

ワサビ成分による腎機能保護作用に関する研究

清水英寿

島根大学生物資源科学部

key words : 6-MSITC, 近位尿細管細胞, HO-1, AMPK, JNK

要 旨

本研究では、本ワサビ成分の一つである 6-Methylsulfanylhexyl Isothiocyanate (6-MSITC) に着目し、慢性腎不全の進行と関わりのある近位尿細管細胞に対する効果について解析を行った。結果として、6-MSITC は近位尿細管細胞の機能保護および回復効果に寄与することが示唆された。そのため 6-MSITC は、慢性腎不全の進行に対して抑制的な作用を有する可能性がある。特に透析治療では、慢性腎不全の進行促進因子であるインドキシル硫酸の除去が困難であるため、その作用に対する軽減効果も期待できる。

1 目 的

近年、我が国では慢性腎不全患者が増加している。慢性腎不全は現在、不可逆的な病変と考えられており、末期まで進行が進むと透析治療が必要となる。この透析治療は患者への負担も大きく、また医療経済的にも大きな社会問題となっている。よって、透析患者数の増加を抑えることは、患者の quality of life の低下を防ぎ、さらには国民医療費の増大に対する社会問題を解決する手段となりうる。

そこで、慢性腎不全に対する治療法の一つである食事療法において、減塩の目的として用いられる本ワサビに着目した。本研究ではその中でも、慢性腎不全に対する効果が不明である本ワサビ特有の成分 6-Methylsulfanylhexyl Isothiocyanate (6-MSITC) に焦点を当て、近位尿細管細胞の保護および回復効果を介した慢性腎

不全の進行抑制への可能性に関して検証することを目的とした。

2 方 法

2-1 細胞培養

培養ヒト近位尿細管細胞である HK-2 細胞を、10% fetal bovine serum (FBS), 10 μ g/ml insulin, 5.5 μ g/ml transferrin, 6.7 μ g/l selenium, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture Ham's F12 (DMEM/F12) 培地を用いて維持した。また、スタベーション (血清飢餓) 培地として、10 μ g/ml insulin, 5.5 μ g/ml transferrin, 6.7 μ g/l selenium, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin 含有 DMEM/F12 (FBS 未含有) を用いた。細胞の維持環境として、温度は 37 度、CO₂ 濃度は 7% に設定した。

2-2 ウェスタンブロット法

HK-2 細胞を 3.5 cm dish に細胞数が 2×10^5 cells/dish になるよう播種した。24 時間後に培地交換を行い、さらに 24 時間のスタベーションを行った。AMP-activated protein kinase (AMPK) の阻害薬である Compound C を用いる場合は、24 時間のスタベーション後、30 分間阻害薬で前処理を行い、次の 6-MSITC の処理を行った。

Heme oxygenase 1 (HO-1) と LC3B のタンパク量に関しては、6-MSITC を 5 μ M で 0~48 時間処理したサンプルを、Extracellular signal-regulated kinase (ERK),

Akt, AMPK, p38, c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun のリン酸化に関しては 6-MSITC を $5\mu\text{M}$ で 0~60 分処理したサンプルを用いて、以下の手順で解析を行った。

6-MSITC を処理したそれぞれの細胞からタンパク抽出を行った後、それぞれを SDS-PAGE に供した。その後、SDS-PAGE で分離したタンパク質を PVDF メンブレンに転写した。この PVDF メンブレンに対して、抗 HO-1 抗体、抗 LC3B 抗体、抗 phospho-ERK 抗体、抗 phospho-Akt 抗体、抗 phospho-AMPK 抗体、抗 phospho-p38 抗体、抗 phospho-JNK 抗体、抗 phospho-c-Jun 抗体の処理を行った。内部標準として、 α -tubulin のタンパク量を指標としたため、抗 α -tubulin 抗体を用いた。バンドの検出には、ImageQuant LAS 4010 densitometer を使用した。

2-3 MTS アッセイ

HK-2 細胞を 96 well プレートに細胞数が 2×10^3 cells/well になるよう播種した。24 時間後に培地交換を行い、さらに 24 時間のスタベーションを行った後、濃度依存的な変化を検証するために、6-MSITC を 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, $5.0\mu\text{M}$ の濃度で 48 時間処理した。また、AMPK の影響を調べるために AMPK の阻害薬である Compound C を用いる場合は、24 時間のスタベーション後、30 分間阻害薬で前処理を行い、続いて $2.5\mu\text{M}$ の 6-MSITC で 48 時間の処理を行った。MTS アッセイにはプロメガ社の CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kits を用いて、添付のプロトコールに従って測定を行った。

2-4 統計処理

Student *t*-tests を用いて比較を行い、危険率 5% 以下を有意差とした。

3 結果

3-1 HO-1 の発現誘導に対する 6-MSITC の効果

他の細胞種において、6-MSITC は HO-1 の発現上昇を導くとの報告があるため¹⁾、HK-2 細胞でも同様の結果が得られるのか確認を行った。

図 1A に示されているように、 $5\mu\text{M}$ で 6-MSITC を 0, 12, 24, 48 時間で処理したところ、12 時間処理後に HO-1 の発現量がピークであった。また、図 1B に示されているように、0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, $5\mu\text{M}$ で 6-MSITC を 24 時間処理したところ、 $5\mu\text{M}$ 処理で HO-1 の発現量がピークであった。以上の結果から、 $5\mu\text{M}$ で 6-MSITC を 12 時間処理したさいが、HO-1 の発現量がピークであると考えられる。

3-2 AMPK の活性化に対する 6-MSITC の効果およびその活性化と HO-1 の発現誘導との関係性

近位尿細管細胞と同様の上皮系細胞である血管内皮細胞において、HO-1 の発現誘導に AMPK の関与が報告されていることから²⁾、6-MSITC 処理が AMPK の活性化を導くのか調べた。

図 2A に示されているように、 $5\mu\text{M}$ で 6-MSITC を 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60 分間で処理したところ、処理 5 分後から時間依存的に AMPK の活性化が認められた。そこで、6-MSITC 処理依存的な AMPK の活性化が HO-1 の発現誘導に関与しているのか検証した。

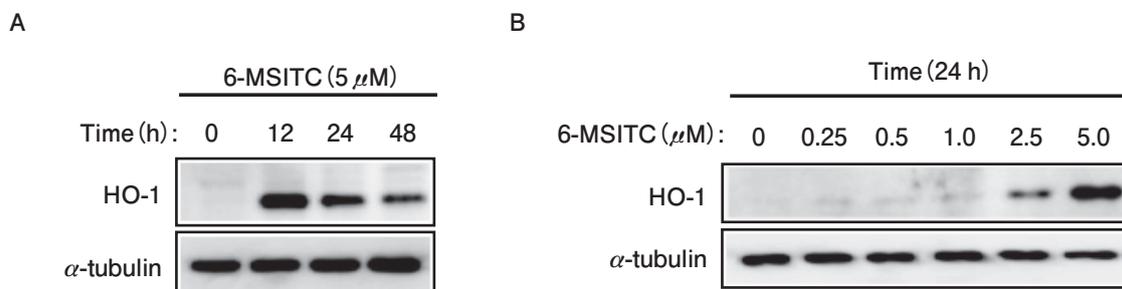


図 1 培養ヒト近位尿細管細胞 HK-2 細胞における HO-1 のタンパク質量

播種した HK-2 細胞が接着後、24 時間のスタベーションを行い、その後に以下の手順で解析を進めた。(A) HK-2 細胞を 6-MSITC ($5\mu\text{M}$) で 0, 12, 24, 48 時間処理を行った後、ウェスタンブロット法により HO-1 のタンパク質量の確認を行った。内部標準として、 α -tubulin を用いた。(B) HK-2 細胞を各濃度の 6-MSITC で 48 時間処理を行った後、ウェスタンブロット法により HO-1 のタンパク質量の確認を行った。内部標準として、 α -tubulin を用いた。

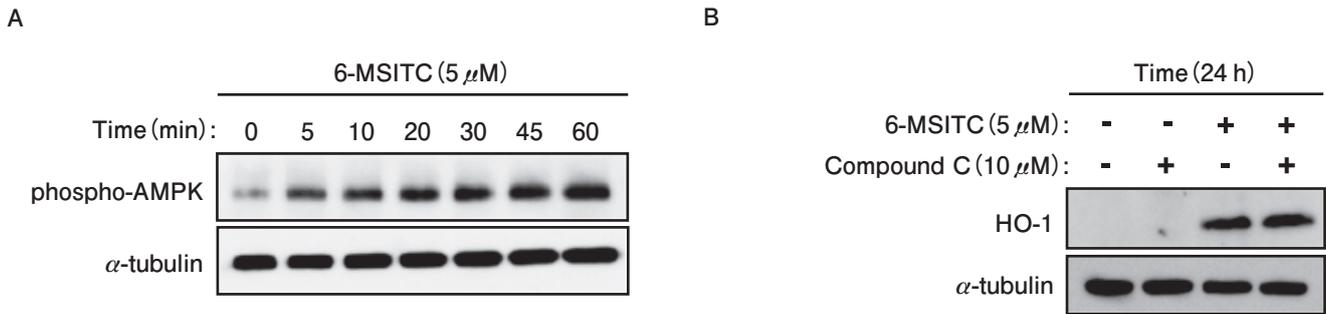


図2 培養ヒト近位尿細管細胞 HK-2 細胞における AMPK の活性化と HO-1 発現誘導との関係性

播種した HK-2 細胞が接着後、24 時間のスタベーションを行い、その後以下の手順で解析を進めた。(A) HK-2 細胞を 6-MSITC (5 μM) で 0~60 分処理した後、ウェスタンブロット法により AMPK のリン酸化を指標に、その活性化の確認を行った。内部標準として、α-tubulin を用いた。(B) HK-2 細胞に AMPK の阻害薬である Compound C (10 μM) を 30 分間前処理した後、6-MSITC (5 μM) を 24 時間処理した。その後、ウェスタンブロット法により HO-1 のタンパク質量の確認を行った。内部標準として、α-tubulin を用いた。

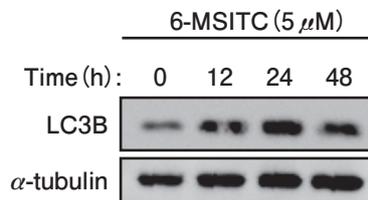


図3 培養ヒト近位尿細管細胞 HK-2 細胞における LC3B のタンパク質量

播種した HK-2 細胞が接着後、24 時間のスタベーションを行い、その後以下の手順で解析を進めた。HK-2 細胞を 6-MSITC (5 μM) で 0, 12, 24, 48 時間処理を行った後、ウェスタンブロット法により LC3B のタンパク質量の確認を行った。内部標準として、α-tubulin を用いた。

図 2B に示されているように、AMPK の阻害薬である Compound C で前処理を行っても、6-MSITC 処理によって誘導される HO-1 の発現量に変化はなかった。よって、6-MSITC 処理依存的な AMPK の活性化は HO-1 の発現誘導に関与しないことが示された。

3-3 LC3B の発現誘導に対する 6-MSITC の効果

AMPK の活性化はオートファジーを惹起するとの報告があることから³⁾、オートファジーのマーカー遺伝子である LC3B の発現量を指標に検討を行った。

図 3 に示されているように、5 μM で 6-MSITC を 0, 12, 24, 48 時間で処理したところ、12 時間と 24 時間処理後に LC3B の発現量の増大が確認された。この結果より、HK-2 細胞において 6-MSITC は、オートファジーを誘導することが示唆された。

3-4 細胞増殖に対する 6-MSITC の効果

6-MSITC 処理により AMPK が活性化されたことから、細胞増殖能に関しても検証を行った。

図 4A に示されているように、0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 μM で 6-MSITC を 48 時間処理したところ HK-2 細胞が増殖しており、特に 2.5 μM でそのピークが観察された。次に、6-MSITC 処理依存的な AMPK の活性化が細胞増殖の誘導に寄与しているのか検証した。図 4B に示されているように、AMPK の阻害薬である Compound C の前処理を行っても、6-MSITC 処理依存的な細胞増殖に影響を与えなかった。つまり、6-MSITC 処理によって引き起こされる HK-2 細胞の増殖に、AMPK は関与していないことが明らかとなった。

3-5 MAPK および Akt の活性化に対する

6-MSITC の効果

様々な細胞種において MAPK である ERK, p38, JNK と Akt の活性化は細胞増殖に関わっていることが知られている。そこで、6-MSITC 処理によって MAPK と Akt が活性化されるのか調べた。

図 5A に示されているように、6-MSITC 処理は ERK と Akt の活性化に関与していなかった。加えて、図 5B

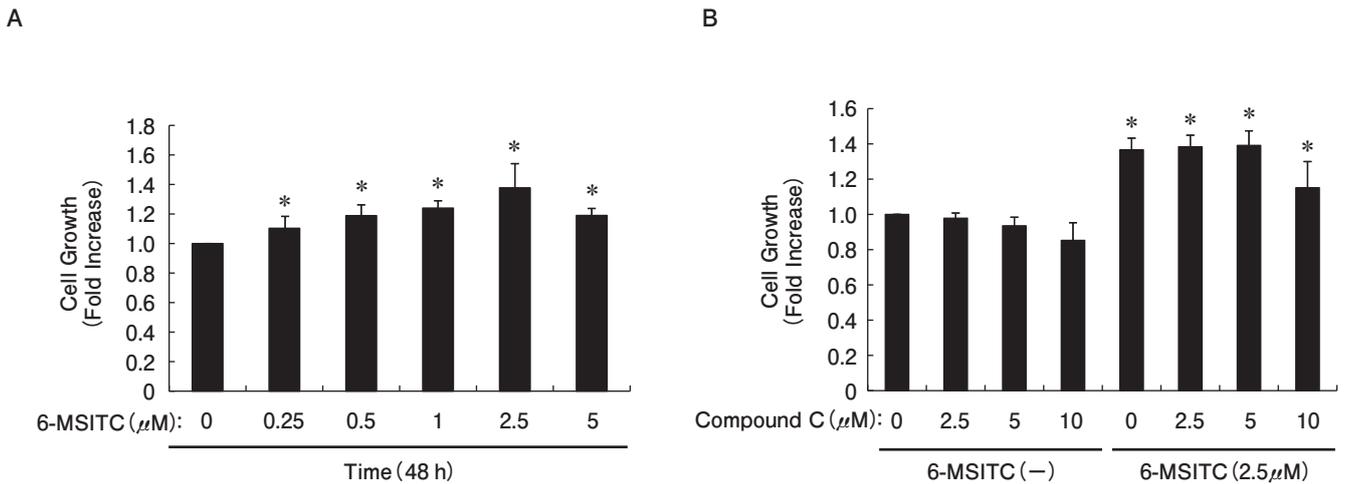


図4 培養ヒト近位尿細管細胞 HK-2 細胞における細胞増殖と AMPK の活性化との関係性
 播種した HK-2 細胞が接着後、24 時間のスタベーションを行い、その後以下の手順で解析を進めた。(A) HK-2 細胞を 6-MSITC (5 μM) で 48 時間処理した後、MTS アッセイにより増殖能の測定を行った。グラフは、平均値 \pm 標準誤差で示した (Student's *t*-test, **p* < 0.05 vs. 6-MSITC 未処理群)。(B) HK-2 細胞に AMPK の阻害薬である Compound C (10 μM) を 30 分前処理した後、6-MSITC (2.5 μM) を 48 時間処理した。その後、MTS アッセイにより増殖能の測定を行った。グラフは、平均値 \pm 標準誤差で示した (Student's *t*-test, **p* < 0.05 vs. Compound C および 6-MSITC 未処理群)。

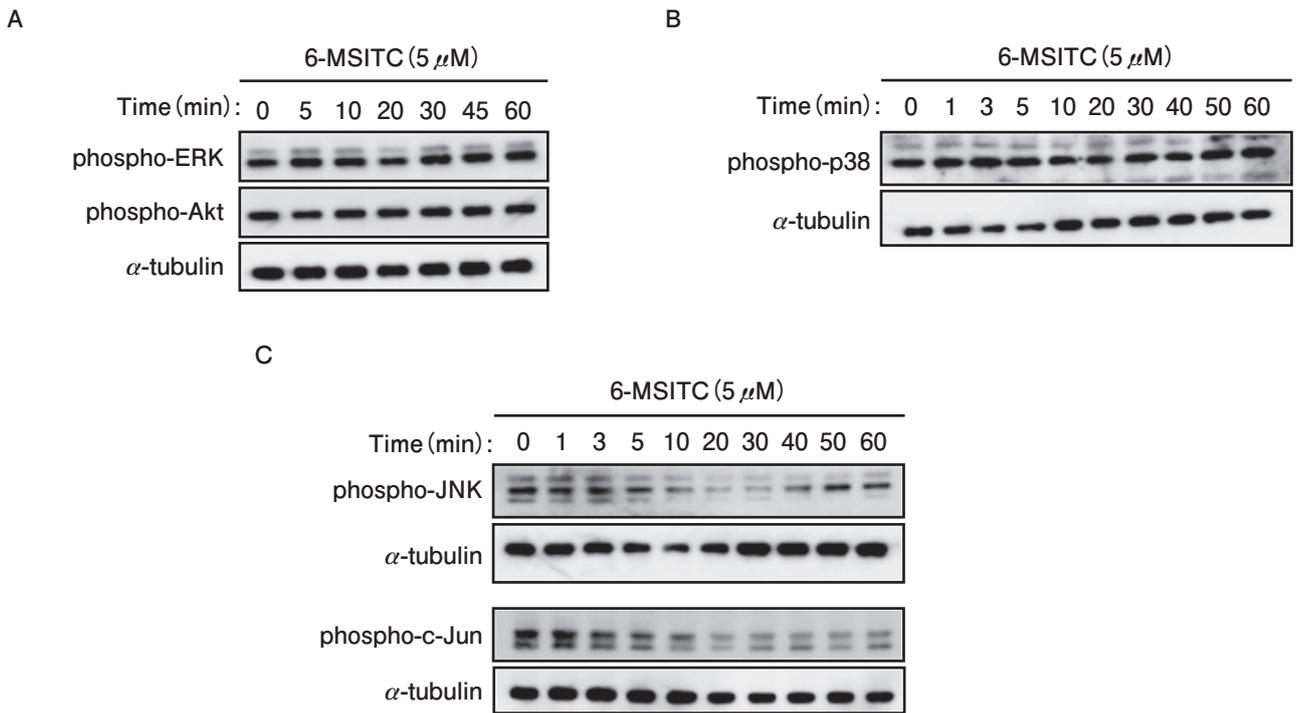


図5 培養ヒト近位尿細管細胞 HK-2 細胞における MAPK および Akt の活性化
 播種した HK-2 細胞が接着後、24 時間のスタベーションを行い、その後 6-MSITC (5 μM) で 0~60 分処理した後、以下のリン酸化抗体を用いてウェスタンブロット法にて、それぞれの分子のリン酸化レベルを測定した。また、それぞれの内部標準として、 α -tubulin を用いた。(A) ERK および Akt。(B) p38。(C) JNK および c-Jun。

に示されているように、p38 の活性化にも 6-MSITC 処理は影響を与えなかった。しかし、JNK の活性化およびその基質である c-Jun のリン酸化レベルの低下を引き起こした (図 5C)。以上の結果から、6-MSITC 処理

によって MAPK および Akt は活性化されないことから、これら分子が 6-MSITC 処理依存的な HK-2 細胞の増殖に関係がないことが確かめられた。

4 考察

本研究では、他の細胞種と同様に、HK-2細胞に対して6-MSITC処理を行うことで、HO-1の発現を誘導した。透析治療において、インドキシル硫酸の除去が困難であることから、透析患者の血中でインドキシル硫酸が蓄積されることが知られている⁴⁾。インドキシル硫酸は、近位尿細管細胞に作用することで様々な機能障害を引き起こし慢性腎不全の進行を促進させるが、この過程において活性酸素の産生が関わっていることを当研究グループでは報告している⁵⁻¹²⁾。HO-1は、ヘムをビリベルジンと一酸化炭素と鉄に分解する過程で活性酸素を除去する抗酸化遺伝子であるため、6-MSITC処理によるHO-1の発現上昇は、インドキシル硫酸による尿細管機能障害の進行を軽減する可能性が本研究結果により示された。

本研究結果より、6-MSITC処理を起因としたAMPKの活性化が新たに見出された。他の細胞種において、活性化されたAMPKがNrf2に作用することでHO-1の発現を促すとの報告もあるが²⁾、HK-2細胞においては、6-MSITC処理により発現誘導されるHO-1に対して、活性化されたAMPKはNrf2に作用はしていないと考えられる。また、AMPKの活性化はオートファジーを促すと考えられている³⁾。本研究において、6-MSITC処理でLC3Bの発現増加が認められたことから、オートファジーが引き起こされることが示唆された。この6-MSITC処理によって誘導されるオートファジーのメカニズムに、活性化されたAMPKが関与しているのか、今後の検証課題の一つである。

慢性腎不全では、近位尿細管細胞数の減少が観察されることが知られている。したがって、6-MSITCにより近位尿細管細胞が増殖されれば、慢性腎不全によって低下した腎機能が回復する可能性がある。加えて、腎機能の低下に伴い血中に蓄積されたインドキシル硫酸は、活性酸素の産生に伴うp53の発現上昇を介して近位尿細管細胞の増殖阻害を惹起することから⁵⁾、6-MSITC処理により発現増加したHO-1の作用によって、この経路の遮断が予想される。よって6-MSITCは、近位尿細管細胞の増殖を促すだけでなく、同時に、インドキシル硫酸による増殖阻害も抑制することが期待できる。

6-MSITC処理によるHK-2細胞の増殖メカニズムに

ついて、AMPK, ERK, p38, JNK, Akt, いずれかの活性化を介していると予想した。しかし、AMPK以外の分子に関しては6-MSITC処理で活性化されず、JNKに至っては逆に不活性化されていた。AMPKに関しては、その阻害薬であるCompound Cによって6-MSITC処理依存的な細胞増殖は抑制されなかった。以上から、上述とは別の分子の活性化を介して6-MSITC処理による細胞増殖が引き起こされることが明らかとなった。

近位尿細管細胞に作用したインドキシル硫酸はJNKを活性化させ、MCP-1の発現上昇を介して単球を誘引する⁸⁾。近位尿細管細胞へと誘引された単球は、細胞表面に接着した後、組織へと浸潤し、マクロファージとなる。マクロファージは炎症を惹起し病態の進行を促進させる。したがって、MCP-1の発現上昇を抑えることは、炎症反応に対する予防策となりうる。本研究により6-MSITCはJNKを不活性化したことから、インドキシル硫酸によるMCP-1の発現増加を阻害できる可能性があり、最終的には腎臓における炎症反応の抑制あるいは軽減に寄与できるかもしれない。

5 結論

食事療法における香辛料の使用は、減塩による味付けの単調さを消失させることを目的としているが、食成分からの腎保護効果に対する機能性についてはあまり着目されていない。そのため、本研究によって分子メカニズムの面から意味付けをされれば、分子栄養学的な側面から、本ワサビを用いた食事療法の有効性を提案できるようになると考えた。

本研究で着目した本ワサビ成分6-MSITCは、HO-1の発現増加による抗酸化能亢進、オートファジーの惹起、尿細管機能障害に関与するJNKの活性化とその下流のc-Junのリン酸化レベルの低下、それぞれを導くことで、慢性腎不全の進行を抑制できる可能性が明らかとなった。さらに6-MSITCは、近位尿細管細胞を増殖させることで、腎機能の回復に寄与する可能性が示唆された。よって、本ワサビに含まれる6-MSITCは、透析患者の腎機能の保護または回復に対して有用な効果を発揮すると期待できる。

加えて、上述のように本ワサビは我が国を代表する香辛料である。本ワサビの代表的な産地は、静岡県、長野県、岩手県、島根県であり、近年、この地域の過疎化により、本ワサビ農家の数は著しく減少している。

特に、島根県の沢ワサビの栽培方法は他の地域では見られない独特な方法であり、長い歴史と文化を有しているが、過疎化に伴い消滅の危機に瀕している。したがって、本研究で得られた有効性は、本ワサビに対する付加価値向上に繋がるため、高齢化社会を迎える我が国の現状を考慮に入れると、消費者拡大に伴う地域活性化に寄与できる可能性がある。さらに近年、「食の安全」が注目されていることから、日本古来の香辛料である本ワサビを提供することは、患者にとっても食に対する安心材料になりうると考えている。

平成 28 年度日本透析医会公募研究助成により得られた成果は、原著論文として『Molecular Nutrition & Food Research』に投稿予定のため、二重投稿となることを避け、本報告書ではその概要を総説的に記載した。

また、本報告書の内容に関連して、申告すべき COI 状態はない。

文 献

- 1) Mizuno K, Kume T, Muto C, et al. : Glutathione biosynthesis via activation of the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)—antioxidant-response element (ARE) pathway is essential for neuroprotective effects of sulforaphane and 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate. *J Pharmacol Sci* 2011; 115 : 320-328.
- 2) Liu XM, Peyton KJ, Shebib AR, et al. : Activation of AMPK stimulates heme oxygenase-1 gene expression and human endothelial cell survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 300 : H84-H93.
- 3) Meley D, Bauvy C, Houben-Weerts JH, et al. : AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *J Biol Chem* 2006; 281 : 34870-34879.

- 4) Niwa T, Ise M : Indoxyl sulfate, a circulating uremic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis. *J Lab Clin Med* 1994; 124 : 96-104.
- 5) Shimizu H, Bolati D, Adijiang A, et al. : Senescence and dysfunction of proximal tubular cells are associated with activated p53 expression by indoxyl sulfate. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299 : C1110-C1117.
- 6) Shimizu H, Bolati D, Adijiang A, et al. : Indoxyl sulfate down-regulates renal expression of Klotho through production of ROS and activation of nuclear factor- κ B. *Am J Nephrol* 2011; 33 : 319-324.
- 7) Shimizu H, Bolati D, Adijiang A, et al. : NF- κ B plays an important role in indoxyl sulfate-induced cellular senescence, fibrotic gene expression, and inhibition of proliferation in proximal tubular cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 301 : C1201-C1212.
- 8) Shimizu H, Bolati D, Higashiyama Y, et al. : Indoxyl sulfate upregulates renal expression of MCP-1 via production of ROS and activation of NF- κ B, p53, ERK, and JNK in proximal tubular cells. *Life Sci* 2012; 90 : 525-530.
- 9) Shimizu H, Yisireyili M, Higashiyama Y, et al. : Indoxyl sulfate upregulates renal expression of ICAM-1 via production of ROS and activation of NF- κ B and p53 in proximal tubular cells. *Life Sci* 2013; 92 : 143-148.
- 10) Shimizu H, Saito S, Higashiyama Y, et al. : CREB, NF- κ B, and NADPH oxidase coordinately upregulate indoxyl sulfate-induced angiotensinogen expression in proximal tubular cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; 304 : C685-C692.
- 11) Saito S, Shimizu H, Yisireyili M, et al. : Indoxyl sulfate-induced activation of (pro) renin receptor is involved in expression of TGF- β 1 and α -smooth muscle actin in proximal tubular cells. *Endocrinology* 2014; 155 : 1899-1907.
- 12) Saito S, Yisireyili M, Shimizu H, et al. : Indoxyl sulfate up-regulates prorenin expression via nuclear factor- κ B p65, signal transducer and activator of transcription 3, and reactive oxygen species in proximal tubular cells. *J Ren Nutr* 2015; 25 : 145-148.