

2023 年度 青森県立保健大学大学院博士論文

胎児期及び乳児期に低栄養に曝され離乳後にフルクトース負荷された
雌性仔ラットの腎臓における Nrf2 及びその標的酵素に及ぼす
乳児期クルクミン摂取の影響

分 野 名 基礎研究・実用技術領域
学 籍 番 号 1993002
氏 名 山岡 伸
指 導 教 員 名 佐藤 伸
提 出 日 2023 年 2 月 13 日

2023 年度青森県立保健大学大学院博士論文要旨

胎児期及び乳児期に低栄養に曝され離乳後にフルクトース負荷された 雌性仔ラットの腎臓における Nrf2 及びその標的酵素に及ぼす 乳児期クルクミン摂取の影響

分 野 名 基礎研究・実用技術領域

学 籍 番 号 1993002

氏 名 山岡 伸

指 導 教 員 名 佐藤 伸

I はじめに

フルクトース (Fr) の過剰摂取は、腎障害を引き起こす一因とされている。これは、Fr の過剰摂取により酸化ストレスが生じ、腎障害に至ると考えられている。一方、胎児期及び乳児期の低栄養は、成長後の児の腎障害などの発症リスクになることが報告されている。

転写因子 NF-E2-related factor 2 (Nrf2) は、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) などの抗酸化に関わる酵素の遺伝子を標的としてそれらの転写を促進する。

ポリフェノール的一种であるクルクミンは、抗酸化作用を有することが知られている。Fr を負荷したラットにクルクミンを与えると、腎臓で Nrf2 の発現量が増加するという。また、クルクミンは、活性酸素のスキャベンジャーとしても働き、酸化ストレスを抑制する。しかし、発育初期に摂取するクルクミンの生理機能に関する知見はほとんど知られていない。

そこで、本研究では、発育初期に摂取するクルクミンの生理機能を明らかにするために、乳児期に摂取するクルクミンが、胎児期及び乳児期に低栄養に曝し、離乳後に Fr 負荷された雌性仔ラットの腎臓の Nrf2 及び Nrf2 標的抗酸化酵素の発現や活性に及ぼす影響を検討した。

II 研究方法と対象

本研究は、青森県立保健大学動物実験委員会の承認を得て実施した (承認番号:19003)。妊娠した Wistar 系ラットを無作為に分け、妊娠期の母ラットに 20%カゼイン食 (NP) あるいは 8%カゼイン食 (LP) を与えた。授乳期の母ラットには、NP は引き続き 20%カゼイン食を、LP は出産日に 3 つに分け、一方には引き続き 8%カゼイン食を、他方には 0.25%クルクミン含有 8%カゼイン食 (Cur) を与えた。離乳後、雌性仔ラットに蒸留水 (W) 又は 10%Fr 液を与えた。群は NP/NP/W、LP/LP/W、LP/LP/Fr 及び LP/Cur/Fr の 4 群である。なお、クルクミンは高吸収クルクミン (セラクルミン®) として飼料に添加した。飼育期間中、体重、摂餌量及び飲水量を測定した。13 週齢時に血漿、腎臓、脂肪組織を採取した。採取した血漿を用いて血液生化学的検査を行った。酸化ストレスの指標として血漿中のマロンジアルデヒド (MDA) 濃度を測定した。腎臓ではマクロファージ (Mφ) 数、線維化面積、グルタチオン (GSH) 量及び GPx 活性を測定した。Nrf2、HO-1 及び SOD1 のタンパク質発現量をウエスタンブロット法により

解析した。

Ⅲ 結 果

1. 妊娠期の母ラットの体重及び摂餌量

母ラットの体重及び摂餌量は、NP と LP を比較しても有意な差は見られなかった。

2. 授乳期の母ラット体重、摂餌量及び乳児期の雌性仔ラットの体重

LP/LP と LP/Cur の母ラットの 20 日以降の体重及び 10~12 日以降の摂餌量は、NP/NP と比較してそれぞれ有意に減少した。LP/LP と LP/Cur の雌性仔ラットの体重は、NP/NP と比較すると 4 日以降、それぞれ有意に減少した。

3. 離乳後の雌性仔ラット体重、摂餌量、飲水量及び摂取エネルギーに及ぼす影響

LP/LP/W、LP/LP/Fr 及び LP/Cur/Fr の体重は、NP/NP/W と比較してそれぞれ有意に減少した。LP/LP/Fr と LP/Cur/Fr の 7 週齢以降の摂餌量及び 12 週齢以降の飲水量は減少した。また、摂取エネルギーは各群の間に有意な差は認められなかった。

4. 腎臓重量及び脂肪組織重量に及ぼす影響

LP/Cur/Fr の腎臓相対重量は、LP/LP/Fr と比べて有意に減少した。子宮周囲相対脂肪重量及び腎臓周囲相対脂肪重量は、LP/LP/Fr と LP/Cur/Fr を比較しても有意な差は見られなかった。

5. 血液生化学検査

LP/Cur/Fr のグルコース (Glc) 並びにトリグリセリド (Tg) 濃度は、LP/LP/Fr と比較すると有意に減少した。このことから、クルクミンは Fr を負荷した仔ラットの血漿中 Glc 及び Tg の増加を抑制することが示された。また、LP/LP/Fr 及び LP/Cur/Fr の BUN 濃度は、LP/LP/W と比較して減少した。

6. 腎臓の Mφ 数及び線維化面積率に及ぼす影響

LP/LP/Fr の Mφ 数及び線維化面積率は、LP/LP/W と比較して増加傾向にあった。これに対して、LP/Cur/Fr の Mφ 数及び線維化面積率は LP/LP/Fr と比較すると有意に減少した。これらのことから、クルクミンは Fr の負荷による腎障害の軽減に関与することが示された。

7. 血漿中 MDA 濃度、腎臓中 GSH 量及び GPx 活性に及ぼす影響

LP/Cur/Fr の MDA 濃度は、LP/LP/Fr と比較すると有意に減少した。LP/Cur/Fr の GSH 量及び GPx 活性は、LP/LP/Fr と比較するとそれぞれ有意に増加した。これらの結果は乳児期に摂取するクルクミンは腎臓の GSH 量を増加することと GPx 活性を高めることを示していた。

8. 腎臓の Nrf2、HO-1 及び SOD1 のタンパク質発現量に及ぼす影響

LP/Cur/Fr の Nrf2 の発現量は、LP/LP/Fr と比較すると有意に増加した。LP/Cur/Fr の HO-1 及び SOD1 の発現量は、LP/LP/Fr と比較するとそれぞれ有意に増加した。これらの結果から、乳児期に摂取するクルクミンは、Nrf2 の発現量を増加し、さらに Nrf2 の標的抗酸化酵素である HO-1 及び SOD1 の発現量を増加することが推察された。

Ⅳ 考 察

以上の結果から、乳児期に摂取するクルクミンは、離乳後に Fr を負荷された雌性仔ラットの腎臓における Nrf2 発現量の増加を介して、Nrf2 の標的である HO-1 及び SOD1 の発現量を増加し、また GPx 活性を高めて、腎臓の酸化ストレスを抑制することが示唆された。

Effects of curcumin intake during infancy on Nrf2 and Nrf2-targeted enzymes in the kidneys of fructose-loaded female rat offspring exposed to maternal protein restriction

Shin Yamaoka (Student ID No. 1993002)

Academic Supervisor: Professor Shin Sato

Department of Public Health Social Welfare Policy Area of Basic Research and Practical
Technique Graduate School of Health Sciences

[Objective]

Excessive intake of fructose induces oxidative stress in the kidney. Moreover, maternal malnutrition during pregnancy and lactation increases oxidative stress, leading to renal diseases later in life. NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a master regulator of antioxidants, regulates transcription as a target antioxidant enzyme, including heme oxygenase-1 (HO-1), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx). Curcumin, a polyphenol, has antioxidant properties. Furthermore, curcumin intake upregulates Nrf2 in rat kidneys. Curcumin acts as a free radical scavenger and suppresses oxidative stress. However, the effects of curcumin intake in early life are largely unknown. The aim of this study was to examine whether curcumin intake regulates Nrf2 and Nrf2-targeted antioxidant enzymes in the kidneys of fructose-loaded female rat offspring exposed to maternal protein restriction.

[Method]

This study was conducted with the approval of the Animal Research Committee of Aomori University of Health and Welfare (permission number:19003). Pregnant Wistar rats received diets containing 20% (NP) or 8% (LP) casein, in addition to 0% or 0.25% curcumin (Cur)-containing LP diets (LP/LP and LP/Cur) during lactation. At weaning, the female offspring were fed distilled water (W) or 10% fructose solution (Fr) and accordingly divided into four groups: NP/NP/W, LP/LP/W, LP/LP/Fr, and LP/Cur/Fr. Curcumin was administered as Theracurmin®. Body weights and food and water intake were measured during breeding. At 13 weeks, adipose tissue and kidney weights, biochemical parameters, and malondialdehyde (MDA) levels in the plasma, macrophages number, fibrotic area, glutathione (GSH) levels, GPx activity, protein expression levels of Nrf2, HO-1, and SOD1 in the kidneys were examined.

[Results]

1. Maternal body weights and food intake during pregnancy

There was no significant difference in the body weights and food intake of the NP and LP groups.

2. Maternal body weights and food intake during lactation, and pups body weights during

infancy

The body weights of maternal in the LP/LP and LP/Cur groups were significantly lower than those in the NP/NP/W group at day 20, 21. The food intake of maternal in the LP/LP and LP/Cur groups were significantly lower than those in the NP/NP group at after day 10-12. During infancy, the body weights pups in the LP/LP and LP/Cur groups were significantly lower than those in the NP/NP group.

3. Body weights, food, water, and energy intake after weaning

During after weaning, the body weights in the LP/LP/W, LP/LP/Fr, and LP/Cur/Fr groups were significantly lower than those in the NP/NP/W group. The food intake in the LP/LP/Fr and LP/Cur/Fr groups was significantly higher than that in the NP/NP/W and LP/LP/W at week 7 and 12. The water intake in the LP/LP/Fr and LP/Cur/Fr groups was significantly higher than that in the NP/NP/W and LP/LP/W at week 12. There was no significant difference in the energy intake among the four groups during lactation.

4. Kidney weights and adipose tissue weights

The relative kidney weight of the LP/Cur/Fr group was significantly lower than that of the LP/LP/Fr group. There was no significant difference in the relative adipose tissue weights and kidney weights of the LP/LP/Fr and LP/Cur/Fr groups.

5. Biochemical parameters in the plasma

The glucose (Glc) and triglyceride (Tg) levels in the LP/Cur/Fr group were significantly lower than those in the LP/LP/Fr group. The plasma BUN levels in the LP/LP/Fr and LP/Cur/Fr groups decreased compared to the LP/LP/W group.

6. Macrophages number and fibrotic area in the kidneys

The macrophages number and fibrotic area in the kidneys of the LP/Cur/Fr group were significantly lower than those of the LP/LP/Fr group.

7. MDA levels in the plasma and GSH levels, GPx activity in the kidneys

The MDA levels in the plasma and GSH levels, GPx activity in the kidneys of the LP/Cur/Fr group were significantly lower than those of the LP/LP/Fr group.

8. Nrf2, HO-1, and SOD protein expression in the kidneys

The expression levels of Nrf2 in the LP/Cur/Fr group were significantly higher than those in the LP/LP/Fr group. The expression levels of HO-1 and SOD1 in the LP/Cur/Fr group were significantly higher than those in the LP/LP/Fr group.

[Conclusion]

This study demonstrated that a diet containing curcumin during infancy upregulated Nrf2 expression, as well as the expression of HO-1 and SOD1, and increased GPx activity, suggesting that curcumin intake during infancy may suppress oxidative stress by upregulating Nrf2 expression in the kidneys of fructose-loaded female rat offspring.

目次
 表目次
 図目次

第 1 章 序論 1

第 2 章 研究方法と対象

1. 実験動物及び実験デザイン 7
 2. 血液生化学検査 7
 3. 免疫染色 8
 4. シリウスレッド染色 8
 5. CD68 抗体陽性マクロファージ数及び線維化面積率の計測方法 9
 6. 血漿中マロンジアルデヒド濃度の測定 9
 7. グルタチオン量の測定 9
 8. グルタチオンペルオキシダーゼ活性の測定 9
 9. ウェスタンブロット法 10
 1) ホモジネイト液の調製 10
 2) SDS-PAGE 電気泳動法 10
 3) ウェスタンブロッティング 11
 10. 統計処理 11

第 3 章 結果

1. 妊娠期の母ラットの体重及び摂餌量 15
 2. 授乳期の母ラット体重、摂餌量及び乳児期の雌性仔ラットの体重 15
 3. 離乳後の仔ラット体重、摂餌量、飲水量及び摂取エネルギーに及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響 15
 4. 血漿中グルコース濃度及びトリグリセリド濃度に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響 15
 5. 腎臓重量及び脂肪組織重量に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響 15
 6. 血漿中の尿素窒素濃度及びクレアチニン濃度に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響 16
 7. 腎臓のマクロファージ数及び線維化に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響 16
 8. 血漿中マロンジアルデヒド濃度に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響 16
 9. 腎臓中のグルタチオン量及びグルタチオンペルオキシダーゼ活性に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響 16
 10. 腎臓の Nrf2 のタンパク質発現量に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響 17
 11. 腎臓のヘムオキシゲナーゼ-1 及びスーパーオキシドジスムターゼ 1 のタンパク質発現量に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響 17

第 4 章 考察 29

第 5 章 結論 33

謝辭 35

参考文献 36

表目次

表 1: 飼料組成 13

表 2: 脂肪組織重量に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響 23

図目次

図 1: フルクトースなどの糖摂取量増加と肥満との関係について	4
図 2: 細胞内でのフルクトースの代謝経路	5
図 3: Nrf2 による Nrf2 標的抗酸化酵素の制御	6
図 4: 動物実験のデザイン	14
図 5: 妊娠期の母ラットの体重(A)及び摂餌量(B)	18
図 6: 授乳期の母ラットの体重(A)及び摂餌量(B)	18
図 7: 乳児期の雌性仔ラットの体重に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響	19
図 8: 離乳後の雌性仔ラットの体重に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響	20
図 9: 離乳後の雌性仔ラットの摂餌量(A)及び飲水量(B)に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響	21
図 10: 離乳後の雌性仔ラットの摂取エネルギーに及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響	21
図 11: 血漿中のグルコース:Glc(A)及びトリグリセリド:Tg(B)濃度に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響	22
図 12: 腎臓絶対重量(A)及び腎臓相対重量(B)に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響	23
図 13: 血漿中の尿素窒素:BUN(A)及びクレアチニン:Cr(B)濃度に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響	24
図 14: 腎臓のマクロファージの浸潤に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響	25
図 15: 腎臓の線維化に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響	25
図 16: 血漿中のマロンジアルデヒド:MDA 濃度に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響	26
図 17: 腎臓中のグルタチオン:GSH 量(A)及びグルタチオンペルオキシダーゼ:GPx 活性(B)に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響	27
図 18: 腎臓の NF-E2-related factor 2:Nrf2 のタンパク質発現量に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響	28
図 19: 腎臓のヘムオキシゲナーゼ-1:HO-1(A)、スーパーオキシドジスムターゼ 1:SOD1(B)のタンパク質発現量に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響	28
図 20: 胎児期及び乳児期の低栄養に曝され、離乳後にフルクトース負荷された雌性仔ラットの腎臓の Nrf2 及びその標的抗酸化酵素の発現や活性に及ぼすクルクミンの影響に関するまとめ	34

第1章 序論

日常的なフルクトースの過剰摂取は、脂質異常、インスリン抵抗性、腎障害などの生活習慣病を引き起こす^{1,2)}。また、フルクトースの過剰摂取に起因する高尿酸血症により腎機能は低下することが知られている³⁾。一方、1日あたりの飲料水中の糖の摂取量が25gを超えると肥満のリスクは高まる(図1)⁴⁾。これらのため、世界保健機関(WHO)は肥満や糖尿病などの生活習慣病を予防及び改善するためにも2015年に総エネルギー中のフルクトースを含む遊離糖類の摂取量を10%未満にするよう勧告を行った⁵⁾。

フルクトースはグルコーストランスポーター5を介して小腸の腸管上皮細胞から主に受動的に吸収され、大部分、肝臓で代謝される^{6,7)}。フルクトースはその代謝の第一酵素であるフルクトキナーゼによって代謝され、その後の代謝産物であるフルクトース1,6-ビスリン酸として解糖系に入り、ジヒドロキシアセトンリン酸、ピルビン酸などを経てクエン酸回路、電子伝達系に入り、アデノシン三リン酸(ATP)が産生される^{7,8)}。一方、クエン酸回路の中間体であるクエン酸からアセチル-CoAやマロニル-CoAを経てトリグリセリド(Tg)にもなる経路もある(図2)^{7~10)}。一方、グルコース(Glc)は律速酵素であるホスホフルクトキナーゼ(PFK)によって制御されるが¹¹⁾、フルクトースの代謝はGlcの代謝とは異なり、PFKに制御されない。それゆえ、フルクトースは用量依存的に代謝され、特に、過剰摂取の場合はクエン酸回路のクエン酸が増加し、アセチル-CoAからマロニル-CoAとなり、その後様々な反応を経てTgとなり、最終的に脂肪組織に蓄積し、肥満をまねく^{2,7,8)}。

腎障害は酸化ストレスや炎症の亢進などにより増悪するという^{12~14)}。たとえば、フルクトースの過剰摂取は、ATPの枯渇をもたらす⁷⁾。それゆえ、肝臓ではATP量を回復させるために、AMPデアミナーゼが活性化し、さらにキサンチンオキシダーゼが活性化するので、尿酸が過剰産生される⁷⁾。腎臓では尿酸によりスーパーオキシドを産生するNADPHオキシダーゼの活性化やミトコンドリアでのスーパーオキシドなどの活性酸素種(Reactive oxygen species:ROS)の増加が生じ、酸化ストレスは亢進すると考えられている^{15,16)}。また、フルクトースの摂取量が1日あたり50gを超えた慢性腎臓病患者は尿酸の値を増加することが知られている³⁾。さらに、ラットは、フルクトース負荷させると腎臓の酸化ストレスが亢進する¹⁷⁾。

一般に、酸化ストレスが生じ、マクロファージの浸潤などが亢進すると、線維化を引き起こす^{18,19)}。たとえば、腎臓ではNADPHオキシダーゼが活性化すると、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β)の発現量が増加し、これにより線維化が亢進する^{20,21)}。腎臓の糸球体や間質において線維化が増悪することで、徐々に腎機能は低下する^{18,21,22)}。上述したように、フルクトースの過剰摂取は、腎臓において酸化ストレスや炎症を招く²²⁾。それゆえ、フルクトースの過剰摂取によって生じる腎障害の予防や改善には、摂取量を抑制することは、最も重要ではあるが、フルクトースの過剰摂取によって生じる酸化ストレスの抑制も重要となると考えられる。

近年、胎児期及び乳児期に低栄養に曝されると、成人後に腎障害などの生活習慣病の発症が高率に起こることがわかってきた²³⁾。この現象を説明する説として、ドーハド(Developmental Origins of Health and Disease:DOHaD)説がある²⁴⁾。すなわち、胎児期及び乳児期において低栄養によりエピジェネティクス(DNAの配列変化によらない遺伝子発現の制御・伝達の変化)が生じ、成人後においてもその変化が持続し、生活習慣病の発症リス

クが高率となるという説である^{23,25)}。たとえば、中国において1959~1961年の飢餓時に生まれた児の尿タンパクを30年後に調査すると、尿タンパクの異常値を持った者が増加していたという。この調査結果から、胎児期や乳児期に低栄養に曝されると、成人になってからの腎機能は低下する可能性が推察されている²⁶⁾。また、ノルウェーで行われた研究では、低体重で生まれた児は糸球体の数が減少し、末期腎不全に罹患しやすくなるという²⁷⁾。これらの報告は、ヒトにおいて胎児期や乳児期の低栄養は、成人後の腎機能に影響を及ぼすことを示唆している。

NF-E2-related factor 2(Nrf2)は、酸化ストレスを制御する転写因子であり²⁸⁾、抗酸化に関係する酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)並びにグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)を標的遺伝子としてそれらの遺伝子発現を促進させる^{29,30)}。非酸化ストレス下では、Nrf2はKelch-like ECH-associated protein 1(Keap1)と結合して細胞質に存在している。ひとたび、酸化ストレス下に置かれるとNrf2はKeap1を解離し、核へ移行し、HO-1、SOD及びGPxなどの転写を促進する(図3)^{31,32)}。また、Nrf2は、グルタチオン(GSH)の代謝に関連する酵素の転写を促進し、GSH量を増加させる¹³⁾。

HO-1は、ヘムを分解し、一酸化炭素、ビリベルジンなどを産生する。一酸化炭素、ビリベルジンは、抗酸化や抗炎症に関わっていることが知られている^{33,34)}。例えば、一酸化炭素は炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子- α (TNF- α)及びインターロイキン(IL)-1 β の発現を抑制したり、抗炎症性サイトカインであるIL-10の発現を増加させたりして、炎症を制御すると考えられている³⁵⁾。一酸化炭素は、マクロファージの浸潤に関する単球走化性タンパク質-1(MCP-1)の発現を抑制し、マクロファージの組織への浸潤を減少させる³⁶⁾。また、ビリベルジンは、ビリベルジン還元酵素によって変換されるビリベルジンとともにNADPHオキシダーゼを阻害し、ROSの産生を抑制する^{34,37,38)}。

SODは、スーパーオキシドを不均化して酸素と過酸化水素へ変換する酵素である³⁹⁾。多量に産生されたスーパーオキシドを除去することで酸化ストレスの抑制に寄与する。SODは、SOD1とSOD2に大別される。SOD1は銅イオンおよび亜鉛イオンを結合した酵素で主に細胞内に存在している⁴⁰⁾。SOD2はマンガンイオンを結合したものでミトコンドリアに多く局在している⁴⁰⁾。また、Nrf2の活性化は、GSH量の増加及びGSHを介して過酸化水素を処理するGPxの発現を亢進させる^{13,32)}。これらの働きは、酸化ストレスの抑制に寄与している。フルクトースを過剰摂取するとNrf2は抑制され、Nrf2の標的遺伝子となるHO-1やSODの発現が抑制され、酸化ストレスが亢進するという⁴¹⁾。たとえば、フルクトース負荷したマウスの腎臓ではNrf2やHO-1のmRNA量の減少やSOD活性の抑制が認められ、酸化ストレスは亢進したという報告がある⁴¹⁾。

ポリフェノールの一種であるクルクミンは、*Curcuma. longa*の根茎から1815年にフォーゲルとペレティエによって分離され⁴²⁾、1842年にフォーゲルJrにより精製された⁴³⁾。クルクミンは抗酸化及び抗炎症作用を有し^{44~46)}、肥満、糖尿病、脂質異常症、非アルコール性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease:NAFLD)、腎障害などの生活習慣病の症状の改善することが報告されている^{13,47~49)}。クルクミンの抗酸化作用の機序の一つとして、次のことが知られている。細胞内においてクルクミンはKeap1をアルキル化する。これによりKeap1から解離したNrf2は核へ移行し、標的となる抗酸化酵素であるHO-1、SODなどの遺伝子の発現を亢進し、酸化ストレスを抑制する^{13,50~52)}。事実、腎障害モデルであるラット

にクルクミンを投与すると、腎臓において Nrf2 量及び SOD 活性の増加が認められた¹³⁾。加えて、膜性腎症モデルであるラットにクルクミン投与を投与すると Nrf2 及び HO-1 の発現量が増加したという⁵⁰⁾。また、クルクミンは、ROS をスカベンジャーとしての働きもある⁵³⁾。フルクトースを負荷したラットにクルクミンを投与すると腎臓及び血漿中で酸化ストレスの指標であるマロンジアルデヒド(MDA)を減少する⁵⁴⁾。MDA は、ROS により多価不飽和脂肪酸が非酵素的に酸化させて生じたものであり、MDA の減少は酸化ストレスの抑制を示している⁵⁵⁾。さらに、クルクミンは、エピジェネティクス修飾やエピジェネティクスに関与する酵素に作用することが知られている⁵⁶⁾。

DNA のメチル化は、エピジェネティクス修飾の 1 つであり、主にシトシンとグアニンの配列(CpG)が集中して存在する領域(CpG アイランド)のほとんどのシトシンにおいて生じるといふ⁵⁷⁾。DNA のメチル化は転写因子の DNA への結合を阻害する⁵⁷⁾。また、DNA へのメチル基の転移を触媒する酵素があり、DNA メチルトランスフェラーゼ(DNMT)ファミリーとして知られている。これには、DNMT1、DNMT3a、DNMT3b が含まれる⁵⁸⁾。加えて、メチル化した DNA を特異的に認識するタンパク質(メチル化 CpG 結合ドメインタンパク質:methyl-CpG-binding domain protein)によって遺伝子の発現が抑制されるという⁵⁹⁾。

実験的に DNMT の発現を阻害すると、Nrf2 のメチル化が低下するという⁶⁰⁾。たとえば、マウス前立腺細胞にクルクミンを添加すると、クルクミンは DNMT の活性を抑制し、Nrf2 の遺伝子のプロモーター領域の低メチルを促し、Nrf2 の発現を誘導するという報告がある⁶¹⁾。しかしながら、発育初期に摂取するクルクミンが成長後の児の Nrf2 発現量、さらに Nrf2 の標的とする抗酸化酵素の発現や活性に及ぼす影響に関する報告はほとんどない。

そこで、本研究では、発育初期に摂取するクルクミンの生理機能を明らかにするために、乳児期に摂取するクルクミンが、胎児期及び乳児期に低栄養に曝され、離乳後にフルクトース負荷された雌性仔ラットの腎臓の Nrf2 及び Nrf2 標的抗酸化酵素の発現や活性に及ぼす影響を検討した。

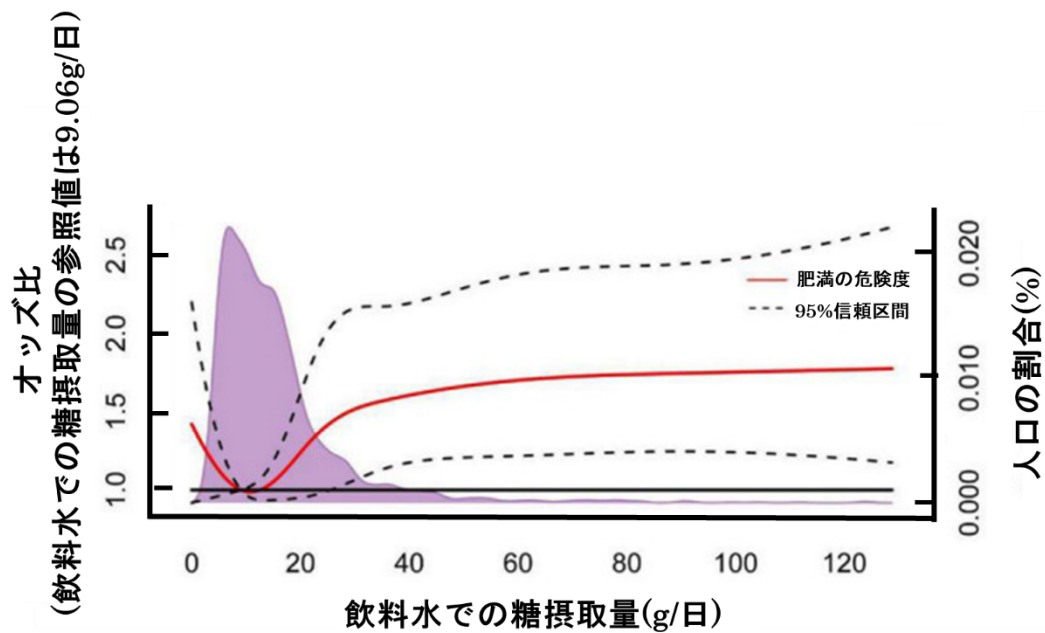


図1 フルクトースなどの糖摂取量増加と肥満との関係について

紫色で示された領域は飲料水での1日あたりの糖摂取量と人口の割合を示したもの。赤線は肥満の危険度を示したもの。1日あたりの飲料水中の糖の摂取量9.06gを基準とすると、1日あたりの飲料水中の糖の摂取量は25gを超えると肥満のリスクが高まることが示された。

Yu L, et al. Front Nutr. 9. 885704. 2022. より改変⁴⁾

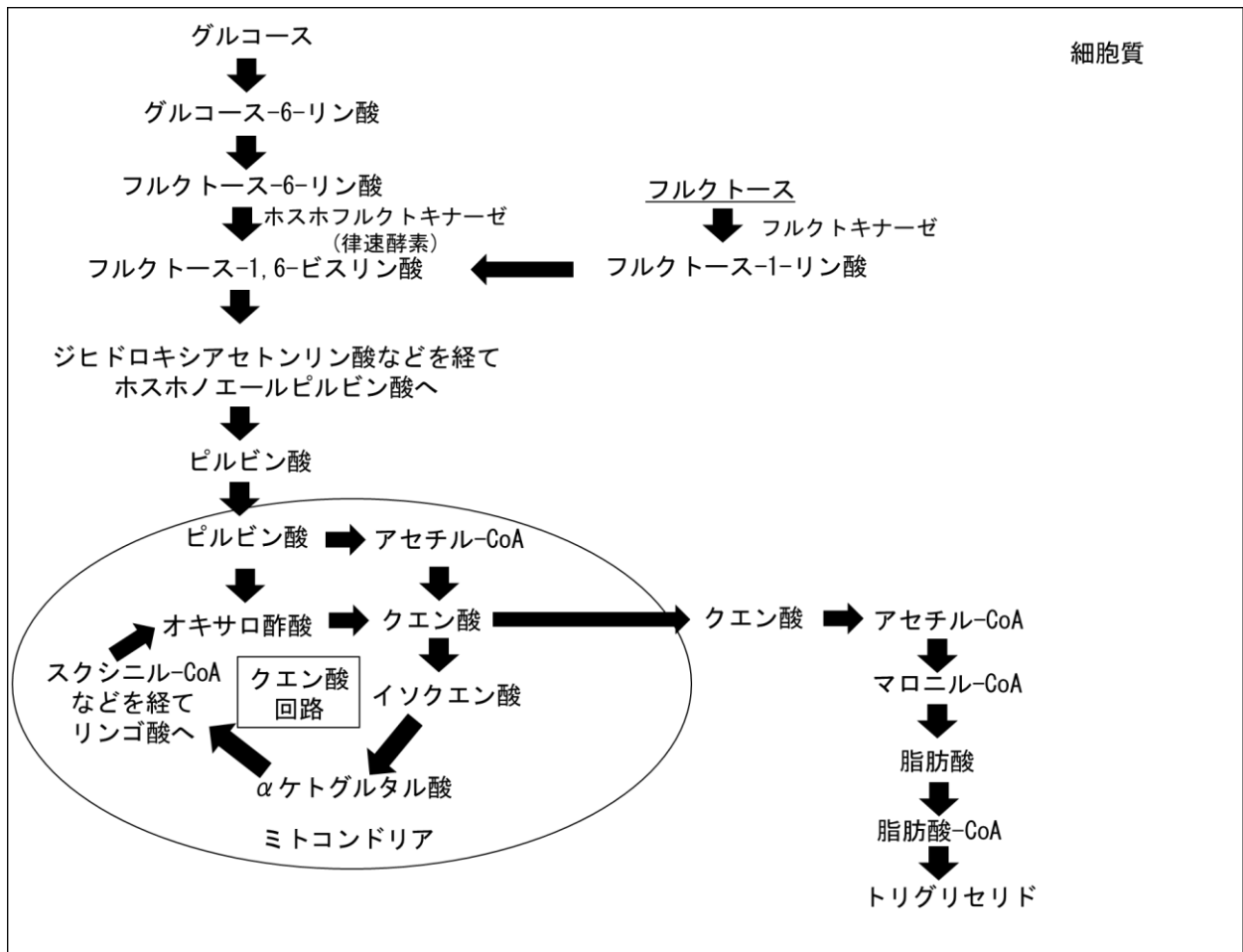


図 2 細胞内でのフルクトースの代謝経路

フルクトースの代謝はグルコースとは異なり、律速酵素であるホスホフルクトキナーゼの影響を受けず、用量依存的に代謝される。フルクトースの過剰摂取は、クエン酸回路の中間体であるクエン酸を経て、トリグリセリド生成の経路に進む。脂肪組織へのトリグリセリドの過剰蓄積は、肥満を招く。

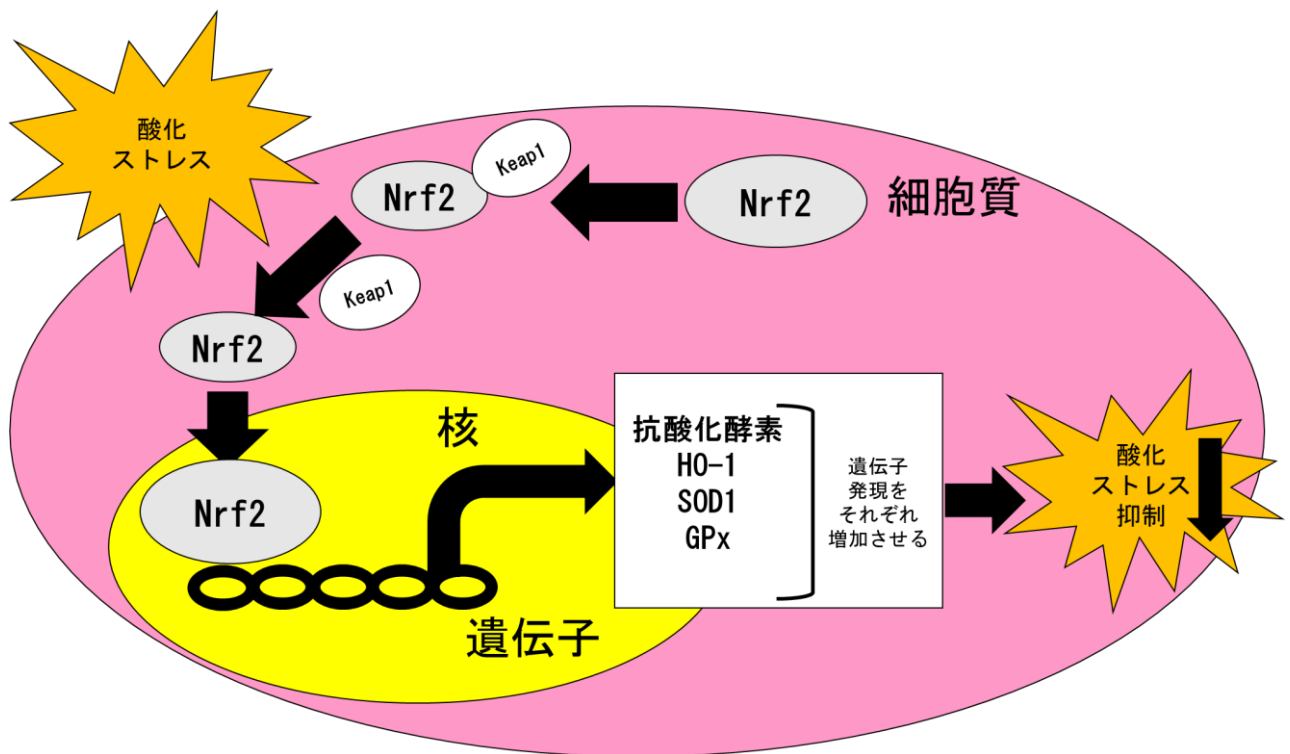


図3 Nrf2によるNrf2標的抗酸化酵素の制御

Nrf2は、フルクトース負荷などに起因する酸化ストレスに曝されると、Keap1と解離し、活性化され、核に移行し、HO-1、SOD1、GPxなどの抗酸化酵素の遺伝子の転写を促進し、酸化ストレスを抑制する。

略称：NF-E2-related factor 2(Nrf2)、Kelch-like ECH-associated protein 1(Keap1)、ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)、スーパーオキシドジスムターゼ 1(SOD1)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)

第2章 研究対象と方法

1. 実験動物及び実験デザイン

本研究の動物実験は、青森県立保健大学動物実験委員会の承認を得て「青森県立保健大学動物実験規程」に従って実施した(承認番号:19003)。

実験動物は Wistar 系ラットを使用した。10 週齢の雌性ラット及び 9 週齢の雄性ラットを日本クレア株式会社(東京、日本)から購入した。母ラットの飼育環境は室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明暗サイクルは 12 時間とした。雌雄ラットは飼料と飲料水を自由摂取させた。飼料として、標準動物飼料である固形飼料 CE-2(日本クレア株式会社)を与えた。

ラットは 15 週齢より、雌ラットの性周期を知るために、膣インピーダンス・チェッカー MK-10C(室町機会株式会社、東京、日本)を用いて膣粘膜上皮のインピーダンスを測定し、 $3 \text{ k}\Omega$ 以上の雌ラットを交配適期と判定した。判定された雌ラットを無作為に選別した雄ラットのケージで一晩同居させ、翌日の午前中に膣口または脱落したプラグ(膣栓)の有無を確認した。プラグを確認した日を「妊娠 0 日」とした。妊娠したラットは、床敷を敷いたケージで飼育した。各群の妊娠ラットにおいての分娩の有無を確認し、分娩したラットについては、その日を「生後 0 日」とした。妊娠 0 日目から出産までを妊娠期、出産を確認した日から離乳までの 21 日間を授乳期とした。

妊娠したラットを無作為に分け、妊娠期に 20%タンパク質食(NP)あるいは 8%タンパク質食(LP)を与えた。授乳期では、NP 群は引き続き 20%タンパク質食を、LP 群は出産日に 3 つに分け、一方には引き続き 8%タンパク質食を、他方には 0.25%クルクミン含有 8%タンパク質食(Cur)を与えた。なおクルクミンは高吸収クルクミン(セラクルミン®:株式会社セラバリュース、東京、日本)として与えた(表 1)。本研究では、ラットにおけるクルクミンの生殖無毒性量(1043 mg/kg (体重))と高吸収クルクミンの無毒性量(5000 mg (セラクルミン®)/ kg (体重)/日)を参考にして^{62,63}、1 日当たりクルクミンとして約 80 mg/kg (体重)、授乳期の母ラットに摂取されるようクルクミン量を決定した。離乳後、雌性仔ラットに蒸留水(W)または 10%フルクトース(Fr)液を与えた(表 1、図 4)。すなわち、妊娠期に NP、授乳期に NP、離乳後に W を与えられた NP/NP/W ($n=12$)、妊娠期に LP、授乳期に LP、離乳後に W を与えられた LP/LP/W ($n=6$)、妊娠期に LP、授乳期に LP、離乳後に Fr を与えられた LP/LP/Fr ($n=8$)、妊娠期に LP、授乳期に Cur、離乳後に Fr を与えられた LP/Cur/Fr ($n=12$)の 4 群とした。

13 週齢時に絶食後(15–16 時間)、体重を測定し、血液サンプルを麻酔下で鎖骨下動脈から採取し、さらに、腎臓、子宮周囲脂肪及び腎臓周囲脂肪を採取した。また、採取した血液は、 4°C 、 $800 \times g$ で 10 分間遠心分離を行い、血漿を得た。仔ラットの飼育期間中は体重、摂餌量及び飲水量を測定し明暗サイクルは 12 時間とし、 $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ の気温を維持した。離乳後の摂餌量($1 \text{ g}=3.6 \text{ kcal}$)及び飲水量(蒸留水: $1 \text{ g}=0 \text{ kcal}$ 、10%Fr 液: $1 \text{ g}=0.4 \text{ kcal}$)から摂取エネルギーを算出した。採取した腎臓は 4%パラフォルムアルデヒドリン酸バッファーに固定した。腎臓の一部は直ちに、液体窒素で凍結し、 -80°C で保管した。

2. 血液生化学検査

血漿中の Glc 濃度の測定では、グルコース測定キット(グルコース CII-テストワコー:富士フィルム和光純薬株式会社、埼玉、日本)を用いた。Tg 濃度は、トリグリセライド測定キ

ット(トリグリセライド E-テストワコー:富士フィルム和光純薬株式会社)を用いて測定した。血漿中の BUN は、富士ドライケム尿素窒素キット(富士ドライケムスライド BUN-PⅢ:富士フィルム和光純薬株式会社)を用いて測定した。血漿中の Cr 濃度の測定は、ラボアッセイ™クレアチニン(富士フィルム和光純薬株式会社)を用いた。

3. 免疫染色

化学固定した腎臓組織をリン酸緩衝液(Phosphate-buffered saline:PBS)(pH 7.4)で5~6回洗浄した。包埋剤としてパラフィン(ヒストテック R:メルク株式会社、東京、日本)を用いた。パラフィンを十分に浸透させるために、60%、70%、80%、90%、95%のアルコール液に組織を浸透させ、最後に99.5%アルコール浸透させて脱水した。次に、100%キシレン液に組織を浸透させ、脱アルコール後、組織切片は、パラフィン槽の中に移した。あらかじめ加温しグリセリンを塗った包埋皿にパラフィンを注ぎ、その中にパラフィンを十分浸透させた組織切片を置いた。さらにパラフィンを注ぎ、包埋カセット(ティッシュ・テック固定・包埋用カセット:サクラファインティックジャパン株式会社、日本、東京)に包埋・固定し、パラフィンブロックとした。

パラフィンブロックをホルダー(マイクロトームアダプター)に装着して滑走式ミトクローム(サクラ精機株式会社、長野、日本)にて、厚さ4~5 μmに薄切した。その後、切片をスライドガラス(APS コート付:松浪硝子工業株式会社、大阪、日本)上へのせ、45℃でパラフィン伸展機(Slide warmer:サクラ精機株式会社)上にて十分伸展・乾燥させた。脱パラフィンを行うために、100%、95%、80%、70%のアルコール、水道水に浸漬し、蒸留水、PBSで洗浄した。組織切片が乾燥しないように、モイスチャー・チャンバーにてPap pen(大道産業株式会社、埼玉、日本)で組織切片を取り囲むように書き、過剰なPBSをキムワイプで取り除いてから、スライドを予め37℃の恒温機に5分ほど入れておいた。氷上においた0.1%ペプシン溶液(Dako、ホーヴェドスターデン、デンマーク)を8滴程度、試料を覆えるくらいに組織切片に滴下し、このスライドを、40℃で10分間インキュベーションした。恒温機からスライドを取り出し、室温で1回につき5分間のPBS洗浄を3回行った。その後、内因性ペルオキシダーゼを阻害するために、3%過酸化水素水を加え、室温で10分間放置した後、PBSで1回につき5分洗浄を3回行った。その後、非特異的な反応をマスクするため、ブロッキング液(1.5%スキムミルク含むPBS)を加え、室温にて30分間放置し、一次抗体であるCD68ラットマクロファージ抗体(AbD Serotec Co、オックスフォードシャー、イギリス)を1%BSAで希釈(1:50)してスライドを浸漬し、4℃の冷蔵庫内に1晩放置した。翌日、PBSで穏やかに洗浄した(1回につき5分洗浄を3回行った)。その後、Histofine simple stain rat MAX PO液(Nichirei Biosciences Co、東京、日本)を2滴加え、室温で30分間反応させ、PBSで5分間、3回洗浄し、3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩水和物(DAB)発色を行った。なお、DAB溶液の調整では、使用前に50 mmol/L トリス塩酸緩衝液(Tris-HCl buffer)(pH 7.4)にDABを溶解させた後、最終濃度が3%になるように過酸化水素水を加えた。DAB発色を検鏡しながら発色具合を観察し、蒸留水で3~4分を目安に反応を停止させた。その後、ヘマトキシリン(核染色)に浸漬し、脱水・透徹し、封入、検鏡を行った。

4. シリウスレッド染色

上述したように、腎臓の切片の脱パラフィンを行った後、シリウスレッド染色を行った。この染色では、シリウスレッドで線維を赤色に染色した。

脱パラフィンを行うために、100%、95%、80%、70% のアルコール、水道水に浸漬し、蒸留水で洗浄した。組織切片が乾燥しないように、モイスチャー・チャンバーにて Pap pen で組織切片を取り囲むように書き、過剰な PBS をキムワイプで取り除いてから、シリウスレッド/ファストグリーン染色キット (Chondrex Inc、ワシントン、アメリカ合衆国) を滴下し、90 分間シリウスレッド染色を施した。その後、水道水で洗浄した後、脱水・透徹し、封入、検鏡を行った。

5. CD68 抗体陽性マクロファージ数及び線維化面積率の計測方法

CD68 陽性マクロファージの浸潤の程度を評価するために、光学顕微鏡を用いて、1 個体につき異なる 10 か所の単位面積当たりの数を Cell Sens Dimension (オリンパス株式会社、東京、日本) で計測した。シリウスレッド染色後、線維化領域を観察した。さらに、線維化の程度を評価するために 1 個体につき、異なる 20 か所において Cell Sens Dimension により線維化面積を算出し、1 視野あたりの割合をパーセントで示した。

6. 血漿中マロンジアルデヒド濃度の測定

血漿中の MDA は、マロンジアルデヒド測定キット (Northwest Life Science Specialties LLC、ワシントン、アメリカ合衆国) を使用して測定した。

7. グルタチオン量の測定

腎臓を 5% スルホサリチル酸溶液に入れてホモジネイトを行い、その後、 $8000 \times g$ 4°C で 10 分間、遠心分離を行い、その上清を蒸留水にてスルホサリチル酸濃度が 0.5% になるように調製し、測定試料とした。測定はグルタチオン測定キット (GSSG/GSH Quantification Kit: 株式会社同人化学研究所、熊本、日本) を用いて測定した。

8. グルタチオンペルオキシダーゼ活性の測定

腎臓を 0.1 M リン酸 Na 緩衝液 (pH 7.4) でホモジネイトし、その後、 4°C で 30 分間 $19000 \times g$ で遠心分離した。その上清を回収し、腎臓酵素液とした。BCA™ Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology Inc、マサチューセッツ、アメリカ合衆国) を使用して腎臓酵素液のタンパク質濃度を測定した。山本らの方法を改変し^{64,65)}、反応液「リン酸緩衝液 0.1 M 100 μL pH 7.4 アジ化ナトリウム 2.0 mM、GSH 0.1 M 20 μL 、グルタチオンレダクターゼ 10 U/1 mL、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 2 mM 100 μL 、腎臓酵素液 10 μL 、蒸留水 670 μL 、過酸化水素 5 mM 10 μL 1.0 mL」を混和し、分光光度計により波長 340 nm で 1 分間測定した。測定は、GPx により過酸化水素が処理される際に生じる酸化型 GSH (GSSG) を GR で GSH に還元し、その際に消費される NADPH を測定して評価した。

GP_x 活性は以下の式で算出した。

$U \div \text{mg protein} =$

$[1 \text{ 分当たりの吸光度変化量}^{*1} \times 2^{*2} \times \text{最終液量}(1 \text{ mL}) \times \text{酵素希釈倍率}(1 \text{ 倍})] / [\text{ミリモル分子吸光係数}(6.22) \times \text{光路長}(1.0 \text{ cm}) \times \text{酵素液量}(0.01 \text{ mL})] / \text{タンパク質濃度}(\text{mg} \div \text{mL})$

※1 ブランクを差し引いたもの

※2 1 分子の NADPH の酸化により 2 分子の GSH が生成する

それぞれの測定値は、タンパク質濃度で補正し比較に用いた。

9. ウェスタンブロット法

1) ホモジネイト液の調製

腎臓の一部にホモジネイト用の緩衝液を加えた。すなわち、プロテアーゼ阻害剤カクテルタブレット (Roche Applied Science、バイエルン、ドイツ) を添加した 150 mM 塩化ナトリウム溶液、1 mM ジチオスレイトール液及び 0.5% (v/v) Tween20 を含む 50 mM ヘペス緩衝液 (pH 7.4) を加えた。ホモジナイザー (Ultra turrax[®]、T25 basic、IKA Labortechnik、バイエルン、ドイツ) を用いて氷上にてホモジナイズした後、5000 × *g* で 45 分間、4°C にて遠心分離し、上清を採取し、試料とした。試料は、測定まで -80°C の冷凍庫で保存した。

腎臓のホモジネイト液のタンパク質濃度を BCA[™] Protein Assay Kit (Pierce biotechnology) で測定した。その後、タンパク質の濃度差が発現量に影響を与えず、抗原が検出できるよう、タンパク質の終濃度が 4 mg/mL になるように希釈し、タンパク質を変性させるために等量の 2×サンプルバッファー (Sigma-Aldrich Co、ミズーリ、アメリカ合衆国) を加えて、98°C にて 4 分間加熱した。

2) SDS-PAGE 電気泳動法

10% もしくは 16% アクリルアミド分離ゲルを調製した。10% アクリルアミド分離ゲルは 30% アクリルアミドストック溶液 (富士フィルム和光純薬株式会社) 3.333 mL、1.5 M トリス塩酸緩衝液 (Tris-HCl) (pH 8.8) 2.5 mL、10% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 100 μL、蒸留水 4.067 mL、10% 過硫酸アンモニウム (APS) 100 μL、テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) 10 μL をよく混合して調製した。16% アクリルアミド分離ゲルは、30% アクリルアミドストック溶液 5.333 mL、1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 2.5 mL、10% SDS 100 μL、蒸留水 1.966 mL、10% APS 100 μL、TEMED 10 μL をよく混合して調製した。アクリルアミド濃縮ゲルは、30% アクリルアミドストック溶液 0.8 mL、1.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 1.5 mL、10% SDS 60 μL、蒸留水 3.64 mL、10% APS 60 μL、TEMED 6 μL を十分に混合し、調製した。次に、泳動用シリコンガスを 2 枚の泳動板ではさみ、ゲル作成板を組み立て、分離ゲル溶液を泳動板の底から 7.5 cm 程度まで注ぎ、液面を均一化するため 50% イソプロピルアルコールを重層した。分離ゲルが固まってから 50% イソプロピルアルコールを捨て、蒸留水で洗浄した後、濃縮ゲルを注ぎ試料注入部分のスペース調整のため コーム (楕状板) を泡が入らないように差し込み、ゲルを作製した。ゲル板から泳動用シリコンガスおよび コーム を抜き取り、ゲル板を泳動槽にセットした。10×Tris running buffer を 250 mmol/L トリス (Tris)、1920 mmol/L グリシン、1% SDS で蒸留水に溶解し、1 L に調製した。

上下の泳動槽に 10×Tris running buffer を蒸留水で 10 倍希釈した電気泳動用緩衝液 (1×Tris running buffer) で満たした。電気泳動用緩衝液で各ウェルを洗浄後、注射針で余分なゲルを取り除き、ウェルの形を整えた。その後、試料の腎臓ホモジネイト溶液をそれぞれ 15 μ L ずつ各ウェルに注入した。なお、分子量マーカーとして着色タンパク質分子量マーカー (Invitrogen、マサチューセッツ、アメリカ合衆国) を試料と同時に泳動し、タンパク質の分子量推定に用いた。濃縮ゲル部分ではゲル 1 枚に対し 80 V、20 mA で約 30 分間、通電、泳動し、分離ゲル部分では 150 V、20 mA で約 90 分間、通電、泳動した。通電終了後、分離ゲルを泳動板からはがし、ウェスタンブロットティングに供した。

3) ウェスタンブロットティング

SDS-PAGE 電気泳動で調製した 10×Tris running buffer を 100 mL ブロットティング用緩衝液 (1×Transfer running buffer)、蒸留水 700 mL、メタノール 200 mL を混合し、ブロットティング用緩衝液 (1×Transfer running buffer) を調製した。フッ化ポリビニリデン (PVDF) メンブレン (GE Healthcare Co、バッキンガムシャー、イギリス) をメタノール、蒸留水、1×Transfer running buffer の順に浸した。また、ブロットティング用緩衝液にゲル、ろ紙を浸した。トランスファーカセットに、ろ紙 2 枚、メンブレン、ゲル、ろ紙 1 枚の順に泡が入らないように重ねた。その後、100 mV、100 mA の条件でおよそ 15 時間通電してブロットティングを行った。

ブロットティングしたメンブレンに対して抗原抗体反応及び検出ブロッキングを行った。PVDF メンブレンを 1 次抗体希釈用ブロッキング溶液 (5% スキムミルク溶液)、あるいは 5% ウシ血清アルブミン (BSA) を含んだ Tween 20 で希釈した一次抗体である、Nrf2 (1 : 400) (Santa Cruz Biotechnology Inc、カリフォルニア、アメリカ合衆国)、H0-1 (1 : 1000) (Enzo Life Sciences Co、ニューヨーク、アメリカ合衆国)、SOD1 (1 : 5000) (Santa Cruz Biotechnology Inc) のウサギ由来の抗体と β -アクチン (β -Actin) (1 : 1000) (Abcam Co、ケンブリッジ、イギリス) いずれかに浸漬して、4°C で一晩インキュベートした。その後、メンブレンを洗浄緩衝液で洗浄した後、二次抗体である HRP 標識抗マウス免疫グロブリン G (Immunoglobulin G: IgG) 抗体 (1 : 2000) (Dako Co) もしくは HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1 : 2000) (Dako Co) 溶液に浸漬し、室温で 1 時間振とうして反応させた。その後、洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。抗原の検出には、ECL ウェスタンブロットティング検出試薬 (GE Healthcare Co) を用いた。ウェスタンブロットティング検出試薬である Reagent1 液 (GE Healthcare Co) と Reagent2 液 (GE Healthcare Co) を等量で混合し、室温にて 2 分間、PVDF メンブレンのタンパク質がブロットされている面と反応させた。余分な検出試薬を除去した後、メンブレンを ECL フィルム (GE Healthcare Co) に密着させ、露光させた。その後、フィルムを現像液 (富士フィルム和光純薬株式会社)、停止液、定着液 (富士フィルム和光純薬株式会社) につけ、水道水で洗浄した後、乾燥させ、フィルムを現像した。現像したフィルムは化学発光のシグナル (バンド) をライトキャップチャーシステム (アトー株式会社、東京、日本) 及び画像解析のソフトウェアである CS Analyzer 2.0 (アトー株式会社) を用いて画像解析及び定量した。Nrf2、H0-1 及び SOD1 のタンパク質発現量は、 β Actin の発現量で標準化した。

10. 統計処理

値は、平均値±標準誤差で表した。各群間での平均値の有意差検定は、一元配置分散分析を行った後、Tukey法(多重比較法)を用いて行った。妊娠期の摂餌量および体重については、Student's t検定を用いた。p<0.05の場合に有意であるとみなした。検定にはコンピュータソフトである、IBM SPSS Statistics Version 26(日本IBM株式会社、東京、日本)を使用した。

表 1 飼料組成

成分	20%カゼイン食	8% カゼイン食	0.25% クルクミン含有 8%カゼイン食
	g/飼料100g		
カゼイン	20.00	8.00	8.00
L-シスチン	0.30	0.30	0.30
コーンスターチ	39.75	38.97	38.97
α 化コーンスターチ	13.20	25.98	25.98
シュークロース	10.00	10.00	10.00
大豆油	7.00	7.00	7.00
セルロース	5.00	5.00	4.75
クルクミン ¹⁾	0	0	0.25
AIN-93Gミネラル混合	3.50	3.50	3.50
AIN-93Gビタミン混合	1.00	1.00	1.00
重酒石酸コリン	0.25	0.25	0.25
第三ブチルヒドロキノン	0.0014	0.0014	0.0014

1) クルクミンは、高吸収クルクミン（セラクルミン®）として加えた。

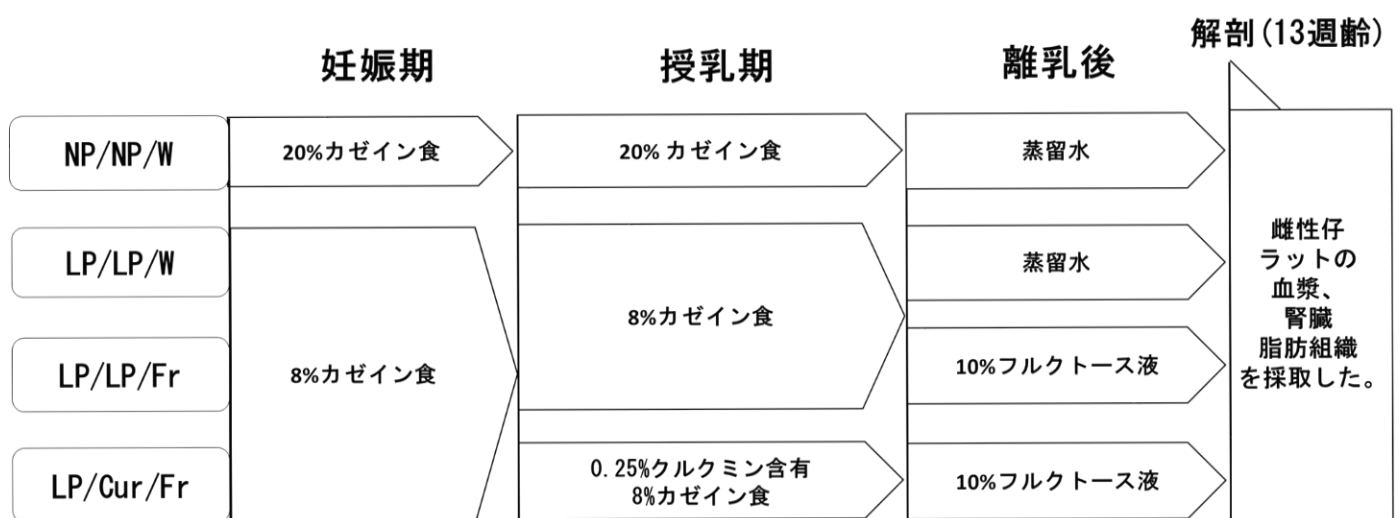


図4 動物実験のデザイン

生後4日に性別を確認し、仔ラット数を8匹に調整した。離乳後の飼料はMF飼料(オリエンタル酵母株式会社、東京、日本)を与えた。カゼインとしてタンパク質を与えた。妊娠中に20%カゼイン食(NP)、授乳中にNP、離乳後に蒸留水(W)を与えられたNP/NP/W(n=12)。妊娠中に8%カゼイン食(LP)、授乳中にLP、離乳後にWを与えられたLP/LP/W(n=6)。妊娠中にLP、授乳中にLP、離乳後に10%フルクトース液(Fr)を与えられたLP/LP/Fr(n=8)。妊娠中にLP、授乳中にクルクミン、離乳後にFrを与えられたLP/Cur/Fr(n=12)以上の4群で実験を行った。クルクミンは、高吸収クルクミン(セラクルミン®)として飼料に添加した。

第3章 結果

1. 妊娠期の母ラットの体重及び摂餌量

妊娠期の母ラットの体重及び摂餌量については、NP と LP を比較すると有意な差は見られなかった(図 5A、図 5B)。

2. 授乳期の母ラットの体重、摂餌量及び乳児期の雌性仔ラットの体重

授乳期の母ラットである LP/Cur 及び LP/LP の体重は、NP/NP と比較して 20 日と 21 日でそれぞれ有意に減少した(図 6A)。授乳期の母ラットである LP/LP の摂餌量は、NP/NP と比較して授乳期の 10~12 日以降有意に減少した(図 6B)。授乳期の母ラットの体重及び摂餌量は LP/LP と LP/Cur を比較すると有意な差は見られなかった。

LP/LP 及び LP/Cur の乳児期の雌性仔ラットの体重は、NP/NP と比較すると 4 日以降それぞれ有意に減少した(図 7)。また、乳児期の雌性仔ラットの体重は、LP/LP と LP/Cur を比較すると有意な差は見られなかった。

3. 離乳後の雌性仔ラットの体重、摂餌量、飲水量及び摂取エネルギーに及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

LP/LP/W、LP/LP/Fr 及び LP/Cur/Fr の雌性仔ラットの体重は、NP/NP/W と比較して、飼育期間中、乳児期と同様にそれぞれ有意に減少した(図 8)。また、LP/Cur/Fr の雌性仔ラットの体重は、4 週齢の時に LP/LP/Fr と比較して有意に減少したが、6 週齢以降有意な差は見られなかった。

LP/LP/Fr 及び LP/Cur/Fr の 7 週齢以降の摂餌量あるいは 12 週齢以降の飲料水は LP/LP/W と比較してそれぞれ有意に減少した(図 9A、図 9B)。一方、LP/LP/Fr と LP/Cur/Fr の摂餌量及び飲水量は有意な差は見られなかった。

離乳後の摂取エネルギーは NP/NP/W、LP/LP/W、LP/LP/Fr 及び LP/Cur/Fr をそれぞれ比較すると有意な差は見られなかった(図 10)。

4. 血漿中のグルコース濃度及びトリグリセリド濃度に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

LP/LP/W 及び NP/NP/W の Glc 濃度を比較すると両者には有意な差は見られなかった。LP/LP/Fr の Glc 濃度は、LP/LP/W と比較して有意に増加した(図 11A)。一方、LP/Cur/Fr の Glc 濃度は、LP/LP/Fr と比較して有意に低下した。

LP/LP/W 及び NP/NP/W の Tg 濃度を比較すると両者には有意な差は見られなかった。LP/LP/Fr の Tg 濃度は、LP/LP/W と比較して有意に増加した(図 11B)。一方、LP/Cur/Fr の Tg 濃度は、LP/LP/Fr と比較して有意に減少した。

5. 腎臓重量及び脂肪組織重量に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

LP/LP/Fr の腎臓絶対重量は、LP/LP/W と比較して増加傾向にあった(図 12A)。一方、LP/Cur/Fr の腎臓絶対重量は LP/LP/Fr と比較して有意に減少した。また、LP/LP/Fr の腎臓相対重量は LP/LP/W と比較して増加傾向にあった(図 12B)。一方、LP/Cur/Fr の腎臓相対重量は LP/LP/Fr と比較して有意に減少した。

子宮周囲相対脂肪重量は、NP/NP/W、LP/LP/W、LP/LP/Fr 及び LP/Cur/Fr を比較するとそれぞれ有意な差は見られなかった(表 2)。LP/LP/W の腎臓周囲相対脂肪重量は、NP/NP/W と比べると有意に低下した(表 2)。しかしながら、腎臓周囲相対脂肪重量は、LP/LP/Fr と LP/Cur/Fr を比較すると有意な差は見られなかった。

6. 血漿中の尿素窒素濃度及びクレアチニン濃度に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

LP/LP/W の BUN 濃度は、NP/NP/W と比較して有意に増加した(図 13A)。一方、LP/LP/Fr 及び LP/Cur/Fr の BUN 濃度は、NP/NP/W 及び LP/LP/W とそれぞれ比較して有意に減少した。しかしながら、BUN 濃度は、LP/LP/Fr と LP/Cur/Fr を比較すると有意な差は見られなかった。

LP/Cur/Fr の Cr 濃度は、NP/NP/W と比較して有意に低下した(図 13B)。

7. 腎臓のマクロファージ数及び線維化に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

フルクトース負荷は、腎臓中で炎症細胞を増加させる¹⁸⁾。そこで、腎臓中のマクロファージの分布及び CD68 マクロファージ陽性細胞数を調べた。LP/LP/Fr の CD68 陽性マクロファージは、LP/LP/W と比較して腎臓の間質と糸球体にやや多く観察された(図 14A、B、C、D)。また、LP/Cur/Fr の CD68 陽性マクロファージは、LP/LP/Fr と比較して腎臓の間質と糸球体において散見された。一方、1 視野あたりの CD68 陽性マクロファージ細胞数を計測すると、LP/LP/Fr のマクロファージ数は、LP/LP/W と比較して増加傾向にあった(図 14E)。また、LP/Cur/Fr のマクロファージ数は、LP/LP/Fr と比較して有意に減少した。

マクロファージの浸潤が亢進すると TGF- β などの線維化促進因子が過剰に産生され、線維化は促進される⁶⁶⁾。そこで、シリウスレッド染色を行い腎臓の線維化の状態を観察した。LP/LP/Fr の間質の線維化領域は LP/LP/W と比較して、やや拡大していた(図 15A、B、C、D)。また、LP/Cur/Fr の線維化領域は LP/LP/Fr と比較すると小さくなっていた。1 視野あたりの線維化面積率を計測すると、LP/LP/Fr の線維化面積率は LP/LP/W と比較して増加する傾向にあった(図 15E)。LP/Cur/Fr の線維化面積率は LP/LP/Fr と比較して有意に減少した。

8. 血漿中マロンジアルデヒド濃度に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

酸化ストレスを評価するために、血漿中の MDA 濃度を測定した。LP/LP/W の MDA 濃度は NP/NP/W と比較して有意傾向にあった(図 16)。また、LP/LP/Fr の MDA 濃度は LP/LP/W と比較して有意に増加した。一方、LP/Cur/Fr の MDA 濃度は LP/LP/Fr と比較して有意に減少した。

9. 腎臓中のグルタチオン量及びグルタチオンペルオキシダーゼ活性に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

LP/LP/Fr の GSH 量は、LP/LP/W と比較して減少傾向にあった(図 17A)。一方、LP/Cur/Fr の GSH 量は、LP/LP/Fr と比較して有意に増加した。

LP/LP/Fr の GPx 活性は、LP/LP/W と比較して減少傾向にあった(図 17B)。一方、LP/Cur/Fr の GPx 活性は、LP/LP/Fr と比較して有意に高値を示した。

10. 腎臓の Nrf2 のタンパク質発現量に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

LP/LP/Fr の Nrf2 の発現量は、LP/LP/W と比較して減少する傾向を示した。また、LP/Cur/Fr の Nrf2 の発現量は LP/LP/Fr と比較して有意に増加した(図 18)。

11. 腎臓のヘムオキシゲナーゼ-1 及びスーパーオキシドジスムターゼ 1 のタンパク質発現量に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

LP/Cur/Fr の HO-1 の発現量は、LP/LP/Fr と比較して有意に増加した(図 19A)。LP/Cur/Fr の SOD1 の発現量は、LP/LP/Fr と比較して有意に増加した(図 19B)。

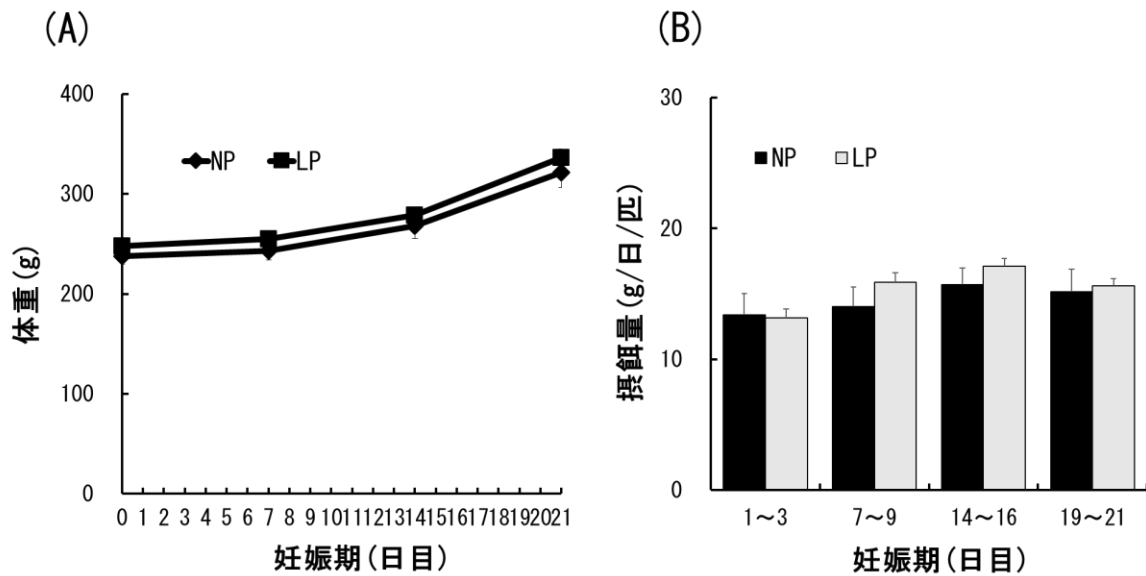


図5 妊娠期の母ラットの体重(A)及び摂餌量(B)
値は平均値±標準誤差(n=4~9)を示す。

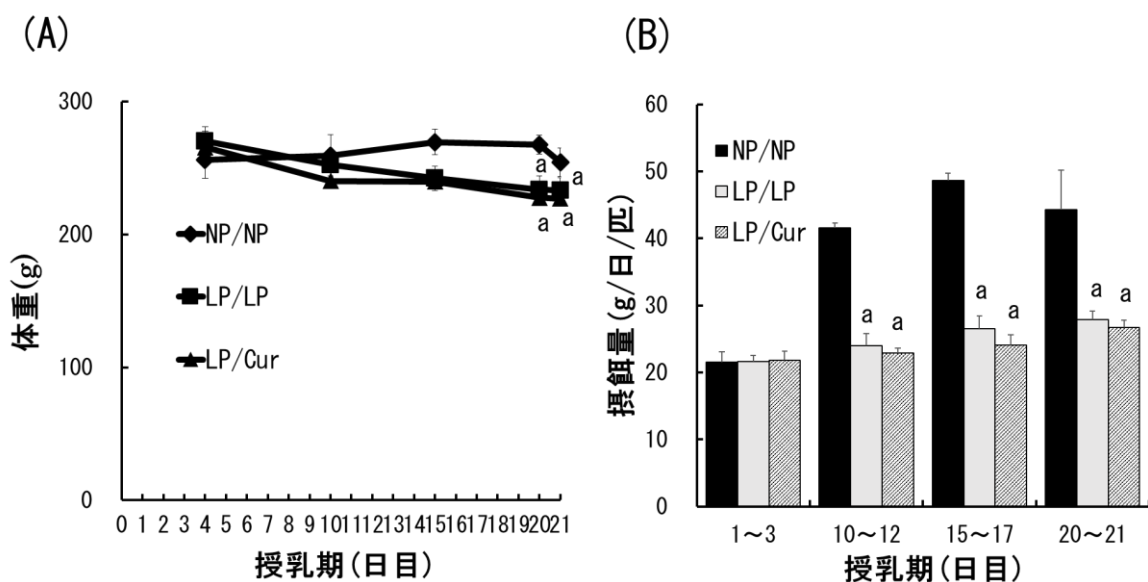


図6 授乳期の母ラットの体重(A)及び摂餌量(B)
値は平均値±標準誤差(n=4~5)を示す。

^ap < 0.05 vs NP/NP

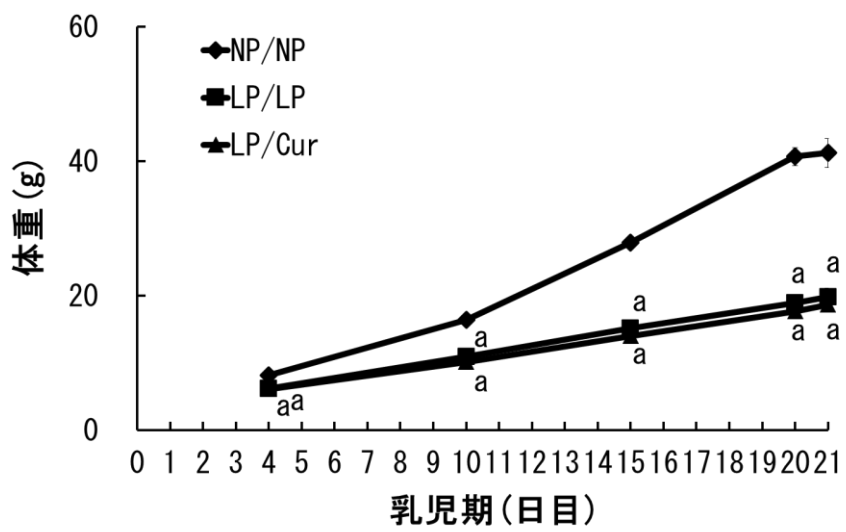


図7 乳児期の雌性仔ラットの体重に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響
 値は平均値±標準誤差(n=6~12)を示す。^ap<0.05 vs NP/NP

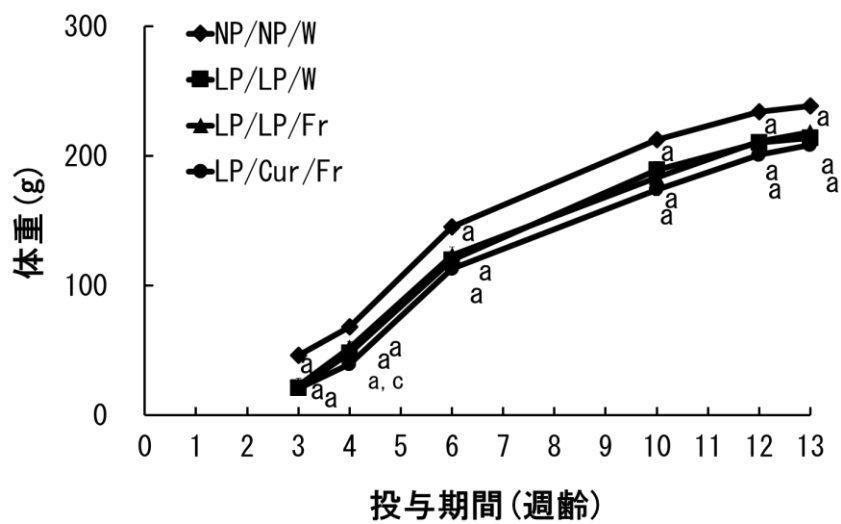


図 8 離乳後の雌性仔ラットの体重に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響
 値は平均値±標準誤差 (n=6~12) を示す。^ap<0.05 vs NP/NP/W、
^cp<0.05 vs LP/LP/Fr

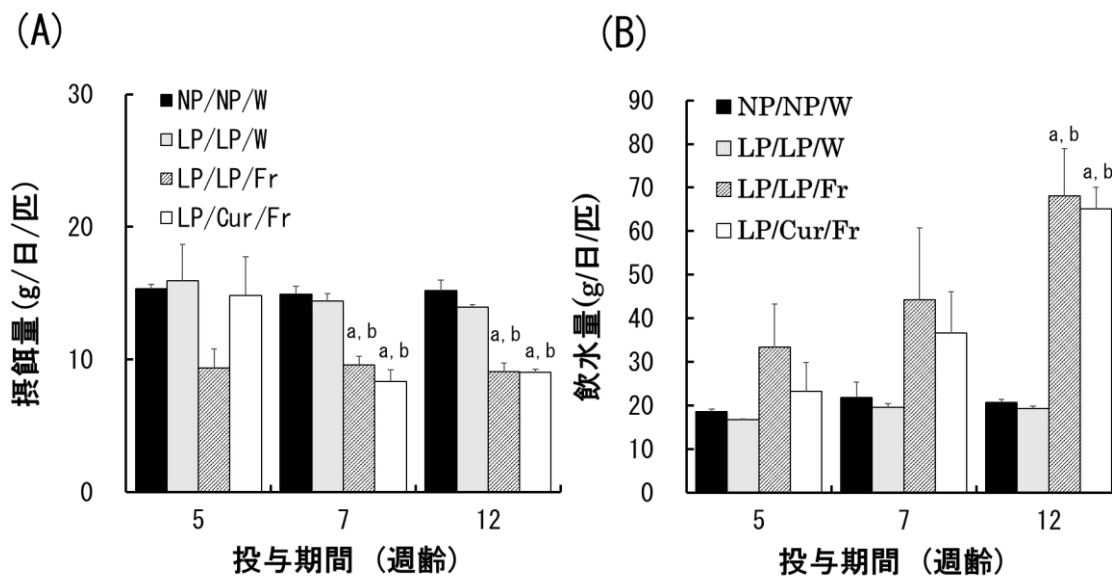


図 9 離乳後の雌性仔ラットの摂餌量(A)及び飲水量(B)に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

値は平均値±標準誤差 (n=6~12) を示す。^ap<0.05 vs NP/NP/W、^bp<0.05 vs LP/LP/W

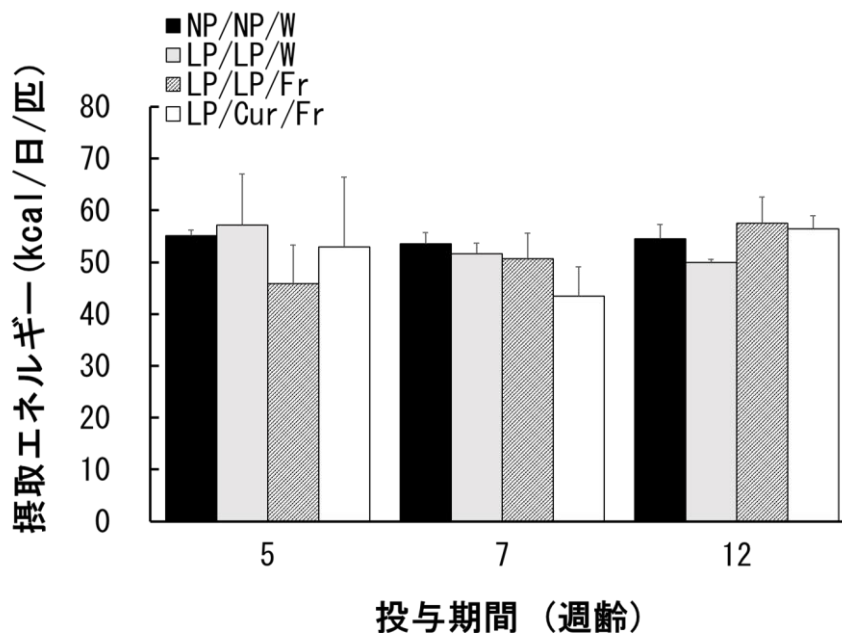


図 10 離乳後の雌性仔ラットの摂取エネルギーに及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

値は平均値±標準誤差 (n=6~12) を示す。

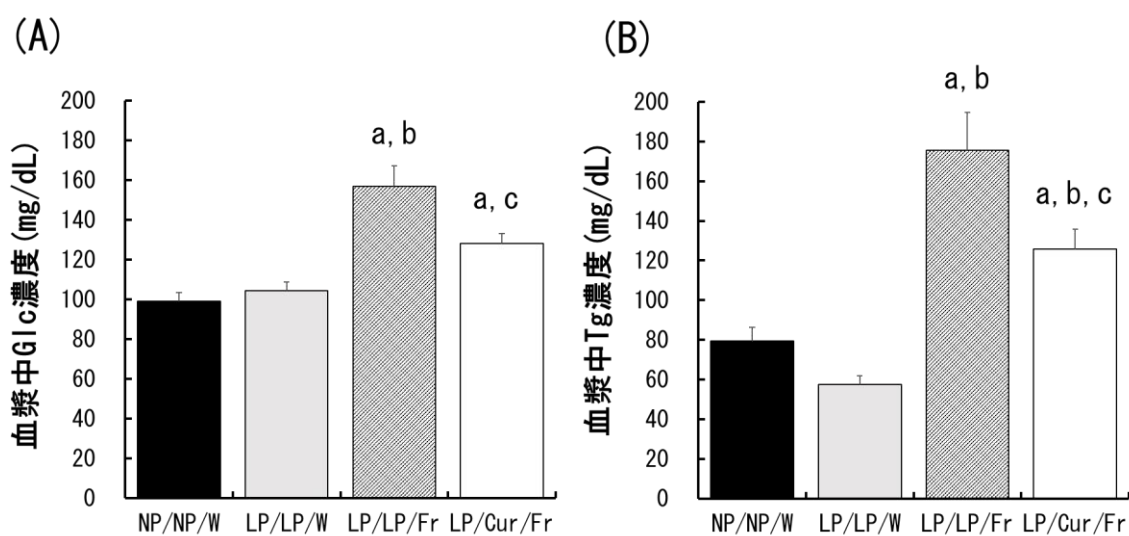


図 11 血漿中のグルコース:Glc(A)及びトリグリセリド:Tg(B)濃度に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

値は平均値±標準誤差 (n=6~12)を示す。^ap<0.05 vs NP/NP/W、
^bp<0.05 vs LP/LP/W、^cp<0.05 vs LP/LP/Fr

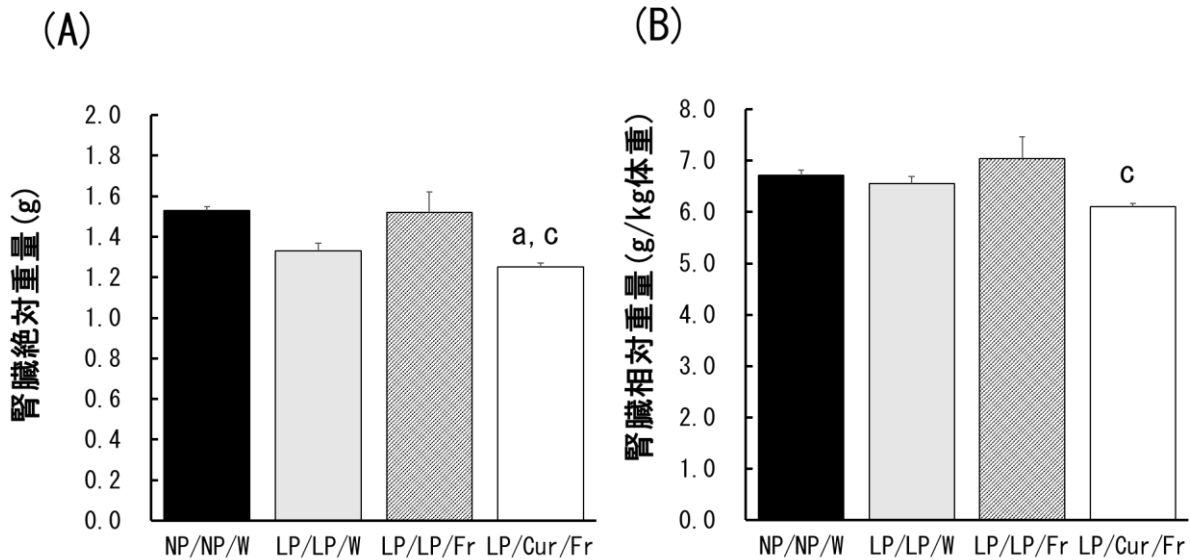


図 12 腎臓絶対重量(A)及び腎臓相対重量(B)に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

値は平均値±標準誤差 (n=6~12)を示す。^ap<0.05 vs NP/NP/W、
^cp<0.05 vs LP/LP/Fr

表 2 脂肪組織重量に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

	NP/NP/W	LP/LP/W	LP/LP/Fr	LP/Cur/Fr
子宮周囲絶対脂肪重量 (g)	7.42±0.45	5.09±0.40 ^a	6.30±0.82	5.63±0.20 ^a
子宮周囲相対脂肪重量 (g/kg)	32.38±1.64	25.04±1.99	28.82±3.41	27.50±0.97
腎臓周囲絶対脂肪重量 (g)	5.12±0.20	3.31±0.41 ^a	4.41±0.45	3.79±0.17 ^a
腎臓周囲相対脂肪重量 (g/kg)	22.41±0.75	16.25±1.96 ^a	20.32±1.80	18.54±0.87

値は平均値±標準誤差 (n=6~12)を示す。^ap<0.05 vs NP/NP/W

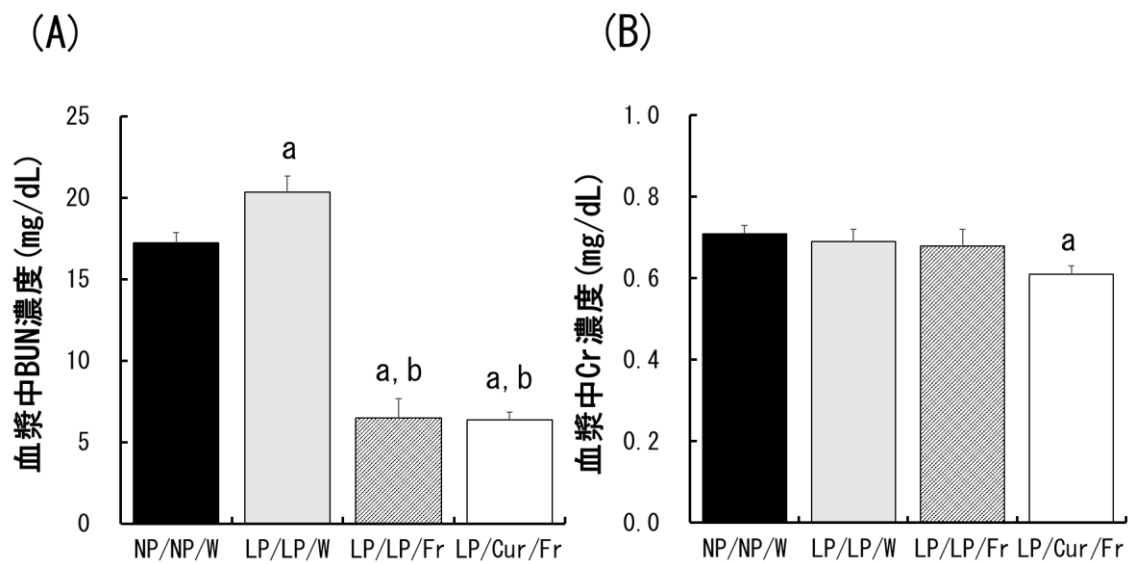


図 13 血漿中の尿素窒素 :BUN(A) 及びクレアチニン :Cr (B) 濃度に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

値は平均値±標準誤差 (n=6~12) を示す。^ap<0.05 vs NP/NP/W、

^bp<0.05 vs LP/LP/W

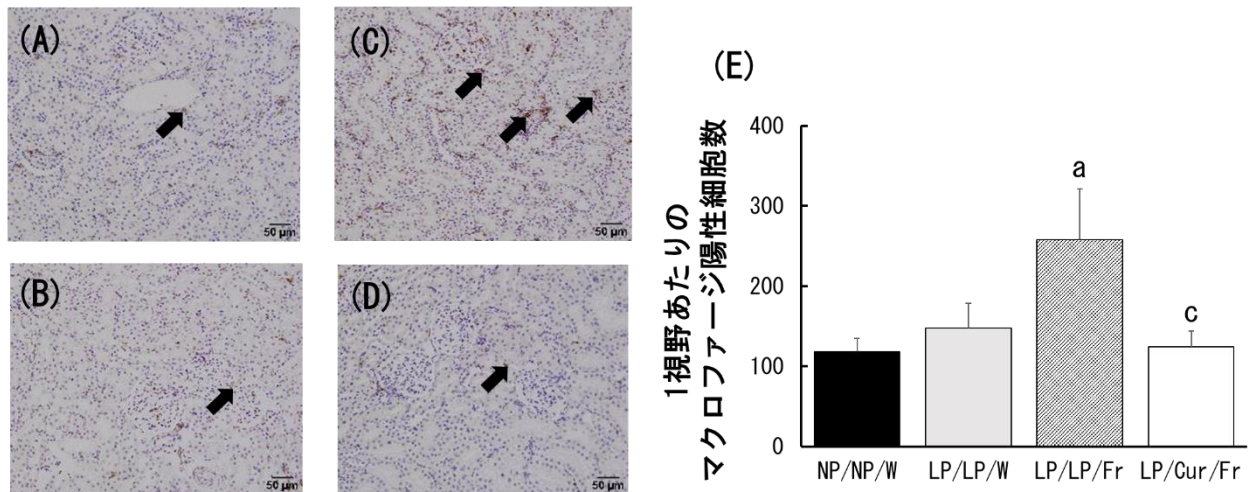


図 14 腎臓のマクロファージの浸潤に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響
 腎臓のマクロファージ浸潤の観察 (A、B、C、D)。NP/NP/W(A)、LP/LP/W(B)、LP/LP/Fr(C)、LP/Cur/Fr(D)。腎臓の CD68 マクロファージ陽性数 (E)。矢印は、マクロファージを示す (青紫で染色された細胞は核で周りを茶色で染色されたものがマクロファージである)。値は平均値±標準誤差 (n=6~12) を示す。^ap<0.05 vs NP/NP/W、^cp<0.05 vs LP/LP/Fr

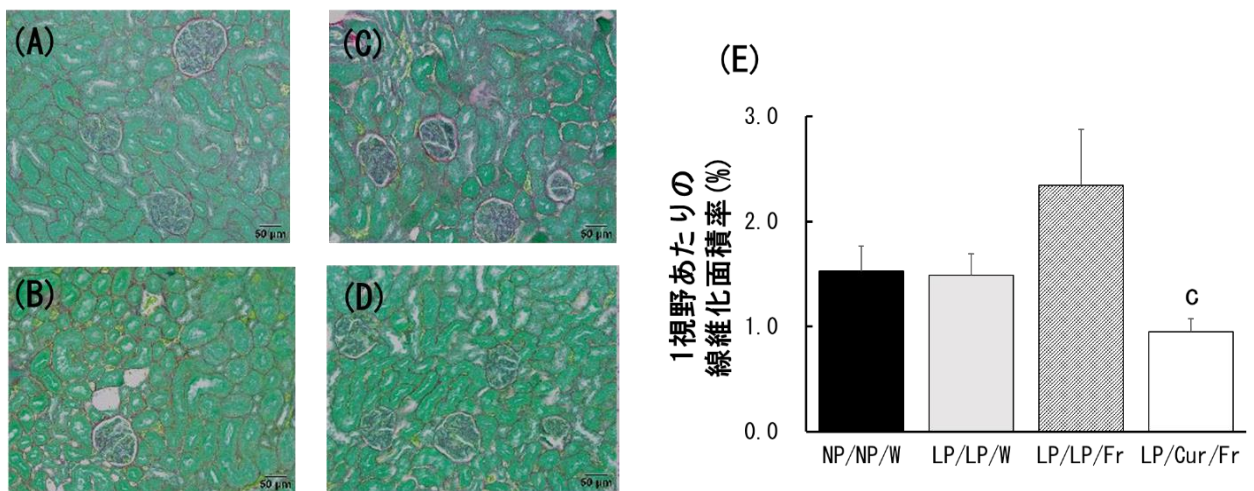


図 15 腎臓の線維化に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響
 腎臓の線維化の観察 (A、B、C、D)、NP/NP/W(A)、LP/LP/W(B)、LP/LP/Fr(C)、LP/Cur/Fr(D)、腎臓線維化面積率 (E)。値は平均値±標準誤差 (n=6~12) を示す。^cp<0.05 vs LP/LP/Fr

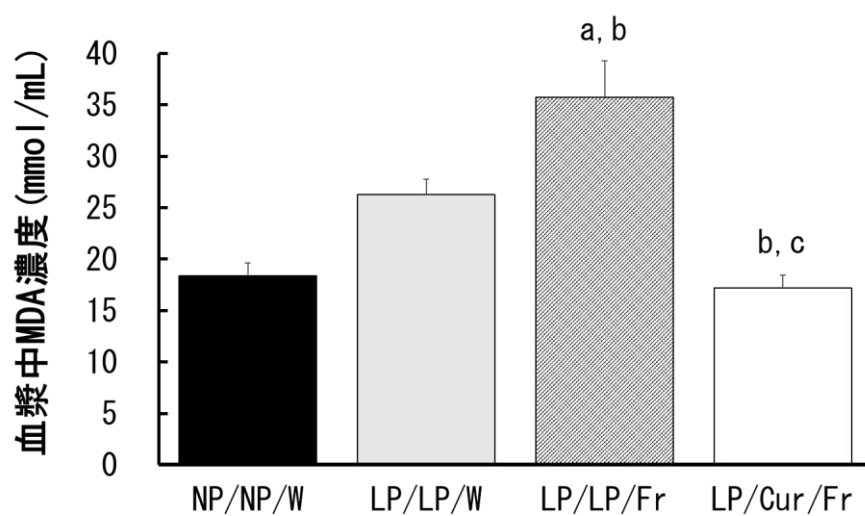


図 16 血漿中のマロンジアルデヒド:MDA 濃度に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響
 値は平均値±標準誤差 (n=6~12) を示す。^ap<0.05 vs NP/NP/W、
^bp<0.05 vs LP/LP/W、^cp<0.05 vs LP/LP/Fr

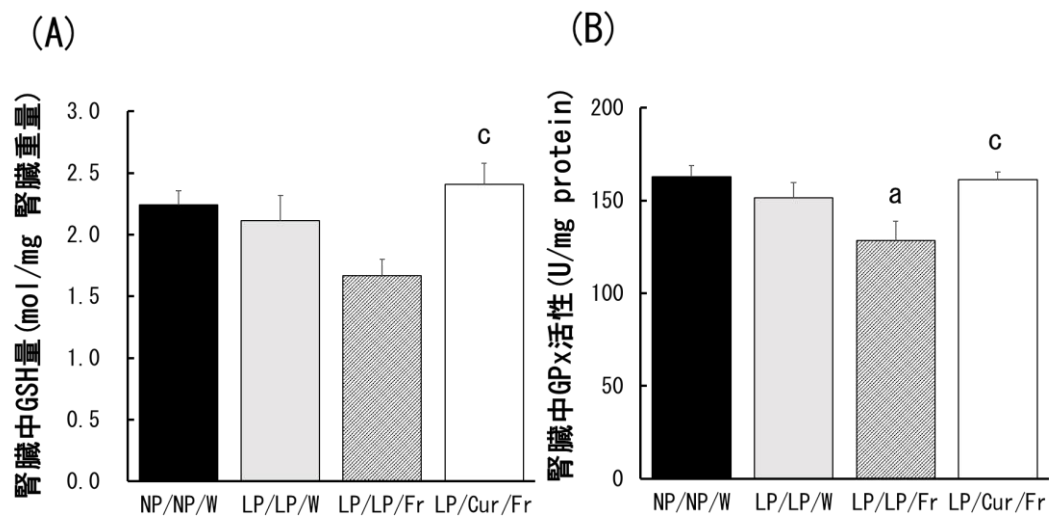


図 17 腎臓中のグルタチオン:GSH 量(A)及びグルタチオンペルオキシダーゼ:GPx 活性(B)に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

値は平均値±標準誤差 (n=6~12)を示す。^ap<0.05 vs NP/NP/W、^cp<0.05 vs LP/LP/Fr

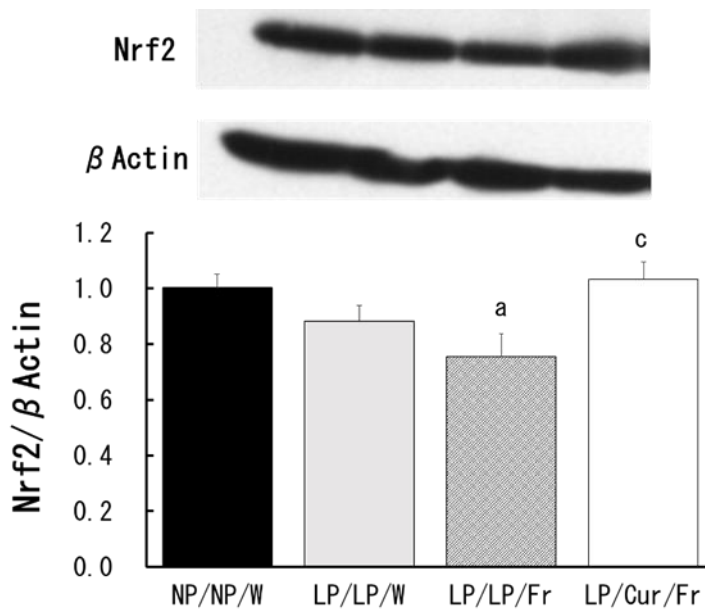


図 18 腎臓の NF-E2-related factor 2:Nrf2 のタンパク質発現量に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

値は平均値±標準誤差 (n=6~12) を示す。^ap<0.05 vs NP/NP/W、^cp<0.05 vs LP/LP/Fr

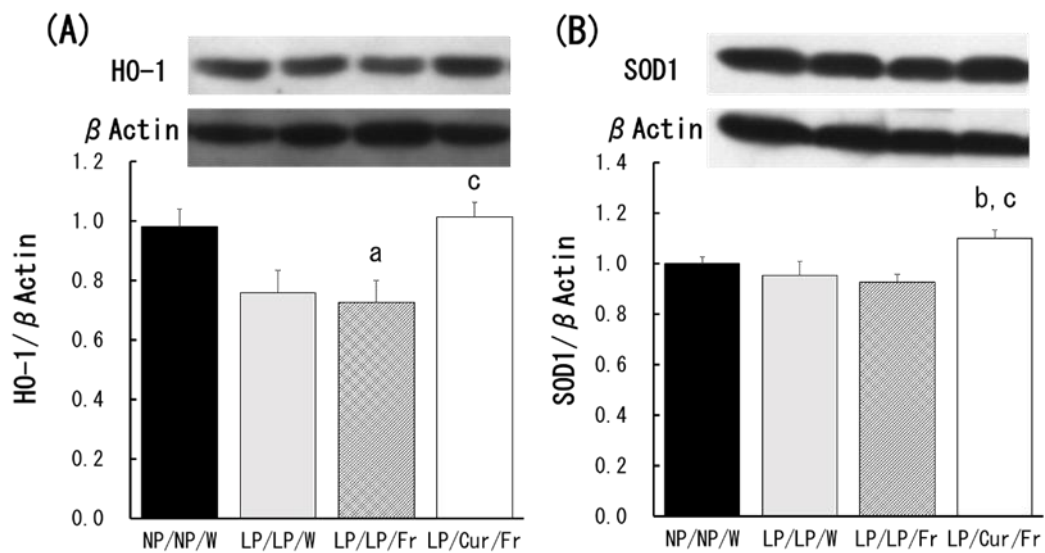


図 19 腎臓のヘムオキシゲナーゼ-1:HO-1(A)、スーパーオキシドジスムターゼ 1:SOD1(B) のタンパク質発現量に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響

値は平均値±標準誤差 (n=6~12) を示す。^ap<0.05 vs NP/NP/W、^bp<0.05 vs LP/LP/W、^cp<0.05 vs LP/LP/Fr

第4章 考察

本研究により、以下のことが明らかになった。胎児期及び乳児期に低栄養に曝され、離乳後にフルクトース負荷された雌性仔ラットの腎臓では、乳児期に摂取したクルクミンにより、(Ⅰ)転写因子である Nrf2 のタンパク質発現量は増加した。(Ⅱ)Nrf2 の標的抗酸化酵素である HO-1 及び SOD1 のタンパク質発現量は増加した。(Ⅲ)GSH 量及び GPx 活性は増加した。(Ⅳ)血漿中 MDA 濃度は減少した。(Ⅴ)血漿中 Glc 及び Tg 濃度は減少した。

LP/LP/W、LP/LP/Fr 及び LP/Cur/Fr の体重は、NP/NP/W と比較してフルクトースの投与期間中にそれぞれ有意に減少した。妊娠期及び授乳期の母ラットに低タンパク質食を与えるると離乳後の仔の体重は低値になることが知られている⁶⁷⁾。本研究においても、先行研究と同様の結果が得られた。フルクトース負荷した成獣ラットにクルクミンを投与すると、体重増加を抑制したという報告がある⁵⁵⁾。本研究では、乳児期にクルクミンを摂取した仔ラットに成獣(13週齢)となるまでフルクトース負荷したが、負荷しない群の体重に比べて有意な差は認められなかった。この結果から、乳児期に摂取したクルクミンは、フルクトース負荷の有無に関わらず、仔の体重に影響を及ぼさないことが示唆された。

フルクトースの過剰摂取により糖・脂質代謝の異常が生じることはよく知られている^{6,8,10)}。たとえば、過剰のフルクトースを与えたラットでは血漿中 Glc 濃度や Tg 濃度が増加し、インスリン抵抗性が生じる⁶⁸⁾。また、過剰のフルクトースを摂取したヒト女性において血漿中 Tg 濃度が上昇し、インスリンは減少することが報告されている⁶⁹⁾。本研究においても、LP/LP/Fr の血漿 Glc 及び Tg 濃度は LP/LP/W に比べて、LP/LP/Fr で有意に増加した。このことは、フルクトースの負荷により、糖や脂質の代謝異常が生じたことを示している。これに対して、LP/Cur/Fr の血漿 Glc 及び Tg 濃度は、LP/LP/Fr と比較すると有意に減少した。本研究の結果から、少なくとも、乳児期に摂取したクルクミンは、フルクトース負荷した仔ラットの血漿中 Glc 及び Tg の増加を抑制することが示唆された。

フルクトースの過剰摂取は腎臓にも影響を及ぼす。過剰のフルクトースを与えたラットでは、腎臓の尿細管の障害や尿路結石が認められた⁷⁰⁾。また、ヒトではフルクトースを多く含む清涼飲料水の摂取量が多いほど腎障害の発症リスクが高まることが報告されている⁷¹⁾。本研究では、LP/Cur/Fr の腎臓相対重量は、LP/LP/Fr に比べて有意に減少したことを見出した。この結果から、乳児期のクルクミン摂取は、フルクトース負荷による腎障害の軽減に関与することが推察された。

血漿中の BUN は腎機能の重要な指標の一つであり、腎障害により増加する⁷²⁾。そこで、仔ラットの血漿 BUN 濃度を測定した。LP/LP/W の BUN 濃度は NP/NP/W に比べて有意に増加した。胎生期及び乳児期の低栄養状態では、離乳後の仔ラットの腎機能は悪化することが知られている⁷³⁾。このことから、胎児期及び乳児期の低タンパク質食により LP/LP/W の腎機能は低下したことが推察された。一方、離乳後にフルクトースを負荷した LP/LP/Fr 及び LP/Cur/Fr の BUN 濃度は、LP/LP/W と比較してそれぞれ有意に低下した。しかし、これらの結果と乳児期に摂取したクルクミンとの関連は不明である。一般に、BUN 値は低タンパク質食などの栄養バランスの偏った食事を負荷すると低下する⁷⁴⁾。また、フルクトースの過剰摂取は、PFC バランスを崩し、炭水化物の生体への摂取量を増やすといわれている。さらに、摂餌量が少なくなると、飼料中のタンパク質の摂取量が低下することも考えられる。事実、フルクトース負荷群である LP/LP/Fr 及び LP/Cur/Fr は、蒸留水を与えられた NP/NP/W 及び

LP/LP/Wと比較すると、7週齢及び12週齢でそれぞれ有意に少ない摂餌量であった。このようなことから、フルクトース負荷群では、胎児期及び乳児期の低タンパク質食の摂取、さらに離乳後のフルクトース負荷によりタンパク質摂取量の減少が生じたために、窒素代謝物が減少し、BUN濃度の減少に至ったと推察された。

フルクトース負荷により、腎臓において炎症や線維化が生じる¹⁸⁾。そこで、炎症の指標の一つであるマクロファージの浸潤及び線維化におけるクルクミンの影響を調べた。LP/LP/FrとLP/LP/Wの腎臓におけるマクロファージ数及び線維化面積率を比較すると、有意な差は見られなかったが、LP/LP/Frの両者の値は増加傾向であった。過剰のフルクトースを摂取した成獣ラットの腎臓では、マクロファージの浸潤や線維化の増大、尿細管間質性障害が報告されている^{18,75)}。それゆえ、離乳後にフルクトース負荷した仔ラットの腎臓において炎症や線維化が生じていると推察された。これに対してLP/Cur/Frのマクロファージ数及び線維化面積率はLP/LP/Frに比べて有意に減少した。この結果は、乳児期に摂取するクルクミンは、離乳後のフルクトース負荷による腎障害を抑制することを示していた。

高血糖症や高トリグリセリド血症は、酸化ストレスを増加する^{17,76)}。また、血漿中のMDAとTg濃度には正の相関関係があるという⁷⁶⁾。そこで、離乳後にフルクトース負荷した雌性仔ラットにおいて酸化ストレスが生じているか調べた。LP/LP/WとNP/NP/Wの血漿MDA濃度を比較すると、有意な差は認められなかったが、LP/LP/WのMDA濃度はやや増加していた。上述したようにフルクトース負荷により酸化ストレスが増加することは知られているが、胎児期及び乳児期に低栄養に曝された場合においても酸化ストレスは亢進する^{77,78)}。それゆえ、本研究においても胎児期及び乳児期の低タンパク質食の摂食により酸化ストレスが亢進したと考えられた。また、LP/LP/FrのMDA濃度はLP/LP/Wに比べて有意に増加した。この結果は、フルクトース負荷は酸化ストレスを亢進するという報告と一致していた⁵⁴⁾。これに対して、LP/Cur/FrのMDA濃度はLP/LP/Frに比べて有意に減少した。クルクミンは、飼料中にフルクトース負荷したラットの血漿MDA濃度を低下する⁵⁴⁾。それゆえ、乳児期に摂取するクルクミンもまた、離乳後にフルクトース負荷した雌性仔ラットの血漿MDA濃度を低下させることが考えられた。

転写因子であるNrf2は抗酸化酵素の制御や細胞の酸化ストレスの抑制に重要な役割を担う⁷⁹⁾。マクロファージにグルコース負荷した*in vitro*実験において、Nrf2の過剰発現並びにNrf2活性化剤(フマル酸ジメチル)の添加が、酸化ストレス及び炎症を有意に抑制した⁸⁰⁾。この報告は、酸化ストレスを抑制するためには、Nrf2の発現並びに活性化が不可欠であることを示していた。本研究において、LP/Cur/FrのNrf2のタンパク質発現量はLP/LP/Frと比較して有意に増加した。これまで、クルクミンなどのポリフェノールとNrf2の活性に関連する報告は存在する。たとえば、腎炎モデルラットにクルクミンを投与すると、腎臓のNrf2の発現は増加し、酸化ストレスを抑制した⁵⁰⁾。また、ポリフェノールの一種であるレスベラトロールをストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットに投与すると、腎臓においてNrf2のmRNA量が増加し、さらにそのタンパク質発現量が増加して、高血糖により生じた酸化ストレスは抑制されたという⁸¹⁾。本研究の結果及びこれまでの報告から、乳児期に摂取したクルクミンは、仔ラットの腎臓のNrf2発現の制御において重要な役割を果たしていると考えられた。

Nrf2は、標的酵素であるHO-1、SOD及びGPxの遺伝子の転写を誘導する^{29,30)}。LP/Cur/Fr

の H0-1 及び SOD1 のタンパク質発現量は、LP/LP/Fr に比べて LP/Cur/Fr で有意に増加した。フルクトース負荷したラットにクルクミンを投与すると、その大動脈の H0-1 発現量は、増加したという⁸²⁾。また、ビスフェノール A によって誘発された腎障害ラットの腎臓においてクルクミンの投与により SOD 及び GPx 活性の上昇や脂質の過酸化の抑制が認められた⁸³⁾。ラットの糸球体細胞にカロテノイドであるアスタキサンチンを添加すると、Nrf2 の発現量が増加し、さらに H0-1 及び SOD1 の発現量が増加したという⁸⁴⁾。これらのことから、乳児期に摂取するクルクミンは、フルクトース負荷した仔ラットの腎臓の Nrf2 発現量の増加を介して H0-1 及び SOD1 の発現量を増加することが示唆された。

本研究において、LP/Cur/Fr の GSH 量並びに GPx 活性は LP/LP/Fr に比べて有意に増加した。虚血/再灌流によって誘発した腎障害ラットにクルクミンを投与すると、GSH 量及び GPx 活性は増加した⁸⁵⁾。Nrf2 は GSH 合成酵素の発現を増加し、GSH の合成を促すことが知られている⁸⁶⁾。たとえば、糖尿病性腎症モデルラットにスイバ属の *Rumex nervosus* 抽出物を投与すると、Nrf2 発現量の増加に伴い GSH 量が増加したという報告がある⁸⁷⁾。これらのことから、乳児期に摂取したクルクミンは、フルクトース負荷した仔ラットの腎臓の Nrf2 の発現に関連して GSH 量や GPx 活性を増加することが示唆された。

なぜ、乳児期に摂取するクルクミンは胎児期及び乳児期に低栄養に曝され離乳後にフルクトース負荷された雌性仔ラットの腎臓で Nrf2 をアップレギュレートしたか、次のことが仮説として考えられた。クルクミンは、エピジェネティクス修飾の一つである DNA のメチル化に関与していることが知られている⁵⁶⁾。例えば、クルクミンは乳がん細胞であるヒト乳癌細胞 MCF7 及び MDA-MB-231 細胞へ添加すると、DNMT 活性の阻害をした⁸⁸⁾。また、クルクミンをマウス前立腺培養細胞へ添加すると、DNMT 活性の阻害及び Nrf2 遺伝子のプロモーターの CpG 領域の低メチル化を介して Nrf2 の発現を誘導したという報告がある⁶¹⁾。これらのことから、本研究において、仔ラットの腎臓の Nrf2 発現に関連した DNA メチル化の程度や DNMT 活性に及ぼすクルクミンの影響を検討する必要はあるが、乳児期に摂取するクルクミンは、少なくとも、雌性仔ラットの腎臓において DNA のメチル化を介して Nrf2 を制御する可能性が推察された。

本研究の限界として以下のことが挙げられる。第一に、乳児期にクルクミンを与え、胎児期及び乳児期に 20%カゼイン含有飼料(正常食)で飼育し、離乳後に蒸留水もしくはフルクトース負荷を与えた群を設けなかった。それゆえ、本研究の結果から、胎児期及び乳児期に低栄養に曝され、離乳後にフルクトース負荷された腎臓に及ぼすクルクミンの知見は得られたが、乳児期に摂取するクルクミンが腎障害を直接誘発するとされるフルクトースのみを負荷された腎臓へ及ぼす影響は不明である。また、フルクトース負荷などの影響を受けなかった場合において乳児期に摂取するクルクミンはどのような影響を腎臓に与えるかも不明である。第二に、マクロファージ浸潤や線維化面積を調べることで、フルクトース負荷により、腎障害が生じていたことは明らかになったが、乳児期に摂取したクルクミンが、フルクトース負荷により生じる炎症や線維化を抑制する作用機序は不明である。それゆえ、炎症に関する転写因子である nuclear factor-kappa B (NF- κ B) や TNF- α 、TGF- β 並びに MCP1 などサイトカイン量を測定してそれらの作用機序を検討する必要がある。第三に、乳児期に摂取したクルクミンが Nrf2 のタンパク発現量を増加することは明らかになったが、なぜ、離乳後もその発現が持続したのかは不明である。今後、エピジェネティクス修飾に関与する

因子、たとえば、DNA のメチル化の程度などを検討する必要がある。

第 5 章 結論

本研究では、発育初期に摂取するクルクミンの生理機能を明らかにするために、胎児期及び乳児期に低栄養に曝され、離乳後にフルクトース負荷された雌性仔ラットの腎臓の Nrf2 及び Nrf2 標的抗酸化酵素の発現や活性に及ぼす乳児期に摂取するクルクミンの影響を検討した。本研究から、(Ⅰ)転写因子である Nrf2 のタンパク質発現量は増加した。(Ⅱ)Nrf2 の標的抗酸化酵素である HO-1 及び SOD1 のタンパク質発現量は増加した。(Ⅲ)GSH 量及び GPx 活性は増加した。(Ⅳ)血漿中 MDA 濃度は減少した。(Ⅴ)血漿中 Glc 及び Tg 濃度は減少した。以上のことが明らかになった。

これらの結果から、乳児期に摂取したクルクミンは、離乳後にフルクトース負荷された雌性仔ラットの腎臓の Nrf2 発現量の増加を介して、Nrf2 の標的抗酸化酵素である HO-1 及び SOD1 の発現を、また GPx 活性を高めて腎臓の酸化ストレスを抑制することが示唆された(図 20)。

本研究の知見から、乳児期に摂取するクルクミンは、その子の出生後のフルクトースの過剰摂取に起因する腎疾患の有用な予防策になると考えられた。

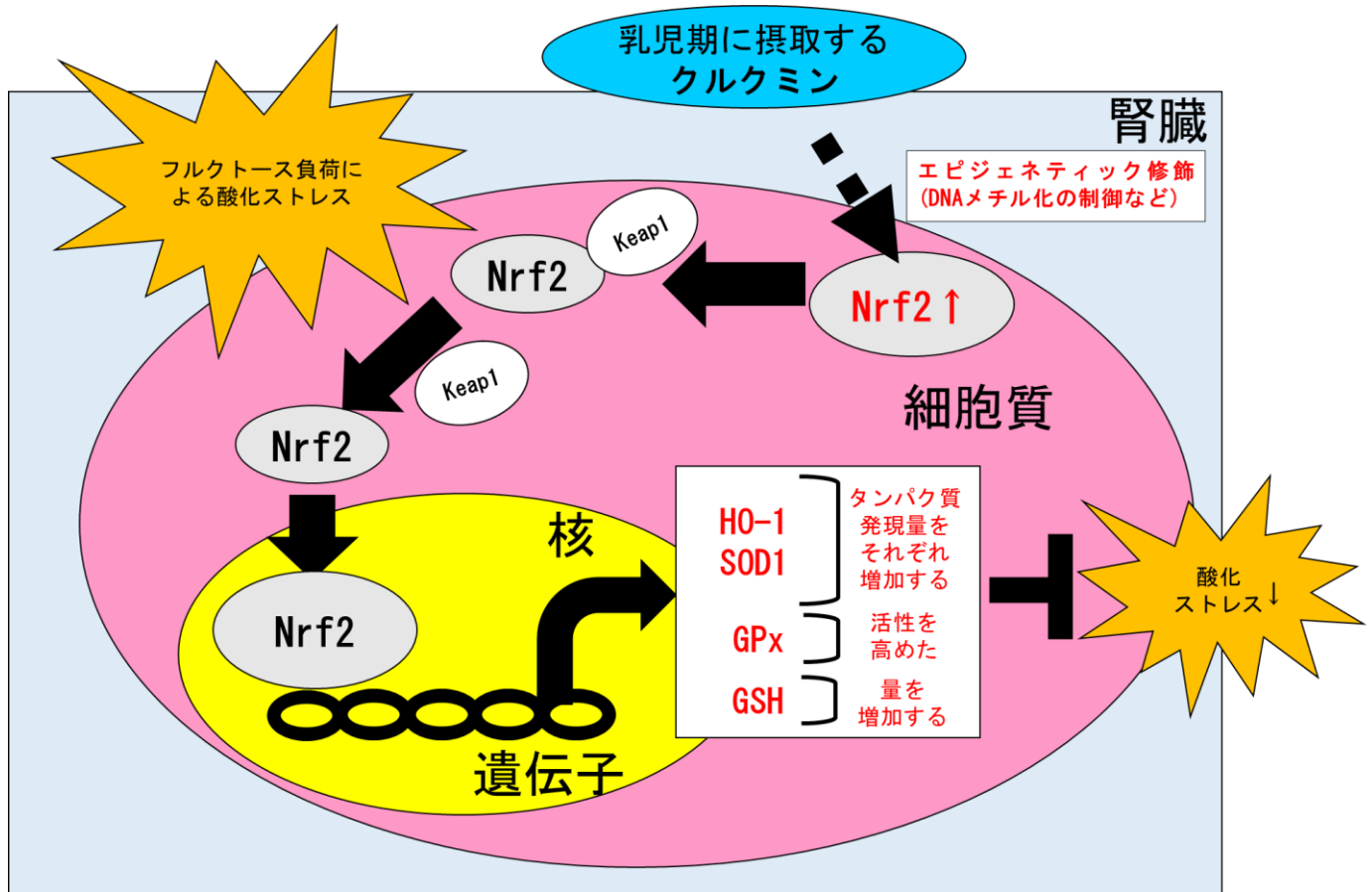


図 20 胎児期及び乳児期の低栄養に曝され、離乳後にフルクトース負荷された雌性仔ラットの腎臓の Nrf2 及びその標的抗酸化酵素の発現や活性に及ぼすクルクミンの影響に関するまとめ

乳児期に摂取するクルクミンは、胎児期及び乳児期の低栄養に曝され、離乳後にフルクトース負荷された雌性仔ラットの腎臓の細胞において、エピジェネティック修飾 (DNA メチル化の制御など) を介して、Nrf2 発現量を増加し、次いで Nrf2 の標的抗酸化酵素である HO-1 や SOD1 の発現量を、さらに GPx 活性や GSH 量を高めて、腎臓の酸化ストレスを抑制することが示唆された。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始変わらぬ丁寧かつ熱心なご指導ならびにご鞭撻を頂きました青森県立保健大学 教授 佐藤伸先生に深く感謝の意を表します。また、本論文の審査に際して、有益な助言を頂いた前青森県立保健大学 教授 飯島美夏先生、神奈川県立保健福祉大学 教授 向井友花先生、青森県立保健大学 准教授 井澤弘美先生に御礼申し上げます。実験にご協力いただきました、青森県立保健大学佐藤研究室佐々木琴美さん、佐藤李香さん、西田朱里さん、佐々木結南さんに深く感謝致します。本研究にあたり、実験のサポートをして頂いた、玉熊敬子さんに深く感謝致します。

参考文献

- 1) Musso G, Cassader M, Cohnen S, De Michieli F, Pinach S, Saba F, Gambino R. Fatty liver and chronic kidney disease:novel mechanistic insights and therapeutic opportunities. *Diabetes Care*. 39(10). 1830–1845. 2016.
- 2) Aragno M, Mastrocola R. Dietary sugars and endogenous formation of advanced glycation endproducts:emerging mechanisms of disease. *Nutrients*. 9(4). 385. 2017.
- 3) Vieira F O, Leal V de O, Stockler-Pinto M B, Barros A de F, Borges N A, Lobo J C, Mafra D. Fructose intake:is there an association with uric acid levels in nondialysis-dependent chronic kidney disease patients?. *Nutr Hos*. 31(2). 772–777. 2014.
- 4) Yu L, Zhou H, Zheng F, Son J, Lu Y, Yu X, Zhao C. Sugar is the key cause of overweight/obesity in sugar-sweetened beverages (SSB). *Front Nutr*. 9. 885704. 2022.
- 5) World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/sugar-guideline/en/>. 2015. (Accessed:4th December 2022)
- 6) Hannou S A, Haslam D E, McKeown M N, Herman A M. Fructose metabolism and metabolic disease. *J Clin Invest*. 128(2). 545–555. 2018.
- 7) Federico A, Rosato V, Masarone M, Torre P, Dallio M, Romeo M, Persico M. The role of fructose in non-alcoholic steatohepatitis:old relationship and new insights. *Nutrients*. 13(4). 1314. 2021.
- 8) Nakagawa T, Johnson R J, Andres-Hernando A, Roncal-Jimenez C, Sanchez-Lozada L G, Tolan D R, Lanasa M A. Fructose production and metabolism in the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 31(5). 898–906. 2020.
- 9) Ter Horst K W, Serlie M J. Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*. 9(9). 981. 2017.
- 10) Taskinen M R, Packard C J, Borén J. Dietary fructose and the metabolic syndrome. *nutrients*. 11(9). 1987. 2019.
- 11) Merino B, Fernández-Díaz C M, Cózar-Castellano I, Perdomo G. Intestinal fructose and glucose metabolism in health and disease. *Nutrients*. 12(1). 94. 2019.
- 12) Wang M, Hu R, Wang Y, Liu L, You H, Zhang J, Wu X, Pei T, Wang F, Lu L, Xiao W, Wei L. Atractylenolide III attenuates muscle wasting in chronic kidney disease via the oxidative stress-mediated PI3K/AKT/mTOR pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2019. 1875471. 2019.
- 13) Ali B H, Al-Salam S, Al Suleimani Y, Al Kalbani J, Al Bahlani S, Ashique M, Manoj P, Al Dhahli B, Al Abri N, Naser H T, Yasin J, Nemmar A, Al Za'abi M, Hartmann C, Schupp N. Curcumin ameliorates kidney function and oxidative stress in experimental chronic kidney disease. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 122(1). 65–73. 2018.

- 14) Ebert T, Pawelzik S C, Witasp A, Arefin S, Hobson S, Kublickiene K, Shiels P G, Bäck M, Stenvinkel P. Inflammation and premature ageing in chronic kidney disease. *Toxins (Basel)*. 12(4). 227. 2020.
- 15) Madlala H P, Maarman G J, Ojuka E. Uric acid and transforming growth factor in fructose-induced production of reactive oxygen species in skeletal muscle. *Nutr Rev*. 74(4). 259-266. 2016.
- 16) Bratoeva K, Stoyanov G S, Merdzhanova A, Radanova M. Manifestations of renal impairment in fructose-induced metabolic syndrome. *Cureus*. 9(11). e1826. 2017.
- 17) Hozayen W G, Mahmoud A M, Soliman H A, Mostafa S R. *Spirulina versicolor* improves insulin sensitivity and attenuates hyperglycemia-mediated oxidative stress in fructose-fed rats. *J Intercult Ethnopharmacol*. 5(1). 57-64. 2016.
- 18) Oudot C, Lajoix A D, Jover B, Rugale C. Dietary sodium restriction prevents kidney damage in high fructose-fed rats. *Kidney Int*. 83(4). 674-683. 2013.
- 19) Lin L, Tan W, Pan X, Tian E, Wu Z, Yang J. Metabolic syndrome-related kidney injury: a review and update. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 13. 904001. 2022.
- 20) Eid B G, Neamatallah T, Hanafy A, El-Bassossy H M, Binmahfouz L, Aldawsari H M, Hasan A, El-Aziz G A, Vemuri K, Makriyannis A. Interference with TGF β 1-mediated inflammation and fibrosis underlies reno-protective effects of the CB1 receptor neutral antagonists AM6545 and AM4113 in a rat model of metabolic syndrome. *Molecules*. 26(4). 866. 2021
- 21) Duni A, Liakopoulos V, Roumeliotis S, Peschos D, Dounousi E. Oxidative stress in the pathogenesis and evolution of chronic kidney disease: untangling ariadne's thread. *Int J Mol Sci*. 20(15). 3711. 2019.
- 22) Hu Z, Ren L, Wang C, Liu B, Song G. Effect of chenodeoxycholic acid on fibrosis, inflammation and oxidative stress in kidney in high-fructose-fed Wistar rats. *Kidney Blood Press Res*. 36(1). 85-97. 2012.
- 23) Vaiserman A, Lushchak O. Prenatal famine exposure and adult health outcomes: an epigenetic link. *Environ Epigenet*. 7(1). 1-5. 2021.
- 24) Gluckman P D, Hanson M A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science*. 305(5691). 1733-1736. 2004.
- 25) Nüsken E, Voggel J, Fink G, Dötsch J, Nüsken K D. Impact of early-life diet on long-term renal health. *Mol Cell Pediatr*. 7(1). 17. 2020.
- 26) Huang C, Guo C, Nichols C, Chen S, Martorell R. Elevated levels of protein in urine in adulthood after exposure to the Chinese famine of 1959-61 during gestation and the early postnatal period. *Int J Epidemiol*. 43(6). 1806-1814. 2014.
- 27) Vikse B E, Irgens L M, Leivestad T, Hallan S, Iversen B M. Low birth weight increases risk for end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 19(1). 151-157. 2008.
- 28) Saha S, Buttari B, Panieri E, Profumo E, Saso L. An overview of Nrf2 signaling

- pathway and its role in inflammation. *Molecules*. 25(22). 5474. 2020.
- 29) Rangasamy T, Cho C Y, Thimmulappa R K, Zhen L, Srisuma S S, Kensler T W, Yamamoto M, Petrache I, Tuder R M, Biswal S. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest*. 114(9). 1248-1259. 2004.
- 30) He X, Ma Q. Redox regulation by nuclear factor erythroid 2-related factor 2: gatekeeping for the basal and diabetes-induced expression of thioredoxin-interacting protein. *Mol Pharmacol*. 82(5). 887-897. 2012.
- 31) Li W, Yu S, Liu T, Kim J H, Blank V, Li H, Kong A N. Heterodimerization with small Maf proteins enhances nuclear retention of Nrf2 via masking the NESzip motif. *Biochim Biophys Acta*. 1783(10). 1847-1856. 2008.
- 32) Ge M H, Tian H, Mao L, Li D Y, Lin J Q, Hu H S, Huang S C, Zhang C J, Mei X F. Zinc attenuates ferroptosis and promotes functional recovery in contusion spinal cord injury by activating Nrf2/GPX4 defense pathway. *CNS Neurosci Ther*. 27(9). 1023-1040. 2021.
- 33) Detsika M G, Lianos E A. Regulation of complement activation by heme oxygenase-1 (HO-1) in kidney injury. *Antioxidants (Basel)*. 10(1). 60. 2021.
- 34) Chiang S K, Chen S E, Chang L C. The role of HO-1 and its crosstalk with oxidative stress in cancer cell survival. *Cells*. 10(9). 2401. 2021.
- 35) Otterbein L E, Bach F H, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis R J, Flavell R A, Choi A M. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med*. 6(4). 422-428. 2000.
- 36) Kakuta Y, Okumi M, Isaka Y, Tsutahara K, Abe T, Yazawa K, Ichimaru N, Matsumura K, Hyon S H, Takahara S, Nonomura N. Epigallocatechin-3-gallate protects kidneys from ischemia reperfusion injury by HO-1 upregulation and inhibition of macrophage infiltration. *Transpl Int*. 24(5). 514-522. 2011.
- 37) Kwak J Y, Takeshige K, Cheung B S, Minakami S. Bilirubin inhibits the activation of superoxide-producing NADPH oxidase in a neutrophil cell-free system. *Biochim Biophys Acta*. 1076(3). 369-373. 1991.
- 38) Lanone S, Bloc S, Foresti R, Almolki A, Taillé C, Callebort J, Conti M, Goven D, Aubier M, Dureuil B, El-Benna J, Motterlini R, Boczkowski J. Bilirubin decreases nos2 expression via inhibition of NAD(P)H oxidase: implications for protection against endotoxic shock in rats. *FASEB J*. 19(13). 1890-1892. 2005.
- 39) Fukui T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*. 15(6). 1583-1606. 2011.
- 40) Miao L, St Clair D K. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*. 47(4). 344-356. 2009.
- 41) Li Q, Xu Q, Tan J, Hu L, Ge C, Xu M. Carminic acid supplementation protects against fructose-induced kidney injury mainly through suppressing inflammation

- and oxidative stress via improving Nrf-2 signaling. *Aging*. 13(7). 10326-10353. 2021.
- 42) Vogel H, Pelletier J. Curcumin-biological and medicinal properties. *J Pharma*. 2. 50. 1815.
 - 43) Vogel A Jr. *Journal de Pharma. et de Chemie*. 3. 20. 1842.
 - 44) Trujillo J, Chirino Y I, Molina-Jijón E, Andérica-Romero A C, Tapia E, Pedraza-Chaverrí J. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: recent findings. *Redox Biol*. 1(1). 448-456. 2013.
 - 45) Choi B H, Kang K S, Kwak M K. Effect of redox modulating NRF2 activators on chronic kidney disease. *Molecules*. 19(8). 12727-12759. 2014.
 - 46) He Y, Yue Y, Zheng X, Zhang K, Chen S, Du Z. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked?. *Molecules*. 20(5). 9183-9213. 2015.
 - 47) Maithilikarpagaselvi N, Sridhar M G, Swaminathan R P, Sripradha R, Badhe B. Curcumin inhibits hyperlipidemia and hepatic fat accumulation in high-fructose-fed male Wistar rats. *Pharm Biol*. 54(12). 2857-2863. 2016.
 - 48) Pan Y, Zhao D, Yu N, An T, Miao J, Mo F, Gu Y, Zhang D, Gao S, Jiang G. Curcumin improves glycolipid metabolism through regulating peroxisome proliferator activated receptor γ signalling pathway in high-fat diet-induced obese mice and 3T3-L1 adipocytes. *R Soc Open Sci*. 15. 4(11). 170917. 2017
 - 49) Jazayeri-Tehrani S A, Rezayat S M, Mansouri S, Qorbani M, Alavian S M, Daneshi-Maskooni M, Hosseinzadeh-Attar M J. Nano-curcumin improves glucose indices, lipids, inflammation, and Nesfatin in overweight and obese patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a double-blind randomized placebo-controlled clinical trial. *Nutr Metab (Lond)*. 16. 8. 2019.
 - 50) Di Tu Q, Jin J, Hu X, Ren Y, Zhao L, He Q. Curcumin improves the renal autophagy in rat experimental membranous nephropathy via regulating the PI3K/AKT/mTOR and Nrf2/HO-1 signaling pathways. *Biomed Res Int*. 2020. 7069052. 2020.
 - 51) Yarru L P, Settivari R S, Gowda N K, Antoniou E, Ledoux D R, Rottinghaus G E. Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on the expression of hepatic genes associated with biotransformation, antioxidant, and immune systems in broiler chicks fed aflatoxin. *Poult Sci*. 88(12). 2620-2627. 2009.
 - 52) Banning A, Deubel S, Kluth D, Zhou Z, Brigelius-Flohé R. The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol Cell Biol*. 25(12). 4914-4923. 2005.
 - 53) Barzegar A, Moosavi-Movahedi A A. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. *PLoS One*. 6(10). e26012. 2011.
 - 54) Maithili Karpaga Selvi N, Sridhar M G, Swaminathan R P, Sripradha R. Curcumin attenuates oxidative stress and activation of redox-sensitive kinases in high fructose- and high-fat-fed male Wistar rats. *Sci Pharm*. 83(1). 159-175. 2014.
 - 55) Ayala A, Muñoz M F, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism,

- and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014. 360438. 2014.
- 56) Boyanapalli S S, Kong A T. "Curcumin, the king of spices": epigenetic regulatory mechanisms in the prevention of cancer, neurological, and inflammatory diseases. *Curr Pharmacol Rep*. 1(2). 129-139. 2015.
 - 57) Brenet F, Moh M, Funk P, Feierstein E, Viale A J, Socci N D, Scandura J M. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS One*. 6(1). e14524. 2011.
 - 58) Moore L D, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 38(1). 23-38. 2013.
 - 59) Yu Y, Blair S, Gillespie D, Jensen R, Myszka D, Badran A H, Ghosh I, Chagovetz A. Direct DNA methylation profiling using methyl binding domain proteins. *Anal Chem*. 82(12). 5012-5029. 2010.
 - 60) Bhattacharjee S, Dashwood R H. Epigenetic regulation of NRF2/KEAP1 by phytochemicals. *Antioxidants (Basel)*. 9(9). 865. 2020.
 - 61) Khor T O, Huang Y, Wu T Y, Shu L, Lee J, Kong A N. Pharmacodynamics of curcumin as DNA hypomethylation agent in restoring the expression of Nrf2 via promoter CpGs demethylation. *Biochem Pharmacol*. 82(9). 1073-1078. 2011.
 - 62) Ganiger S, Malleshappa H N, Krishnappa H, Rajashekhar G, Ramakrishna Rao V, Sullivan F. A two generation reproductive toxicity study with curcumin, turmeric yellow, in Wistar rats. *Food Chem Toxicol*. 45(1). 64-69. 2007.
 - 63) THERAVALUES : セラクルミン®の安全性: https://theravalues.co.jp/business_products/theracurmin/. (Accessed: 1th December 2022)
 - 64) Yamamoto Y, Takahashi K. Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides. *Arch Biochem Biophys*. 305(2). 541-545. 1993.
 - 65) Yamamoto Y, Takekoshi Y, Itami N, Honjo T, Kojima H, Yano S, Takahashi H, Saito I, Takahashi K. Enzyme-linked immunosorbent assay for extracellular glutathione peroxidase in serum of normal individuals and patients with renal failure on hemodialysis. *Clin Chim Acta*. 236(1). 93-99. 1995.
 - 66) Nishida K, Watanabe H, Murata R, Tokumaru K, Fujimura R, Oshiro S, Nagasaki T, Miyahisa M, Hiramoto Y, Nosaki H, Imafuku T, Maeda H, Fukagawa M, Maruyama T. Recombinant long-acting thioredoxin ameliorates AKI to CKD transition via modulating renal oxidative stress and inflammation. *Int J Mol Sci*. 22(11). 5600. 2021.
 - 67) Kataoka S, Norikura T, Sato S. Maternal green tea polyphenol intake during lactation attenuates kidney injury in high-fat-diet-fed male offspring programmed by maternal protein restriction in rats. *J Nutr Biochem*. 56. 99-108. 2018.
 - 68) Kapar F S, Ciftci G. The effects of curcumin and *Lactobacillus acidophilus* on certain hormones and insulin resistance in rats with metabolic syndrome. *J*

- Diabetes Metab Disord. 19(2). 907-914. 2020.
- 69) Teff K L, Elliott S S, Tschöp M, Kieffer T J, Rader D, Heiman M, Townsend R R, Keim N L, D'Alessio D, Havel P J. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(6). 2963-2972. 2004.
- 70) Flisiński M, Brymora A, Skoczylas-Makowska N, Stefańska A, Manitius J. Fructose-rich diet is a risk factor for metabolic syndrome, proximal tubule injury and urolithiasis in rats. *Int J Mol Sci.* 23(1). 203. 2021.
- 71) Rebholz C M, Young B A, Katz R, Tucker K L, Carithers T C, Norwood A F, Correa A. Patterns of beverages consumed and risk of incident kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 14(1). 49-56. 2019.
- 72) Liu X, Gao L, Huang X, Deng R, Wei X, Lu J, Li S. Lipidomics reveals the potential mechanism of honokiol against adenine-induced chronic kidney disease. *Front Pharmacol.* 13. 1019629. 2022.
- 73) Woods L L, Weeks D A, Rasch R. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction:role of nephrogenesis. *Kidney Int.* 65(4).1339-1348. 2004.
- 74) Mino M, Nakamura J, Nakamuta N, Morioka H, Morikawa Y, Okada T. Effects of low protein intake on the development of the remaining kidney in subtotaly nephrectomized immature rats:apoptosis and epidermal growth factor. *J Vet Med Sci.* 69(3). 247-252. 2007.
- 75) Nakayama T, Kosugi T, Gersch M, Connor T, Sanchez-Lozada L G, Lanaspa M A, Roncal C, Perez-Pozo S E, Johnson R J, Nakagawa T. Dietary fructose causes tubulointerstitial injury in the normal rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 298(3). F712-720. 2010.
- 76) Sharma D, Garg S, Mehndiratta M, V Madhu S, Puri D. Relationship of serum apolipoprotein A-V levels, oxidative stress and inflammatory biomarkers with hypertriglyceridemia in type 2 diabetes mellitus. *Int J Endocrinol Metab.* 15(2). e44805. 2017.
- 77) Vieira-Filho L D, Cabral E V, Farias J S, Silva P A, Muzi-Filho H, Vieyra A, Paixão A D. Renal molecular mechanisms underlying altered Na⁺ handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. *Br J Nutr.* 111(11). 1932-1944. 2014.
- 78) Watanabe I K M, Jara Z P, Volpini R A, Franco M D C, Jung F F, Casarini D E. Up-regulation of renal renin-angiotensin system and inflammatory mechanisms in the prenatal programming by low-protein diet:beneficial effect of the post-weaning losartan treatment. *J Dev Orig Health Dis.* 9(5). 530-535. 2018.
- 79) Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1865(5). 721-733. 2018.
- 80) Li M, Yu H, Pan H, Zhou X, Ruan Q, Kong D, Chu Z, Li H, Huang J, Huang X, Chau A, Xie W, Ding Y, Yao P. Nrf2 suppression delays diabetic wound healing through

- sustained oxidative stress and inflammation. *Front Pharmacol.* 10. 1099. 2019.
- 81) Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. *Biochim Biophys Acta.* 1812(7). 719-731.2011.
- 82) El-Bassossy H M, Hassan N, Zakaria M N. Heme oxygenase-1 alleviates vascular complications associated with metabolic syndrome:effect on endothelial dependent relaxation and NO production. *Chem Biol Interact.* 223. 109-115. 2014.
- 83) Aslanturk A, Uzunhisarcikli M. Protective potential of curcumin or taurine on nephrotoxicity caused by bisphenol A. *Environ Sci Pollut Res Int.* 27(19). 23994-24003. 2020.
- 84) Xie X, Chen Q, Tao J. Astaxanthin promotes Nrf2/ARE signaling to inhibit HG-induced renal fibrosis in GMCs. *Mar Drugs.* 16(4). 117. 2018.
- 85) Cui X, Lin L, Sun X, Wang L, Shen R. Curcumin protects against renal ischemia /reperfusion injury by regulating oxidative stress and inflammatory response. 2021(1). 8490772. 2021.
- 86) Lu S C. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 30(1-2). 42-59. 2009.
- 87) Al Mousa L A, Al Faris N A, Al shammari G M, Al sayadi M, AL Tamimi J Z, Al agal R I, Yahya M A. Rumex nervosus could alleviate streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats by activating Nrf2 signaling. *Sci Prog.* 105(2). 368504221102751. 2022.
- 88) Mirza S, Sharma G, Parshad R, Gupta S D, Pandya P, Ralhan R. Expression of DNA methyltransferases in breast cancer patients and to analyze the effect of natural compounds on DNA methyltransferases and associated proteins. *J Breast Cancer.* 16(1). 23-31. 2013.