

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19501

研究課題名(和文)慢性腎臓病におけるインフラマソーム活性化による炎症遷延化機序解明と治療法開発

研究課題名(英文)The mechanism of inflammasome activation associated chronic inflammation on CKD.

研究代表者

長洲 一 (Nagasu, Hajime)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：40412176

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):慢性腎臓病は国民病の一つでありその予防また進展阻止は重要な課題であった。本研究テーマではその進展機序の一つとして慢性炎症に着目し検討を行った。その結果の一部を論文化し報告している。慢性炎症の機序は不明であり自然免疫のシステムであるInflammasomeに着目し検討を行っている。我々が着目したのは転写因子であるNrf2である。Nrf2は自然免疫応答のシステムであるInflammasome活性化に必須のタンパクとしても知られているが、その意義は不明であった。そこで「Nrf2依存的inflammasome活性化が腎組織内炎症遷延及び線維化に重要である」という仮説を検証し報告している。

研究成果の概要(英文):Chronic inflammation can be a major driver of the failure of a variety of organs, including chronic kidney disease (CKD). TNuclear factor erythroid2-related factor 2 (Nrf2), the master transcription factor for anti-oxidant responses, has also been implicated in inflammasome activation under physiological conditions. However, the mechanism underlying inflammasome activation in CKD remains elusive. Here, we show that the loss of Nrf2 suppresses inflammation in a unilateral ureter obstruction (UUO) model of CKD in mice. We consistently observed decreased expression of inflammation-related genes NLRP3 and IL-1 in Nrf2-deficient kidneys after UUO. Increased infiltration of M1, but not M2, macrophages appears to mediate the suppression of UUO-induced CKD symptoms. These results demonstrate that Nrf2-related inflammasome activation can promote CKD symptoms via infiltration of M1 macrophages. Thus, we have identified the Nrf2 pathway as a promising therapeutic target for CKD.

研究分野：腎疾患、炎症性疾患

キーワード：腎臓病 慢性炎症

### 1. 研究開始当初の背景

CKD における腎間質の慢性炎症の炎症慢性化、増幅機序の分子機序を解明し新規治療法立案に資する事を目的とする。非感染性の「慢性炎症」に Inflammasome 活性化が重要な役割を担っている。腎間質慢性炎症の病態形成における NLRP3-Inflammasome 活性化の意義と分子機序を解明する。具体的には マクロファージにおける Inflammasome 活性化, pyroptosis の分子機序を解明する。Caspase1 依存性 pyroptosis に由来する DAMPs の実体, 特に Caspase-1 の役割を解明し、尿細管障害機序における Inflammasome 活性化の意義を明らかにする。炎症慢性化、増幅機序におけるマクロファージ・尿細管連関機序を明らかにする。Caspase-1 による Sirt1 活性抑制を介した CKD における加齢変化加速の病態解明に取り組み、新規 CKD 治療法立案に貢献したい。

### 2. 研究の目的

Inflammasome 関連慢性炎症の制御機構の解明を行うことを目的とし、以下の検討を行った。

1) Nrf2 活性化による活性酸素種制御と Inflammasome 活性化の関連解明

2) 内皮機能障害による eNOS-NO 経路の破綻に伴う Inflammasome 活性化促進機序の解明。

### 3. 研究の方法

1) に関して以下の研究を行なった。着目したのは転写因子である Nrf2(nuclear factor E2 p45-related factor 2) であり抗酸化遺伝子群のマスターレギュレーターである。Nrf 2 活性化は抗酸化作用及び抗炎症作用により腎保護的に働くことが想定されており創薬の一つのターゲットとなっている。一方で自然免疫応答のシステムである Inflammasome 活性化に必須のタンパクとしても知られておりその意義は不明であった。そこで「Nrf2 依存的 inflammasome 活性化が腎組織内炎症遷延及び線維化に重要である」という仮説のもと研究を行った。炎症及び線維化を評価するため一側尿管結紮モデル(UUO)を用いて検討を行った。動物は C57B/6J( 雄性、6-8 週齢 )を使用した。最初に野生型 (WT) および Nrf2 遺伝子欠損マウス (Nrf2KO) に UUO を作成し、Day14 の組織を検討した。

2) に関して eNOS 欠損マウスを持ちて検討を行った。WT、eNOSKO に片腎摘出を施し、アルドステロン (Ald; 250 µg/day) 投与により高血圧モデルマウスを作成した。Ald を 4 週間投与した後に腎組織を採取し、NLRP3 インフラマソーム活性及び尿細管障害を検討した。次に腎障害とインフラマソーム活性の直接的な作用を検討するために、eNOSKO に ASC 遺伝子欠損マウス (ASCKO) を交配し、

eNOS/ASC 二重遺伝子欠損マウス (eNOS/ASCKO) を作成し、同様にアルドステロンを投与し高血圧を誘発した。最後に骨髄由来分化誘導マクロファージ (BMDM)を用いて In vitro の系で分子メカニズムを検討した。In vitro 系の刺激は LPS+ATP を添加し NLRP3 インフラマソームを活性化させた。同時に NO donor である GSNO を前投与し NLRP3 インフラマソーム活性化を検討した。

### 4. 研究成果

1) Nrf2KO-UUO では WT-UUO に比較し腎重量は保たれており、Masson 染色 および CollagenIV 染色で評価される線維化は抑制されていた。Masson 染色では継時的に (Day0,3,7,14) 線維化の程度を評価しているが UUO 作成 Day3-7 では両群間に有意な変化は認めないものの、Day14 でその差は顕著であった。線維化関連遺伝子である CTGF、SMA の mRNA 発現を UUO-day14 で評価したところ、WT-UUO で WT-Sham に比較し有意に上昇したが、Nrf2KO-UUO は WT-UUO に比較しその上昇は有意に抑制されていた。SMA のタンパク発現量を WB で評価しているが、同様の傾向であった。炎症関連遺伝子に関しては MCP1 および ICAM を評価しているが、同様に WT-UUO では Sham に比較し mRNA 発現が上昇しているものの、その変化は Nrf2KO で有意に抑制されていた。

IL1 蛋白発現を pro-IL1 とともに検討したところ pro-IL1 は UUO 作成により発現上昇を認めているが、WT-UUO と Nrf2KO-UUO では変化はなく IL1 は WT-UUO に比較し Nrf2KO-UUO で有意に抑制されていた。これらのことから Nrf2 はなんらかの機序で炎症拡大を抑制し結果として線維化が軽減されていた。

UUO においては Inflammasome 活性化が炎症拡大と線維化に關与することが知られている。そのため次に Inflammasome 活性化に着目し検討を続けた。Inflammasome 関連遺伝子として TLR4、NLRP3、Caspase1、IL18 の mRNA 発現量を評価しているがこれらの遺伝子発現は Nrf2KO-UUO は WT-UUO に比較しその上昇は有意に抑制されていた。

一方で F4/80 陽性細胞は軽度低下にとどまり、WB で確認したタンパク発現量と同様で有意な変化ではなかった。WT-UUO を継時的に評価すると Day3,Day7 で F4/80 蛋白発現量が増加していた。同時期に IL1 および Nrf2 蛋白発現の上昇を認めた。同様に炎症関連遺伝子群 (NLRP3 and IL18) も Day3,Day7 で上昇する一方で線維化関連遺伝子群 (CTGF and  $\alpha$ SMA) は少し遅れて上昇する傾向にあった。これらの結果から F4/80 陽性細胞の浸潤自体には影響を与えずに炎症を抑制する可能性が示唆された。

そこでマクロファージの詳細な検討を行うため FACS にて M1 マクロファージおよび

M2 マクロファージの検討を行った。

WT-UUO-Day3 および WT-UUO-Day7 でのマクロファージの population を検討した。UUO-Day3 で CD11b 陽性-F4/80 low および CD11b 陽性-F4/80 high の細胞群が増加することがわかった。その後、UUO-Day7 では CD11b 陽性-F4/80 high の細胞群が増加していった。CD11b 陽性-F4/80 low、CD11b 陽性-F4/80 high それぞれを sorting し M1 marker である iNOS と M2 marker である CD206 の mRNA 発現を qPCR で評価したところ CD11b 陽性-F4/80 high では CD206 発現高値で M2 マクロファージであることが示された。同時に CD11b 陽性-F4/80 low では iNOS mRNA 発現が高値であり M1 マクロファージであった。

以上のことから UUO 作成により早期の UUO-Day3 より M1 マクロファージが浸潤しており、M2 マクロファージはその後 UUO-Day7 から増加していくことがわかった。そこで、継時的な M1-M2 マクロファージの変化を WT および Nrf2KO で評価を行った。UUO-Day7 では両群間には変化はなく、Nrf2KO-UUO-Day14 では M1 population が WT-UUO-Day14 に比較して減少していた。この変化は ASCKO でも同様であった。また Day7 で M1 マクロファージと M2 マクロファージを sorting し、mRNA 発現を検討したところ、M1 における IL1 および Caspase1 の mRNA 発現が WT に比較し Nrf2KO においては抑制されていた。

次に WT に対して Caspase1 特異的阻害薬である VX765 を経口投与し Caspase1 活性化の継時的意義を検討した。later phase (Day7-14)、で投薬を行い M1 population 維持にどの時期の Inflammasome 活性化が重要かを FACS にて検討した。結果として Figure 3D に示すように later phase (UUO-Day7 以降) で Inflammasome 活性化を抑制することにより M1 population が減少することがわかった。以上の結果から M1 population の維持に Inflammasome 活性化が重要であり、特に early phase ではなく later phase でその意義が顕著であった。

骨髄細胞由来細胞における Nrf2 活性化の意義を検討するため次に骨髄移植実験を行った。骨髄移植は WT、Nrf2KO、ASCKO の骨髄細胞をそれぞれ採取し WT へ移植を行い以下の 3 群を作成し検討した (WT-WT-BMT, Nrf2KO-WT, ASCKO-WT)。

UUO 作成後、Day14 で評価している。Masson 染色で示されるように線維化は Nrf2-WT で有意に抑制されており、線維化関連遺伝子 (SMA、CTGF) も WT-WT-UUO に比較し、Nrf2KO-WT-UUO では有意に抑制されていた。ASCKO-WT-UUO においても WT-WT-UUO と比較、同様の結果を確認しており、Inflammasome 活性化が線維化促進に働いていることがわかった。

Nrf2 と Inflammasome の関連を確認するため WT および Nrf2KO から骨髄由来マクロファージを採取し NLRP3 Inflammasome 活性化に

ついて検討を行った。NLRP3 Inflammasome 活性化を LPS-ATP で行い、活性化は上清中の IL1 を ELISA で確認するとともに細胞内での cleaved Caspase1 および IL1 の発現を WB で検討した。WT 由来 BMDM では LPS-ATP 刺激後の IL1 上清中への分泌と細胞内での活性化型 Caspase-1 発現を認めた。しかし、Nrf2KO ではその活性化は限定的であった。しかし、IL6 の発現は変化なく、直接的に Inflammasome 活性化へ影響を与えている可能性があった。

2) eNOSKO は WT と比較して、Ald 投与に伴うインフラマソーム活性が上昇し、尿細管間質へマクロファージ浸潤が著名に増加し、尿細管細胞障害及び間質線維化が促進された。こうした障害は eNOS/ASCKO で有意に軽減された。次に In vitro において LPS+ATP 刺激により NLRP3 インフラマソーム活性の亢進を認め、この活性は GSNO で抑制された。以上の事から eNOS/NO 経路の破綻はアルドステロン誘発の高血圧におけるインフラマソーム活性及び腎障害を促進させる。更に NO がマクロファージにおける NLRP3 インフラマソーム活性制御に直接的に関わる事が分かった。以上の結果から eNOS/NO 経路の破綻はマクロファージにおける NLRP3 インフラマソームを活性化させ、尿細管障害を進展させることが解明された。  
本実験に関しては現在論文投稿中である。

1)、2) の結果から腎疾患における Inflammasome 制御機構が明らかになった。これらの知見から治療の対象として内皮機能保護などが考えられさらなる検討を行っている。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Infiltration of M1, but not M2, macrophages is impaired after unilateral ureter obstruction in Nrf2-deficient mice. Sogawa Y, Nagasu H, Iwase S, Ithoriya C, Itano S, Uchida A, Kidokoro K, Taniguchi S, Takahashi M, Satoh M, Sasaki T, Suzuki T, Yamamoto M, Horng T, Kashihara N.

[学会発表](計 4件)

第 39 回日本高血圧学会総会 長洲 一  
「Nrf2 依存的 Inflammasome 活性化は M1 マクロファージの維持により炎症線維化に寄与する」

国際高血圧学会 Hajime Nagasu

「Endothelial Cells Regulate Inflammasome Activation Through Nitric Oxide in Hypertensive Kidney Disease.」

第 59 回日本腎臓学会学術総会 長洲 一  
「内皮機能はインフラマソーム活性化を制御し腎疾患進展を抑制する」

第 37 回日本炎症・再生医学会 長洲 一  
「内皮障害はインフラマソーム活性化を促進し腎障害進展に寄与する」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

長洲 一 (Nagasu, Hajime) 川崎医科大学・  
医学部・講師  
研究者番号：40412176

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )