

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16225

研究課題名(和文)低カリウム血症における自然免疫経路の役割

研究課題名(英文)The role of innate immune system in potassium deficiency

研究代表者

駒田 敬則 (Komada, Takanori)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90824730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：低カリウム血症(低K血症)は、心疾患や死亡リスクを上昇させるだけでなく、低K血症性腎症を発症して慢性腎臓病(CKD)に進展しうる。インフラマソームは細胞内カリウム流出によって活性化され、炎症と細胞死を誘導することから、低K血症における関与を考えた。本研究では、K欠乏動物モデルを作製し、その解析を行った。インフラマソーム構成分子であるNLRP3とASCが低K血症性腎症の炎症に関わることが判明したが、カスパーゼ-1、-11は寄与しないことがわかり、インフラマソーム非依存的であった。K欠乏による腎の低K環境がNLRP3、ASCを介した炎症を惹起し、腎障害に進展することが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カリウムは生体に必須の元素であり、K異常症は不整脈などを誘発して生命予後に影響する。K異常による炎症惹起と臓器障害は未だ不明な点が多い。本研究では、低K血症による腎の炎症惹起機序について、その責任細胞と寄与経路を明らかにした。電解質異常における臓器炎症の制御機構の理解につながり、学術的意義がある。本研究の成果は、CKD腎を含めた腎疾患の炎症病態解明と治療法開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Hypokalaemia is not only the risk of all-cause mortality and cardiovascular death but also the independent risk of chronic kidney disease (CKD) progression. It is known that long-standing hypokalaemia occasionally develops kidney dysfunction, so-called hypokalaemic nephropathy (HN). We investigated the role of inflammasome-composing molecules in the mouse HN model. Inflammatory cells expanded in HN kidneys. This phenotype was highly associated with several inflammasome-related molecules but independent of inflammasome activation. These results indicate the possible interconnection between the pro-inflammatory signalling and the potassium homeostatic pathway.

研究分野：腎臓病学

キーワード：慢性腎臓病 低K血症 炎症 インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

低カリウム血症（低 K 血症）は高頻度に認められる電解質異常である。感染のリスクになり、不整脈などの合併症で死亡リスクが 10 倍以上に上昇することから、速やかに是正すべき病態と考えられている¹。それにも関わらず、合併疾患に必須の薬剤・不適切な食事のため、是正困難な低 K 血症が持続する患者は多く、それを起因とした腎機能障害（低 K 血症性腎症）を呈することがある。また低 K 血症は既存の慢性腎臓病（CKD）の増悪因子となり、低 K 血症性腎症の一部は不可逆の CKD に陥る²。低 K 血症性腎症は、組織学的に尿細管間質の細胞死・炎症・線維化や嚢胞形成を特徴とするが、その発症機序は明らかにされていない。

インフラマソームは、NLRP3 や AIM2 などの細胞質内パターン認識受容体（PRR）が、アダプター分子 ASC とカスパーゼ-1 と共に形成するタンパク質複合体で、炎症と細胞死を司る自然免疫機構である。活性化されると、カスパーゼ-1 活性化を介した炎症性サイトカイン IL-1 β の成熟化・分泌によって炎症が惹起される。さらに、カスパーゼ-1 はガスダーミン D（GSDMD）を切断し、細胞膜に穴を開けることで細胞死を誘導する。NLRP3 は細胞内カリウム流出によって活性化され³、AIM2 など他の PRR の活性化にもカリウム流出が関与する⁴。しかし、カリウム欠乏による PRR 活性化についての分子機序はよくわかっておらず、生体のカリウム異常疾患とインフラマソームの関連は全くの不明である。低 K 血症では自然免疫異常が示唆されており⁵、カリウム欠乏食を与えたマウスでは腎に顕著な炎症細胞浸潤が誘導される。本研究では、カリウム欠乏に应答する腎の炎症について、インフラマソーム経路が関連することを考え、それを検証した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、低 K 血症性腎症の病態にインフラマソーム経路が関与するかを検証し、病的腎における炎症制御機構を明らかにすることである。生体レベルのカリウム異常疾患でのインフラマソームの役割はよくわかっておらず、動物モデルやヒト初代細胞を用いて病態解明を目指した。

3. 研究の方法

1) 低 K 血症性腎症における炎症の解析:

8-10 週齢の雄性マウス（B57BL/6J）に正 K 食（K=0.5%）もしくは低 K 食（K=0.00032%）を与えて低 K 血症性腎症モデルを作製し、電解質、腎機能、炎症と細胞死、線維化について経時的変化を解析した。また、浸潤炎症細胞をフローサイトメトリーで解析した。

2) 低 K 血症性腎症におけるインフラマソームの寄与の解析:

野生型（WT）とインフラマソーム構成分子の遺伝子欠損マウス（*Nlrp3*^{-/-}、*Aim2*^{-/-}、*Asc*^{-/-}、*Caspase-11*^{-/-}、*Gsdmd*^{-/-}）において低 K 血症性腎症モデルを作成し比較した。インフラマソーム形成を検証するために、蛍光標識 ASC を用いたレポーターマウス（ASC-Citrine）の低 K 血症性腎症を解析した。また、責任細胞の同定のため、10Gy のガンマ線照射したマウスに骨髄移植を行い、生着後に低 K 食を与えて表現型を比較した。

3) 低 K 血症性腎症における腎細胞のシングルセル（sc）RNA-seq 解析:

正 K 食もしくは低 K 食を 4 週間与えた WT マウスの腎細胞をソーティングし、シングルセル RNA-seq 解析を行った。

4) 低 K 環境における腎細胞の応答の解析:

マウスおよびヒト腎の初代細胞を用いて、低 K 培地による反応を解析した。

4. 研究成果

1) 低 K 血症性腎症における炎症の解析:

野生型マウスに低 K 食を与えたところ、2 週目から血清 K および腎組織 K の低下が認められ、腎に炎症性マクロファージと好中球の浸潤が出現し、経時的に悪化した。4 週間後から腎機能低下と組織傷害、線維化が顕著となった（図 1）。腎の炎症は低 K 血症性腎症の組織傷害に先行して認められることが判明した。

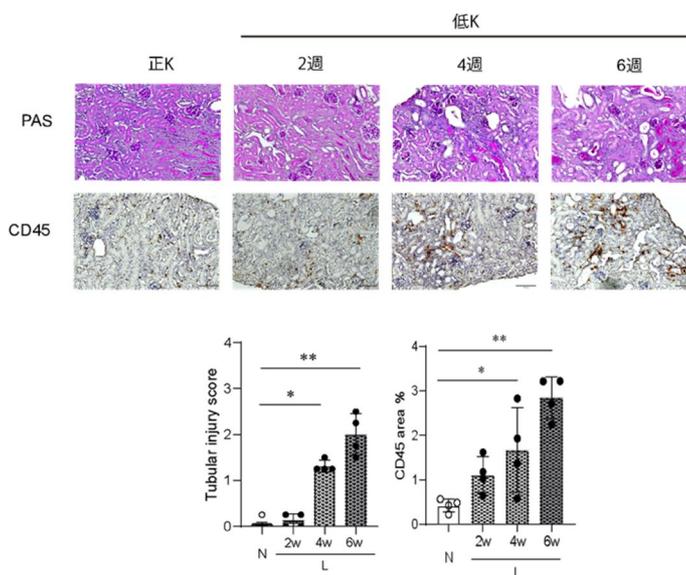


図1: 低K食により、経時的に腎傷害・炎症細胞浸潤が増加する。 mean±SD; *p<0.05 and **p<0.01

2) 低 K 血症性腎症におけるインフラマソームの寄与の解析:

WT およびインフラマソーム構成分子欠損マウスを解析したところ、*Nlrp3*^{-/-}および *Asc*^{-/-}マウスで腎傷害と炎症細胞浸潤が軽減した。一方で、*Caspase-1*^{-/-}*-11*^{-/-}を含めた他の欠損マウスでは明らかな改善を認めなかった (図 2)。ASC-Citrine マウスの解析では、カリウム欠乏による腎 ASC 凝集体形成増加は検出できなかった。従って、低 K 血症性腎症における炎症細胞浸潤に、NLRP3 および ASC が関与するものの、それは炎症性カスパーゼ (*Caspase-1*^{-/-}*-11*^{-/-}) 活性化で定義されるインフラマソーム依存性ではないことが考えられた。さらに WT と *Nlrp3*^{-/-}の間で作製した

骨髄移植マウスにおいて、非骨髄由来 *Nlrp3* が、低 K 血症性腎症の腎傷害に関わることがわかった。骨髄移植マウスの生体内イメージングにより、非骨髄細胞由来の NLRP3 と ASC が低 K 血症性腎症の炎症惹起に重要であることが判明した。

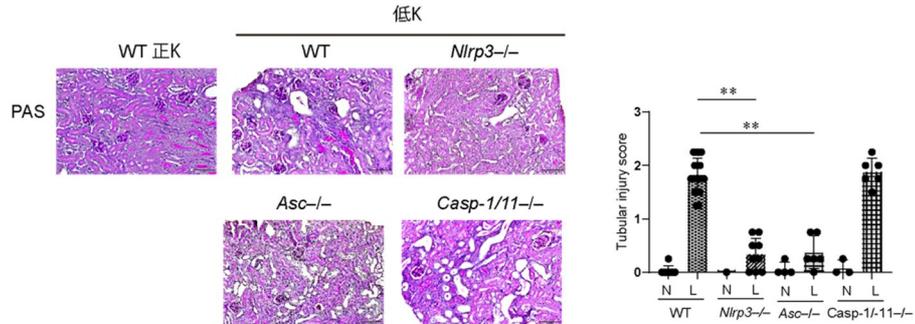


図2: *Nlrp3*, *Asc* 欠損により低K血症性腎症の尿管管傷害が軽減する。 mean±SD; *p<0.05 and **p<0.01

3) 低 K 血症性腎症における腎細胞の scRNA-seq 解析:

2)の結果から、マウス低 K 血症性腎症モデルにおける腎の非炎症細胞に着目し、腎固有細胞の scRNA-seq 解析を行った。低 K 血症性腎症では、遠位尿管管~集合管にかけて *Asc* 発現の上昇が認められた。同部位では複数のチャンネルに関わる遺伝子発現が低下しており、炎症に関わる遺伝子発現が上昇していた。タンパク質レベルでも、低 K 食によって ASC は遠位尿管管~集合管にかけて発現誘導されることがわかった。

4) 低 K 環境における腎細胞の応答の解析:

マウスおよびヒトの初代腎細胞を用いて、低 K 培地による反応を解析した。低 K 環境では炎症経路の活性化が認められ、また炎症性サイトカインへの反応性も上昇していた。この反応は *Nlrp3* 欠損、*Asc* 欠損によって抑制され、低 K 環境においてこれらの分子が重要であることがあきらかになった。

以上より、低 K 血症性腎症において、尿管管・集合管 NLRP3 と ASC がインフラマソームと関係なく炎症惹起に寄与していることがわかった。インフラマソームと独立した、同部位の NLRP3・ASC 経路についての分子メカニズムの解明が必要である。低 K 血症性腎症においては炎症が顕著に認められ、主要な病態と考えられる。今後、NLRP3・ASC 経路を標的とした本症の予防と治療の開発が期待される。

<引用文献>

1. Kjeldsen, K. Hypokalemia and sudden cardiac death. *Exp Clin Cardiol* **15**, e96-9 (2010).
2. Yalamanchili, H. B., Calp-Inal, S., Zhou, X. J. & Choudhury, D. Hypokalemic Nephropathy. *Kidney Int Reports* **3**, 1482–1488 (2018).
3. Pétrilli, V. *et al.* Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* **14**, 4402195 (2007).
4. Fernandes-Alnemri, T. *et al.* The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nat Immunol* **11**, 385–393 (2010).
5. Do, E. A. & Gries, C. M. Beyond Homeostasis: Potassium and Pathogenesis during Bacterial Infections. *Infect Immun* **89**, e00766-20 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Karasawa Tadayoshi, Komada Takanori, Baatarjav Chintogtokh, Aizawa Emi, Mizushina Yoshiko, Fujimura Kenta, Gunji Yoshitaka, Komori Satoko, Aizawa Hidetoshi, Jing Tao Cantona Billton, Matsumura Takayoshi, Takahashi Masafumi	4. 巻 686
2. 論文標題 Caspase-11 deficiency attenuates neutrophil recruitment into the atherosclerotic lesion in apolipoprotein E-deficient mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149158 ~ 149158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.149158	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 Fujimura Kenta, Karasawa Tadayoshi, Komada Takanori, Yamada Naoya, Mizushina Yoshiko, Baatarjav Chintogtokh, Matsumura Takayoshi, Otsu Kinya, Takeda Norihiko, Mizukami Hiroaki, Kario Kazuomi, Takahashi Masafumi	4. 巻 180
2. 論文標題 NLRP3 inflammasome-driven IL-1 and IL-18 contribute to lipopolysaccharide-induced septic cardiomyopathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 58 ~ 68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yjmcc.2023.05.003	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1件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 駒田 敬則
2. 発表標題 AKI・CKDにおけるインフラマソームとパイロトーシス
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

自治医科大学 分子病態研究センター 炎症・免疫研究部 <https://www.jichi.ac.jp/inflammation/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------