

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17271

研究課題名(和文)レドックス制御因子Nrf2を活性化するグルコラファニンの糖尿病腎症改善効果の検討

研究課題名(英文)Disecting the effect of glucoraphanin, an Nrf2 activator, on diabetic nephropathy.

研究代表者

別所 瞭一 (Bessho, Ryoichi)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：10869358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Nrf2活性化剤Glucoraphanin (GR)による糖尿病性腎症改善効果を検討した。野生型およびNrf2欠損C57BL/6Jマウスに対し、高脂肪食と少量ストレプトゾトシンにより糖尿病を誘導し、GR混飼を投与した。GRは野生型およびNrf2欠損糖尿病マウスの双方において、尿細管障害を改善し、Sodium-Glucose co-Transporter 2(SGLT2)蛋白発現を減少させた。GRの活性体Sulforaphaneは、ヒト近位尿細管上皮培養細胞において、Nrf2非依存的なSGLT2発現減少を認めた。GRによるNrf2非依存的な腎保護効果とSGLT2発現減少の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ブロッコリー新芽由来生理活性物質Glucoraphanin(GR)の腎保護効果とその作用機構の一端を明らかにした。従来、GRの腎保護作用機構には、レドックス制御因子NF-E2-related Factor 2 (Nrf2)活性化の影響が大きいと考えられていた。しかし本検討により、GRのNrf2非依存的な腎保護効果が明らかとなり、Sodium-Glucose co-Transporter 2 (SGLT2)発現減少の関与が示唆された。本研究成果は、積極的・特異的治療法の乏しい糖尿病性腎症に対する新規創薬への応用や、新規治療標的の発見への展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：NF-E2-related Factor 2 (Nrf2) activators have renoprotective potential, however their mechanisms are not fully elucidated. In this study, we investigated the effect of Glucoraphanin (GR), an Nrf2 activator derived from broccoli sprouts, and its active form, sulforaphane (SFN), on diabetic nephropathy. We treated wild-type and Nrf2-deficient (C57BL/6J background) mice, made diabetic by a high-fat diet and low-dose streptozotocin, with a GR containing diet. GR did not affect glomerular lesions and albuminuria, but improved tubular damage and renal fibrosis in both wild-type and Nrf2-deficient diabetic mice. GR decreased Sodium-Glucose co-Transporter 2 (SGLT2) protein expression in wild-type and Nrf2-deficient diabetic mice. In addition, SFN showed an Nrf2-independent decrease in SGLT2 gene expression in cultured human proximal tubular epithelial cells. These results suggest that GR may have renoprotective effects in a Nrf2-independent manner, and the involvement of SGLT2 down-regulation.

研究分野：糖尿病性腎症

キーワード：Glucoraphanin 糖尿病性腎症 Nrf2 SGLT2

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は、末期腎不全の主要な原因疾患であり、生活の質の著しい低下と生命予後の短縮をもたらす。しかしこれまでに、積極的・特異的治療は臨床応用されておらず、有効な治療薬の開発が強く求められている。細胞のレドックス状態を調節するマスター制御因子 Nrf2(NF-E2-related factor 2)活性化剤は腎機能を改善させる薬剤として期待されている¹⁾²⁾が、その腎保護作用機構は十分に解明されていない。

ブロッコリー新芽などのアブラナ科野菜に豊富に含まれるグルコラファニン(Gucoraphanin; GR)は、咀嚼により生体内で加水分解された後、活性体のスルフォラファン(Sulforaphane; SFN)に変換され、Nrf2 抑制因子である Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1)を阻害し Nrf2 を活性化する。GR は、食品としてこれまで広く摂取されてきたことから安全性は高く、他の Nrf2 活性化剤と比較し臨床応用に適した物質であると考え、本物質に着目した。

2. 研究の目的

Nrf2 活性化剤 GR とその活性体 SFN による腎保護効果を糖尿病マウスとヒト近位尿細管上皮培養細胞を用い検討することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

C57bl/6J マウスと Nrf2 欠損マウス(RBRC01390; C57BL/6J background)に対し、4 週齢より高脂肪食(60% Fat)を投与し、8 週齢で膵β細胞毒性を有する Streptozotocin (STZ)を 40 mg/kg/day、5 日間腹腔内注射し作成した糖尿病マウスを使用した。8 週齢より 20 週間、対照群と GR 0.3%混飼投与群に分け 28 週齢で解剖し、代謝指標や、血液・尿生化学検査所見、組織所見を比較した。

さらに、ヒト近位尿細管上皮培養細胞(Lonza 社)を用い、Lipofectamine 法により、Nrf2 siRNA を導入した後 SFN を加え培養し、腎障害関連因子の遺伝子発現を定量 PCR 法により検討した。

4. 研究成果

(1) 糖尿病群では糸球体において、野生型、Nrf2 欠損マウスの双方で軽度のメサンギウム領域の拡大を認めた。GR 投与による明らかな糸球体病変の改善はなく、Nrf2 欠損マウスにおける糸球体病変の変化は観察されなかった(図 1 および図 2)。

(2) 糖尿病群は、尿細管上皮の萎縮、尿細管拡張、尿細管内の debris 貯留など、尿細管障害の所見を呈した。GR 投与群ではそれら尿細管障害の改善を認めた。GR による尿細管障害改善効果は、Nrf2 欠損マウスにおいても認められた。Nrf2 欠損マウスでは野生型マウスと比較し、尿細管障害の悪化は認めなかった(図 1 および図 2)。

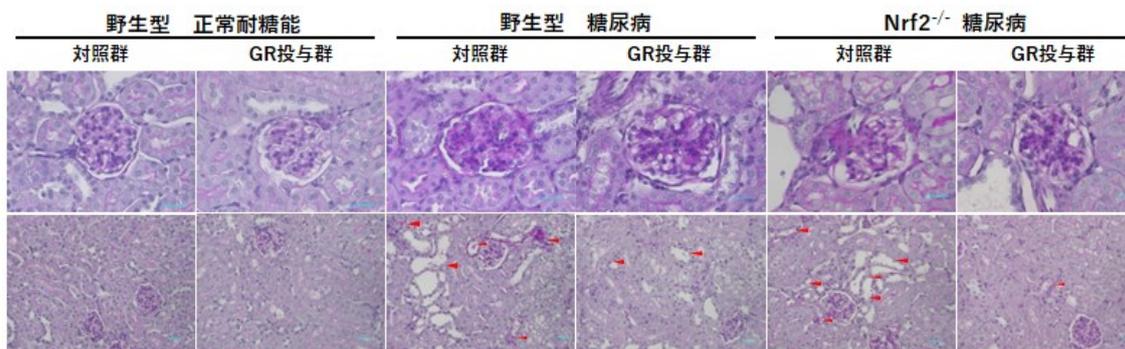


図1: 各群の組織所見の変化(Periodic acid Schiff染色). GRは糖尿病により生じた糸球体病変には明らかな影響を与えなかったが、野生型およびNrf2欠損マウスの双方において尿細管障害を改善した。Bar=30μm.

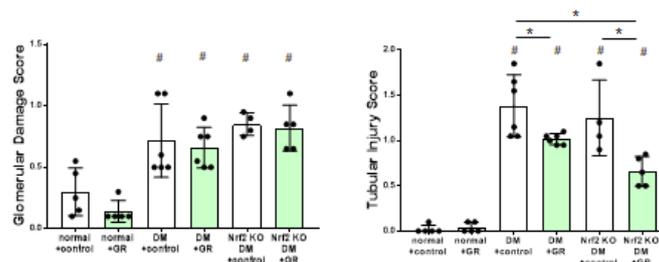


図2: 組織所見の半定量的解析。糸球体障害スコアおよび尿細管障害スコア。Kruskal-Wallis test, Man-whitney' U test for post hoc analysis, *p<0.05, #p<0.05 vs 野生型 正常耐糖能 対照群

(3) 糖尿病群では、尿中アルブミンの有意な増加を認めた。また、GR 投与群では、野生型で尿中アルブミンを増加させる傾向を有したが、Nrf2 欠損マウスでは明らかな変化を認めなかった。Nrf2 欠損糖尿病マウスにおいて、尿中アルブミンの増加は認めなかった。また、腎機能の指標として血中 Cystatin C および BUN を測定したが、各群間で差は認めなかった。興味深いことに、GR は Nrf2 欠損マウスにおいて、空腹時血糖値、収縮期血圧、平均血圧を低下させた(表 1)。

	野生型 正常耐糖能		野生型 糖尿病		Nrf2 ^{-/-} 糖尿病	
	対照群	GR投与群	対照群	GR投与群	対照群	GR投与群
収縮期血圧 (mmHg)	111.10±6.00	103.20±15.12	115.17±5.37*	110.67±14.58*	108.00±7.38	85.20±9.35
平均血圧 (mmHg)	76.20±6.31	72.00±12.70	81.50±7.68*	79.33±13.21*	74.00±7.85*	49.60±11.27#
空腹時血糖値 (mg/dl)	153.60±27.68	119.20±46.15	447.50±131.12**	480.33±71.18**	426.60±119.91**	188.20±112.42
HbA1c (%)	4.20±0.35	4.00±0.35	9.95±1.16**	9.35±1.16**	8.28±1.56**	4.62±0.80
尿中アルブミン (µg/day)	7.97±6.34	18.29±8.26†	72.94±38.22†	173.55±76.26†	57.06±26.78†	31.34±15.63**†
血中Cystatin C (ng/ml)	554.37±58.88	504.57±23.19	519.01±88.26	466.27±58.60	520.93±83.45	625.67±52.56
血中BUN (pg/ml)	24.90±3.44	27.84±4.82	31.62±6.50	24.82±2.19	22.80±3.15	24.26±4.01

表1: 血糖値、血圧、腎機能指標。One-way ANOVA (Tukey's post hoc test), *p<0.05 vs 野生型 正常耐糖能 対照群, †p<0.05 vs Nrf2^{-/-} 糖尿病 GR投与群, ‡p<0.05 vs 野生型 糖尿病 GR投与群

(4) 次に我々は、近年糖尿病性腎症の病態形成および治療において注目されている Sodium-Glucose co-Transporter 2 (SGLT2)³⁾⁴⁾の発現に対する GR の影響を、免疫組織化学的染色法により検討した。野生型および Nrf2 欠損マウスの糖尿病対照群では SGLT2 の染色性が増加した一方、GR 投与群では、野生型および Nrf2 欠損マウスの双方で SGLT2 発現減少を認めた。

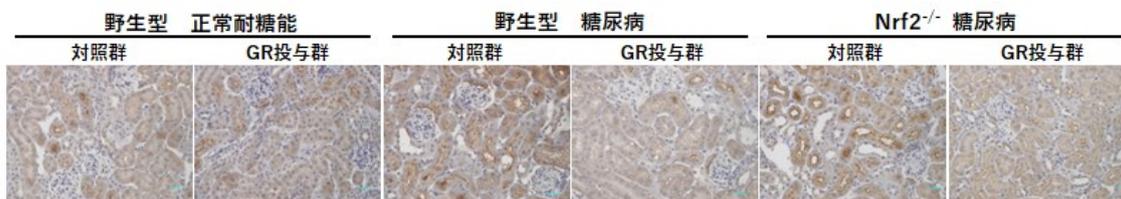


図3: 糖尿病群におけるSGLT2発現増加とGRによる発現減少。Bar=30µm.

(5) さらに、ヒト近位尿細管上皮培養細胞を用い、Nrf2 欠損および GR の活性体である SFN の投与が SGLT2 遺伝子発現に与える影響について検討した。SFN は、Nrf2 標的遺伝子 NQO-1 を増加させた一方、SGLT2 mRNA 発現を減少させた。また、Nrf2 ノックダウンは、SGLT2 遺伝子発現を減少させ、Nrf2 ノックダウン下では、SFN による SGLT2 発現抑制は認めなかった。

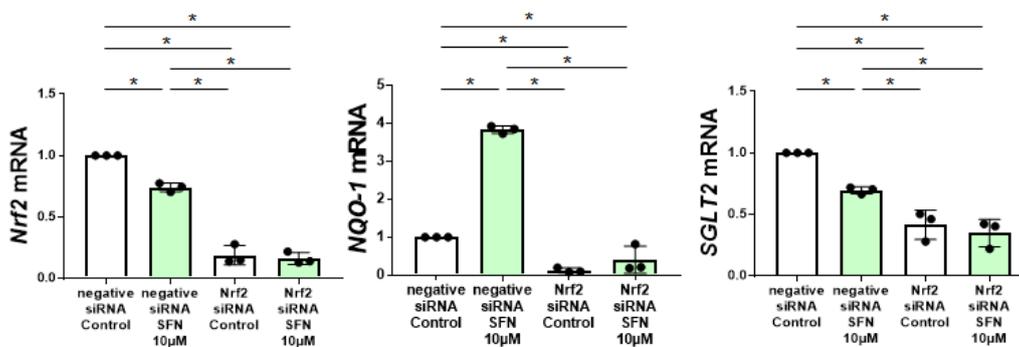


図4: ヒト近位尿細管上皮培養細胞におけるNrf2、Nrf2標的遺伝子NQ-1およびSGLT2 mRNA発現の検討。One-way ANOVA (Tukey's post hoc test), *p<0.05

本研究により、GR の Nrf2 非依存的な腎保護効果が明らかとなり、その作用機序として腎近位尿細管細胞における SGLT2 発現減少の関与が示唆された。近年、ヒト SGLT2 遺伝子のプロモーター領域には Nrf2 応答配列が存在し、Nrf2 活性化が SGLT2 発現増加を引き起こし、糖尿病腎症を悪化させる可能性が報告されている⁵⁾。しかしながら、本検討では、GR および SFN は SGLT2 発現を減少させ、その機序は Nrf2 非依存と考えられた。さらに、我々は Nrf2 欠損マウスの近位尿細管上皮細胞における GR によるアセチルヒストン H3 発現増加も確認しており、GR は Nrf2 非依存的にエピジェネティック修飾を介し糖尿病性腎症改善効果を有する可能性も示唆され、追加検討を実施した後論文投稿を予定している。

<引用文献>

- 1) de Zeeuw D, et al. *N Engl J Med.* 2013; 369: 2492-2503
- 2) Nangaku M, et al. *Kidney Int Rep.* 2020; 14: 879-890
- 3) Perkovic V, et al. *N Engl J Med* 2019; 380: 2295-2306
- 4) Heerspink H, et al. *N Engl J Med* 2020; 383: 1436-1446
- 5) Zhao S et al, *Diabetes* 2021; 70: 1388-1403

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 別所 瞭一、滝山 侑里、滝山 貴央、Suratsawadee Promsuwan、佐藤 茉欧、澤本 一樹、橘内 博哉、竹田 安孝、滝山 由美
2. 発表標題 グルコラファニンは糖尿病腎組織においてSGLT2発現を減少させる
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 別所 瞭一、Suratsawadee Promsuwan、澤本 一樹、滝山 侑里、滝山 貴央、橘内 博哉、竹田 安孝、滝山 由美
2. 発表標題 Nrf2欠損マウスにおけるglucoraphaninの腎保護効果
3. 学会等名 第33回日本糖尿病性腎症研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 別所 瞭一、滝山 貴央、Suratsawadee Promsuwan、滝山 侑里、佐々木 彩華、澤本 一樹、橘内 博哉、竹田 安孝、滝山 由美
2. 発表標題 Nrf2活性化剤スルフォラファンは近位尿管細胞のTFAMを活性化しSTINGを抑制する
3. 学会等名 第36回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別所 瞭一、滝山 貴央、Suratsawadee Promsuwan、宿田 夕季、橘内 博哉、澤本 一樹、竹田 安孝、坂上 英充、滝山 由美
2. 発表標題 Nrf2活性化剤によるTFAM活性化とSTING抑制作用
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 RYOICHI BESSHO, TAKAO TAKIYAMA, SURATSAWADEE PROMSUWAN, HIROYA KITSUNAI, KAZUKI SAWAMOTO, YASUTAKA TAKEDA, YUMI TAKIYAMA
2. 発表標題 The Nrf2 Activator Increases TFAM and Suppresses STING expressions in Human Renal Proximal Tubular Cells
3. 学会等名 American Diabetes Association 81st Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------