

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08290

研究課題名(和文) 進行性糖尿病性腎臓病の病態におけるシステイニルロイコトリエン受容体1の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of cysteinyl leukotriene receptor1 on advanced diabetic kidney disease

研究代表者

北田 宗弘 (Munehiro, Kitada)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：40434469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病/肥満マウスの進行した腎病変，ならびに，培養ヒト近位尿細管細胞を用いた実験において，プラルルカストは，糖尿病状態の腎近位尿細管細胞において認められる栄養応答シグナル経路の変異（AMPK活性の低下とmTORC1活性の増加），ならびにそれと関連するオートファジーの低下を回復することで，炎症を改善し，腎保護効果を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病関連腎臓病(DKD)における尿細管間質の慢性炎症は，腎機能低下の進展に対する病態形成に重要である。したがって，慢性炎症の制御が，DKDからの末期腎不全への進展抑制に対するアンメット・ニーズを満たす治療に繋がる可能性がある。本研究では，現在，気管支喘息に対する治療薬として用いられているプラルルカストが進行したDKDにおける炎症を改善する可能性を見出したため，同薬剤のDKD治療薬としての，ドラッグ・リポジショニングとしての可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：In the advanced renal lesions in type 2 diabetic/obese rats and in the experiments using cultured human proximal tubule cells, it was suggested that pranlukast may improve inflammation and exert a renal protective effects by restoring alteration of nutrients sensing signaling pathway including decreased AMPK activity and increased mTORC1 activity, and its related decrease in autophagy, which is observed in diabetic renal proximal tubule cells.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病関連腎臓病 システイニル ロイコトリエン受容体1 プランルカスト 炎症 尿細管間質障害 オートファジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎臓病 (Diabetic Kidney Disease: DKD) において腎機能低下が速く進行性に経過する患者 (Rapid GFR decliner) は、末期腎不全への進展リスクが高いため、その病態解明と新規治療法の開発は急務である。申請者らは、これまでに 2 型糖尿病/肥満 (Wistar fatty (fa/fa)) ラットの腎では高度な炎症性変化と尿細管間質障害を認めることを報告してきた。また DNA メチル化解析の結果、非糖尿病ラットと比較して、糖尿病ラット腎では、システインメチルトランスフェラーゼ 1 (CysLTR1)、インターロイキン (IL)-1 $\beta$ 、リポカリン-2 を含む炎症関連遺伝子の高度な発現増加を認めるため、これらによる炎症が進行性の腎障害に密接に関与していると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、CysLTR1 に着目し、糖尿病腎の炎症の病態形成と腎病変の進展における CysLTR1 の果たす役割を CysLTR1 拮抗薬 プラリカストを用いて解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 実験 1: Wistar fatty ラットに対する プラリカストの DKD 抑制効果の検証

Wistar lean ラット: コントロール (Cont), Wistar fatty (fa/fa) ラット: 糖尿病 (DM) の各ラット (雄, 36 週齢, 各 n=7) を以下の群に分別し 8 週間治療介入。

群: 1) Cont+対照液, 2) Cont+プラリカスト 3mg/kg/日, 3) DM+対照液, 5) DM+3mg/kg/日。プラリカスト: ギンテにて投与。

評価項目:

- ・治療介入後の体重, 血糖値, 腎重量, 尿中アルブミン/ L 型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP)/クレアチニン (Cr) 比, HbA1c 値。
- ・腎組織: マッソトリクロム染色 (線維化), CD68 免疫染色 (マクロファージ浸潤), p-S6RP 免疫染色 (mTORC1 の活性化), p62 免疫染色 (オートファジー), CysLTR1 発現 (腎皮質), 炎症性サイトカイン・ケモカイン発現 (腎皮質) (RT-PCR): IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CCL2, リポカリン-2 (Lcn2), 線維化マーカー発現 (腎皮質) (RT-PCR): コラーゲン III, 尿細管障害マーカー発現 (腎皮質) (RT-PCR): Kidney injury molecule (Kim)-1。

#### 実験 2: 培養した近位尿細管細胞 (HK-2 細胞) の高ブドウ糖によるオートファジーおよび炎症の変異に対する プラリカストの効果の検証

- ・HK-2 細胞をクレンチリット SFM 培地で培養・継代し実験に用いた。
- ・高ブドウ糖刺激は、30mM ブドウ糖含有培地 (High Glucose (HG)) にて 24 時間培養した。なお、5mM ブドウ糖含有培地に 25mM マンニトールを加えた培地をコントロール (Cont) とした。
- ・プラリカストは、最終濃度 1-50  $\mu$ M にて MTT アッセイおよび LDH release アッセイにて細胞毒性の評価を行った。
- ・HG およびプラリカスト付置 24 時間後に、リン酸化-AMPK (p-AMPK), AMPK, リン酸化-S6 ribosomal protein (p-S6RP), S6RP, LC3, CysLTR1, リン酸化-NF- $\kappa$ B (p-NF $\kappa$ B), NF- $\kappa$ B, nucleotide binding and oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3), IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ,  $\alpha$ -actin 発現を WB 法にて評価した。
- ・実験結果は、3 回の独立した重複実験の平均  $\pm$  標準偏差 (SD) 値を表し、一元配置分散分析とそれに続く Tukey の多重比較を使用して、3 群間以上の差異の有意性を評価した。p < 0.05 値を統計的に有意であるとした。

## 4. 研究成果

### 実験 1

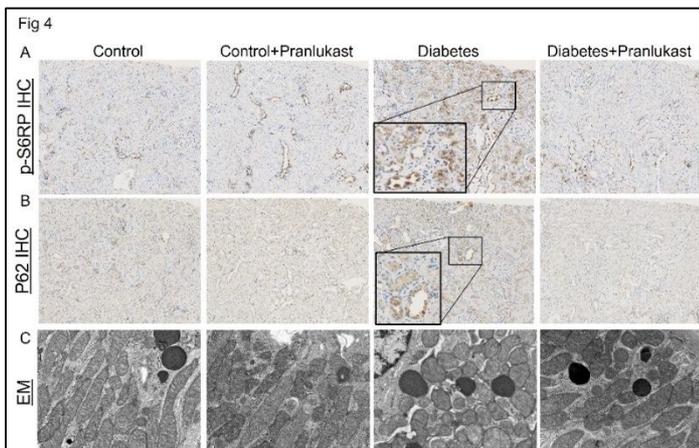
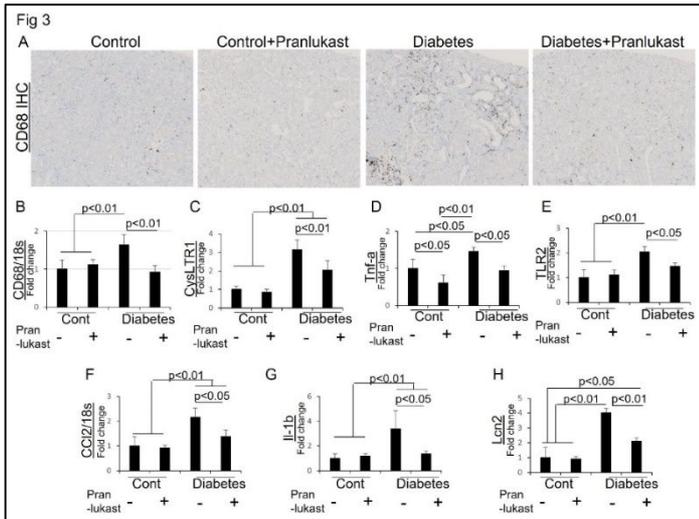
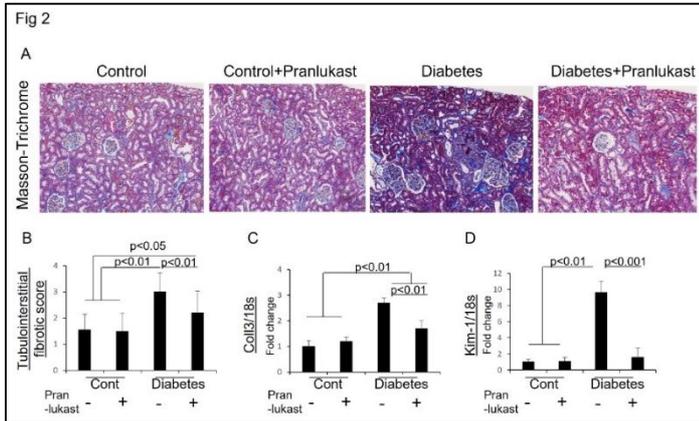
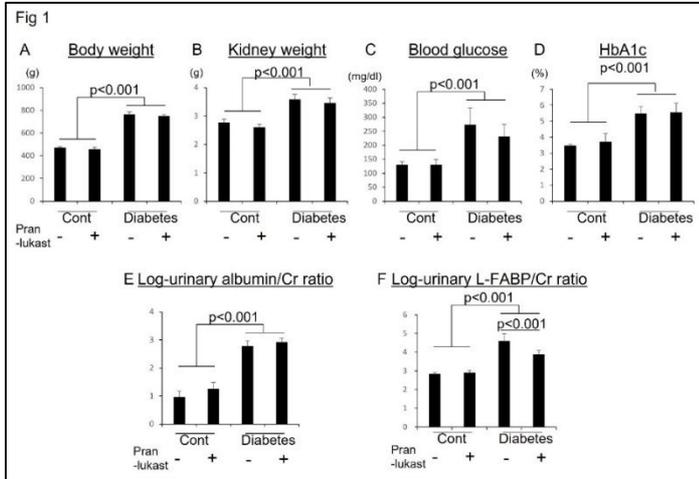
・治療介入後(44 週)の時点で, DM 群では, Cont 群と比較して, 有意に体重, 腎重量, 随時血糖値, HbA1c 値の上昇を認めしたが, DM 群と DM+プラナルカスト群の間に差を認めなかった(Fig 1A-D).

・尿中アルブミンおよび L-FABP/Cr 比は, Cont 群と比較して DM 群で有意に増加した(Fig 1E,F). 尿中アルブミン/Cr 比は, DM 群と DM+プラナルカスト群の間に差を認めなかったが (Fig 1E), 尿中 L-FABP/Cr 比は, DM+プラナルカスト群で, DM 群と比較して有意に減少した(Fig 1F).

・MT 染色, 3 型コラーゲン発現, Kim-1 発現で評価した腎尿細管間質の線維化, 尿細管細胞障害は, Cont 群と比較して DM 群で有意に増加し, DM+プラナルカスト群で有意な低下を認めた(Fig 2A-D).

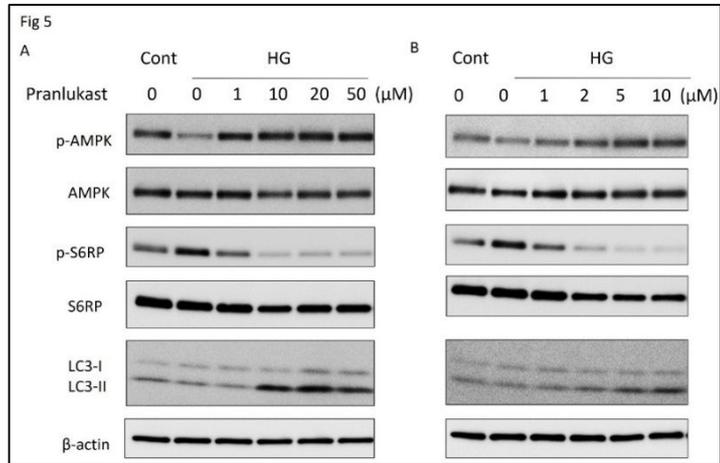
・CD68 免疫染色, CD68, CysLTR1, Tnf- $\alpha$ , TLR2, CCL2, Il-1 $\beta$ , Lcn2 発現で評価した炎症は, Cont 群と比較して DM 群で有意に増加し, DM+プラナルカスト群で有意な低下を認めた(Fig 3A-D).

・p-S6RP, p62 発現は, Cont 群と比較して DM 群で有意に増加し, DM+プラナルカスト群で低下を認めた. 電子顕微鏡にて評価した近位尿細管細胞におけるミトコンドリア形態変化は, DM 群で断片化, クリスの消失を認めしたが, DM+プラナルカスト群で改善した.

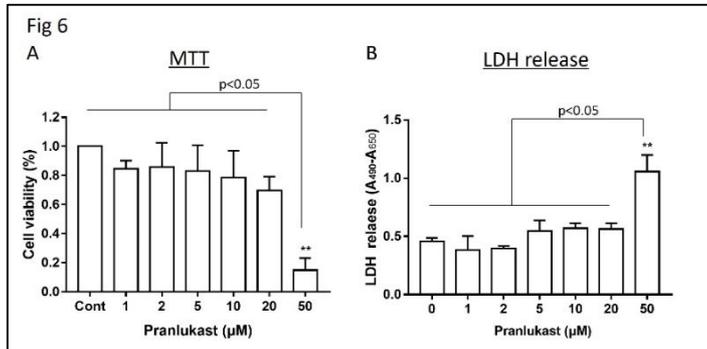


## 実験 2

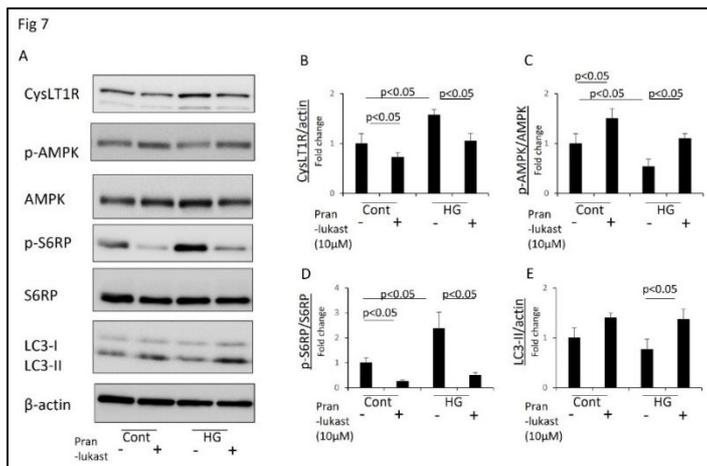
・Cont と比較して, HG(0)にて有意な p-AMPK 発現の低下, p-S6RP 発現の増加を認めた. プラニルカストは, 1~50  $\mu$ M の附置にて, 1~10  $\mu$ M では用量依存的に (Fig 5A), 10~50  $\mu$ M では, ほぼ同等に(Fig 5B), p-AMPK の増加および p-S6RP 発現の低下, LC3-II 発現の増加を認めた.



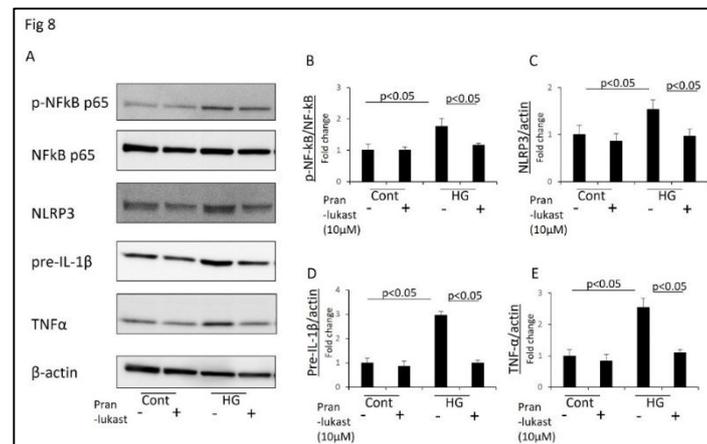
・プラニルカストの細胞毒性に関して, MTT アッセイ(Fig 6A)および LDH release アッセイ(Fig 6B)にて評価したところ, 50  $\mu$ M でのみ細胞毒性を示した.



・HG により誘導される CysLTR1, p-S6RP 発現の増加, p-AMPK 発現の低下は, プラニルカスト 10  $\mu$ M の附置にて, CysLTR1, p-S6RP 発現は低下, ならびに p-AMPK 発現は増加を認めた (Fig 7A-D). LC3II 発現は, プラニルカストにより有意な増加を示した(Fig 7A, E)



・HG により誘導される炎症に関しては, p-NF- $\kappa$ B, NLRP3, IL-1, TNF- $\alpha$  発現は, プラニルカスト 10  $\mu$ M の附置にて有意に低下を認めた(Fig 8A-E).



## 考察・結語

2型糖尿病/肥満マウスの進行した腎病変，ならびに，培養した近位尿細管細胞を用いた実験において，プラリカストは，糖尿病状態の腎近位尿細管細胞において認められる栄養応答シグナル変異（AMPK活性の低下とmTORC1活性の増加），ならびにそれと関連するオートファジーの低下を回復することで，炎症を改善し，腎保護効果を発揮する可能性が示唆された．今後，今回示されたプラリカストの腎保護効果が，CysLT1Rを介した効果であるかどうか，in vivo実験におけるCysLTR1ノックアウトマウス，ならびにin vitro実験におけるCysLTR1ノックアウト・システムを用いた検討により明らかにする予定である．

DKDにおける尿細管間質の慢性炎症は，腎機能低下の進展に対する病態形成に重要である．したがって，慢性炎症の制御が，DKDからの末期腎不全への進展抑制に対するアンメット・ニーズを満たす治療に繋がる可能性がある．本研究では，現在，気管支喘息に対する治療薬として用いられているプラリカストが進行したDKDにおける炎症を改善する可能性を見出したため，同薬剤のDKD治療薬としての，ドラッグ・リポジショニングとしての可能性を示すものである．

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 北田宗弘	4. 巻 36
2. 論文標題 糖尿病性腎臓病の食事療法～摂取タンパク質量の制限からタンパク源を重視した食事パターンへ～	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 糖尿病合併症	6. 最初と最後の頁 234, 238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitada M, Araki SI, Koya D.	4. 巻 12
2. 論文標題 The Role of CD38 in the Pathogenesis of Cardiorenal Metabolic Disease and Aging, an Approach from Basic Research	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12040595	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Monno I, Ogura Y, Xu J, Koya D, Kitada M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Exercise Ameliorates Diabetic Kidney Disease in Type 2 Diabetic Fatty Rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10111754	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Xu J, Kitada M, Ogura Y, Liu H, Koya D.	4. 巻 10
2. 論文標題 Dapagliflozin Restores Impaired Autophagy and Suppresses Inflammation in High Glucose-Treated HK-2 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10061457.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitada M, Koya D.	4. 巻 11
2. 論文標題 Autophagy in metabolic disease and ageing.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Rev Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 647-461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41574-021-00551-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogura Y, Kitada M, Koya D.	4. 巻 10
2. 論文標題 Sirtuins and Renal Oxidative Stress.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10081198.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Xu J, Kitada M, Koya D.	4. 巻 8
2. 論文標題 NAD+ Homeostasis in Diabetic Kidney Disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Med (Lausanne).	6. 最初と最後の頁 703076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2021.703076.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Xu J, Kitada M, Ogura Y, Koya D.	4. 巻 9
2. 論文標題 Relationship Between Autophagy and Metabolic Syndrome Characteristics in the Pathogenesis of Atherosclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 641852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.641852.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Xu J, Hirai T, Koya D, Kitada M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Effects of SGLT2 Inhibitors on Atherosclerosis: Lessons from Cardiovascular Clinical Outcomes in Type 2 Diabetic Patients and Basic Researches	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11010137.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 門野 至, 小倉慶雄, 北田宗弘, Jing Xu, 古家大祐
2. 発表標題 運動負荷は2型糖尿病/肥満ラット腎における炎症を軽減する
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

〔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
研究分担者	古家 大祐  (Koya Daisuke)  (70242980)	金沢医科大学・医学部・客員教授    (33303)	

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
---------	---------