

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K19668

研究課題名(和文) ビタミンKによる腎脂肪毒性の改善作用と作用機構の解明

研究課題名(英文) The effects of vitamin K on renal lipotoxicity and oxidative stress in HK-2 cells

研究代表者

何 欣蓉 (Ho, Hsin-Jung)

北海道大学・保健科学研究所・特任講師

研究者番号：50815561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ビタミンKの一種であるメナキノン-4(MK-4)による腎近位尿細管細胞の酸化ストレスの改善作用に着目した。HK-2細胞に活性酸素種(ROS)の誘導剤や脂肪酸を添加し、ROSの蓄積によって酸化ストレス状態になり、脂肪滴の蓄積やATPの低下、さらにミトコンドリアの機能異常が観察された。これらの障害はMK-4の添加によって改善された。一方、ミトコンドリア呼吸能の変化を測定した結果、非刺激HK-2細胞においても、MK-4がミトコンドリア機能を活性化させることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、酸化ストレスが糖尿病性腎症を含む様々な疾患の原因と報告されている。本研究でビタミンKの一つであるMK-4が酸化ストレスや脂肪毒性から細胞を保護し、ATP産生を増加させたことから、糖尿病性腎症や酸化ストレス関連疾患の予防に働くことが期待できる。また、MK-4も新たな治療戦略になり得、患者の減少や医療費削減に貢献することができると考える。

研究成果の概要(英文)：The main focus of current study is to clarify the effect of vitamin K (menaquinone-4, MK-4) in proximal tubular HK-2 cells against oxidative stress. The addition of ROS inducer or fatty acid caused oxidative stress in HK-2 cells, whereas MK-4 improved the oxidative damage, including the increase of ROS, lipid droplets, and the decrease of ATP production, mitochondrial dysfunction. Moreover, MK-4 also enhanced mitochondrial function in HK-2 cells without oxidative stress. The results suggested that MK-4 might protect kidney through the improvement of mitochondrial function in proximal tubular cells.

研究分野：栄養学

キーワード：ビタミンK 腎臓近位尿細管細胞 ミトコンドリア 酸化ストレス 脂肪毒性 抗酸化作用

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症では腎臓の近位尿細管細胞に脂肪滴の蓄積が起こることが報告された。この脂肪滴の蓄積によりミトコンドリア機能の異常を起し、過剰な活性酸素種 (ROS) が生じることが予想され、酸化ストレスによって細胞死に至ると考えられる。一方、ビタミン K の一つであるメナキノン-4 (MK-4) の多岐に渡る生理活性を持つことが明らかにされている。近年、MK-4 がミトコンドリアの電子伝達体として新たな機能性が報告された。よって、MK-4 はミトコンドリア障害の改善作用を有する可能性が考えられる。本研究で MK-4 による腎近位尿細管細胞の保護作用および作用機序の解明ができた場合、MK-4 による脂質毒性および酸化ストレスの抑制、さらにミトコンドリアを標的とした新たな治療戦略になり得、患者の減少や医療費削減に貢献することができると思う。

2. 研究の目的

本研究では、MK-4 を用いて腎臓の酸化ストレスおよび脂質毒性によるミトコンドリア障害の改善作用の解明のため、下記の実験を行なった。

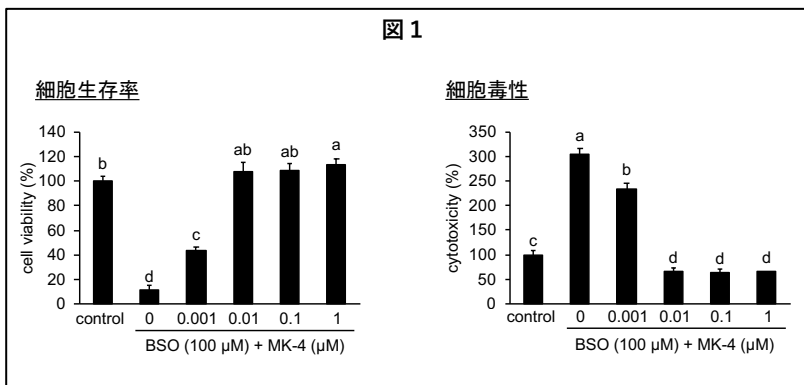
- 1) 近位尿細管培養細胞への酸化ストレス負荷による細胞毒性やミトコンドリア機能への影響を検討すること。
- 2) 近位尿細管培養細胞への脂肪酸負荷による脂質毒性やミトコンドリア機能への影響を検討すること。
- 3) 酸化ストレスおよび脂質毒性に対する MK-4 の保護作用の機序解明を目的とする。

3. 研究の方法

- 1) 酸化ストレスモデル: ヒト腎臓近位尿細管由来 HK-2 細胞を用いて、GSH 合成阻害剤であるブチオニンスルホキシイミン(BSO)を 48 時間添加し、ROS を上昇させ細胞死を引き起こすモデルを確立した。
- 2) 脂質毒性モデル: ヒト腎臓近位尿細管由来 HK-2 細胞を用いて、脂肪酸 (パルミチン酸、PA) を 48 時間添加し、脂肪滴を形成させ脂質毒性を引き起こすモデルを確立した。
- 3) MK-4の保護作用: BSO や PAを添加した HK-2 細胞の毒性を確認するため、CCK-8 と LDH 試験によって細胞生存率や細胞毒性を評価した。また、ROSの蓄積や脂肪滴の形成を観察するため、それぞれに DHR123 や Oil Red O 染色で評価した。さらに、qPCR によるミトコンドリア障害に関連する遺伝子の発現量測定、蛍光染色によるミトコンドリア品質の観察、細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリアの呼吸能の測定を行い、MK-4 添加による HK-2 細胞への保護効果とその作用機序に着目した。

4. 研究成果

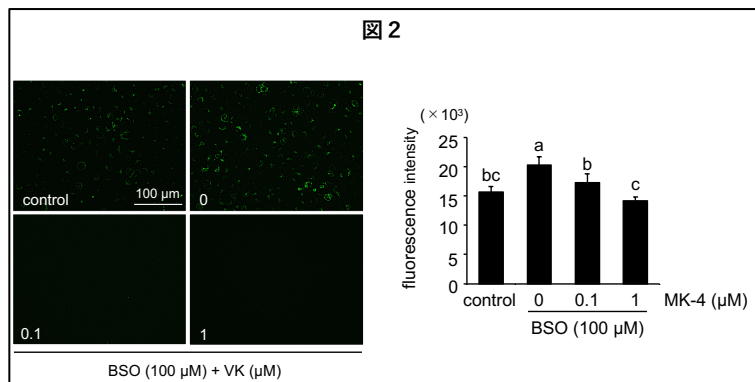
1) MK-4 が酸化ストレスから細胞を保護するかを検討した。酸化ストレスの誘導剤として BSO を用いて HK-2 細胞を酸化ストレスにさらし、MK-4 を添加して 48 時間培養した。図 1 に示したように、BSO 処理により細胞生存率はコントロール群 (control 群) と比



べ有意に低下したが、MK-4 添加により濃度依存的回復した。また、BSO 処理ではコントロール群と比べ細胞毒性が有意に増加したが、MK-4 添加により濃度依存的減少した。これらの結果から、MK-4 は BSO 毒性に対し HK-2 細胞の保護作用を有することを示した。

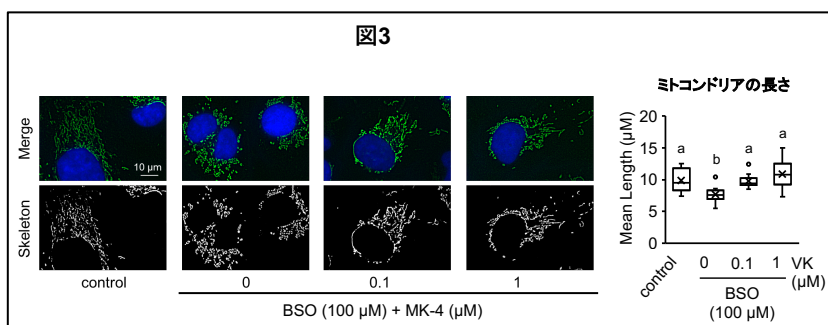
また、。BSO の添加により細胞に与えられた影響を確認するため、細胞死の一つであるアポトーシスの関連遺伝子 Bcl-2-interacting killer (BIK) と Endonuclease G (ENDO G) の発現量を測定した。36 時間 BSO で刺激した細胞の BIK と ENDO G 発現量が増加したが、MK-4 添加によって BIK と ENDO G の発現量が減少した。これらの結果から BSO 刺激による細胞死が起きたが、MK-4 添加により細胞障害が減少し細胞死が抑制されることが示唆された。

2) BSO は細胞内 ROS の除去を阻害するため、ミトコンドリア ROS の蓄積が予想される。BSO と MK-4 がミトコンドリア ROS の産生と除去に働くかを検証するために、DHR123 を用いてミトコンドリア ROS を観察および測定した。図 2 に示したように、BSO 添加により未処理であるコントロール



群よりも強く ROS を示す緑色の蛍光が観察されたが、MK-4 添加により緑色の蛍光はほとんど観察できなかった。また、蛍光の測定値においても同じ結果を得た。この結果から MK-4 は BSO によりミトコンドリア障害から細胞保護に働いている可能性が示唆された。

3) HK-2 細胞を染色し、ミトコンドリアの形態を観察した。図 3 に示したように、コントロール群はミトコンドリアが長いネットワークが形成され、BSO 処理群では小さなミトコンドリアが多く観察された。一方 MK-4 添



加群では、コントロール群と同じような長いネットワークが観察された。以上の結果より、BSO 添加による ROS の蓄積が原因となりミトコンドリア断片化を引き起こすが、MK-4 によって保護されることが示唆された。さらに、ミトコンドリアの分裂に関連する DRP1 と FIS1 について調べた。DRP1 と FIS1 の発現量はコントロール群と比べ BSO 添加によって増加し、MK-4 添加により DRP1 の発現量が減少し、FIS1 発現量も減少傾向が見られた。この結果から、BSO によってミトコンドリアの分裂が促進し、ミトコンドリアの断片化を引き起こしたと考えられ、MK-4 がミトコンドリアの分裂を抑制することができた。

4) 酸化ストレスによりミトコンドリアの機能低下が引き起こされることが報告されている。BSO 刺激でミトコンドリア断片化が観察されたことから、酸化ストレスによりミトコンドリアの呼吸能が障害されていると予想される。また、MK-4 はミトコンドリアの呼吸能障害を軽減することが期待されるため、細胞外フラックスアナライザーを用いて酸化ストレスにおける MK-4 のミトコンドリア呼吸能の改善作用について検討した。

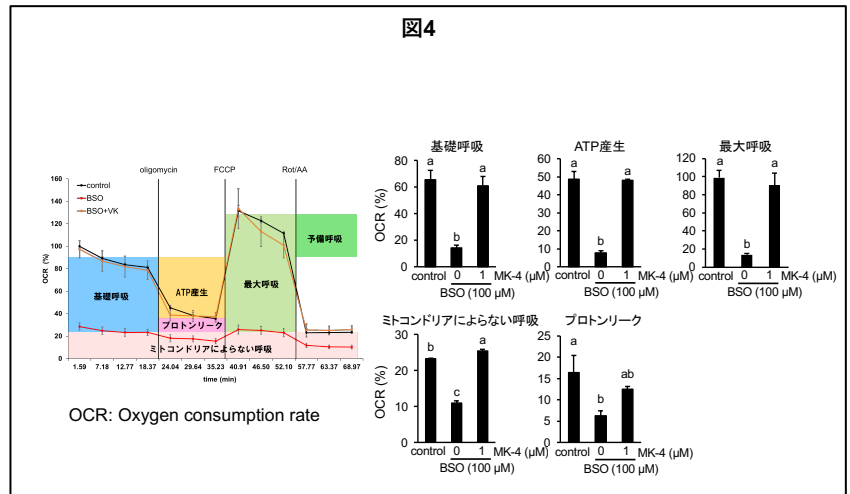
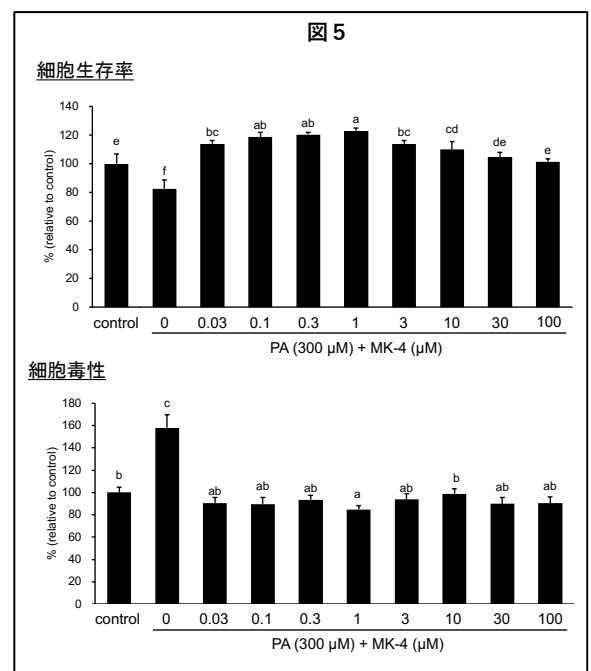


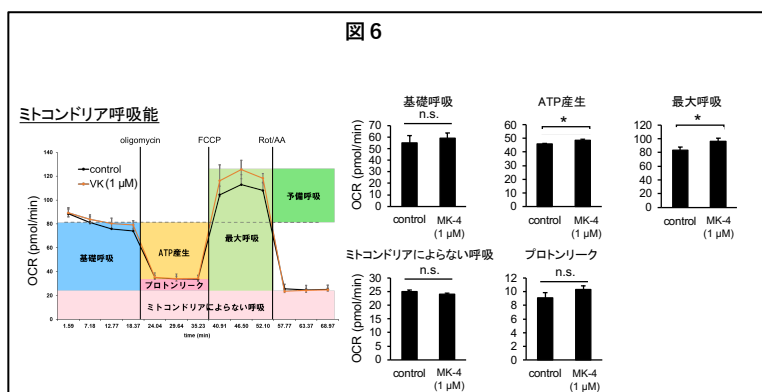
図4に示したように、細胞の酸素消費速度の測定からミトコンドリア機能評価における主要な指標：基礎呼吸、ATP 産生、最大呼吸、ミトコンドリアによらない呼吸、プロトンリークを算出した。算出した指標すべてにおいてコントロール群と比べ BSO 処理群は減少し、BSO による酸化ストレスがミトコンドリアの呼吸能を低下させたことが確認した。また、MK-4 の添加でミトコンドリアの呼吸能が回復した。この結果から、MK-4 は酸化ストレス下においてミトコンドリアの呼吸能障害を改善できることが示唆された。

5) MK-4 が脂質毒性から細胞保護するかを検討した。HK-2 細胞に脂肪酸 PA を添加し、HK-2 細胞を脂質毒性にさらし、MK-4 を添加して 48 時間培養した。図5に示したように、PA 処理により細胞生存率はコントロール群 (control 群) と比べ有意に低下したが、MK-4 添加により濃度依存的回復した。また、PA 処理ではコントロール群と比べ細胞毒性が有意に増加したが、MK-4 添加により濃度依存的減少した。これらの結果から、MK-4 は脂質毒性



に対し HK-2 細胞の保護作用を有することを示した。HK-2 細胞に脂肪酸を添加することによって、ATP の産生量が減少したことから、これらの保護作用は MK-4 が HK-2 細胞の酸化ストレスを軽減し、ミトコンドリアの機能改善に繋がると考えられる。

6) また、MK-4 が ATP 産生を促進させたことからミトコンドリア呼吸能も活性化することが考えられる。そこで非酸化ストレス下における MK-4 のミトコンドリア呼吸能の変化を測定した。図 6 に示すように、コントロール群に比べ、MK-4 群で ATP 産生と最大呼吸が増加した。



MK-4 は ATP 合成酵素の活性を増加させる可能性が考えられる。一方、ミトコンドリアによらない呼吸は MK-4 添加によって変化が見られなかった。これらの結果から MK-4 はミトコンドリアによらない呼吸すなわち解糖系によるものではなく、ミトコンドリアの呼吸により ATP 産生を増加させたことが考えられる。したがって MK-4 は近位尿細管細胞においてもミトコンドリアの呼吸による ATP 産生を増加させることが考えられる。また、最大呼吸が増加したことから MK-4 が電子の伝達を促進する可能性も考えられる。この結果から MK-4 が細胞内ミトコンドリアの呼吸能を向上させることが示唆された。

本研究では MK-4 が酸化ストレスや脂質毒性においてヒト近位尿細管 HK-2 細胞を保護することを示した。その機序として、MK-4 の細胞内 ROS 除去作用が細胞保護につながる可能性が示唆された。また、MK-4 は酸化ストレスにより誘導されたミトコンドリア ROS の除去やミトコンドリア断片化の阻止、さらにミトコンドリアの呼吸能を維持した。そのため、MK-4 はミトコンドリアを酸化ストレスから保護し、機能を維持することで細胞保護に働く可能性が示唆された。さらに、非酸化ストレス下においても MK-4 は ATP 産生の増加作用や呼吸機能の向上効果を示した。MK-4 は腎臓病におけるミトコンドリア障害を回復させる可能性があるだけでなく、健康食品などに利用することで病気の予防にもつながる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Natsumi Aoki, Hsin-jung Ho, Ming-chen Gao, Hiroataka Suzuki, Hitoshi Chiba, Shu-Ping Hui
2. 発表標題 The protection of vitamin K on mitochondrial function in oxidative stress cells.
3. 学会等名 The 5th FHS International Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木菜摘、何欣蓉、高明晨、鈴木拓貴、千葉仁志、惠淑萍
2. 発表標題 ビタミンKの腎臓近位尿細管細胞におけるミトコンドリア保護作用の解明
3. 学会等名 第31回日本臨床化学会北海道支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木菜摘、何欣蓉、高明晨、鈴木拓貴、千葉仁志、惠淑萍
2. 発表標題 ビタミンKによる腎臓近位尿細管細胞のミトコンドリア保護作用
3. 学会等名 第62回日本臨床化学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------	---------