

## A. 研究目的

ヘルシーリセッタ® (HR、日清オイリオ) は、菜種油にココナツ油やパーム油を配合することで中鎖脂肪酸含量を増した製品であり、ヘルシーコレステ® (HC、日清オイリオ) は米油と菜種油に植物胚芽ステロールを加えた製品である。一方、健康サララ® (KS、味の素) は、ダイズ油にダイズ胚芽ステロールを添加した製品で、菜種油由来の成分を含まない。

雄性脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) では、カノーラ (菜種) 油摂取により生存期間が短縮し、昇圧促進、腎傷害促進に加え、ステロイドホルモン代謝への影響が認められる (1) (学会報告 1-3, 5)。カノーラ油の有害効果が植物ステロール含量に依存するという報告があることから (2)、カノーラ油およびカノーラ油由来の植物ステロールの影響を確認することは、これらの製品の安全性を評価するうえで意義がある。

平成24年度の研究では、雄性 SHRSPに、HR、HCまたはKSを唯一の脂肪源として4週間与え、精巢のステロイドホルモンレベルへの影響を検討した。その結果、顕著な変化は認められなかった。しかし、カノーラ油を摂取した雄性 SHRSPでは、精巢プレグネノロンおよびテストステロンの低下が認められていることから (学会報告 1-3)、平成25年度研究では、カノーラ油摂取雄性 SHRSPにおけるステロイド産生急性調節タンパク質 (StAR)、CYP11A、CYP17遺伝子の発現をダイズ油摂取 (対照) 群と比較することを目的とした。また、糖尿病モデル (ob/ob) マウスに、HR、HCまたはKSを唯一の脂肪源とした場合の精巢におけるステロイドホルモン代謝に対する影響の有無を調べるために、摂取期間終了後に精巢を摘出して凍結保管した。

## B. 研究方法

SHRSPを用いたカノーラ油とダイズ油のステロイドホルモン代謝に及ぼす影響の検討

5週齢の雄 SHRSP (Izm、エスエルシー) 6匹を、1週間の検疫馴化期間後、3匹ずつ2群に分け、それぞれの群に、AIN-93 G組成の標準精製飼料の油脂成分をダイズ油に代えた飼料 (対照) またはカノーラ油に代えた飼料 (日本クレア) を8週間自由摂取させた。飲水も自由摂取とした。飼料中の油脂量は10w/w%とした。飼育施設の環境は温度22.0~25.0°C、湿度10.0~70.0%、12時間照明である。

摂取期間終了後、動物をペントバルビタールナトリウムで麻酔し、精巢を摘出して、実験実施まで-80°Cで凍結保存した。

### SHRSP 精巢のミトコンドリア中 CYP11Aのウエスタンブロット

凍結した精巢組織を3倍量のリン酸緩衝液中でホモジナイズし、1000×g、4°Cで15分間遠心した上清を分取した。沈渣を再懸濁して同条件で遠心し、上清を得た。この操作を延べ3回繰り返し、プールした上清を10000×g、4°Cで45分間遠心し、沈渣のミトコンドリア分画を採取した。ミトコンドリア分画は、リン酸緩衝液に懸濁して適宜希釈してタンパク質濃度を測定した。

タンパク質量として4 μgのミトコンドリア分画をミニプロテアンゲル (バイオラッド) にロードして泳動し、PVDFメンブレンにブロット後、抗ラットP450 Sec 抗体 (ミリポア) を用いて検出した。タンパク質量の相対発現量は、ハウスキーピング遺伝子タンパク質のCOXIVおよびβアクチンを用いて算出した。

### PCRによるSHRSP 精巢のStAR、CYP11AおよびCYP17遺伝子発現の比較

凍結した精巢組織からTrizol (Ambion) でtotalRNAを抽出、定量後、High Capacity RNA-to-DNA kit (ABI) を用いて逆転写し、生成したcDNAを増幅後、StAR、CYP11AおよびCYP17遺伝子の発現量をTaqMan® Assay (ABI) を用い、Prism 7300 (ABI) で増幅し、比較した。対照にはGADPH遺伝子を用いた。

## マウスを用いた検討

雄性ob/obマウスおよびB57CL/6Jマウス(5週齢)を日本エスエルシーから購入し、1週間の検疫馴化期間後、体重および空腹時血糖値に基づき、それぞれを1群10~11匹からなる4群に分けた。これらを対照、HR、HCおよびKS群とし、それぞれの油脂を唯一の脂肪源として7w/w%含有する精製試料(オリエンタル酵母工業)を28日間自由摂取させた。対照群にはダイズ油を含有する精製飼料を与えた。摂取期間終了後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下に肝および精巢を摘出した。各動物の肝臓からは、Trizol(Ambion)でmRNAを抽出、精製して群毎にプールし、約24000の遺伝子発現を網羅的に調べて、パスウェイ解析を行った(3D-Gene、東レ)。摘出した臓器は実験実施まで-80°Cにて凍結保存した。

(倫理面への配慮)

本研究は、「金城学院大学動物実験指針」および「国立循環器病研究センター動物実験実施規定」に基づき、「金城学院大学動物実験委員会」および「国立循環器病研究センター実験委員会」による実験計画書の審査を経て、それぞれ、実験動物に対する動物愛護上の配慮等、倫理的配慮が適性であることが確認された後、実施許可されたものである。

## C. 研究結果

### SHRSP 精巢における CYP11A タンパク質の発現

実験結果を Figure 1~3 に示す。

カノーラ油摂取群の CYP11A タンパク質発現は、ダイズ油摂取群と比較し、有意に低下した。

### SHRSP 精巢における StAR、CYP11A および CYP17 遺伝子の発現

実験結果を Figure 4~6 に示す。

カノーラ油摂取群の精巢における StAR、CYP11A および CYP17 遺伝子発現はいずれもダイズ油摂取群と比較して有意に抑制された。

### マウスの肝における遺伝子発現のパスウェイ解析

HR 群では対照群との比較で関与遺伝子の発現が有意に上昇した経路が8、HC 群では19、KS 群では15認められた。一方、対照群に対し関与遺伝子の発現が有意に低下した経路がHR 群では18、HC 群では14、KS 群では5認められた。3群に共通して関与遺伝子の発現が有意に上昇した経路はなかった。HR 群とHC 群では3経路で、HC 群とKS 群では4経路で、それぞれ共通した関与遺伝子の有意な発現上昇が認められた。遺伝子発現の有意な低下により影響を受ける可能性がある経路には、3群で共通のものが1経路あった。HR 群とHC 群間では4経路で共通した関与遺伝子の有意な発現低下が認められた。HC 群とKS 群間では関与遺伝子の有意な発現低下がみられた共通の経路は無かった。

これらの中で、HR 群とHC 群においては関与遺伝子の発現低下が共通して認められた3経路では、脂肪酸の $\omega$ 酸化、 $\beta$ 酸化の抑制(Figure 7)、ブラジキニン受容体の発現低下によるアンジオテンシンII作用の相対的強化(Figure 8)、エストロゲンの分解抑制(Figure 9)の可能性が示唆された。

## D. 考察

カノーラ油摂取が雄性 SHRSP の生存期間を短縮する背景には、昇圧の促進、腎や心の組織傷害の促進につながる SHRSP の遺伝的病態の悪化がある(3)。SHRSP の由来系統である高血圧自然発症ラット(SHR)、WKYラットでも、血小板数の低下や血脂の上昇などが認められ、循環機能および血液凝固系への影響が推定される(4-6)。雄性 SHRSP では、対照のダイズ油摂取群に比べ、カノーラ油摂取群で血漿中アルドステロン濃度の上昇、テストステロン濃度の低下、インスリン感受性の低下(学会報告3)が認められた。従って、カノーラ油摂取は、雄性 SHRSP において、ステロイドホルモン代謝に影響を及ぼし、アルドステロンレベルの上昇に伴うインス

リン感受性の低下が、血管腎の傷害を促進する可能性が疑われた。血漿中アルドステロン濃度の上昇は、他系統の Wistar ラットでも確認されている (7)。

カノーラ油中にこれらの有害効果の原因物質があるとすれば、原料としてカノーラ (菜種) 油を使用した製品の安全性は、カノーラ油の有害性を考慮して評価すべきである。

平成 24 年度の研究結果から、HR、HC または KS が、雄性 SHRSP の精巣ステロイド代謝に著しい影響を及ぼさないことが示唆されたが、プレグネノロン、アンドロステンジオンおよびテストステロンは、いずれのトクホ摂取群でも上昇する傾向がみられ、HC 摂取群ではプレグネノロン濃度の有意な上昇が認められたことより、摂取油脂またはその含有物がステロイドホルモンの生合成に影響を及ぼしている可能性は除外できなかった (平成 24 年度本研究報告)。混餌摂取させた場合の 1 日油脂摂取量に相当する量を 4 週間強制経口投与した際にも、血圧、血液凝系および血管平滑筋の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性への影響が認められたこと (8, 9) から、油脂摂取の影響が顕われる場合は、4 週間の摂取でも変化が見られるであろうが、摂取期間を延長すれば、影響がさらに明瞭になったかもしれない。

平成 25 年度は、これまで SHRSP で認められている、カノーラ油摂取による精巣ステロイドホルモン代謝への影響を、生化学的に明確にするため、雄性 SHRSP に油脂含油飼料を 8 週間摂取させ、精巣の CYP11A タンパク質発現量をダイズ油摂取群と比較したところ、カノーラ油群で有意な抑制が認められた。また、PCR による遺伝子発現の解析では、コレステロールをミトコンドリアへ取り込む際に働くタンパク質である StAR、コレステロール側鎖切断酵素である CYP11A およびプレグネノロンからアンドロステンジオンなどのアンドロゲン生成に関わる CYP17 の遺伝子に注目したが、いずれの遺伝子もカノーラ油摂取群ではダイズ油摂取群と比較し、有意に低下した。従って、SHRSP 精巣では StAR の発現が抑制さ

れて、その下流のステロイド代謝系が抑制されるか、または、これら 3 酵素とも、その発現が抑制されている可能性が示唆された。CYP17A の活性にはカノーラ油摂取群で抑制傾向がみとめられている (学会報告 2)。今後、StAR 発現量、CYP11A 活性、CYP17 タンパク質発現量を確認する必要がある。

今年度は ob/ob マウスの肝から抽出した mRNA を用い、パスウェイ解析を行ったが、関与遺伝子の有意な変化があった経路で、カノーラ (菜種) 油を原料とした HR および HC 摂取群で共通しており、KS 摂取群では認められなかった CYP1a2、ブラジキニン受容体遺伝子 *Bdkrb2* の発現低下である。これらの変化は、3 つの経路に影響を及ぼす可能性がある。すなわち、CYP1a2 発現低下によって脂肪酸分解 ( $\omega$ 酸化、 $\beta$ 酸化) およびエストロゲン分解の抑制、ブラジキニン受容体発現低下によるアンギオテンシン II 作用に拮抗するブラジキニン受容体を經由した血管弛緩反応の促進である。脂肪酸代謝への影響、アンギオテンシン II 作用の増強の可能性については、これまで SHR で認められたカノーラ油摂取による肝 G6PD 活性 (6)、SHRSP で認められた血脂の上昇、血圧上昇の促進 (3, 9) とどのような関連があるか検討する余地がある。また、ob/ob マウスおよび SHRSP は、ともに糖尿病モデルであるため、インスリン作用の変化が病態に及ぼす影響の解析が求められる。さらに、エストロゲン代謝への影響と、これまでに認められている SHRSP でのステロイドホルモン代謝の変化との関連については、今後さらに検討が必要である。

平成 24 年度の研究で、雄性 SHRSP の精巣ステロイド代謝に著しい影響は及ぼさないことが示唆されたが、プレグネノロン、アンドロステンジオンおよびテストステロンは、これらのトクホ摂取群で上昇する傾向がみられ、HC 摂取群ではプレグネノロン濃度の有意な上昇が認められた。これらは、カノーラ油摂取によって SHRSP で認められた変化とは異なるが、SHRSP でも血清ではアンドロゲン以外のステロイドホルモン

レベルが上昇傾向を示し、副腎ではステロイドホルモン産生が亢進している可能性が示唆された（学会発表1-3）。カノーラ油を長期間摂取させたミニブタの肝におけるマイクロアレイ解析でもステロイドホルモン代謝経路に関与する酵素、タンパク質の遺伝子に影響が認められている（平成19年度～平成23年度私立大学学術研究高度化推進事業「脂質栄養と性差に関するオープン・リサーチ」研究成果報告書で報告）。

これらの結果から、植物油摂取がステロイドホルモン代謝に影響を及ぼすことが強く示唆される。今後は、作用の標的臓器に種差がある可能性を考慮した研究の展開が必要である。

#### E. 結論

平成24年度の研究成果から、雄性SHRSPにHR、HCまたはKSを唯一の脂肪源として4週間与えた際、精巢のプレグネノロン、アンドロステンジオンおよびテストステロンが、ダイズ油を与えた対照群より高値を示す傾向が見られ、HC摂取群ではプレグネノロンの増大が有意であった。これらの結果は、これらのトクホ油脂を4週間摂取した際、顕著ではないが、ステロイドホルモン代謝への影響があることを示している。しかし、SHRSPの精巢においては、カノーラ油摂取による顕著な影響が見られているので、平成25年度研究では、カノーラ油8週間摂取がSHRSPの精巢ステロイドホルモン代謝に関与するStAR、CYP11AおよびCYP17の遺伝子発現に及ぼす影響をダイズ油摂取群と比較し、顕著な抑制が見られることを確認した。ob/obマウスにおけるパスウェイ解析では、カノーラ油を原料とするHRおよびHCで脂肪酸代謝、血管反応およびエストロゲン代謝に関わる経路に影響を及ぼす可能性がある遺伝子の発現変化が認められた。ob/obマウスおよびSHRSPはともに糖尿病モデル動物であることから、インスリン感受性の変化、アルドステロンに対する反応の変化の確認、さらに、これらの変化とステロイド代謝へ

の影響の関連の有無について、今後、さらに検討したい。

#### (参考文献)

1. Okuyama H, Ohara N, Tatematsu K, Fuma S, Nonogaki T, Yamada K, Ichikawa Y, Miyazawa D, Yasui Y, Honma S. 2010. Testosterone-lowering activity of canola and hydrogenated soybean oil in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *J Toxicol Sci.* 35(5): 743-747.
2. Ratnayake WM, L'Abbé MR, Mueller R, Hayward S, Plouffe L, Hollywood R, Trick K. 2000. Vegetable oils high in phytosterols make erythrocytes less deformable and shorten the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.* 130(5): 1166-1178.
3. Naito Y, Nagata T, Takano Y, Nagatsu T, Ohara N. 2003. Rapeseed oil ingestion and exacerbation of hypertension-related conditions in stroke prone spontaneously hypertensive rats. *Toxicology* 187(2-3): 205-216.
4. Naito Y, Yoshida H, Nagata T, Tanaka A, Ono H, Ohara N. 2000. Dietary intake of rapeseed oil or soybean oil as the only fat nutrient in spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats - blood pressure and pathophysiology. *Toxicology* 146(2-3): 197-208.
5. Naito Y, Kasama K, Yoshida H, Ohara N. 2000. Thirteen-week dietary intake of rapeseed oil or soybean oil as the only dietary fat in Wistar Kyoto rats-change in blood pressure. *Food Chem Toxicol.* 38(9): 811-816.
6. Ohara N, Kasama K, Naito Y, Nagata T, Saito Y, Kuwagata M, Okuyama H. 2008. Different effects of 26-week dietary intake of rapeseed oil and soybean oil on plasma lipid levels, glucose-6-phosphate dehy-

drogenase activity and cyclooxygenase-2 expression in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem Toxicol.*46(7): 2573-2579.

7. Ohara N, Naito Y, Nagata T, Tachibana S, Okimoto M, Okuyama H. 2008. Dietary intake of rapeseed oil as the sole fat nutrient in Wistar rats —lack of increase in plasma lipids and renal lesions. *J Toxicol Sci.*33(5): 641-645.

8. Naito Y, Konishi C, Katsumura H, Ohara N. 2000. Increase in blood pressure with enhanced Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats after 4-weeks intake of rapeseed oil as the sole dietary fat. *Pharmacol Toxicol.* 87(3): 144-148.

9. Naito Y, Konishi C, Ohara N. 2000. Blood coagulation and osmolar tolerance of erythrocytes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats given rapeseed oil or soybean oil as the only dietary fat. *Toxicol Lett.*116(3): 209-215.

## F. 健康危険情報

(総括報告書記載事項)

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし。

### 2. 学会発表

1) 小野田早恵, 内藤由紀子, 立花滋博, 河村さやか, 大原直樹, 吉川真衣, 新美まどか, 川口真帆, 宮澤大介, 安井裕子, 山田和代, 奥山治美. 菜種(カノーラ)油摂取が脳卒中易発症 高血圧自然発症ラット(SHRSP)の病態悪化を促進する機序.第39回日本毒理学学会学術年会. 2012年7月17日~19日.仙台, 要旨集 P121 (7月18日).

2) 河村さやか, 内藤由紀子, 立花滋博, 小野

田早恵, 大原直樹, 吉川真衣, 新美まどか, 川口真帆, 宮澤大介, 安井裕子, 山田和代, 奥山治美. 植物油摂取が脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)の生存日数に及ぼす影響 —カノーラ油による生存日数短縮とその背景—. 日本薬学会 フォーラム 2012 衛生薬学、環境トキシコロジー. 2012年10月25~26日. 名古屋, 要旨集 166 (10月26日).

3) Chihiro Amma, Mai Takamatsu, Mai Yoshikawa, Madoka Niimi, Maho Kawaguchi, Yukiko Naito, Shigehiro Tachibana, Naoki Ohara, Harumi Okuyama. Sex difference of the adverse effects induced by canola oil ingestion in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). 第86回日本薬理学会年会. 2013年3月21~23日. 博多, JPS 121Suppl. 238P P3-105 (3月23日).

4) 立松憲次郎, 宮澤大介, 大原直樹, 奥山治美. 高融点油脂を摂取した脳卒中ラットの寿命短縮効果について. 日本脂質栄養学会第22回大会. 2013年9月6,7日. 高知. 脂質栄養学22. 134.

5) 大原直樹, 内藤由紀子, 岩井直温. 機能性食用油の安全性に関する研究 —食用油摂取がステロイドホルモン代謝に及ぼす影響—日本脂質栄養学会第22回大会. 2013年9月6,7日. 高知. 脂質栄養学22. 153.

6) 内藤由紀子, 遠藤恒介, 翁華春, 大原直樹, 岩井直温. 脳卒中易発症高血圧自然発症ラットにおける3種の機能性食用油摂取の影響. 日本脂質栄養学会第22回大会. 2013年9月6,7日. 高知. 脂質栄養学22. 156.

7) 橋本洋子, 山田和代, 森真由美, 宮澤大介, 西尾康二, 大原直樹, 奥山治美. 異なる高脂肪食が非肥満性ラットの代謝に及ぼす影響の比較. 日本脂質栄養学会第22回大会. 2013年9月6,7日. 高知. 脂質栄養学22. 159.

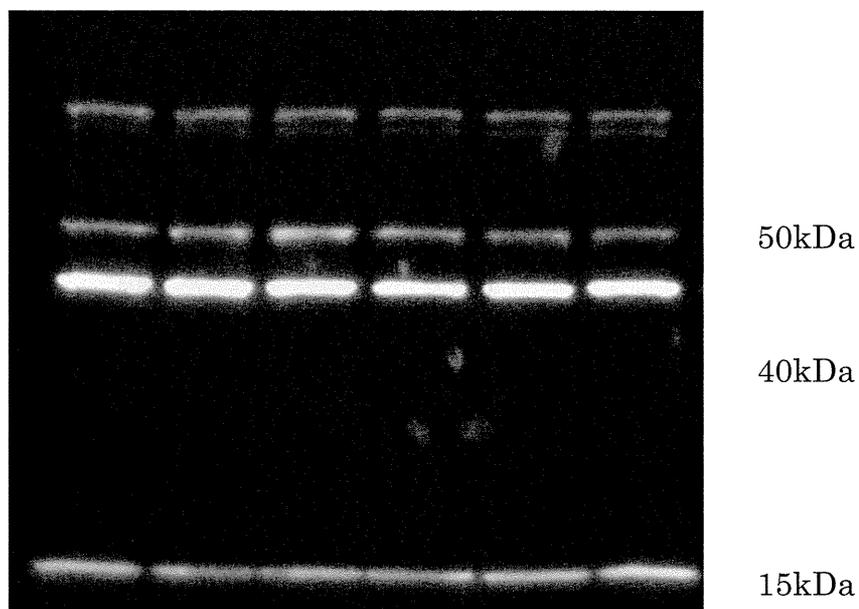


Figure 1 SHRSP 精巢のミトコンドリア中 CYP11A のウエスタンブロット  
CYP11A (50kDa)、 $\beta$ -アクチン (45kDa)、COXIV (17kDa)  
左 3 レーンはダイズ油摂取群、右 3 レーンはカノーラ油摂取群。

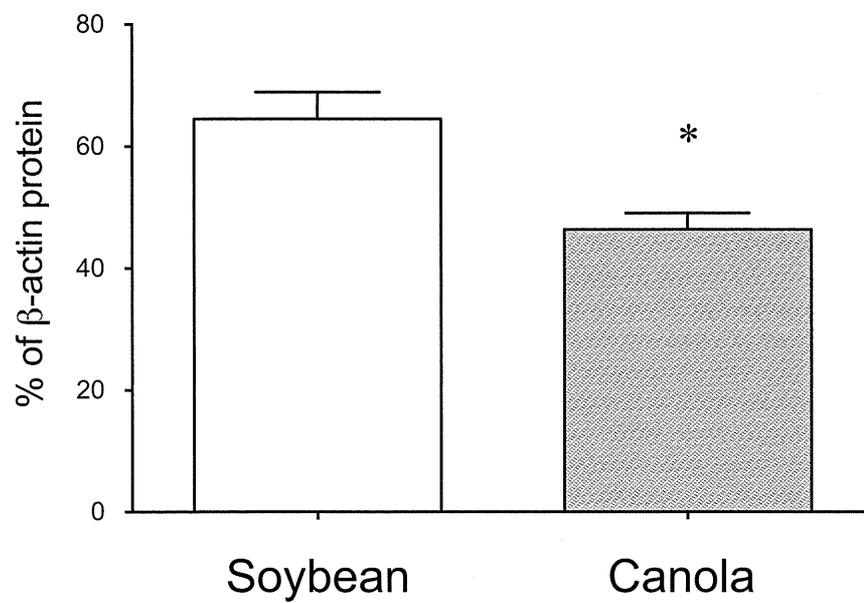


Figure 2 SHRSP 精巢のミトコンドリアにおける CYP11A の発現

Soybean : ダイズ油摂取群、Canola : カノーラ油摂取群

$\beta$ -アクチン量に対する相対発現量 \* $p < 0.05$ 、 $N=3$

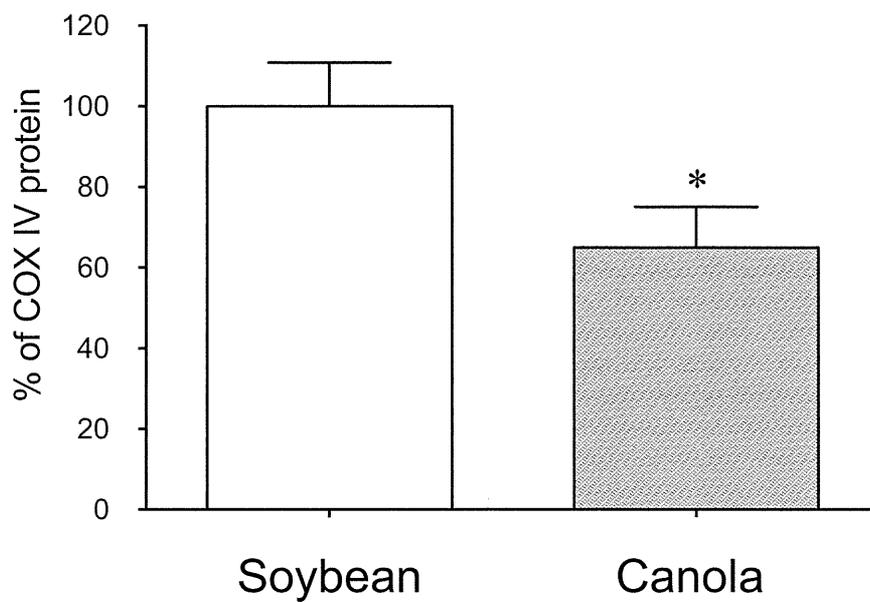


Figure 3 SHRSP 精巢のミトコンドリアにおける CYP11A の発現

Soybean : ダイズ油摂取群、Canola : カノーラ油摂取群

COXIV量に対する相対発現量 \*p<0.05、N=3

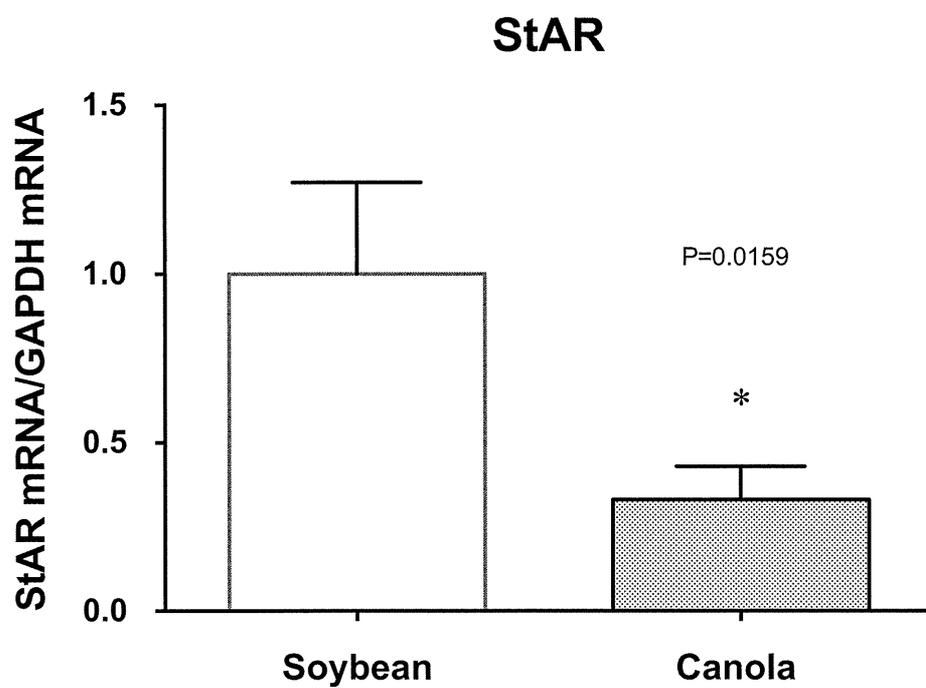


Figure 4 PCRによるSHRSP精巢のStAR遺伝子発現の比較

Soybean : ダイズ油摂取群、Canola : カノーラ油摂取群 \* $p < 0.05$ 、 $N=3$

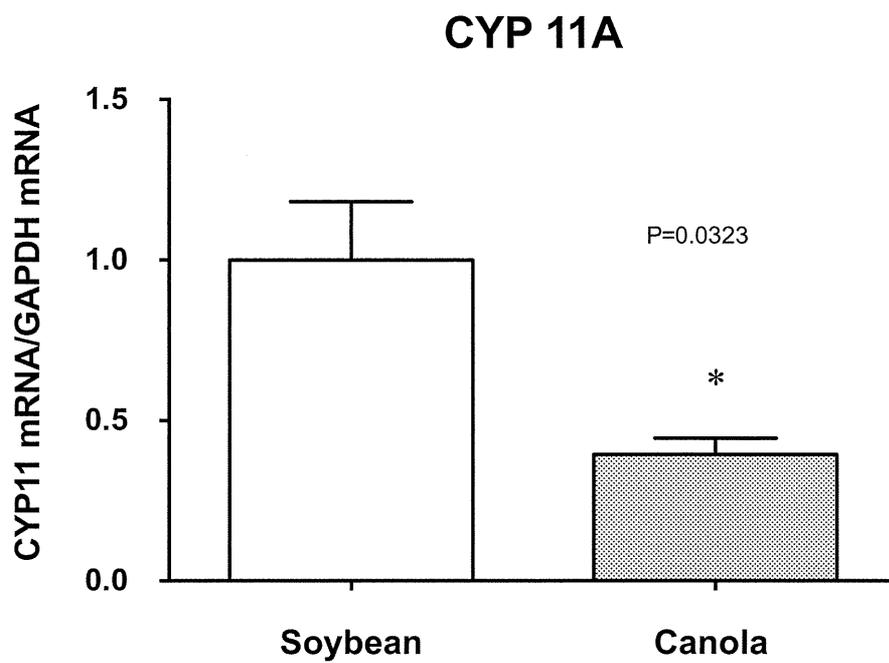


Figure 5 PCRによるSHRSのCYP11A遺伝子発現の比較

Soybean : ダイズ油摂取群、Canola : カノーラ油摂取群 \* $p < 0.05$ 、 $N=3$

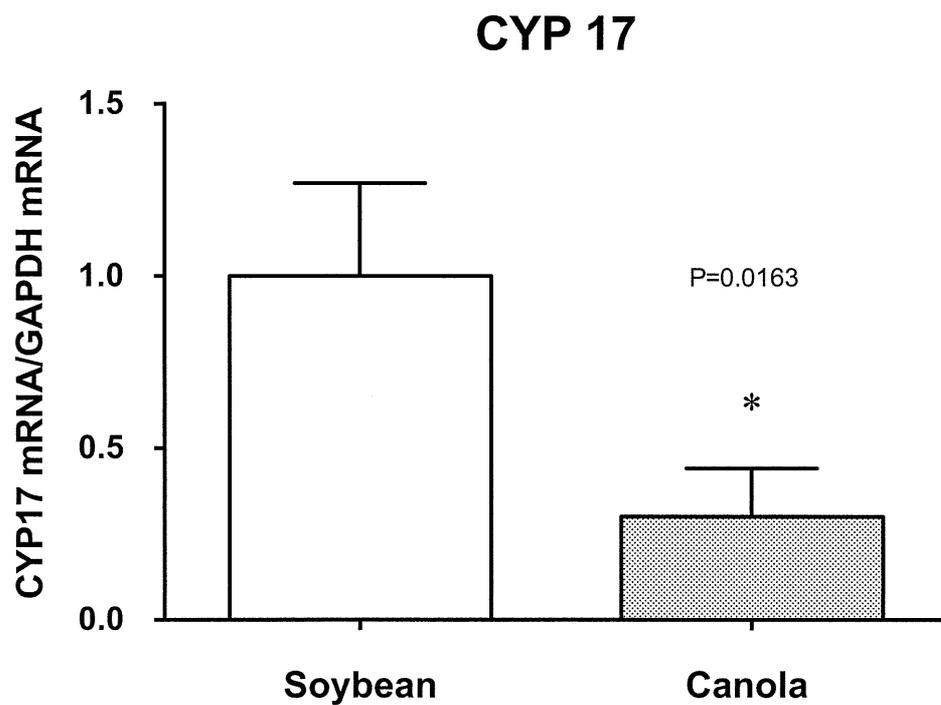
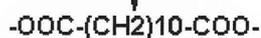
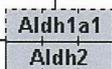
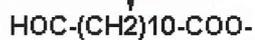
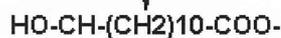
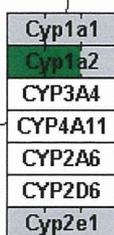
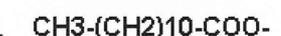


Figure 6 PCR による SHRSP 精巢の CYP17 遺伝子発現の比較

Soybean : ダイズ油摂取群、Canola : カノーラ油摂取群 \* $p < 0.05$ 、 $N=3$

## Fatty Acid Omega Oxidation

**Author:** Chris Evelo et al.  
**Maintained by:** Chris Evelo for NuGO  
**E-mail:** mapps@bigcat.unimaas.nl  
**Last modified:** Inferred from human  
<http://www.bigcat.unimaas.nl/mapps/>  
 Copyright © 2005, BIGCaT Bioinformatics



Beta Oxidation

### Gene Database

Mm-Std\_20070817.gdb

### Expression Dataset

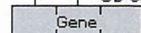
Name: MAA13290-GM

Color Sets:

OB-Cont vs OB-HR

OB-Cont vs OB-HC

OB-Cont vs OB-KS



### Legend: OB-Cont vs OB-HR

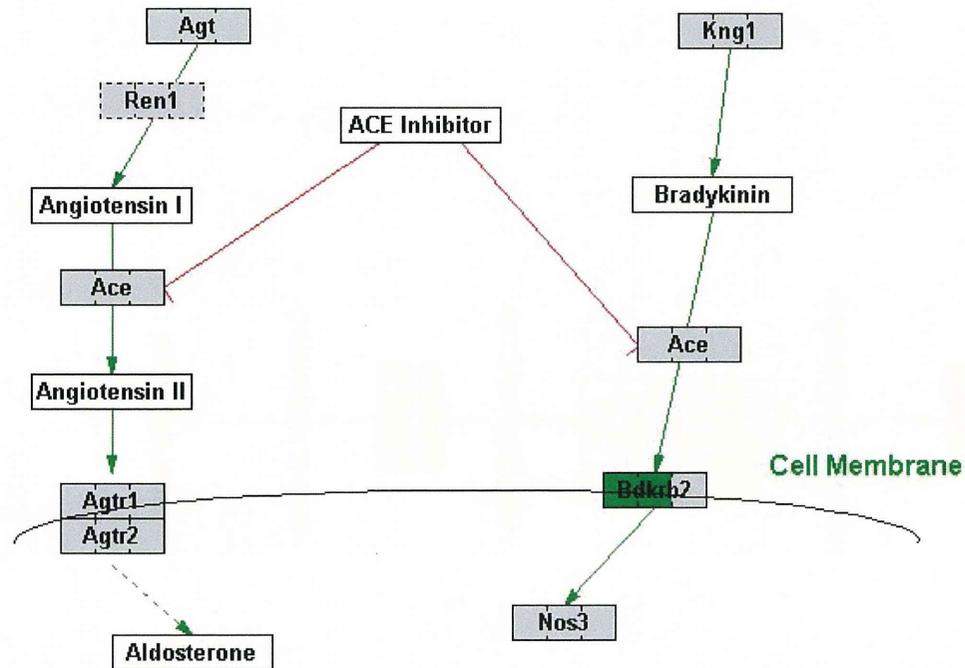
- ratio > 1.5
- ratio < 0.67
- No criteria met
- Not found

Figure 7 ob/ob マウス肝の mRNA を用いたパスウェイ解析 脂肪酸代謝経路

HR および HC 摂取群において、CYP1a2 遺伝子の発現が対照群に対し有意に低下している (緑)。

## ACE Inhibitor Pathway

**Author:** Caroline F. Thorn  
**E-mail:** genmapp@gladstone.ucsf.edu



### Gene Database

Mm-Std\_20070817.gdb

### Expression Dataset

Name: MAA13290-GM

Color Sets:

OB-Cont vs OB-HR

OB-Cont vs OB-HC

OB-Cont vs OB-KS

Gene

### Legend: OB-Cont vs OB-HR

ratio > 1.5

ratio < 0.67

No criteria met

Not found

Figure 8 ob/ob マウス肝の mRNA を用いたパスウェイ解析

アンジオテンシン、ブラジキニン作用に関わる経路

HR および HC 摂取群において、Bdkrb2 遺伝子の発現が対照群に対し有意に低下している (緑)。

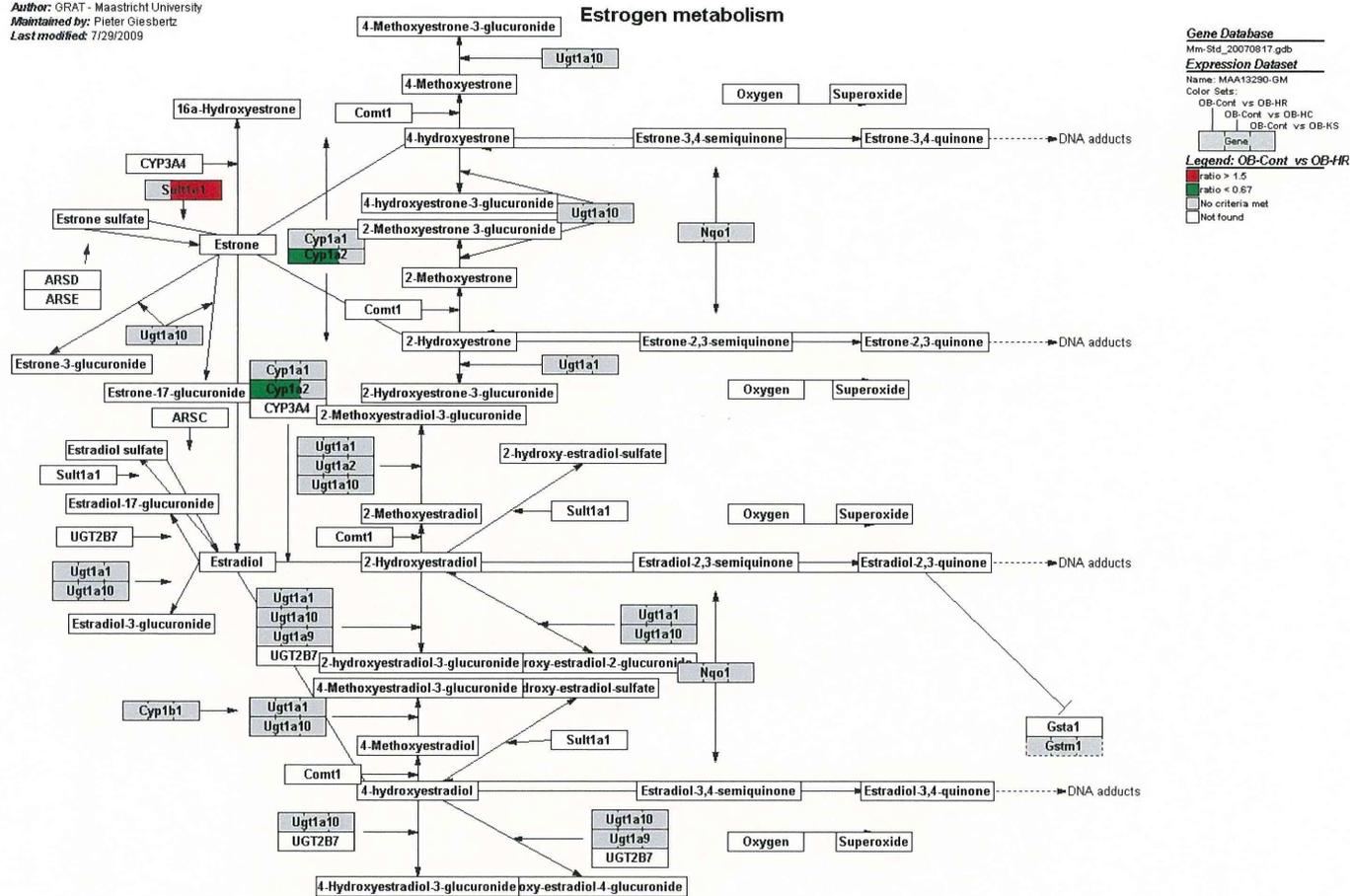


Figure 9 ob/ob マウス肝の mRNA を用いたパスウェイ解析 エストロゲン代謝経路  
 HR および HC 摂取群において、CYP1a2 遺伝子の発現が対照群に対し有意に低下している (緑)。  
 また、HC および HK 摂取群において、Sult1e1 遺伝子の発現が対照群に対し有意に増大している (赤)。

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ji X, Naito Y, Weng H, Ma X, Endo K, Kito N, Yanagawa N, Yu Y, Li J, Iwai N	Renoprotective mechanisms of pirfenidone in hypertension-induced renal injury: through anti-fibrotic and anti-oxidative stress pathways	Biomedical Research	34(6)	309 - 319	2013

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## Renoprotective mechanisms of pirfenidone in hypertension-induced renal injury: through anti-fibrotic and anti-oxidative stress pathways

Xu Ji<sup>1,2</sup>, Yukiko NAITO<sup>2</sup>, Huachun WENG<sup>2</sup>, Xiao MA<sup>2</sup>, Kosuke ENDO<sup>2</sup>, Naoko KITO<sup>2</sup>, Nariaki YANAGAWA<sup>2</sup>, Yang YU<sup>1</sup>, Jie LI<sup>1</sup>, and Naoharu IWAI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650201, China and <sup>2</sup> Department of Genomic Medicine, National Cerebral and Cardiovascular Center, Suita 5658565, Japan

(Received 30 September 2013; and accepted 17 October 2013)

### ABSTRACT

Pirfenidone (PFD) is a novel anti-fibrotic agent that targets TGF $\beta$ . However, the mechanisms underlying its renoprotective properties in hypertension-induced renal injury are poorly understood. We investigated the renoprotective properties of PFD and clarified its renoprotective mechanisms in a rat hypertension-induced renal injury model. Dahl salt-sensitive rats were fed a high-salt diet with or without 1% PFD for 6 weeks. During the administration period, we examined the effects of PFD on blood pressure and renal function. After the administration, the protein levels of renal TGF $\beta$ , Smad2/3, TNF $\alpha$ , MMP9, TIMP1, and catalase were examined. In addition, total serum antioxidant activity was measured. Compared to untreated rats, PFD treatment significantly attenuated blood pressure and proteinuria. Histological study showed that PFD treatment improved renal fibrosis. PFD may exert its anti-fibrotic effects via the downregulation of TGF $\beta$ -Smad2/3 signaling, improvement of MMP9/TIMP1 balance, and suppression of fibroblast proliferation. PFD treatment also increased catalase expression and total serum antioxidant activity. In contrast, PFD treatment did not affect the expression of TNF $\alpha$  protein, macrophage or T-cell infiltration, or plasma interleukin 1 $\beta$  levels. PFD prevents renal injury via its anti-fibrotic and anti-oxidative stress mechanisms. Clarifying the renoprotective mechanisms of PFD will help improve treatment for chronic renal diseases.

Pirfenidone (PFD; 5-methyl-1-phenylpyridin-2-one) is an anti-fibrotic agent. PFD has been considered as an antagonist of transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), and has anti-fibrotic, anti-inflammatory, and anti-oxidative stress activities (6, 12–14, 27, 36). PFD has demonstrated an anti-fibrotic effect via the downregulation of TGF $\beta$  expression in several animal nephropathy models, including unilateral ureteral

obstruction (36), diabetic nephropathy (24, 27), nephrectomy (35, 38), vanadate-induced renal fibrosis (1), and calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity (5, 6, 34). In addition, the clinical effectiveness of PFD has been evaluated in human diabetic nephropathy (32) and focal segmental glomerulosclerosis (7). The anti-fibrotic effect of PFD might also be due to the regulation of the balance of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) (6, 10, 20, 36). Furthermore, PFD may also exert its anti-fibrotic effect via the suppression of fibroblast proliferation (14).

PFD has demonstrated anti-inflammatory effects via the inhibition of the expressions of inflammatory mediators such as tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) both *in vivo* and *in vitro* (2,

---

Address correspondence to: Xu Ji, PhD or Yukiko Naito, PhD

Department of Genomic Medicine, National Cerebral and Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

Tel: +81-6-6833-5012 (Ext 2513), Fax: +81-6-6835-2088

E-mail: jixu@mail.kib.ac.cn or naitoy@ncvc.go.jp

12, 13, 20). Oxidative stress is related to progressive renal injury (28). PFD is reported to exert anti-oxidative stress in mesangial cells and in a cirrhosis model (27, 30). Therefore, the anti-inflammatory and anti-oxidative stress effects of PFD are also expected to ameliorate renal injury. At present, although some renoprotective mechanisms of PFD have been reported, no systematic study has clarified the renoprotective mechanisms of PFD. Furthermore, the mechanisms underlying the renoprotective action of PFD in hypertension-induced renal injury are poorly understood. Therefore, the present systematic study investigated the anti-fibrotic, anti-inflammatory, and anti-oxidative stress effects of PFD. To elucidate the mechanisms underlying the renoprotective action of PFD, we administered PFD to Dahl salt-sensitive rats, and measured blood pressure and renal function. We also investigated the effects of PFD on TGF $\beta$  protein levels as well as its upstream and downstream signaling pathways. The PFD-induced protein expression changes of MMP9 and TIMP1 were examined. The effects of PFD on fibroblast proliferation were also investigated by immunohistochemistry. In addition, the effects of PFD on inflammatory factors such as macrophage and T-cell infiltration, TNF $\alpha$  protein expression, and plasma levels of IL1 $\beta$  were examined. Finally, we investigated catalase protein expression and total serum antioxidant activity.

## MATERIALS AND METHODS

*Experimental animals.* Dahl salt-sensitive rats were obtained from SLC Japan (Shizuoka, Japan). The rats were housed in a temperature-controlled pathogen-free room with light from 0700 to 1900 h (daytime) and had free access to food and water. Experiments were performed in accordance with the guidelines of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the experimental protocols were approved by the National Cerebral and Cardiovascular Center for the Care and Use of Experimental Animals.

*Renoprotective effects of PFD in Dahl salt-sensitive rats.* Dahl salt-sensitive rats were fed a high-salt diet [8% NaCl (w/w); Oriental Yeast, Tokyo, Japan] from 4.5 weeks of age. PFD-treated Dahl salt-sensitive rats (PFD group,  $n = 10$ ) were fed the high-salt diet with mixed with 1% PFD (approximately 700 mg kg $^{-1}$  day $^{-1}$ ). Control Dahl salt-sensitive rats (Control group,  $n = 10$ ) were administered only the high-salt diet. Rats were treated with PFD for 6 weeks. PFD

was provided by Shionogi (Osaka, Japan).

Blood pressure was measured once every 2 weeks using a tail-cuff method (BP-98A; Softron, Tokyo, Japan). Rats were housed in metabolic cages once every 2 weeks for 24-h urine collection. Urinary protein levels were measured using a BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Creatinine clearance ( $C_{Cr}$ ) at week 6 of administration was calculated using the following formula:  $C_{Cr} = (U_{Cr} \times V) / P_{Cr}$ ;  $U_{Cr}$  is the concentration of urinary creatinine (mg  $\cdot$  mL $^{-1}$ ),  $P_{Cr}$  is the concentration of plasma creatinine (mg  $\cdot$  mL $^{-1}$ ), and  $V$  is the urine flow rate (mL  $\cdot$  min $^{-1}$ ). Creatinine levels were measured using a QuantiChrom creatinine assay kit (DIUR-500; BioAssay Systems, Hayward, CA, USA).

*Measurement of TGF $\beta$  mRNA in the Dahl salt-sensitive rat kidneys.* After 6 weeks with or without PFD treatment, the rats were anesthetized with pentobarbital (25 mg  $\cdot$  kg $^{-1}$ ). Venous blood was collected from the vena cava. Plasma (EDTA as an anticoagulant) and serum were isolated by centrifugation and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until measurement. The left kidneys of the rats were removed, weighed, and sectioned longitudinally. Half of each left kidney was frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until measurement, while the other half was used to isolate RNA with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. TGF $\beta$  mRNA expression levels were determined by real-time RT-PCR using a commercial kit (Rn01442102\_m1; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and normalized to the expression of  $\beta$ -actin mRNA; these measurements were expressed as  $\log_{10} (2^{35-CT1} / 2^{25-CT2})$ , where  $2^{35-CT1}$  and  $2^{25-CT2}$  correspond to the expression levels of TGF $\beta$  and  $\beta$ -actin mRNA, respectively, as described previously (17).

*Western blotting.* Western blot analysis was performed using the extracts from rat kidneys frozen in liquid nitrogen and homogenized in 1% NP-40 lysis buffer as described previously (15). Equal amounts of protein (40  $\mu$ g) were separated by SDS-PAGE (10% gels) and then transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond ECL, 0.22  $\mu$ m; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) or a PVDF membrane (Hybond-P, 0.45  $\mu$ m; GE Healthcare). After blocking with 5% (w/v) skim milk powder, the membranes were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) against TGF $\beta$ , Smad2/3, phosphorylated Smad2/3 (pSmad2/3), chromosome 3p kinase (3pK), homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2),

TNF $\alpha$ , MMP9, TIMP1, and catalase at 1 : 500 dilution. Membrane-bound antibodies were visualized with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) at 1 : 10000 dilution and an ECL advanced Western blotting detection kit (GE Healthcare).  $\beta$ -Actin (Santa Cruz Biotechnology) was used as a loading control.

*Histological examination.* As previously reported (16), for histological evaluation, the rats on week 6 of high-salt intake with or without PFD treatment were anesthetized with pentobarbital (25 mg  $\cdot$  kg $^{-1}$ ) and portions of the right kidney were fixed in 10% buffered formalin-saline overnight at 4°C and subsequently embedded in paraffin blocks. Tissue sections 5- $\mu$ m thick were stained with Masson's trichrome. The area of renal fibrosis was measured and analyzed with a BZ Image Analyzer II (Keyence, Osaka, Japan).

*Immunohistochemistry.* Immunohistochemistry was used to detect macrophages (CD68), T cells (CD3), and fibroblasts (FSP1, fibroblast-specific protein 1). After deparaffinization and antigen retrieval, endogenous peroxidase activity was blocked by 3.3% H $_2$ O $_2$  and nonspecific binding was blocked by 5% normal goat serum. The sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against CD68 (Abcam, Cambridge, UK), CD3 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), and FSP1 (Abcam). The Simplestain MAX-PO (rat) kit (Nichirei, Tokyo, Japan) was used as a secondary antibody and allowed to incubate for 30 min at room temperature. Antibody binding was visualized using 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan), and the nuclei were stained with hematoxylin. The numbers of positive cells were counted, and the results are expressed as the number of positive cells per square millimeter renal tissue.

*Plasma IL1 $\beta$  measurement.* Plasma IL1 $\beta$  was measured in duplicate with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (IBL, Gunma, Japan).

*Measurement of total serum antioxidant activity.* To evaluate reactive oxygen species, we determined the total serum antioxidant activity by using the total antioxidant power colorimetric microplate assay kit (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI, USA), which measures the reductive capacity by detecting the reduction of Cu $^{2+}$  to Cu $^{+}$ .

*Statistical analysis.* Values are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using JMP (SAS Institute, Cary, NC, USA). Analysis of variance (ANOVA) was used to estimate differences among groups, and the significance of differences was tested using Student's *t*-test.

## RESULTS

### *Effects of PFD treatment on body weight, urinary protein, C $_c$ , heart rate, and blood pressure*

Between the Control and PFD groups, there were no significant differences in body weight (Fig. 1A) and food intake (data not shown). Neither urine volume (Fig. 1B) nor water intake (data not shown) was significantly different between the Control and PFD groups. In contrast, urinary protein excretion was significantly attenuated at weeks 2 and 4 after the PFD treatment, indicating that PFD exerted a renoprotective effect (Fig. 1C). Although a trend demonstrating the improvement of C $_c$  was observed after 6 weeks of PFD treatment (Fig. 1D), there was no significant difference between the Control and PFD groups (1.58  $\pm$  0.22 vs. 2.93  $\pm$  0.66 mL  $\cdot$  min $^{-1}$ , respectively; *P* = 0.13).

PFD treatment did not affect heart rate as measured by the tail-cuff method (Fig. 1E). Six weeks of 8% NaCl diet feeding increased systolic blood pressure (SBP) in the Control group significantly. PFD treatment significantly attenuated this increase in SBP at weeks 2 and 4 (Fig. 1F).

From the results described above, we conclude that PFD treatment ameliorates hypertension and renal injury.

### *Effects of PFD treatment on renal weight and fibrosis*

There were no significant differences in renal weight between the Control and PFD groups at week 6 (Fig. 2A). Six weeks of 8% NaCl diet feeding caused tubular dilatation, interstitial fibrosis, and glomerular sclerosis (Fig. 2C); PFD treatment significantly attenuated these pathological changes (Fig. 2D). PFD treatment markedly reduced fibrotic areas (Fig. 2B).

### *Effects of PFD treatment on renal TGF $\beta$ , Smad2/3, pSmad2/3, 3pK, and HIPK2 expression*

PFD exerts a renoprotective effect via the downregulation of TGF $\beta$  expression (1, 5–7, 24, 27, 34–36, 38). Therefore, we examined whether PFD regulates TGF $\beta$  expression in a rat salt-sensitive hypertension model. Indeed, PFD treatment significantly reduced the mRNA (Fig. 3A) and protein (Fig. 3B) expres-