

糖尿病性腎臓病の進展抑制に対する抗炎症的治療法の探索

— プランルカストの糖尿病性腎臓病抑制効果 —

1. 研究の目的

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 アレイ解析の結果、非糖尿病ラットと比較して、糖尿病ラット腎では、システイニルロイコトリエン受容体 1 (CysLTR1)、インターロイキン(IL)-1 β 、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。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 拮抗薬プランルカストを用いて解明することを目的とする。

2. 研究の計画

(1) 実験 1: Wistar fatty ラットに対するプランルカストの DKD 抑制効果の検証

- ① 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+プランルカスト 3mg/kg/日、3) DM+対照液、4) DM+3mg/kg/日。 ※プランルカスト: ゾンデにて経口投与。
- ② 評価項目:
ア. 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。
イ. 腎組織: マッソン・トリクローム染色 (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 β 、TNF- α 、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。

(2) 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ンルカストの効果の検証

- ① HK-2 細胞をケラチノサイト SFM 培地で培養・継代し実験に用いた。
- ② 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。
- ③ プランルカストは、最終濃度 1-50 μ 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。
- ④ HG およびプランルカスト付置 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- κ B (p-NF κ B)、NF- κ B、nucleotide binding and oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3)、IL-1 β 、TNF- α 、 β -actin 発現を WB 法にて評価した。
- ⑤ 実験結果は、3 回の独立した重複実験の平均士標準偏差 (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。

3. 研究の成果

(1) 実験 1

- 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 値の上昇を認めたが、DM 群と DM+プランルカスト群の間に差を認めなかった (Fig 1A-D)。
- ② 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+プラン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+プラニルカスト群で、DM 群と比較して有意に減少した(Fig 1F)。

- ③ 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 群に比較して DM 群で有意に増加し、DM+プラニルカスト群で有意な低下を認めた(Fig 2A-D)。
- ④ CD68 免疫染色、CD68、CysLTR1、Tnf- α 、TLR2、CCL2、Il-1 β 、Lcn2 発現で評価した炎症は、Cont 群に比較して DM 群で有意に増加し、DM+プラニルカスト群で有意な低下を認めた(Fig 3A-D)。
- ⑤ p-S6RP、p62 発現は、Cont 群に比較して DM 群で有意に増加し、DM+プラニ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、クリステの消失を認めたが、DM+プラニルカスト群で改善した。

(2) 実験 2

- ① 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 μ M の附置にて、1~10 μ M では用量依存的に (Fig 5A)、10~50 μ 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。
- ② 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 μ M でのみ細胞毒性を示した。
- ③ 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 μ 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)。
- ④ HG により誘導される炎症に関しては、p-NF- κ B、NLRP3、IL-1 β 、TNF- α 発現は、プラニルカスト 10 μ M の附置にて有意に低下を認めた(Fig 8A-E)。

Fig 1

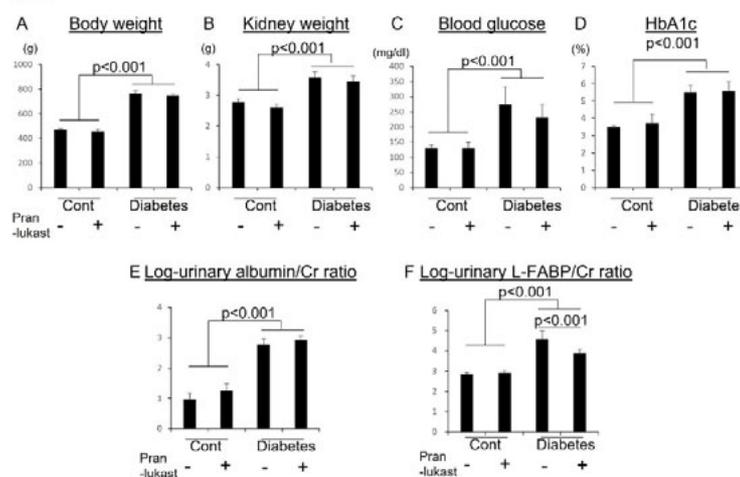


Fig 2

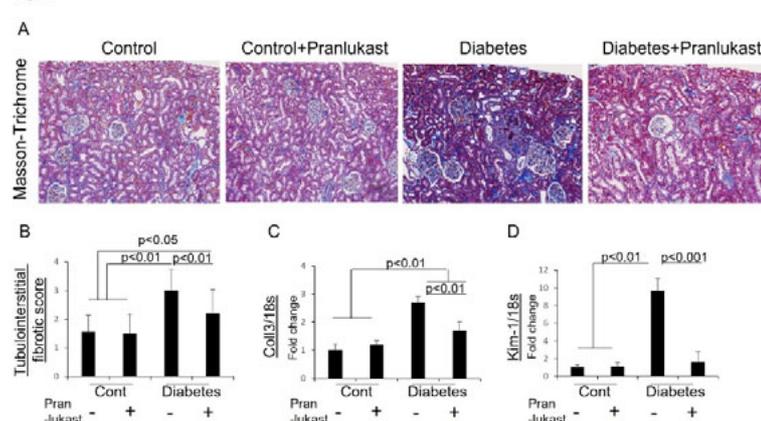


Fig 3

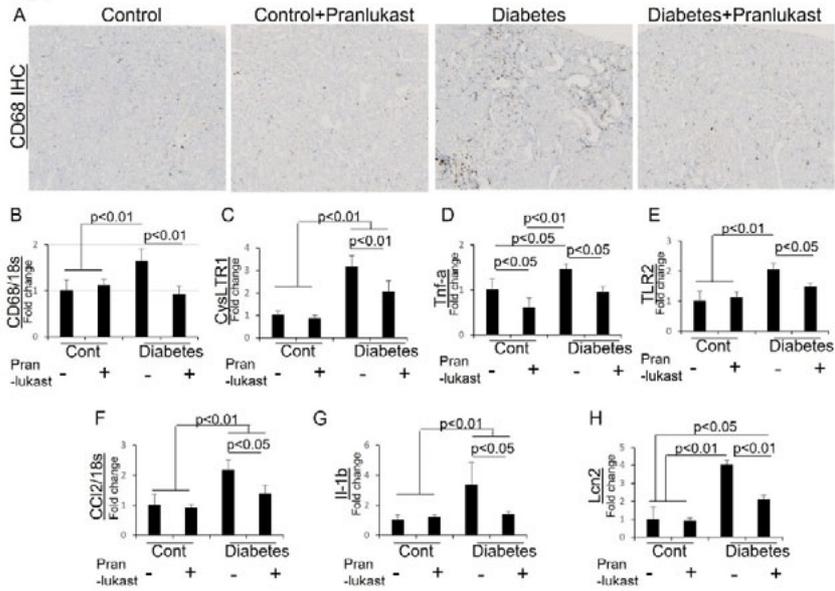


Fig 4

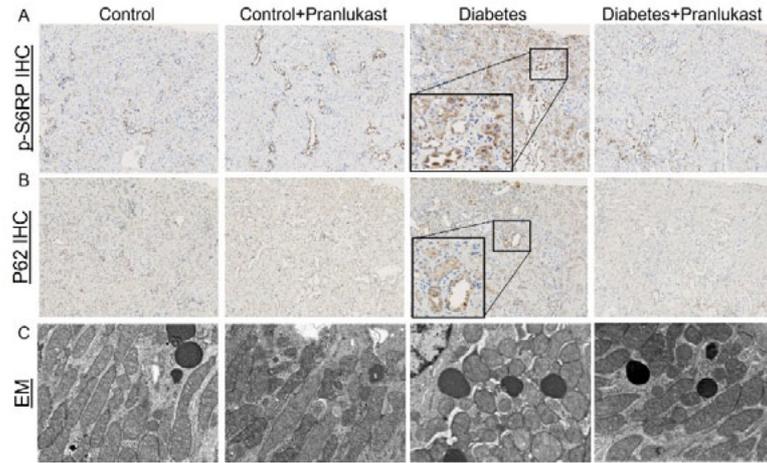


Fig 5

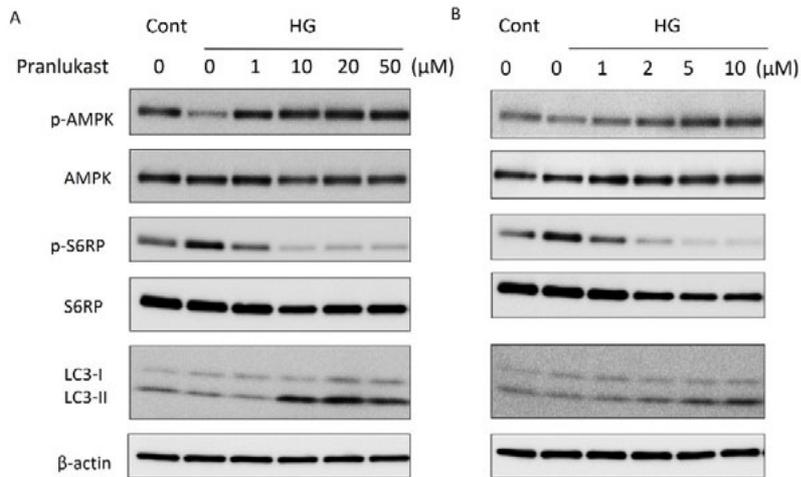


Fig 6

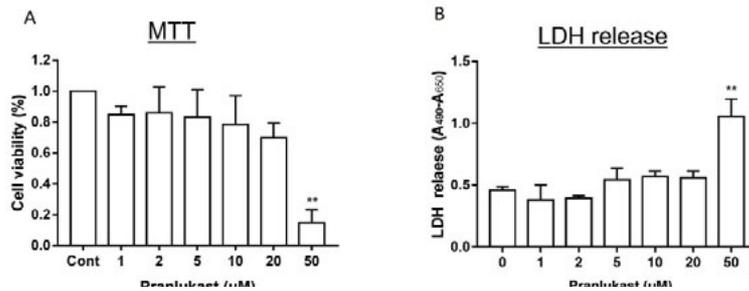


Fig 7

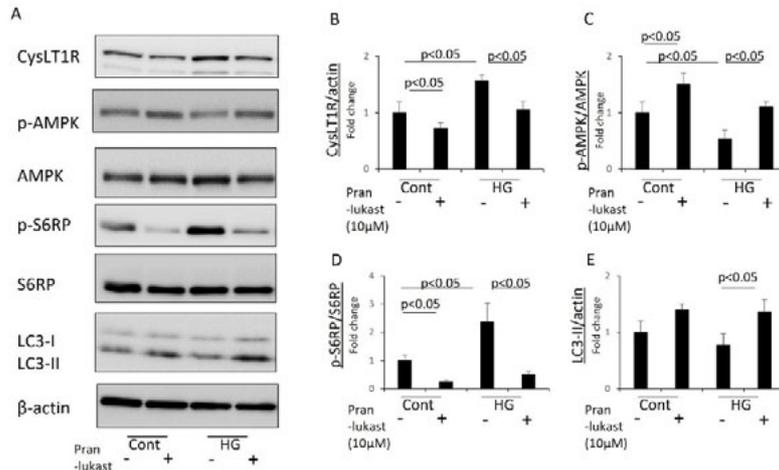
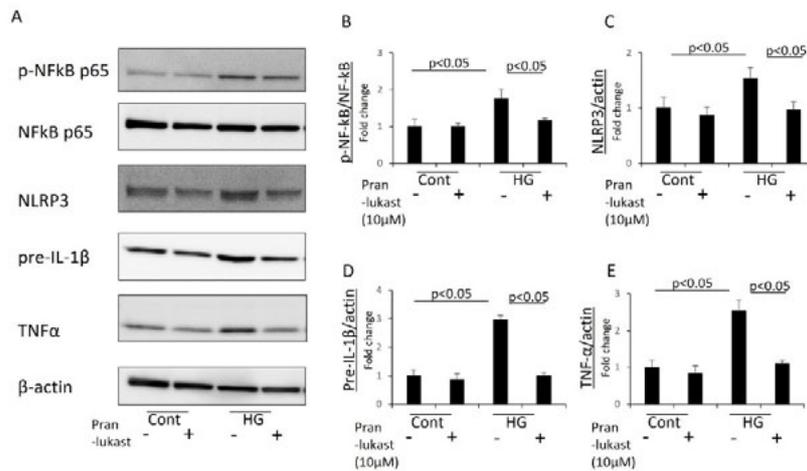


Fig 8



4. 研究の反省・考察

プラニルカストは、糖尿病状態の腎近位尿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 活性の低下)、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、今回示されたプラニル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 CysLT1R ノックアウトマウス、ならびに in vitro 実験における CysLT1R ノックダウン・システムを用いた検討により明らかにする予定である。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
ありません
- (2) 口頭発表
ありません
- (3) 出版物
ありません