による胆汁酸代謝制御の分子機構の解明と 非アルコール性脂肪肝炎（NASH）治療への展開 －FGF19/15- β Klotho による胆汁酸代謝制御を解析基軸とした メタボロミクス的手法による研究－ 伊藤 慎二	----- 7
--	---------

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 1 2

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 1 3

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

柴胡剤・熊胆剤による胆汁酸代謝制御の分子機構の解明と
非アルコール性脂肪肝炎（NASH）治療への展開
－非アルコール性脂肪肝炎（NASH）病態モデル動物を用いた解析－

主任研究者：田中 智洋

（公益財団法人 先端医療振興財団 先端医療センター 主任研究員）

B・C型肝炎ウイルス感染に起因する病態が中心であったわが国の肝疾患の疾病構造は、生活習慣病の増加に伴う非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の蔓延により大きく変貌しつつある。NASHは欧米諸国では肝硬変、肝ガンの最も高頻度な原疾患であり、わが国においても近い将来、NASHに起因する肝硬変、肝ガンの激増が予想される。しかし現在有効性が確立されたNASH治療薬は皆無で、減量指導以外に対処法は無い。本研究の特徴は、胆汁酸代謝異常としての観点からNASHの病態生理を解明し、また胆汁酸代謝に介入する方法論として、肝胆疾患に古来より用いられる、柴胡剤・熊胆剤を用いることにある。研究代表者は非アルコール性脂肪肝炎（NASH）病態モデル動物を用いた解析の実施と、研究分担者によるメタボロミクス解析の結果の解釈、統合の責任を有する。研究代表者の研究により、平成23年には①野生型ないし $\beta klotho$ ノックアウトマウス($\beta klotho^{-/-}$)にNASHを誘発した際の肝臓の遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した。これらは当初の予定にはなかった成果であり、 $\beta klotho$ シグナル伝達系に対する柴胡剤・熊胆剤の作用を解析しようとする平成24年の研究計画遂行への重要な布石となる。平成23年にはさらに当初の作業仮説の通り、②メチオニン・コリン欠乏食(MCD)及び高脂肪食負荷マウスをモデルとした解析において、柴胡剤・熊胆剤のNASH改善作用を実証することに成功した。一方、③ $\beta klotho$ のタンパク発現はマウスの脂肪肝において明らかに増加すること、④ $\beta klotho$ が既に報告したコレステロールの胆汁排泄抑制作用と別にVLDLトリグリセライドの放出を促進することから、 $\beta klotho$ の発現・機能の亢進が、脂質の体内滞留を促しNASHの病態形成を促進している可能性が示唆される。実際、⑤ $\beta klotho^{-/-}$ にMCDによる脂肪肝を誘発すると、脂質含量や酸化ストレスマーカーの増加が対照野生型よりも経度であった。NASH病態への $\beta klotho$ の関与の検討に関しては今年度の成果として⑥肝細胞特異的 $\beta klotho$ トランスジェニックマウスの樹立に成功した。

分担研究者
伊藤慎二
（京都大学大学院医学研究科 助教）

A. 研究目的

わが国では肥満・メタボリックシンドローム罹患者の増加とともに非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の有病率は増加の一途

をたどっている。脂肪肝の病的意義は長らく疑問視されてきたが、近年になり肝生検で炎症細胞浸潤や線維化を認める脂肪肝炎症例(NASH症例)では肝ガン、肝硬変への進行が高率に認められること、線維化を

伴うNASH症例では10年生存率は約50%台であること（東京女子医科大学 肝臓 47(12), 2006）などが明らかとなってきた。罹患率・有病率の増加に鑑みてNASHは肝ガン、肝硬変の基盤病態として国民健康衛生上の大きな問題となりつつあるといえる。しかしNASHの発症メカニズムは未だ明らかではなく、有効性が確立した治療法も無い。

NASHの病態モデルとしては、Two-hit theory (Day et al. Gastroenterology, 1998) が広く受け入れられている。すなわち正常肝に1st hitとしての代謝異常が加わることによりNASHの1st stepとしての肝脂肪蓄積 (Steatosis) が起こり、さらに2nd hitとしての免疫異常が加わることで、2nd stepとしての炎症 (Inflammation) や線維化 (Fibrosis) を生じ病態が進行する、という考え方である。しかし、1st hitや2nd hitの本態は明らかにはなっておらず、また1st hitと2nd hitを結びつけるメカニズムについても明らかではない。われわれは第一に、これまであまり注目されてこなかった、NASHの基盤病態としての胆汁酸代謝調節異常に着目した。胆汁酸はコレステロールの最大の排泄・クリアランス経路であるだけでなく、食物中の脂質吸収効率を決定づける因子であるからである。実際、胆汁酸吸着レジン[®]は脂質異常症の治療薬としてヒトにおける有効性が確立している。第二に、古来肝疾患

に対し用いられている熊胆剤、柴胡剤による胆汁酸代謝調節作用に着目し、これら漢方薬による胆汁酸代謝制御機能を活かした、全く新しいNASHの治療戦略を提唱することを目的とした。

本研究では上記の独自の着想に基づいてこれまでに、(1) 柴胡剤・熊胆剤各単剤及び併用によるNASH治療のPOC (proof of concept) の確立を目指した検討、(2) 柴胡剤・熊胆剤の作用メカニズム解明のための検討、(3) 胆汁酸代謝の観点からのNASH病態解明に向けた検討、の3つの観点から研究を進めてきた。(1) では、種々のNASH誘発モデルマウスを疾患モデルとして柴胡剤・熊胆剤によるNASHの病理組織像・肝遺伝子発現・血清マーカーの改善の有無を実証する必要がある。(2) (3) については、本研究の特徴である胆汁酸代謝の観点からのNASHと柴胡剤・熊胆剤作用の関係性の解析を実施することにより、NASH病態および柴胡剤・熊胆剤作用におけるFGF19-βKlothoシステムの意義を明らかにする必要がある。本年度においてはまず、柴胡剤・熊胆剤各単剤及びこれらの併用により、NASH治療のPOCの確立を目指した検討を行った。さらには、胆汁酸代謝のマスターレギュレーターとしての位置が確立しつつある、FGF19-βKlothoシステムの遺伝子改変動物の新規樹立と解析により、全く新しい、「胆汁酸代謝統御によるNASH治療」の新規パラ

ダイム樹立に向けた取り組みを行った。

B. 研究方法

NASH の疾患・病態モデルとしては、上述の 1st hit のモデルとしてマウスへの高脂肪食 (HFD) 負荷、2nd hit のモデルとしてはメチオニン・コリン欠乏餌 (MCD) 負荷が最も代表的に用いられている。そこで本研究ではこれらのモデルを用いて、柴胡剤・熊胆剤の NASH への有効性と作用メカニズムの検討を行った。マウスの血清代謝パラメータの測定、肝臓切片の H&E 染色やマッソン・トリクローム染色、酸化ストレスマーカーである 4 ヒドロキシノネナールの免疫染色などを行うことで病理組織学的検討を加えた。

一方、FGF19 の共受容体として機能することが知られる β Klotho のノックアウトマウスでは、胆汁酸の合成・分泌・排泄が亢進していることが既に分かっている。本研究では、胆汁酸代謝制御に中心的役割を果たすことが広く認識されつつある、FGF19- β Klotho システムの生理機能と NASH 発症との因果関係を明らかにする目的で、 β Klotho のノックアウトマウスに HFD および MCD による NASH 誘発試験を行い、野生型との差異を病理組織学的検討および遺伝子発現解析により解析した。さらには研究分担者が専門とするメ

タボローム解析により β Klotho ノックアウトマウスと野生型マウスのメタボローム構成を、超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) と、飛行時間型質量分析装置 (Q-TofMS) とを組み合わせた独自のシステム (UPLC-Q-TofMS)、さらに、多変量解析ソフトウェア (SIMCA-P+) を活用することによって網羅的に解析し、 β Klotho 依存的な量的変化を示す分子を、胆汁酸骨格の有無に関わらず広く探索した。

C. 結果と考察

雄性 C57BL/6 マウスに 60%kcal の高脂肪食 (HFD) を 6 週間自由摂食で与えると、macrolobular lipid droplet の瀰漫性の蓄積を生じましたが、同時に小柴胡湯ないしは熊胆剤の主な有効成分であるウルソデオキシコール酸 (UDCA) を経口投与すると、脂肪滴の明らかな現象が観察され、肝脂肪化の改善が認められた。

次にメチオニン・コリン欠乏餌 (MCD) を同様に雄性 C57BL/6 マウスに 4 週間与えることで生じる脂肪蓄積と炎症性変化について検討した。その結果、MCD による肝脂質蓄積については UDCA の方が程度は強いものの、いずれの薬剤によっても脂肪滴の減少が認められ、これらの併用で脂肪滴の沈着はほとんど完全に消失が認められた。さらに、MCD 投与マウスの肝組織切片において、酸化ストレスマーカー (特に過酸化脂質を検出するとされる) で

ある、4ヒドロキシノネナールの免疫染色を行ったところ、薬剤投与群において、4ヒドロキシノネナールの陽性領域、染色性の強度のいずれもが減少していた。さらに肝組織内の線維化の指標としてマッソン・トリクローム染色を行った。この検討でも小柴胡湯、UDCAにより、明らかに線維化の減少が病理組織学的に観察された。

次に胆汁酸代謝制御において中心的役割を果たす、FGF19- β Klotho システムに関する遺伝子操作が、NASH 発症に及ぼす影響を解析する目的で、 β Klotho ノックアウトマウスに対する MCD 投与実験を行った。その結果、 β Klotho ノックアウトマウスにおいては、胆汁酸の合成・分泌・排泄の亢進とともに、肝への脂肪蓄積が明らかに抑制されていることが明らかとなった。そこで β Klotho ノックアウトマウスでの肝脂肪化抑制作用と薬剤による NASH 改善との関連性を明らかにするため、肝遺伝子発現をマイクロアレイにより検討した。すると β klotho 遺伝子を欠損することで減少が認められる遺伝子群と UDCA 治療により発現抑制される遺伝子の多くが共通であったのに対し、小柴胡湯により抑制される遺伝子群の多くが β Klotho ノックアウトマウスで低下しているものとは異なっていた。以上の結果より、UDCA と小柴胡湯は互いに異なる機序により NASH を改善する可能性が示唆された。

さらに UPLC-Q-ToFMS および多変量解析ソフトウェアを用いた網羅的解析により、 β Klotho ノックアウトマウスに由来する尿、血

清、糞便サンプル中では、多くの胆汁酸誘導体が一斉に増加していることを確認することが出来た。さらに、 β Klotho ノックアウトマウスの尿中で、餌や性別などによらず、恒常的に有意に減少（約 50%）し、なおかつ量的に豊富に存在する、非常に興味深い未知化合物（イオン 569）を見出すことに成功した。

以上を総括すると、平成 22 年には、当初の計画通り①肝臓への脂質蓄積プロセスにおける β Klotho / FGF19 システムの意義の解明に成功し、その一部を論文として報告した (Tomiya et al. *PNAS*, 2010) 。より詳細な分子メカニズムの解明のため、②肝臓の細胞膜画分のプロテオミクス解析により β Klotho 結合分子群を明らかにし、平成 23 年には③野生型ないし β klotho ノックアウトマウス(β kl^{-/-})に NASH を誘発した際の肝臓の遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した。これらは当初の予定にはなかった成果であり、 β Klotho シグナル伝達系に対する柴胡剤・熊胆剤の作用を解析しようとする平成 24 年の研究計画遂行への重要な布石となる。平成 23 年にはさらに当初の作業仮説の通り、④メチオニン・コリン欠乏食(MCD)及び高脂肪食負荷マウスをモデルとした解析において、柴胡剤・熊胆剤の NASH 改善作用を実証することに成功した。一方、⑤ β Klotho のタンパク発現はマウスの脂肪肝において明らかに増加すること、⑥ β Klotho が既に報告したコレステロールの胆汁排泄抑制作用と別に VLDL トリグリセライドの放出を促進することから、 β Klotho の発現・機能の亢進

が、脂質の体内滞留を促し NASH の病態形成を促進している可能性が示唆される。実際、⑦ *βkl* ^{-/-} に MCD による脂肪肝を誘発すると、脂質含量や酸化ストレスマーカーの増加が対照野生型よりも軽度であった。NASH 病態への *βKlotho* の関与については⑧樹立に成功した肝細胞特異的 *βklotho* トランスジェニックマウスを用いて解析を進める。以上の①~⑧が本研究事業によるこれまでの研究成果である。これら検討により、柴胡剤、熊胆剤のそれぞれ単独及び併用による有効性が証明できたことから、平成 24 年度は投与レジメンの最適化のための検討と、より詳細な作用メカニズムの解析に取り組むたい。

D. 参考文献

1. Decreased renal α -Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion.

O. Asai, K. Nakatani, ○**T. Tanaka**, H. Sakan, A. Imura, S. Yoshimoto, K. Samejima, Y. Yamaguchi, M. Matsui, Y. Akai, N. Konishi, M. Iwano, Y. Nabeshima, Y. Saito

Kidney Int.

81(6): 539-547, 2012

2. Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling in vivo.

K. Tomiyama, R. Maeda, I. Urakawa, Y. Yamazaki, ○**T. Tanaka**, S. Ito,

Y. Nabeshima, T. Tomita, S. Odori, K. Hosoda, K. Nakao, A. Imura, Y. Nabeshima.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107(4):1666-1671, 2010

3. Adipose tissue-specific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice: Impact of nutritional status and adipocyte hypertrophy.

S. Yasue, H. Masuzaki, S. Okada, T. Ishii, C. Kozuka, ○**T. Tanaka**, J. Fujikura, K. Ebihara, K. Hosoda, A. Katsurada, N. Ohashi, M. Urushihara, H. Kobori, N. Morimoto, T. Kawazoe, M. Naitoh, M. Okada, H. Sakaue, S. Suzuki, K. Nakao.

Am. J. Hypertens. 23(4):425-431, 2010

4. Glucocorticoid reamplification within cells intensifies NF κ B and MAPK signaling and reinforces inflammation in activated preadipocytes.

T. Ishii-Yonemoto, H. Masuzaki, S. Yasue, S. Okada, C. Kozuka, ○**T. Tanaka**, M. Noguchi, T. Tomita, J. Fujikura, Y. Yamamoto, K. Ebihara, K. Hosoda, K. Nakao.

Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 298(5):E930-E940, 2010

5. Adipose-tissue-specific dysregulation of angiotensinogen by oxidative stress in obesity.

S. Okada, C. Kozuka, H. Masuzaki,

S. Yasue, T. Ishii-Yonemoto,
○ T. Tanaka, Y. Yamamoto, M.
Noguchi, T. Kusakabe, T. Tomita, J.
Fujikura, K. Ebihara, K. Hosoda, H.
Sakaue,
H. Kobori, M. Ham, Y. S. Lee, J. B.
Kim, Y. Saito, K. Nakao.

***Metabolism* 59(9):1241-1251, 2010**

2. 学会発表

なし

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

6. 「心腎連関解明の新しい分子標的 α
Klotho」
○田中智洋、鍋島陽一
Cardiovascular Frontier (メディカルレ
ビュー社) 3(1): 30-37, 2012
7. 「メタボリック症候群と病理」 Klotho
ファミリーによる代謝の統合的制御
○田中智洋、鍋島陽一
病理と臨床 (文光堂) 28(9):924-931,
2010
8. 「肥満症第2版—基礎・臨床研究の進歩」
中枢メラノコルチン系 (POMC/ α -MSH)
○田中智洋、益崎裕章、中尾一和
日本臨床 (日本臨床社)
68(Suppl.2):75-82, **2010**
9. メタボリックシンドロームのマスター
レギュレーターとしてのPPAR γ
○田中智洋、益崎裕章、細田公則、
中尾一和
日本臨床(日本臨床社) 68(2):203-209,
2010

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

柴胡剤・熊胆剤による胆汁酸代謝制御の分子機構の解明と
非アルコール性脂肪肝炎（NASH）治療への展開

—FGF19/15- β Klothoによる胆汁酸代謝制御を解析基軸としたメタボロミクス的手法による研究—

分担研究者：伊藤 慎二（京都大学大学院医学研究科 助教）

B・C型肝炎ウイルス感染に起因する病態が中心であったわが国の肝疾患の疾病構造は、生活習慣病の増加に伴う非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の蔓延により大きく変貌しつつある。NASHは欧米諸国では肝硬変、肝ガンの最も高頻度な原疾患であり、わが国においても近い将来、NASHに起因する肝硬変、肝ガンの激増が予想される。しかし現在有効性が確立されたNASH治療薬は皆無で、減量指導以外に対処法は無い。本研究の特徴は、胆汁酸代謝異常としての観点からNASHの病態生理を解明し、また胆汁酸代謝に介入する方法論として、肝胆疾患に古来より用いられる、柴胡剤・熊胆剤を用いることにある。メタボロミクス解析の責任を担う研究分担者として、本年度は、胆汁酸合成制御において中心的な役割を担うことがすでに確立しつつある β Klotho / FGF19システムが、単に胆汁酸プールのサイズ全体を調節するのみならず、胆汁酸プールの構成因子の比率の制御にも関与するとの作業仮説に基づいて研究を進めた。その結果、興味深いピーク、すなわち未知化合物（イオン569）の同定に成功した。更なる検討は必要であるが、本研究のさらなる推進により、柴胡・熊胆剤によるNASHの治療効果とメタボロームの変化の全貌が解明されれば、漢方薬によるメタボローム制御のコンセプトと、全く新しいNASHの治療標的分子の発見に繋がるものと期待される。

A. 研究目的

β Klotho は、 α Klotho と構造的に類似する分子として、2000年に我々が同定した分子である（参考文献1、2）。 β Klothoの主な発現組織は肝臓、脂肪組織、膵臓であり、肝臓においては胆汁酸生合成のネガティブフィードバック制御における中心的な役割を果たしている。その作用機序は

内分泌性線維芽細胞増殖因子（fibroblast growth factor（FGF））の一つであり、食事後に回腸から分泌され、門脈を介して肝臓へ至り、肝臓で胆汁酸生合成を抑制する液性因子 FGF19/15 の共受容体としての働きによるものである（参考文献3）。また、 β Klothoによる胆汁酸生合成抑制は、胆汁酸生合成全体の律速段階を司る酵素、コレステロール7 α 水酸化酵素（Cyp7a1）に選択的なものであり、コール酸生合成に

必須の酵素(コレステロール12 α 水酸化酵素(Cyp8b1))に対しては相対的に弱いことを我々は明らかにしている。したがって、 β Klotho は胆汁酸プールを構成する分子種の調節にも寄与すると考えられる(参考文献4)。

α Klotho は、ステロイド環を持つ分子に単糖(グルクロン酸)が付加された類ステロイド化合物と結合し、配糖体と単糖との間の結合を加水分解する活性を示すが(参考文献5)、 β Klotho が α Klotho と類似する構造を持つことや、胆汁酸がステロイド環を持つ化合物であることを考慮に入れると、配糖体ステロイドの代謝が Klotho ファミリー分子に共通する役割である可能性も考えられる。なかんずく、胆汁酸と β Klotho との深い関わりからは、 β Klotho が、胆汁酸骨格を持ち、単糖の修飾を受けた化合物の代謝に関わる可能性が示唆される。

B. 研究方法

我々は、 β Klotho ノックアウトマウスと野生型マウスのメタボローム構成を、超高速液体クロマトグラフィー(UPLC)と、飛行時間型質量分析装置(Q-ToFMS)とを組み合わせた独自のシステム(UPLC-Q-ToFMS)、さらに、多変量解析ソフトウェア(SIMCA-P+)を活用することによって網羅的に解析し、 β Klotho 依

存的な量的変化を示す分子を、胆汁酸骨格の有無に関わらず広く探索した。これにより、本研究パートでは、 β Klotho が特定の標的化合物の選択的代謝を介して、肝機能、脂質代謝等を調節し、生体恒常性維持システムに寄与する可能性を探るとともに、 β Klotho やその周縁の共役化合物群によって構成されるシステムが、脂肪肝炎(NASH)の予防、治療を志向した創薬標的として活用できる可能性について検討することを目指した。

C. 結果と考察

UPLC-Q-ToFMS および多変量解析ソフトウェアを用いた網羅的解析により、 β Klotho ノックアウトマウスに由来する尿、血清、糞便サンプル中では、多くの胆汁酸誘導体が一斉に増加していることを確認することが出来た。さらに、 β Klotho ノックアウトマウスの尿中で、餌や性別などによらず、恒常的に有意に減少(約50%)し、なおかつ量的に豊富に存在する、非常に興味深い未知化合物(イオン569)を見出すことに成功した(図1(未発表データ))。UPLC-Q-ToFMSを用いて、当該分子の精密質量測定、Empirical formula(経験式(元素組成))推定、タンデムマスによる断片化パターン解析、標準品との比較を行ったところ、当該分子(イオン569)は、コール酸にグルコース1分子が付加し

た、コール酸グルコシドである可能性が最も高いことが分かった。コール酸は既述した通り、胆汁酸の1種であるが、 β Klotho ノックアウトマウスの主要な表現型が、胆汁酸生合成のネガティブフィードバック制御の破綻と、それに伴う胆汁酸の過生成であることを考えると、 β Klotho ノックアウトマウスでは、本来、胆汁酸誘導体の多くが増加することが期待される。それにも関わらず、コール酸誘導体の一つが減少していることは意外であり、コール酸グルコシドには、単に抱合反応によって水溶性を高めた胆汁酸代謝産物(=老廃物)としての意味合いとは別に、何らかの生理機能を備えた生理活性分子としての役割があるのかもしれない。この分子の量的変動については、(1) β Klotho の酵素活性の欠損により直接的にもたらされている可能性や、(2) β Klotho 欠損の影響によるメタボローム変化を反映した間接的なものである可能性、などが考えられるが、現時点においては確定するには至っていない。

我々が見出した、コール酸グルコシド(イオン 569)の β Klotho 依存的な量的変動は、 β Klotho ノックアウトマウスの表現型(=病態)形成の一部に寄与している可能性がある。コール酸グルコシドなど、胆汁酸に単糖が付加された代謝産物は、血中や尿中などに広く存在することが古くから知られている。しかしながら、一般的なホルモン等に比べ高濃度で存在するに

も関わらず、それらは単に胆汁酸の水溶性を増し、体外への排出を促進するための抱合反応の産物であるとしか認識されてこなかった。今後の解析によって、コール酸グルコシドに β Klotho ノックアウトマウスの表現型、たとえば肝機能や脂質代謝調節と関連する生理活性が存在することを示すことができれば、従来は単に老廃物であると考えられてきた、これらの分子群の役割が、根本的に見直されることにつながり、同種の分子群の医薬品としての利用が可能になるかも知れない。

本年度の研究により新規の胆汁酸関連分子動態が明らかとなったことで、胆汁酸代謝障害としての NASH 病態理解に向けた物質論的観点からの情報の提供が可能であったと考えている。

D. 参考文献

1 β Klotho の同定とその機能

伊藤慎二

内分泌・糖尿病科 (科学評論社)、
平成20年、第26巻、第6号、
562-573頁

2 Molecular cloning and expression analyses of mouse β klotho, which encodes a novel Klotho family protein

Shinji Ito, Satoko Kinoshita, Norihiko Shiraishi, Satoshi Nakagawa, Susumu Sekine,

Toshihiko Fujimori, Yo-ichi Nabeshima
Mechanisms of Development, 2000; 98:
115-119

3 Relevant use of Klotho in FGF19
subfamily signaling system *in vivo*.

Ken-ichi Tomiyama, Ryota Maeda, Itaru
Urakawa, Yuji Yamazaki, Tomohiro Tanaka,
Shinji Ito, Yoko Nabeshima, Tsutomu Tomita,
Shinji Odori, Kiminori Hosoda, Kazuwa
Nakao, Akihiro Imura, Yo-ichi Nabeshima.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2010; 107(4):
1666-1671

4 Impaired negative feedback suppression
of bile acid synthesis in mice lacking β Klotho.

Shinji Ito, Toshihiko Fujimori, Akiko Furuya,
Junko Satoh, Yoko Nabeshima, Yo-ichi
Nabeshima
The Journal of Clinical Investigation, 2005;
115(8): 2202-2208

5 Klotho is a novel beta-glucuronidase
capable of hydrolyzing beta-glucuronides

Osamu Tohyama, Akihiro Imura, Akiko Iwano,
Jean-Noel Freund, Bernard Henrissat,
Toshihiko Fujimori, Yo-ichi Nabeshima
Journal of Biological Chemistry, 2004; 279:
9777-9784

(参考図)

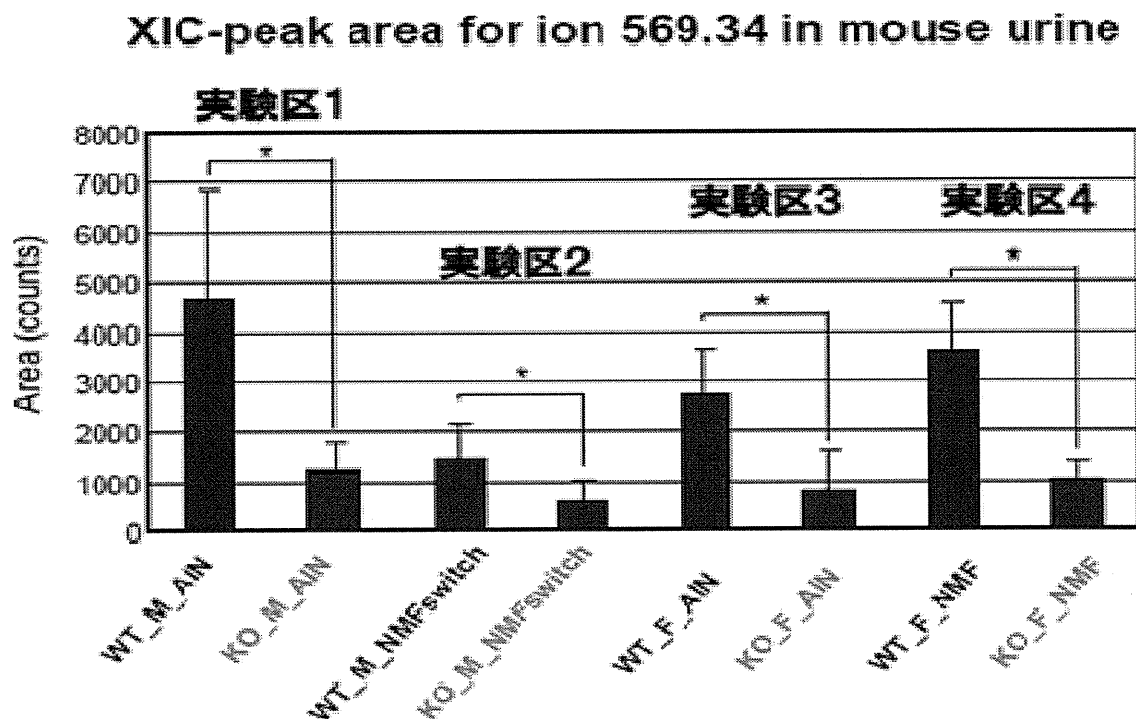


図1 β Klotho ノックアウトマウス尿中で減少する未知化合物 (イオン 569)

縦軸はイオン 569 に相当する分子量 (569.34) で抽出したクロマトグラム (Extracted ion chromatogram(XIC)) から算出した、ピークエリアを表す。飼育コロニーの餌 (AIN または NMF) や性別 (M または F) により区分した 4 つの実験区のいずれにおいても、イオン 569 は野生型マウス (WT) に比べて、 β Klotho ノックアウトマウス (KO) において有意に減少する。エラーバーは標準誤差、アスタリスクは $P < 0.05$ を示す。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌 (田中智洋)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Osamu Asai, Kimihiko Nakatani, Tomohiro Tanaka, Hirokazu Sakan, Akihiro Imura, Shuhei Yoshimoto, Ken-ichi Samejima, Yukinari Yamaguchi, Masaru Matsui, Yasuhiro Akai, Noboru Konishi, Masayuki Iwano, Yoichi Nabeshima and Yoshihiko Saito	Decreased renal α -Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion	Kidney Int	Vol. 81 No. 6	539-547	2012
田中智洋 鍋島陽一	心腎連関解明の新しい分子標的 α Klotho	Cardiovascular Frontier	Vol. 3 No. 1	30-37	2012
田中智洋 鍋島陽一	メタボリック症候群と病理 Klothoファミリーによる代謝の統合的制御	病理と臨床	Vol. 28 No. 9	924-931	2010

Decreased renal α -Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion

Osamu Asai¹, Kimihiko Nakatani^{1,2}, Tomohiro Tanaka³, Hirokazu Sakan¹, Akihiro Imura³, Shuhei Yoshimoto¹, Ken-ichi Samejima¹, Yukinari Yamaguchi¹, Masaru Matsui¹, Yasuhiro Akai¹, Noboru Konishi², Masayuki Iwano^{1,4}, Yoichi Nabeshima³ and Yoshihiko Saito^{1,5}

¹First Department of Internal Medicine, Nara Medical University, Kashihara, Japan; ²Department of Pathology, Nara Medical University, Kashihara, Japan; ³Department of Pathology and Tumor Biology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan; ⁴Division of Nephrology, Department of General Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, Yoshida-gun, Japan and ⁵Department of Regulatory Medicine for Blood Pressure, Nara Medical University, Kashihara, Japan

Hypercalciuria is one of the early manifestations of diabetic nephropathy. We explored here the role of α -Klotho, a protein expressed predominantly in distal convoluted tubules that has a role in calcium reabsorption. We studied 31 patients with early diabetic nephropathy and compared them with 31 patients with IgA nephropathy and 7 with minimal change disease. Renal α -Klotho expression was significantly lower and urinary calcium excretion (UCa/UCr) significantly higher in diabetic nephropathy than in IgA nephropathy or minimal change disease. Multiple regression analyses indicated that α -Klotho mRNA was inversely correlated with calcium excretion. We next measured these parameters in a mouse model of streptozotocin (STZ)-induced diabetic nephropathy, characterized by glomerular hyperfiltration, as seen in early diabetic nephropathy. We also confirmed a reduction of renal α -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 α -Klotho knockout mice in comparison with wild-type mice, each with STZ-induced diabetic nephropathy. Thus, α -Klotho expression was decreased in distal convoluted tubules in diabetic nephropathy in humans and mice. Renal loss of α -Klotho may affect urinary calcium excretion in early diabetic nephropathy.

Kidney International advance online publication, 4 January 2012; doi:10.1038/ki.2011.423

KEYWORDS: diabetic nephropathy; hypercalciuria; hypoxia

Correspondence: Kimihiko Nakatani, First Department of Internal Medicine, Nara Medical University, 840, Shijo-cho, Kashihara, Nara, 634-8522, Japan. E-mail: nkimihik@naramed-u.ac.jp

Received 9 March 2011; revised 28 September 2011; accepted 11 October 2011

Hypercalciuria is one of the early findings of uncontrolled diabetes mellitus in both humans and experimental animal models.^{1–4} Hypercalciuria is essentially associated with a negative calcium balance hallmarked by renal calcium loss in diabetes mellitus,^{1,2} which has been proposed to contribute to the increased risk of bone fracture.^{5,6} Although osmotic diuresis and increased dietary calcium intake secondary to hyperphagia may have a role in the hypercalciuria seen in diabetic patients,² control of osmotic diuresis with appropriate insulin therapy only partially corrects hypercalciuria.⁷ Furthermore, increased dietary calcium intake may not increase the calcium load on the kidney, because calcium absorption in the gut is also decreased in the early stages of streptozotocin (STZ)-induced diabetes.^{8,9} Thus, there may be impairment in the renal handling of calcium in diabetes mellitus. Although ultrafiltered calcium is reabsorbed in the proximal tubules and the distal convoluted tubules (DCTs),¹⁰ previous studies have not revealed any decreases in calcium reabsorption in the proximal tubules in diabetic models.^{7,11,12} Thus, DCTs may contribute to the impairment in calcium transport,⁷ the underlying molecular mechanisms of which remain unclear.

α -Klotho (α -KL) mutant mice were originally used to model disorders associated with human aging, because the phenotype of the mutant animals includes arteriosclerosis, ectopic calcification (including vascular calcification), emphysema, and osteoporosis.¹³ The α -KL gene is predominantly expressed in the parathyroid glands, the DCTs in the kidney, and the choroid plexus in the brain,^{14,15} all of which have an important role in calcium–phosphorus homeostasis. Recently, evidence has accumulated showing that α -KL regulates (1) parathyroid hormone (PTH) release in the parathyroid gland,¹⁴ (2) the production of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ by negatively regulating the expression of 1 α -hydroxylase, which encodes a rate-limiting enzyme of active vitamin D synthesis,^{16,17} and (3) transepithelial calcium transport in the

DCTs via activation of the transient receptor potential vanilloid 5 (TRPV5) channel.¹⁸ In fact, mice lacking α -KL display diminished renal calcium reabsorption, resulting in severe hypercalciuria.¹⁹

In this study, we showed that renal α -KL expression levels were decreased in patients with early diabetic nephropathy (DN) and in the STZ-induced mouse model of diabetes, and that renal α -KL expression levels were inversely correlated with urinary calcium augmentation in patients with DN and a mouse model of DN. Furthermore, we confirmed the exaggerated urinary excretion of calcium in STZ-induced DN in heterozygous α -KL knockout mice (α -KL^{+/-} mice). Thus, we propose that renal α -KL expression levels are partially involved in hypercalciuria in early DN.

RESULTS

Elevation of urinary calcium excretion (UCa/UCr) in patients with DN

Urinary calcium excretion (UCa/UCr), which was normalized to the urinary creatinine, was significantly higher in

patients with DN than in those with either IgA nephropathy (IgAN) or minimal change disease (MCD) (DN, 0.081 ± 0.044; IgAN, 0.037 ± 0.021; MCD, 0.039 ± 0.022; *P* < 0.001; Figure 1a). Serum calcium concentrations were similar among the three patient groups (Table 1). On considering the population subset with an estimated glomerular filtration rate (eGFR) greater than 60 ml/min per 1.73 m², UCa/UCr levels in DN were highly elevated relative to those seen in

Table 1 | Clinical characteristics of study population

	DN	IgAN	MCD
Number of patients	74	90	26
Age (years)	64 ± 10 [†]	40 ± 16	35 ± 16
Serum creatinine (mg/dl)	0.95 ± 0.48	0.85 ± 0.31	0.82 ± 0.22
eGFR (ml/min per 1.73 m ²) ^a	74.4 ± 24.9	79.2 ± 23.9	87.2 ± 22.5 [†]
Corrected serum calcium (mg/dl)	9.4 ± 0.4	9.3 ± 0.3	9.5 ± 0.4

Abbreviations: DN, diabetic nephropathy; eGFR, estimated glomerular filtration rate; IgAN, IgA nephropathy; MCD, minimal change disease. Clinical parameters are presented as means ± s.d. ^aeGFR was calculated by means of the creatinine-based Modification of Diet in Renal Disease Study Equation. [†]*P* < 0.05 vs. IgAN or MCD. [‡]*P* < 0.05 vs. DN.

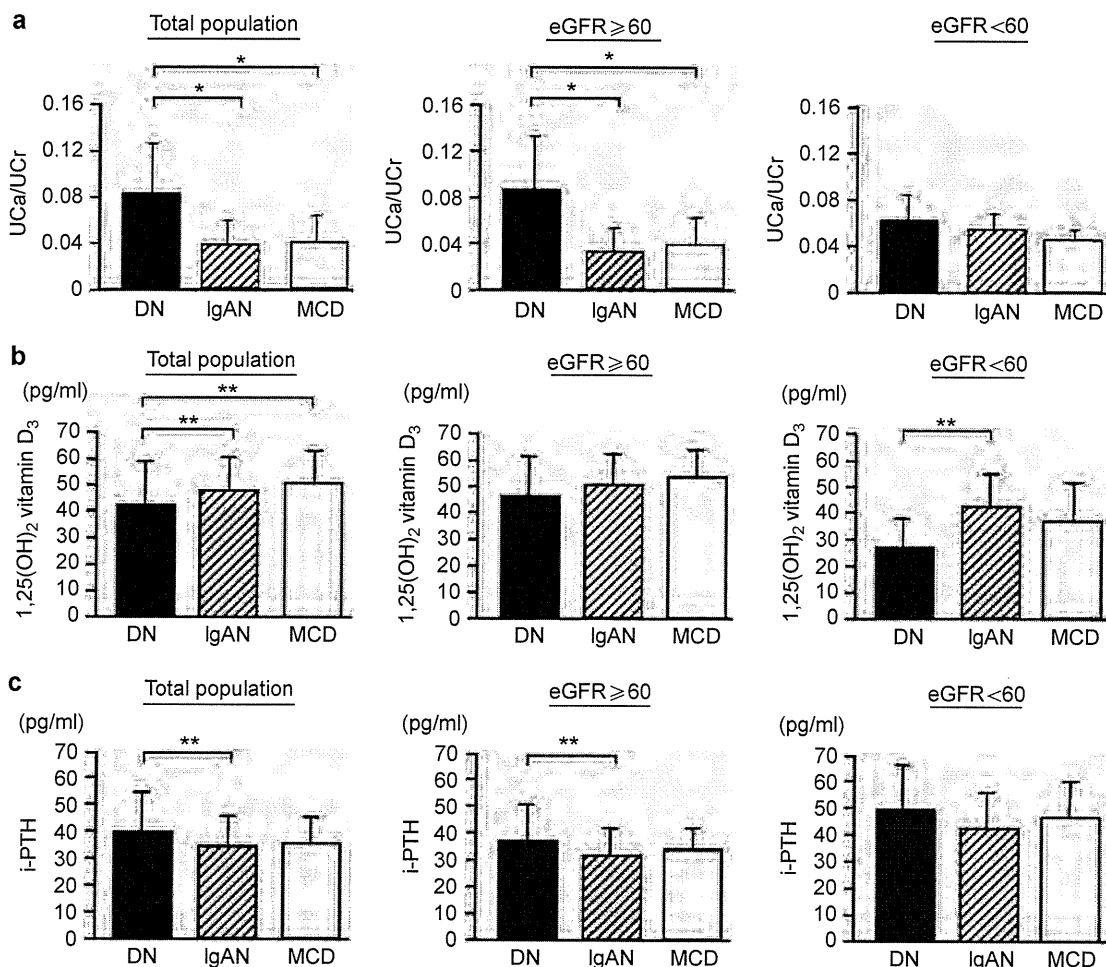


Figure 1 | Elevation of urinary calcium excretion (UCa/UCr) in patients with diabetic nephropathy (DN). (a) UCa/UCr, (b) serum 1,25(OH)₂ vitamin D₃ concentration, and (c) serum intact parathyroid hormone (i-PTH) concentration were measured in patients with DN (black bars), IgA nephropathy (IgAN) (striped bars), or minimal change disease (MCD) (white bars). Data are shown as means ± s.e.m. for each group. Kruskal–Wallis analysis of variance by ranks with Bonferroni adjustment was used to compare groups. **P* < 0.001; ***P* < 0.01.

IgAN and MCD (DN, 0.086 ± 0.047 ; IgAN, 0.032 ± 0.020 ; MCD, 0.038 ± 0.024 ; $P < 0.001$; Figure 1a). In patients with an eGFR under $60 \text{ ml/min per } 1.73 \text{ m}^2$, however, there was no significant difference in UCa/UCr levels between DN, IgAN, and MCD (DN, 0.062 ± 0.021 ; IgAN, 0.054 ± 0.013 ; MCD, 0.045 ± 0.009 ; $P = 0.265$; Figure 1a). Serum levels of $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 were significantly lower in DN than in IgAN and MCD (DN, $41.69 \pm 16.1 \text{ pg/ml}$; IgAN, $48.18 \pm 12.51 \text{ pg/ml}$; MCD, $50.2 \pm 12.6 \text{ pg/ml}$; $P = 0.004$; Figure 1b). In the population with an eGFR greater than $60 \text{ ml/min per } 1.73 \text{ m}^2$, however, serum $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 levels were lower in DN, as compared with IgAN and MCD, but this decrease was not significant (DN, $45.86 \pm 14.88 \text{ pg/ml}$; IgAN, $50.00 \pm 11.87 \text{ pg/ml}$; MCD, $52.61 \pm 10.95 \text{ pg/ml}$; $P = 0.069$; Figure 1b). Serum intact PTH (i-PTH) values were significantly increased in DN in comparison with those in IgAN for both the total study population (DN, $39.2 \pm 15.19 \text{ pg/ml}$; IgAN, $33.68 \pm 11.79 \text{ pg/ml}$; MCD, $35.23 \pm 9.96 \text{ pg/ml}$; $P = 0.027$, Figure 1c) and the population subset with an eGFR greater than $60 \text{ ml/min per } 1.73 \text{ m}^2$ (DN, $36.53 \pm 13.65 \text{ pg/ml}$; IgAN, $31.16 \pm 10.20 \text{ pg/ml}$; MCD, $33.09 \pm 7.99 \text{ pg/ml}$; $P = 0.032$; Figure 1c).

Reduction in α -KL expression in the early stages of human DN

In immunohistological examination, although α -KL reactivity was detectable exclusively in DCTs in patients with MCD

and IgAN (Figure 2b and c), the reactivity was significantly reduced in samples from DN patients (Figure 2a). α -KL reactivity was also detected in the proximal convoluted tubules, although the reactivity in proximal convoluted tubules was weaker than that in DCTs. α -KL immunoreactivity in proximal convoluted tubules was similar to that in DN, IgAN, and MCD. Renal α -KL mRNA expression levels, quantitatively measured by real-time PCR, were significantly correlated with eGFR ($r = 0.353$, $P = 0.0034$; Figure 2e), suggesting that renal α -KL mRNA expression levels were decreased with the advance of renal failure. Notably, looking at the population with an eGFR greater than $60 \text{ ml/min per } 1.73 \text{ m}^2$, renal α -KL mRNA expression levels were markedly decreased in the presence of DN in comparison with IgAN and MCD (DN, $0.45 \pm 0.27 \text{ AU}$; IgAN, $1.07 \pm 0.45 \text{ AU}$; MCD, $1.29 \pm 0.58 \text{ AU}$; $P = 0.0004$; Figure 2f). However, in the population subset with an eGFR under $60 \text{ ml/min per } 1.73 \text{ m}^2$, renal α -KL mRNA expression levels were similar to those in DN, IgAN, and MCD (Figure 2f).

Next, we used the same renal biopsy specimens to investigate the degree of renal tubulointerstitial damage progression in the DN, IgAN, and MCD groups. Neither the average numbers of CD31-positive peritubular capillaries (PTCs) nor the percentage of type I collagen-positive areas per single field in DN were significantly different from those seen in IgAN or MCD when the eGFR was greater than

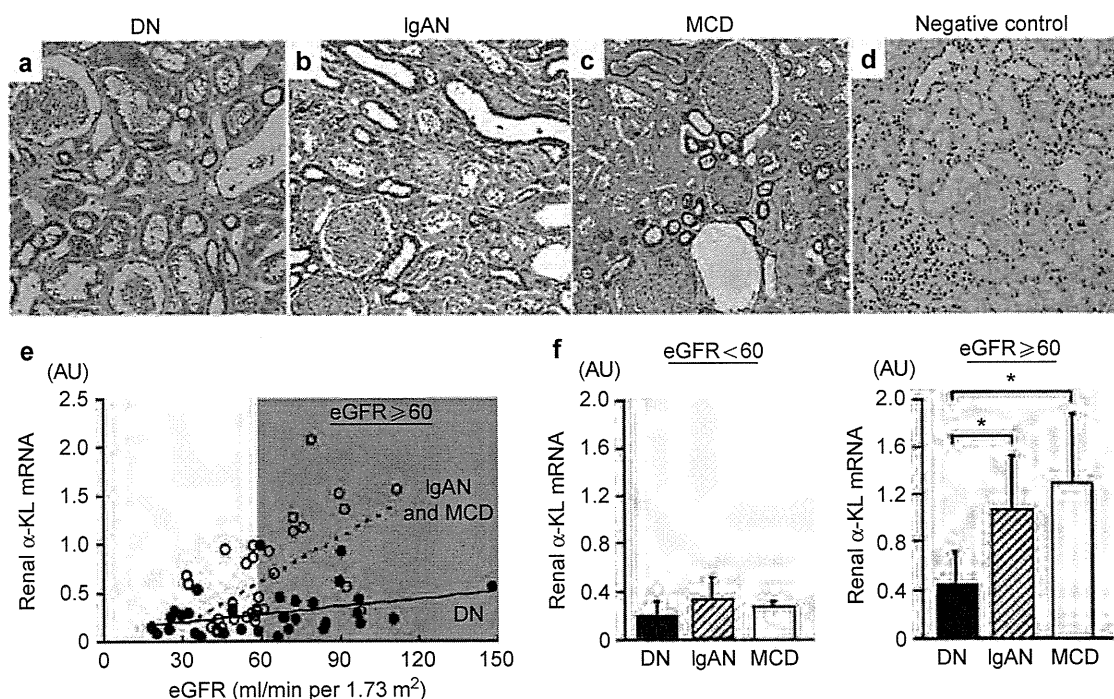


Figure 2 | Reduction in α -Klotho (α -KL) expression in human early diabetic nephropathy (DN). (a–d) Representative immunoperoxidase staining for α -KL protein in renal biopsy sections from human patients with DN, IgA nephropathy (IgAN), or minimal change disease (MCD), and negative control (MCD treated with rat immunoglobulins instead of rat anti- α -KL antibody). Original magnification, $\times 100$. (e) Correlation of renal α -KL mRNA expression levels with estimated glomerular filtration rate (eGFR) in patients with DN (closed circles) and IgAN and MCD (open circles). (f) Renal α -KL mRNA expression levels in DN (black bars), IgAN (striped bars), and MCD (white bars). Data are shown as means \pm s.e.m. for each group. Kruskal–Wallis analysis of variance by ranks with Bonferroni adjustment was used to compare groups. $*P < 0.01$.

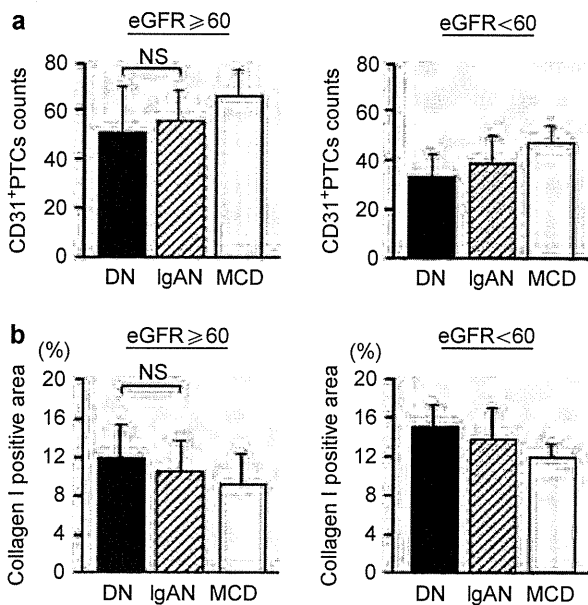


Figure 3 | The degree of renal tubulointerstitial damage progression in the diabetic nephropathy (DN), IgA nephropathy (IgAN), and minimal change disease (MCD). (a) The average number of CD31-positive peritubular capillaries (PTCs) and (b) the average proportion of type I collagen-positive areas per field in renal biopsy specimens from patients with DN (black bars), IgAN (striped bars), and MCD (white bars). Data are shown as means ± s.e.m. for each group. Kruskal–Wallis analysis of variance by ranks with Bonferroni adjustment was used to compare groups.

60 ml/min per 1.73 m² (CD31-positive PTC numbers: DN, 50.6 ± 18.9; IgAN, 55.2 ± 12.8; MCD, 66.8 ± 10.6; *P* = 0.174; Figure 3a; Type I collagen positive areas: DN, 11.7 ± 3.5%, IgAN 10.4 ± 3.2%, MCD 8.7 ± 3.2%; *P* = 0.234; Figure 3b).

Correlation of renal α-KL mRNA expression levels with UCa/Ucr

An examination of three clinical parameters governing calcium metabolism—levels of renal α-KL expression, serum 1,25(OH)₂ vitamin D₃, and serum i-PTH—showed that levels of renal α-KL mRNA expression (*r* = −0.642, *P* < 0.0001), serum 1,25(OH)₂ vitamin D₃ (*r* = −0.334, *P* = 0.0054), and serum i-PTH (*r* = 0.274, *P* = 0.0244) correlated significantly with UCa/Ucr across all patients with DN, IgAN, and MCD, who had undergone renal biopsy (Figure 4). Multiple regression analyses revealed that renal α-KL expression levels were significantly and inversely correlated with UCa/Ucr (β = 10.644, *P* < 0.0001) as an independent variable in order of importance (*R*² = 0.375, *P* < 0.0001), but serum 1,25(OH)₂ vitamin D₃, serum i-PTH, serum calcium, eGFR, and age were not (Table 2), among all patients who had undergone renal biopsy. In patients with an eGFR greater than 60 ml/min per 1.73 m², univariate analysis showed that renal α-KL mRNA expression levels correlated significantly with only UCa/Ucr (*r* = −0.755, *P* < 0.0001; data not shown).

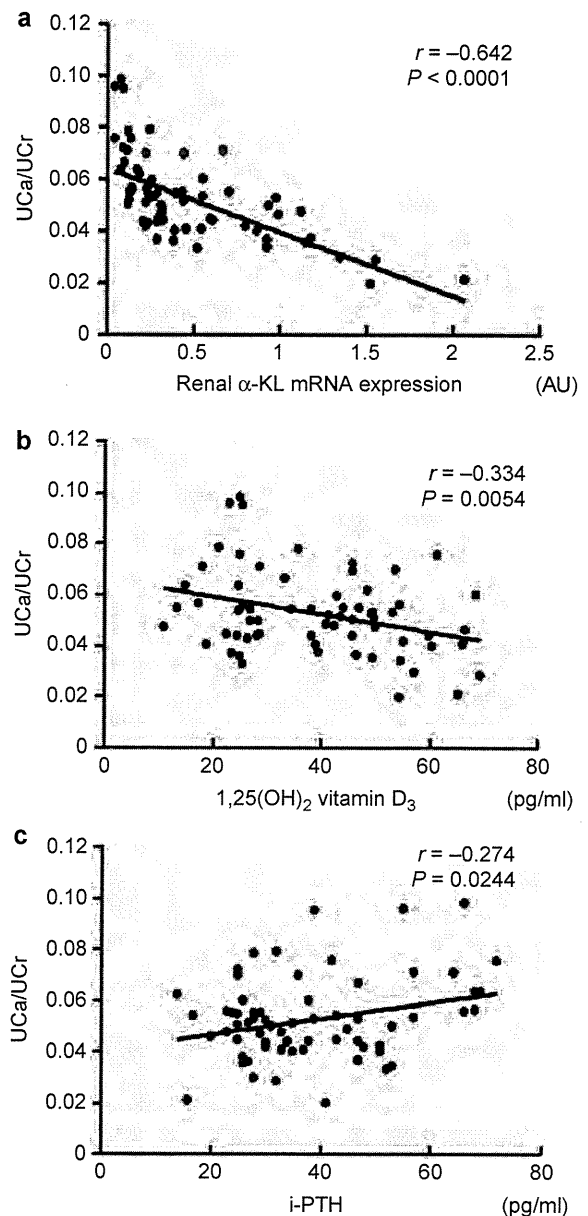


Figure 4 | Correlation of renal α-Klotho (α-KL) mRNA expression levels with urinary calcium excretion (UCa/Ucr). (a) UCa/Ucr with renal α-KL mRNA expression indices (*r* = −0.642, *P* < 0.0001), (b) serum 1,25(OH)₂ vitamin D₃ concentrations (*r* = −0.334, *P* = 0.0054), and (c) serum intact-parathyroid hormone (i-PTH) concentrations (*r* = 0.274, *P* = 0.0244) in patients who had undergone renal biopsy. Correlations were evaluated using the Pearson correlation coefficient.

Development of DN in STZ-treated mice

In this human study, we revealed a significant decrease in renal α-KL expression levels and an increase in UCa/Ucr in DN with an eGFR greater than 60 ml/min per 1.73 m². Therefore, to confirm that renal α-KL expression levels were decreased in early DN, and that this decrease was related to elevations in UCa/Ucr, we used the STZ-induced mouse model of diabetes. In this model mouse, urinary albumin to creatinine ratios were increased at 2, 4, 6, and 8 weeks after

Table 2 | Multiple regression analysis^a for urinary calcium excretion (UCa/UCr)

Independent variable	β^{\dagger}	P-value
Renal α -Klotho expression levels	-0.644	<0.0001
Serum 1,25(OH) ₂ vitamin D ₃	0.048	0.7131
Serum intact-PTH	0.151	0.1952
eGFR	0.05	0.7207
Corrected serum calcium	-0.035	0.7268
Age	0.047	0.6961

Abbreviations: eGFR, estimated glomerular filtration rate; PTH, parathyroid hormone; UCa/UCr, urinary calcium (mg/dl)/urinary creatinine (mg/dl).

^aAdjusted coefficient of determination (R^2); $R^2=0.375$, $P<0.0001$.

[†]Standard partial regression coefficient.

the establishment of diabetes (Supplementary Figure S1 online). This diabetic mouse model did not show apparent histopathological findings characteristic with DN at 8 weeks after the establishment of diabetes, indicating to be a useful model for early DN (Supplementary Figure S2 online).

Decrease in renal α -KL expression levels and elevation of UCa/UCr in STZ-induced diabetic mice

In STZ-induced diabetic mice, renal α -KL mRNA expression levels were maintained until 4 weeks after the establishment of diabetes mellitus, but they decreased significantly to about 70% of the levels of nondiabetic control mice at 6 weeks and to about 50% at 8 weeks ($P<0.001$, Figure 5c). This decrease was also confirmed at the protein level by immunohistological examination and western blotting (Figure 5a and b). UCa/UCr in diabetic mice was slightly but significantly increased beginning 2 weeks after the establishment of diabetes mellitus, and it was further elevated at 6 and 8 weeks ($P<0.001$; Figure 5d). Interestingly, the levels of UCa/UCr in diabetic mice at 6 weeks significantly increased to about one and a half times as much as those in diabetic mice at 4 weeks, and these levels at 8 weeks showed a further significant increase to about two times as much as those at 4 weeks (Figure 5d). Thus, the reduction of renal α -KL expression in STZ-induced diabetic mice may be related to further enhancement of UCa/UCr levels.

Exaggeration of UCa/UCr in STZ-induced diabetic α -KL^{+/-} mice

To confirm whether or not the approximately 50% reduction in renal α -KL expression resulted in an elevation in UCa/UCr, we measured this excretion in α -KL^{+/-} mice. There were no significant differences in UCa/UCr levels between α -KL^{+/-} and α -KL^{+/+} mice (Figure 6a). Next, we examined STZ-induced DN in α -KL^{+/-} mice. To avoid the DN-related decline of renal α -KL expression, we examined UCa/UCr beginning 2 weeks after the establishment of diabetes mellitus in both diabetic α -KL^{+/+} and α -KL^{+/-} mice. During the first 2 weeks, although renal α -KL expression levels were similar in diabetic and nondiabetic mice of both genotypes (Figure 6b and c), UCa/UCr levels in diabetic α -KL^{+/-} mice increased to about one and a half times as much as those in

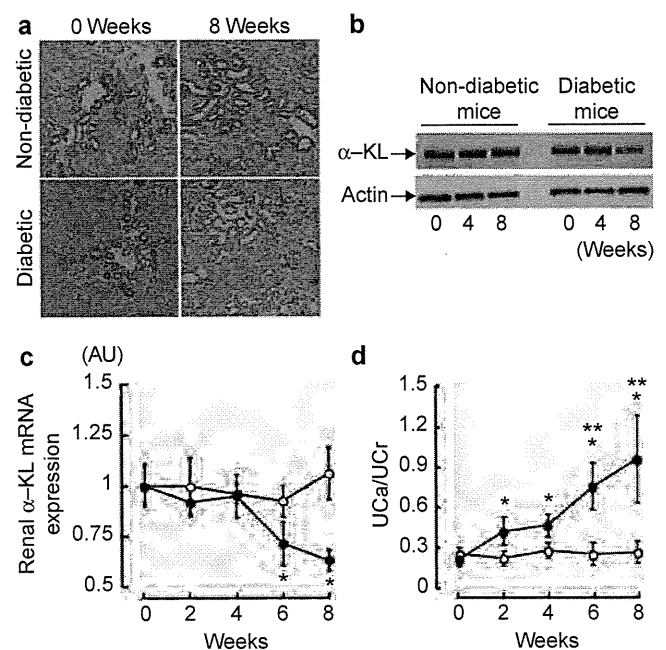


Figure 5 | Decrease in renal α -Klotho (α -KL) expression levels and elevation of urinary calcium excretion (UCA/UCr) in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice. (a) Representative immunoperoxidase staining for α -KL in kidney specimens, and (b) western blotting to detect α -KL of the kidney from the indicated mice. (c) Time course of renal α -KL mRNA expression levels and (d) time course of the urinary calcium (mg/dl) to creatinine (mg/dl) ratio in diabetic (closed circles) and nondiabetic (open circles) mice. Original magnification, $\times 100$. Student's *t*-test was used to compare groups. * $P<0.001$, vs. nondiabetic mice; ** $P<0.05$, vs. STZ-treated mice 4 weeks after the establishment of diabetes.

diabetic α -KL^{+/+} mice ($P<0.001$; Figure 6a). Thus, when diabetes was induced, the 50% reduction in renal α -KL expression may be related to the greater increases in UCa/UCr levels in α -KL^{+/-} mice than those in α -KL^{+/+} mice.

The effect of α -KL expression levels on the activity of TRPV5

TRPV5 is predominantly involved in renal calcium handling. TRPV5 colocalizes with α -KL in DCTs, and its activity is stimulated by α -KL.¹⁸ Therefore, to investigate the mechanism by which the reduction of renal α -KL expression is related to the increase of urinary calcium excretion, we studied the effect of α -KL expression on TRPV5 activity. First, we verified that the level of renal TRPV5 expression was not significantly lower in DN with an eGFR greater than 60 ml/min per 1.73 m² than in IgAN or MCD, and also not lower in STZ-induced diabetic mice at 8 weeks than nondiabetic mice (Figure 7a-d), indicating that there is no significant association between the levels of α -KL expression and those of TRPV5 expression in the kidney. Next, to clarify whether or not TRPV5 channel activity is associated with the level of α -KL expression, we transfected both TRPV5 and various amounts of adenoviral vectors carrying the α -KL gene into human embryonic kidney 293 (HEK293) cells, and then

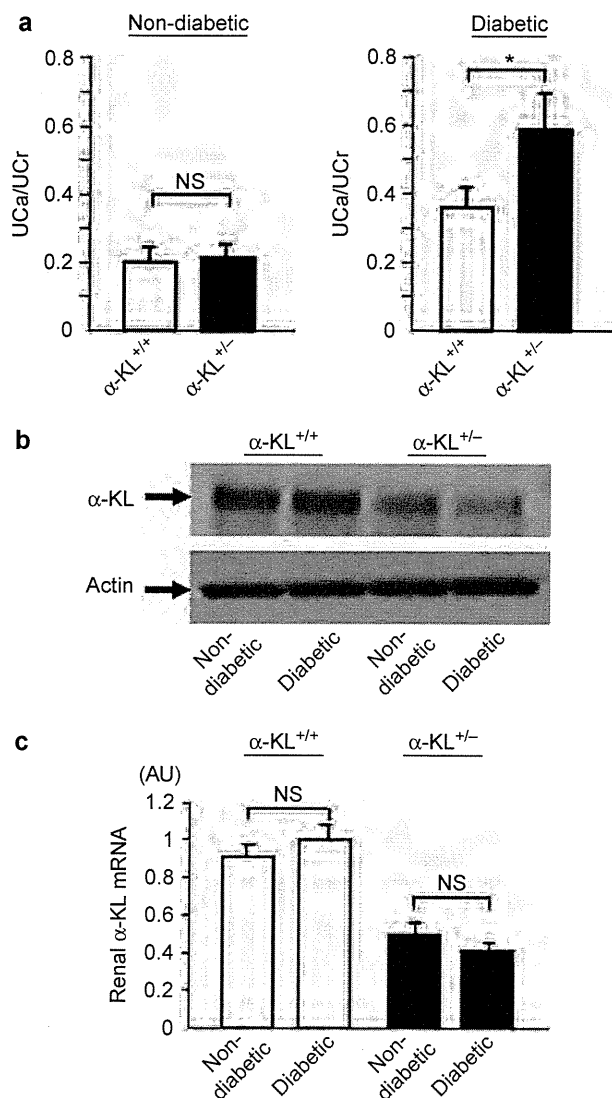


Figure 6 | Exaggeration of urinary calcium excretion (UCa/UCr) in streptozotocin (STZ)-induced diabetic $\alpha\text{-Klotho}$ ($\alpha\text{-KL}$)^{+/-} mice. (a) UCa/UCr in diabetic and nondiabetic mice of $\alpha\text{-KL}^{+/-}$ (black bars) and $\alpha\text{-KL}^{+/+}$ (white bars) strains. **(b)** Western blotting for $\alpha\text{-KL}$ in kidney specimens from the indicated mice, and **(c)** renal $\alpha\text{-KL}$ mRNA expression indices in diabetic and nondiabetic mice of $\alpha\text{-KL}^{+/-}$ (black bars) and $\alpha\text{-KL}^{+/+}$ (white bars) strains. Student's *t*-test was used to compare groups. **P* < 0.001.

analyzed calcium uptake in the transfectants. In this *in vitro* experiment, we showed that, in HEK293 transfected with both *TRPV5* and $\alpha\text{-KL}$ gene, calcium uptake was significantly increased in proportion to the $\alpha\text{-KL}$ expression (Figure 7e). In this experiment, HEK293 cells transfected with both *TRPV5* and *Lac Z* gene served as the control. We also found that calcium uptake did not significantly increase in HEK293 cells in the absence of *TRPV5*, even when $\alpha\text{-KL}$ expression was elevated (Figure 7e).

DISCUSSION

This study demonstrated, for the first time, that renal $\alpha\text{-KL}$ expression levels in patients with DN were markedly

decreased in comparison with those in patients with either IgAN or MCD with an eGFR greater than 60 ml/min per 1.73 m². We confirmed that UCa/UCr in patients with DN was markedly increased in comparison with patients with IgAN or MCD, and renal $\alpha\text{-KL}$ expression levels correlated significantly with UCa/UCr in humans. In the STZ-induced mouse model of diabetes, we also observed that the decreases in renal $\alpha\text{-KL}$ expression levels correlated with greater enhancement of UCa/UCr. Moreover, we confirmed the exacerbated renal calcium loss in $\text{KL}^{+/-}$ mice with STZ-induced DN. These findings indicate for the first time a significant correlation between renal $\alpha\text{-KL}$ loss and hypercalciuria in early DN.

Our study revealed that renal $\alpha\text{-KL}$ expression levels were significantly decreased in patients of DN with an eGFR greater than 60 ml/min per 1.73 m². Although eGFR is grossly related to the degree of renal tubulointerstitial damage, eGFR may not always be correlated with renal tubulointerstitial damage because of the development of glomerular hyperfiltration in the early stages of DN.^{20,21} To exclude the possibility that increased tubulointerstitial damage was responsible for the observed decreases in renal $\alpha\text{-KL}$ expression in DN, we immunohistologically investigated PTC counts and the degree of interstitial fibrosis.^{22,23} In the population of patients with an eGFR greater than 60 ml/min per 1.73 m², we did not observe any significant histological differences in tubulointerstitial damage among DN, IgAN, and MCD specimens. In addition to human examination, we confirmed the reduced expression of $\alpha\text{-KL}$ mRNA in the kidneys of STZ-induced diabetic mice, in which apparent glomerular and tubulointerstitial injury were not detected. These results suggest that a reduction of renal $\alpha\text{-KL}$ expression in the early stages of DN is a characteristic finding of DN.

Hypercalciuria is also an early finding characteristic of patients with DN,¹ and renal tubular calcium excretion is indicated to be increased in STZ-induced diabetes mellitus, despite exhibiting normal plasma calcium concentrations.²⁻⁴ The precise mechanism of hypercalciuria in DN, however, remains unclear. In the present study, multiple regression analyses clearly showed that the renal expression of $\alpha\text{-KL}$ mRNA is an independent determinant of UCa/UCr, and the reduction of renal $\alpha\text{-KL}$ expression in STZ-induced diabetic mice was shown to enhance the diabetes-related increase of UCa/UCr levels. Thus, it is possible that the decline of $\alpha\text{-KL}$ mRNA in DCTs is responsible for the increase of UCa/UCr observed in DN. Given the evidence that $\alpha\text{-KL}^{-/-}$ mice showed a tremendous increase in UCa/UCr,¹⁹ this scenario is plausible but not evident, because the reduction of $\alpha\text{-KL}$ mRNA levels was at most 50% in the diabetic patients and mouse model of diabetes.

To confirm the scenario, we investigated UCa/UCr levels in $\alpha\text{-KL}^{+/-}$ mice. Half reduction of $\alpha\text{-KL}$ expression *per se* did not lead to hypercalciuria in $\alpha\text{-KL}^{+/-}$ mice. However, when we induced diabetes by STZ injection in $\alpha\text{-KL}^{+/-}$ and $\alpha\text{-KL}^{+/+}$ mice, diabetes-induced increment of UCa/UCr levels was significantly larger in $\alpha\text{-KL}^{+/-}$ mice than in