

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06216・19K21319

研究課題名（和文）遠隔臓器障害による急性腎障害の新規発症機序の解明

研究課題名（英文）Mechanism of Acute Kidney Injury Induced by Remote organ injury

研究代表者

駒田 敬則（Komada, Takanori）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：90824730

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：多臓器不全・遠隔臓器障害によって急性腎障害（AKI）が発症・増悪することが知られている。本研究では、横紋筋融解症に伴った壊死細胞DNAが腎実質に到達し、DNAセンサーであるAbsent in Melanoma 2（AIM2）を介してAKI発症に関与するという仮説を検証した。横紋筋融解症によるAKIモデルを作成し、AIM2欠損マウスと野生型との間で横紋筋融解症AKIの病態変化を比較した。壊死細胞DNAはAKI増悪に関与するが、AIM2欠損がAKI増悪に働くことが分かり、インフラマソーム非依存的にAKI病態に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

横紋筋融解症による急性腎障害は、特異的な治療法がなく腎予後・生命予後に影響する。本研究では、壊死細胞二本鎖DNAが治療標的となりうること、また細胞質内DNAセンサーであるAIM2が病態に関与することを示した。今後詳細にその機序をあきらかにすることで、AKIの新たな治療法開発に繋がることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Acute kidney injury (AKI) is known worsened under conditions of multi-organ or remote-organ failure. In this study, we examined the hypothesis that dead cell DNA derived from rhabdomyolysis reaches the kidney and influences the AKI onset through a DNA sensor, absent in melanoma 2 (AIM2). Using a rhabdomyolysis-induced AKI (RIAKI) model, we compared the pathophysiological changes under RIAKI between AIM2 knockout and wild-type mice. Dead cell DNA was involved in AKI progression, but AIM2 deficiency worsened AKI. Our results indicated that AIM2 contributed to AKI independently of the inflammasome.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：インフラマソーム Absent in melanoma 2 二本鎖DNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

急性腎障害(AKI)は、短時間に腎機能が低下し、窒素含有老廃物が全身に貯留する病態である。重症患者に多く、肝・肺・心などの他臓器障害とAKIは、互いに相乗的増悪作用を持つ(腎-臓器連関)。横紋筋融解症は代表的な腎-臓器連関を示す疾患であり、15-50%にAKIを合併する。AKIを合併すると死亡率が著しく上昇し、回復しても慢性腎臓病(CKD)に進展することが多い。AKIは数十年間にわたり、対症療法以外の効果的な治療法が見出されていない。循環動態変化や過剰なサイトカインがAKIを発症するとされるが、その発症機構も未だ明らかではない。細胞質内の病原体DNAセンサーであるAbsent in Melanoma 2(AIM2)は、インフラマソームと呼ばれるタンパク質複合体を形成してカスパーゼ-1を切断・活性化する。それにより炎症性サイトカインIL-1 $\beta$ を成熟化して炎症を惹起し、またパイロプトーシスと呼ばれる細胞死を誘導する。申請者はこれまでに、病原体に関与しない自己の死細胞DNAが腎マクロファージに取り込まれ、AIM2インフラマソーム形成を介して慢性腎臓病(CKD)増悪に働くことを見出した(Komada et al. JASN, 2018, 29(4) 1165-1181)。本研究では、遠隔臓器である骨格横紋筋由来の死細胞DNAが、AIM2インフラマソームを介して横紋筋融解症AKI(RIAKI)を引き起こすという仮説を立て、研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では、横紋筋融解を起因とする壊死DNAが、腎AIM2インフラマソーム活性化を介して腎傷害を起こすという仮説を検証する。RIAKI発生過程における二本鎖DNAの役割とAIM2の寄与を明らかにし、AIM2インフラマソームを制御することで新たな治療法を確立することを目的とし、研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 8-10週のC57BL/6J雄性マウスにおいて、50%グリセロール筋注によるRIAKIモデルを作製した。死細胞DNAの寄与を確認するために、DNase Iを腹腔内投与して腎機能・腎組織を評価した。

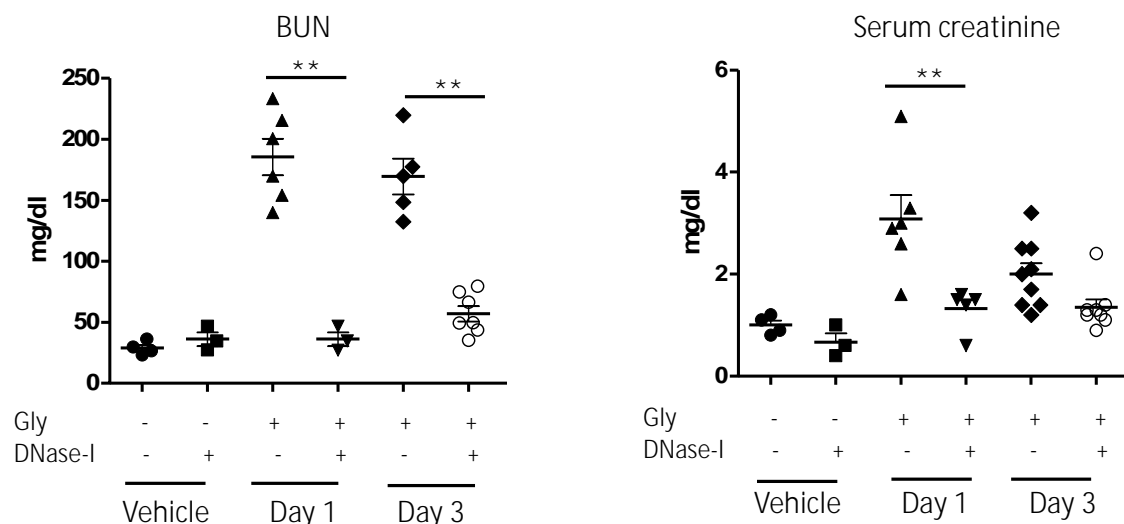
(2) 野生型(WT)とAim2欠損(Aim2<sup>-/-</sup>)マウスに対してRIAKIモデルを作製し、腎機能・腎組織・炎症・線維化を評価した。

(3) WTおよびAim2<sup>-/-</sup>マウスから骨髄由来マクロファージと腎初代細胞を採取し、二本鎖DNAによる炎症と細胞死を解析した。

## 4. 研究成果

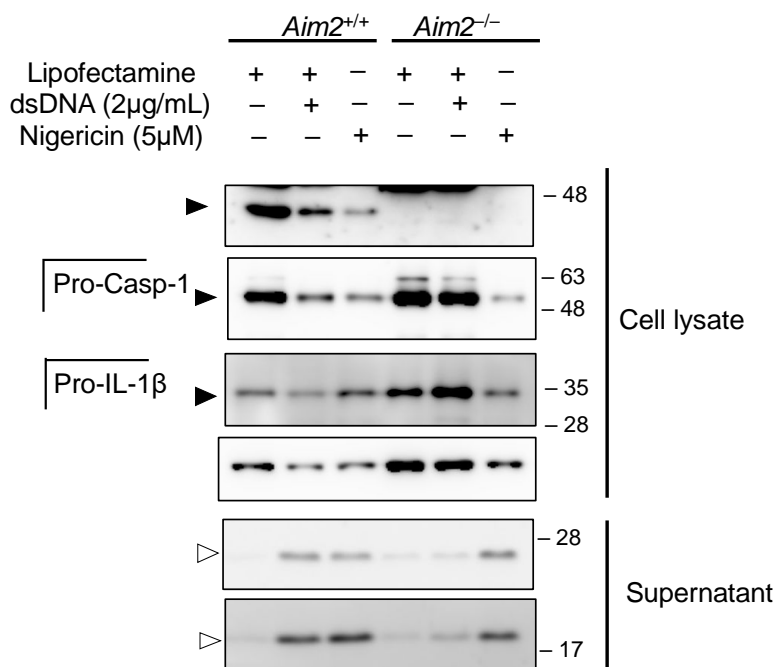
### (1) RIAKIはDNase I投与によって軽減する

RIAKIモデルマウスにおいて、DNase Iを12時間毎に腹腔内投与することで、組織障害を示すLDHは高値を示すものの、腎機能悪化が有意に抑制された。組織学的な腎尿細管傷害、炎症細胞浸潤(F4/80陽性細胞増加)、腎傷害マーカーであるKIM-1(Kidney injury molecule-1)の発現上昇も抑制された。

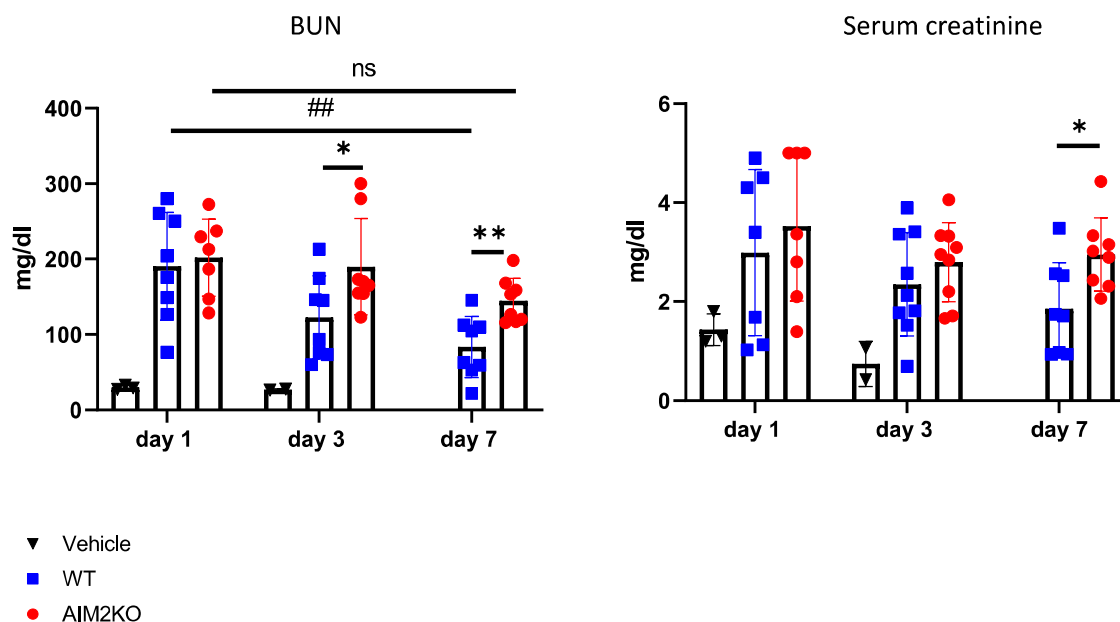


(2) マウス RIAKI は AIM2 欠損により軽減せず、マクロファージ浸潤と線維化が増悪する  
従来のSV129由来ES細胞を用いたAIM2欠損マウスでは、インターフェロン経路に関わる遺伝

子の passenger mutation が問題となっている (Choubey D, Panchanathan R. 2017, Clin Immunol, 176:42-48)。そこで我々は、CRISPR/Cas9 システムを用いて新たに作製した、C57BL/6J 系統の AIM2 欠損マウスを用いて実験を行った。新たな AIM2<sup>-/-</sup>マウスから骨髄由来マクロファージを採取して、AIM2 欠損と、二本鎖 DNA によるインフラマソーム活性化の欠如 (カスパーゼ-1 および IL-1 の切断) を Western blotting で確認した。



WT と AIM2<sup>-/-</sup>マウスに RIAKI を誘導したところ、予想に反して 1 日後の腎機能障害に差は認められず、3 日後・7 日後で AIM2<sup>-/-</sup>マウスで腎機能回復が遅れることが分かった。さらに、腎組織でのマクロファージ浸潤と線維化が、AIM2<sup>-/-</sup>マウスで増悪した。



### (3) マクロファージと腎尿管細胞において、二本鎖 DNA は細胞死を誘導する

WT および *Aim2*<sup>-/-</sup>マウスから骨髄由来マクロファージと腎尿管細胞を採取して二本鎖 DNA で刺激したところ、いずれも細胞死が誘導された。WT のマクロファージでは AIM2 インフラマソーム活性化に伴うパイロプトシスが誘導され、尿管細胞では AIM2 非依存的にアポトーシスが誘導された。

本研究では、腎 AIM2 がインフラマソームとは異なる経路を介して RIAKI の病態に寄与している可能性が示唆された。現在(2)(3)について、さらに研究を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Aizawa Emi, Karasawa Tadayoshi, Watanabe Sachiko, Komada Takanori, Kimura Hiroaki, Kamata Ryo, Ito Homare, Hishida Erika, Yamada Naoya, Kasahara Tadashi, Mori Yoshiyuki, Takahashi Masafumi	4. 巻 23
2. 論文標題 GSDME-Dependent Incomplete Pyroptosis Permits Selective IL-1 Release under Caspase-1 Inhibition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101070 ~ 101070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Sachiko, Usui Kawanishi Fumitake, Karasawa Tadayoshi, Kimura Hiroaki, Kamata Ryo, Komada Takanori, Inoue Yoshiyuki, Mise Nathan, Kasahara Tadashi, Takahashi Masafumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Glucose regulates hypoxia induced NLRP3 inflammasome activation in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.29659	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Komada Takanori, Muruve Daniel A.	4. 巻 15
2. 論文標題 The role of inflammasomes in kidney disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Reviews Nephrology	6. 最初と最後の頁 501 ~ 520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41581-019-0158-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hishida Erika, Ito Homare, Komada Takanori, Karasawa Tadayoshi, Kimura Hiroaki, Watanabe Sachiko, Kamata Ryo, Aizawa Emi, Kasahara Tadashi, Morishita Yoshiyuki, Akimoto Tetsu, Nagata Daisuke, Takahashi Masafumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Crucial Role of NLRP3 Inflammasome in the Development of Peritoneal Dialysis-related Peritoneal Fibrosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46504-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Anzai Fumiya, Watanabe Sachiko, Kimura Hiroaki, Kamata Ryo, Karasawa Tadayoshi, Komada Takanori, Nakamura Jun, Nagi-miura Noriko, Ohno Naohito, Takeishi Yasuchika, Takahashi Masafumi	4. 巻 138
2. 論文標題 Crucial role of NLRP3 inflammasome in a murine model of Kawasaki disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 185 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2019.11.158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizushima Yoshiko, Karasawa Tadayoshi, Aizawa Kenichi, Kimura Hiroaki, Watanabe Sachiko, Kamata Ryo, Komada Takanori, Mato Naoko, Kasahara Tadashi, Koyama Shinichiro, Bando Masashi, Hagiwara Koichi, Takahashi Masafumi	4. 巻 203
2. 論文標題 Inflammasome-Independent and Atypical Processing of IL-1 Contributes to Acid Aspiration-Induced Acute Lung Injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 236 ~ 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1900168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Homare, Sadatomo Ai, Inoue Yoshiyuki, Yamada Naoya, Aizawa Emi, Hishida Erika, Kamata Ryo, Karasawa Tadayoshi, Kimura Hiroaki, Watanabe Sachiko, Komada Takanori, Horie Hisanaga, Kitayama Joji, Sata Naohiro, Takahashi Masafumi	4. 巻 519
2. 論文標題 Role of TLR5 in inflammation and tissue damage after intestinal ischemia-reperfusion injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 15 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.08.083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Naoya, Karasawa Tadayoshi, Kimura Hiroaki, Watanabe Sachiko, Komada Takanori, Kamata Ryo, Sampilvanjil Ariunaa, Ito Junya, Nakagawa Kiyotaka, Kuwata Hiroshi, Hara Shuntaro, Mizuta Koichi, Sakuma Yasunaru, Sata Naohiro, Takahashi Masafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Ferroptosis driven by radical oxidation of n-6 polyunsaturated fatty acids mediates acetaminophen-induced acute liver failure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-2334-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sampilvanjil Ariunaa, Karasawa Tadayoshi, Yamada Naoya, Komada Takanori, Higashi Tsunehito, Baatarjav Chintogtokh, Watanabe Sachiko, Kamata Ryo, Ohno Nobuhiko, Takahashi Masafumi	4. 巻 318
2. 論文標題 Cigarette smoke extract induces ferroptosis in vascular smooth muscle cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H508 ~ H518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpheart.00559.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Naoya, Karasawa Tadayoshi, Wakiya Taiichi, Sadatomo Ai, Ito Homare, Kamata Ryo, Watanabe Sachiko, Komada Takanori, Kimura Hiroaki, Sanada Yukihiko, Sakuma Yasunaru, Mizuta Koichi, Ohno Nobuhiko, Sata Naohiro, Takahashi Masafumi	4. 巻 20
2. 論文標題 Iron overload as a risk factor for hepatic ischemia reperfusion injury in liver transplantation: Potential role of ferroptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Transplantation	6. 最初と最後の頁 1606 ~ 1618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ajt.15773	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高橋 将文  (Takahashi Masafumi)	自治医科大学・炎症・免疫研究部・教授  (32202)	