

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32309

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15469

研究課題名（和文）近位尿細管上皮細胞の障害に対するイソチオシアネート類の効用に関する研究

研究課題名（英文）Study on the protective effect of isothiocyanates in proximal tubular epithelial cells

研究代表者

三浦 佑介（Miura, Yusuke）

群馬パース大学・保健科学部・助教

研究者番号：20848791

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000 円

研究成果の概要（和文）：スルフォラファン、6-MSITC、アリルイソチオシアネート、フェニルイソチオシアネートの構造の異なる4種類のイソチオシアネート類が、脂肪酸添加による近位尿細管上皮細胞障害に対して保護的に作用するか検討した。スルフォラファンは既知の性質である抗酸化作用に加えて、腎臓のミトコンドリア機能障害から細胞を保護する作用を持つ可能性が示唆された。また、イソチオシアネート類が細胞に対して抗酸化作用やミトコンドリア保護作用を及ぼすためには、構造中にスルフィニル基をもち、炭素鎖が適切な長さであることが重要な要素となる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病は、患者数がわが国の成人のうち8人に1人にのぼるともいわれ、糖尿病や高血圧に加えて新たな国民病として注目度の高い疾患である。そのため、新たな予防法や治療法の確立が強く求められている。腎臓における近位尿細管上皮細胞障害の原因は、酸化ストレスをはじめミトコンドリア機能低下や脂質の蓄積など多岐にわたり、Keap1-Nrf2経路を介した作用が有効手段の1つとして考えられる。Keap1-Nrf2経路を活性化させるスルフォラファンがミトコンドリア機能低下を抑制する可能性をもつことから、今後の予防法・治療法の探索に寄与し得る研究であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether four types of isothiocyanates with different structures, sulforaphane, 6-MSITC, allyl isothiocyanate, and phenyl isothiocyanate, affect protectively against proximal tubular epithelial cell damage caused by fatty acids. In addition to the antioxidant activity of already known effect, sulforaphane is possible that it may protect cells from mitochondrial damage in the kidney. Furthermore, it might be important that to have a sulfinyl group and the carbon chain of appropriate length in the structure of isothiocyanates for exerting an antioxidant and a mitochondrial protective effect on cells.

研究分野：分析化学

キーワード：イソチオシアネート 酸化ストレス ミトコンドリア 近位尿細管上皮細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病の進行に酸化ストレスが大きく関与することが知られており、予防法や治療法の確立が課題となっている。抗酸化物質は酸化ストレスに対する有効性から、予防や治療に対する効果が注目されている。イソチオシアネート類は、Keap1-Nrf2 経路を活性化する抗酸化物質として知られており、 $-N=C=S$  という構造を分子内に持つ。アブラナ科の野菜に含まれるスルフォラファンが代表的な物質であり、抗酸化作用以外にも抗炎症作用や抗がん作用など多くの研究例が報告されている。近年、Nrf2 の活性化は、抗酸化作用だけでなくミトコンドリア機能や肥満に対して改善効果が期待される報告がなされた。そのため、イソチオシアネート類が腎臓の近位尿細管障害の予防や治療に対して有効な物質ではないかと考え、その効果を検討することとした。

### 2. 研究の目的

本研究は、イソチオシアネート類が脂肪酸添加による近位尿細管障害に対して、保護的な作用をもたらすかどうかを検討することを目的とした。イソチオシアネート類として、スルフォラファン、6-MSITC、アリルイソチオシアネート、フェニルイソチオシアネートの4種類を用い、構造の違いが及ぼす影響について確認することも目的とした。脂肪酸による障害には、脂肪滴の蓄積やミトコンドリア機能の低下、酸化ストレスの発生など複数の要素が関与している。これらの要素に対して4種類のイソチオシアネート類の効果を確認した。

### 3. 研究の方法

はじめに、近位尿細管上皮細胞 (HK-2 細胞) を 24 時間以上前培養する。その後、イソチオシアネート類を含む培地と交換し、さらに 24 時間培養する。各イソチオシアネートの添加濃度は、事前に CCK-8 を用いて細胞毒性を評価することで決定する。その後、アラキドン酸 100  $\mu$ M を含む培地と交換し、さらに 24 時間培養したのちに、それぞれの各実験項目に用いることとした。

#### (1) 脂質の蓄積に対する効果

形質的な変化を確認するため、Oil Red O 染色を行う。Oil Red O 染色の様子を顕微鏡で撮影後、イソプロパノールで染色色素を溶出し、プレートリーダーで吸光度を測定することで染色量を定量的に評価した。細胞内に生成する脂肪滴の主成分として、トリグリセリドやエステル型のコレステロールが考えられ、市販のキットを用いて、プレートリーダーで吸光度を測定し定量した。

#### (2) 酸化ストレスに対する効果

過酸化脂質生成の指標として、脂質過酸化反応の最終産物である TBARS について市販のキット (Fluorometric TBARS Microplate Assay Kit, Oxford Biochemical Research) を用いて蛍光プレートリーダーで検出した。さらに、細胞内で抗酸化的な働きをするグルタチオンについて、市販のキット (Total Glutathione Quantification Kit, Dojindo) を用いて吸光プレートリーダーで検出した。

#### (3) ミトコンドリア機能に対する効果

ミトコンドリアが傷害されることで ATP 生成やミトコンドリア膜電位の低下が起こるため、市販のキット (ATP Assay Kit-Luminescence, JC-1 MitoMP Detection Kit, Dojindo) を用いて蛍光プレートリーダーで測定した。またミトコンドリア固有の脂質であるカルジオリピン量の変化について市販のキット (Cardiolipin Assay Kit Fluorometric, BioVision) を用いて蛍光プレートリーダーで測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 脂質の蓄積に対する効果

アラキドン酸を HK-2 細胞に 24 時間作用させると、細胞内に脂肪滴が形成され、Oil Red O で検出された。また、トリグリセリドやエステル型のコレステロールが増加した。しかしながら、4 種類のイソチオシアネート類の添加によって脂肪滴の蓄積は抑制されなかった。過去にイソチオシアネート類を含む食餌によってマウスの肥満が抑制されたことが報告されていることから<sup>1)</sup>、イソチオシアネート類の代謝物や添加物が脂質蓄積の抑制に関与している可能性も考えられ、今後さらなる検討を要する。

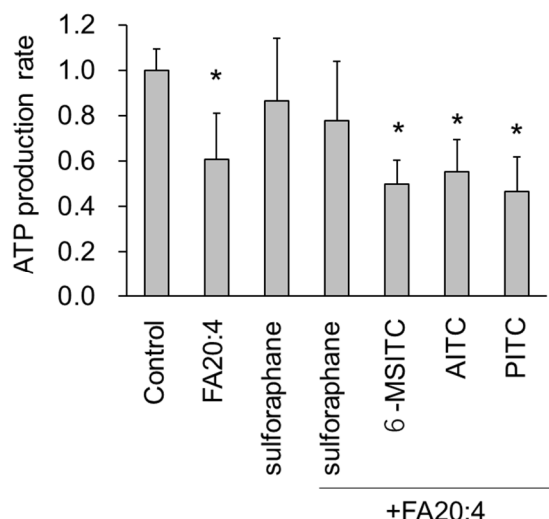
#### (2) 酸化ストレスに対する効果

アラキドン酸を HK-2 細胞に 24 時間作用させると、TBARS が増加した。スルフォラファンを作用させることで、TBARS の生成量が減少したが、その他 3 種のイソチオシアネート類では

減少しなかった。6-MSITC は減少傾向にあるものの、有意ではなかった。スルフォラファンと 6-MSITC では構造上、炭素鎖の長さだけが異なり 6-MSITC の方が炭素 2 個分だけ長い。このわずかな構造の違いが、抗酸化作用に影響を及ぼしている可能性がある。また、スルフォラファンと 6-MSITC は構造中にスルフィニル基 ( $-S(=O)-$ ) をもつ。アリルイソチオシアネートはスルフィニル基ではなくアリル基 ( $H_2C=CH-CH_2-$ ) をもち、フェニルイソチオシアネートはフェニル基 ( $C_6H_5-$ ) をもつ。したがってイソチオシアネート類の抗酸化作用にはスルフィニル基をもつことが重要であると示唆された。

### (3) ミトコンドリア機能に対する効果

アラキドン酸は HK-2 の ATP 生成量を減少させ、ミトコンドリア膜電位を低下させる。あらかじめスルフォラファンを添加しておくことで、ATP 生成量の減少が抑制された (図)。また、スルフォラファンはミトコンドリア膜電位の低下を抑制する傾向が見られたが有意ではなかった。他の 3 種類のイソチオシアネート類に関してはミトコンドリア機能の低下を抑制するような結果は得られなかった。カルジオリピンの生成量に関しては、いずれのイソチオシアネート類も変化はなかった。



**図 ATP生成割合**

アラキドン酸 (FA20:4) 添加群、スルフォラファン添加群および FA20:4 + 各イソチオシアネート添加群による ATP 生成量について、コントロールを 1 として示した (N = 6, \*P < 0.05)。各群の ATP 生成量は蛋白量で補正している。

以上の結果をまとめると、スルフォラファンが既知の性質である抗酸化作用に加えて、腎臓のミトコンドリア障害から細胞を保護する作用を持つ可能性が考えられた。しかし、その作用機序については今回の実験内容からは不明であり、さらなる検討を必要とする。また、イソチオシアネート類が細胞に対して抗酸化作用やミトコンドリア保護作用を及ぼすためには、構造中にスルフィニル基をもち、炭素鎖が適切な長さであることが重要な要素となる可能性が考えられた。

### < 引用文献 >

- (1) Tanaka Y et al. Clinical and experimental pharmacology and physiology. 43(11):1153-1156, 2016.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------