

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860634

研究課題名(和文)尿酸腎症におけるインフラマソームの関与と対抗するオートファジー

研究課題名(英文)Autophagy guards against inflammasome in acute hyperuricemic nephropathy.

研究代表者

高橋 篤史(Takahashi, Atsushi)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10704786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究で、尿酸腎症マウスモデルにおいて、近位尿細管特異的オートファジー不全マウスでは、NLRP3インフラマソームがより活性化されていること、マクロファージの浸潤や線維化がより増悪していることが分かった。また、*in vitro*の研究では、オートファジー欠損尿細管細胞において、高濃度の尿酸下での活性酸素の産生がより増加していること、リソソーム膜の透過性亢進がより起こっていることを示した。これらの結果より、オートファジーが、活性酸素やリソソーム傷害を抑制することによって、尿酸腎症に対抗していると考えられた。オートファジー活性化が尿酸腎症の有望な治療戦略となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that in hyperuricemic mice model, NLRP3 inflammasome was more activated in proximal-tubule specific autophagy-deficient mice than in autophagy competent mice. Furthermore, infiltration of macrophage and fibrotic changes were exacerbated in proximal-tubule specific autophagy-deficient mice. Our *in vitro* study indicated that more ROS production was induced in high concentration of uric acid and more LMP (Lysosomal Membrane Permeabilization) was triggered during MSU crystals exposure in autophagy deficient proximal tubular cells compared with in autophagy competent cells. These results suggest that NLRP3 inflammasome is involved in hyperuricemic nephropathy and that autophagy guards against hyperuricemic nephropathy by alleviating ROS production and LMP. Upregulation of autophagy might be promising strategy for hyperuricemic nephropathy.

研究分野：腎臓

キーワード：尿酸腎症 近位尿細管 オートファジー リソソーム傷害

1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣病のひとつとして、増加傾向である高尿酸血症は、痛風関節炎を引き起こすだけでなく、心血管イベントや慢性腎臓病進展の危険因子であると報告されている。

高尿酸血症による腎障害(尿酸腎症)に関しては、従来は血液腫瘍疾患に対する化学療法の際に「急性尿酸腎症」として言及され、尿細管腔内の pH が低下する集合管が傷害の起点と考えられてきたが、正確な傷害メカニズムについては不明な点も多い。我々が以前報告した研究(EMBO J. 2013 Aug 28;32(17):2336-47)においては、近位尿細管も重要な傷害部位であり、また、細胞内恒常性を維持している蛋白分解機構「オートファジー」が傷害を受けたリソソームを処理することがわかった(リソファジー)。

一方、NLRP3(nucleotide binding domain, leucine-rich repeats containing family, pyrin domain-containing-3)を介したインフラマソームが痛風関節炎など様々な疾患に関与していることが報告されているが、痛風関節炎と同様に尿酸腎症においてもNLRP3インフラマソームが関与しているか否かについては定かでない。

2. 研究の目的

高尿酸血症による腎障害(尿酸腎症)の機序に関して、

- (1) 高濃度の尿酸そのものと尿酸結晶のそれぞれがどのような傷害を引き起こすか?
- (2) 痛風関節炎で見られるようなNLRP3インフラマソームによる炎症が関与しているかどうか?
- (3) 細胞内恒常性維持に重要であるオートファジーが尿酸腎症傷害をどのように軽減するか?

の観点から、検討することとした。

3. 研究の方法

近位尿細管特異的オートファジー不全マウス(以下、KOマウス)ならびに対照マウスに対して、尿酸(UA)ならびにオキシニン酸(OAウリカーゼ阻害薬)を投与することによって、尿酸腎症を誘発したうえで、インフラマソーム関連因子として、NLRP3、ASC、caspase-1のmRNAをreal time PCRにより、また、IL-1 β についてはウエスタンブロットにより評価した。

(腎機能、PAS染色による組織傷害についての評価は、以前の報告で検討済である。)

さらに、炎症に関する評価として、マクロファージ遊走因子であるMCP-1のmRNAをreal time PCRによって、また、マクロファージの浸潤の程度を、F4/80の免疫染色を行った。

なお、NLRP3に関しては、インフラマソームによる炎症とは別に、線維化を引き起こすことが報告されているので、尿酸腎症モデルにおいても線維化を検討するため、 α SMA、

collagen I、TGF- β のmRNAをreal time PCRにより評価した。

また、尿酸腎症においては、高濃度の尿酸、ならびに、尿酸結晶それぞれが傷害を引き起こしている可能性がある。それぞれの傷害メカニズムを検討するために、KOマウスから単離したオートファジー欠損近位尿細管細胞ならびに対照近位尿細管細胞に対して、高濃度の尿酸負荷、ならびに、尿酸結晶負荷という別々の条件で培養することによって、NLRP3インフラマソームの重要な刺激因子である、活性酸素(ROS)とリソソーム傷害(lysosomal membrane permeabilization: LMP)を、それぞれ、ROS検出試薬であるCellROX、ならびに、Cathepsin BとLamp1の共染色(LMPが起こるとCathepsin BがLamp1陽性のリソソームから漏出する)により、評価を行った。最後にMTT assayを用いて、尿酸ならびに尿酸結晶存在下における細胞の生存率についても検討した。

4. 研究成果

以前の我々の報告でこの尿酸腎症マウスモデルでは、KOマウスにおいて腎障害が増悪することはすでに示しているが、今回の研究では、KOマウスにおいてNLRP3インフラマソーム関連因子である、NLRP3、ASC、Caspase-1のmRNAレベルの増加、IL-1 β の蛋白レベルでの増加が見られた(図1)。これらの結果より、オートファジー不全状態ではNLRP3インフラマソームによる炎症が増悪しており、尿酸腎症におけるNLRP3インフラマソームの関与が示唆された。

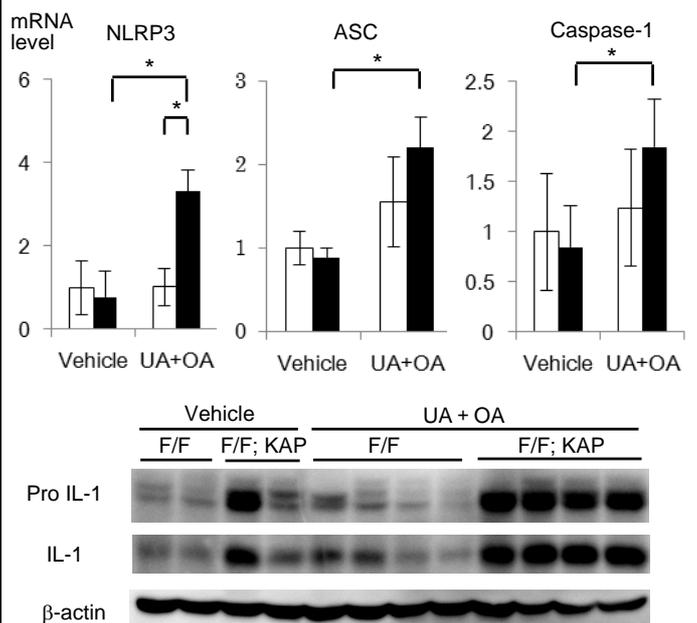


図1 KOマウスではインフラマソーム関連因子のmRNAもしくは蛋白レベルでの増加が見られる。

; F/F ; 対照マウス
; F/F;KAP ; KOマウス

また、KO マウスでは腎臓において、マクロファージ遊走因子である MCP-1 の mRNA が増加しており、F4/80 の免疫染色より、マクロファージの浸潤も増悪していることがわかった (図 2)。

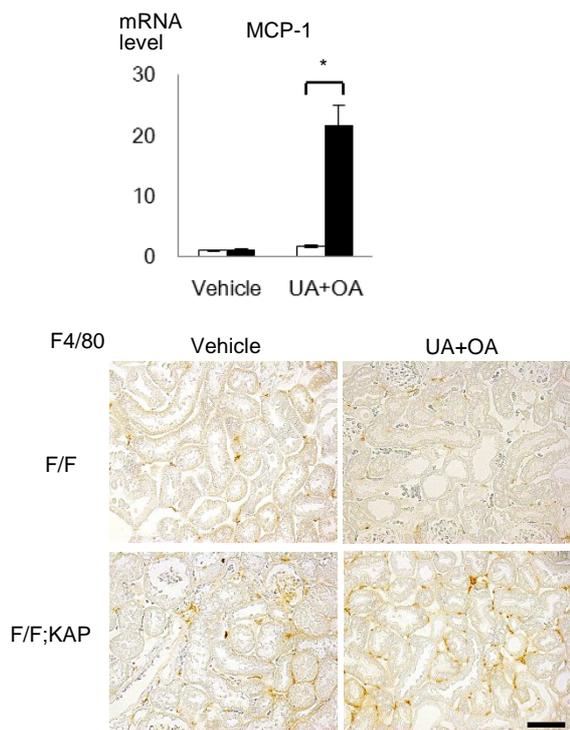


図 2 KO マウスでは尿酸腎症において MCP-1 の mRNA 増加ならびにマクロファージ(F4/80 陽性細胞)浸潤の増悪が見られる。

; F/F ; 対照マウス
; F/F;KAP ; KO マウス
Bar 50µm

さらに、NLRP3 が関与し得る線維化についても、 α SMA、collagen I、TGF- β の mRNA 増加が KO マウスで見られたため、オートファジー不全状態では、尿酸腎症において、線維化刺激も増強していると考えられた(図 3)。

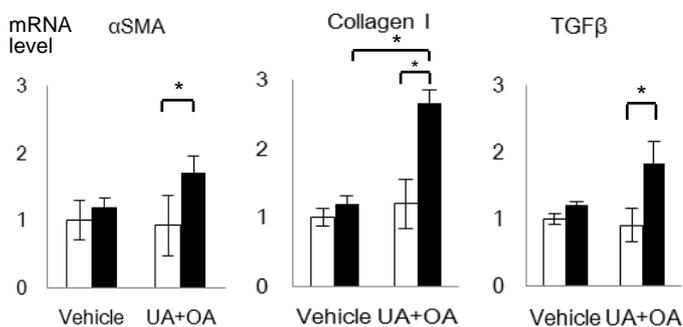


図 3 KO マウスでは尿酸腎症において α SMA、CollagenI、TGF β の mRNA 増加が見られる。

; F/F ; 対照マウス
; F/F;KAP ; KO マウス

また、in vitro の実験において、オートファジー欠損近位尿細管細胞(Atg5(-))では、対照近位尿細管細胞(Atg5(+))と比べて、高濃度の尿酸(10mg/dL)の条件下では ROS の産生が増加し(図 4)尿酸結晶負荷の条件下では LMP が増悪している(図 5) in vivo における NLRP3 インフラマソーム活性化の主因になっている可能性が考えられた。

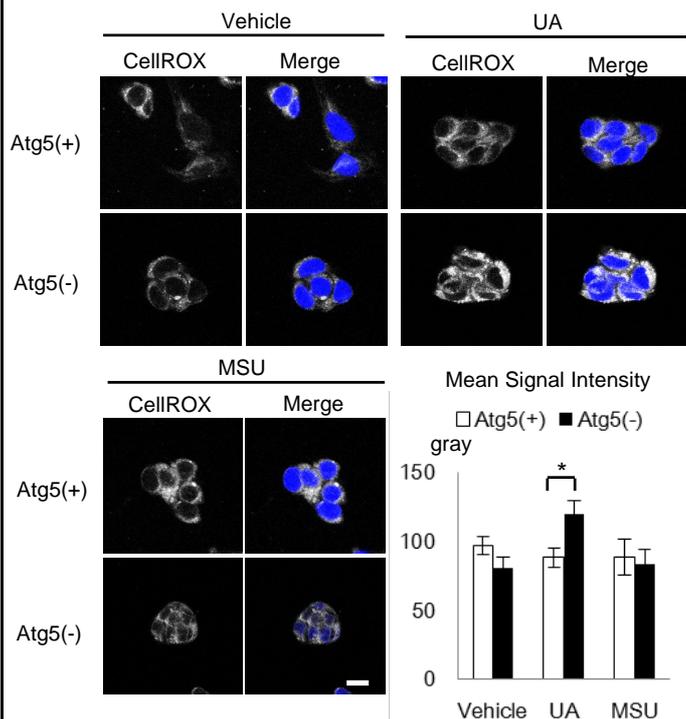


図 4 オートファジー欠損近位尿細管細胞では、高濃度の尿酸(UA)負荷において活性酸素が増加している。

Atg5(+): 対照近位尿細管細胞
Atg5(-): オートファジー欠損近位尿細管細胞
UA: Uric Acid、MSU: Mosodium Urate
Bar 20µm

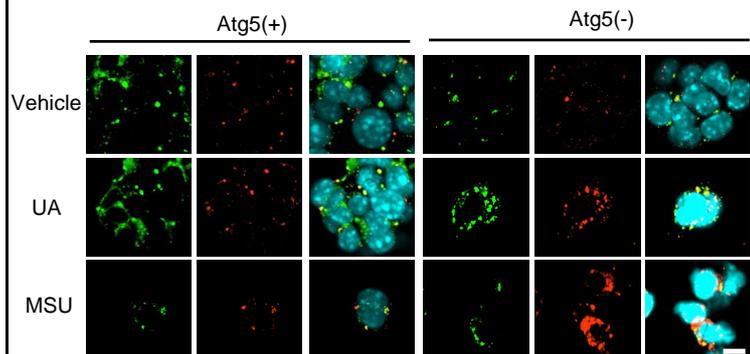


図 5 オート 欠損近位尿細管細胞では、尿酸結晶(MSU)負荷により、LMP(Cathepsin のリソソームからの漏出)が見られる。

Atg5(+): 対照近位尿細管細胞
Atg5(-): オートファジー欠損近位尿細管細胞
UA: Uric Acid MSU: Mosodium Urate
Bar 20µm

最後に、MTT assay を用いて、尿酸ならびに尿酸結晶存在下での、細胞生存率を検討したところ、オートファジー欠損近位尿細管細胞では、対照近位尿細管細胞と比べて、尿酸結晶負荷時の細胞生存率が有意に低下することがわかった（**図6**）

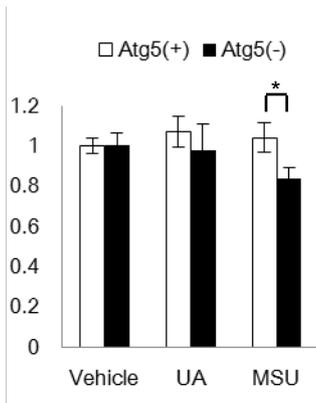
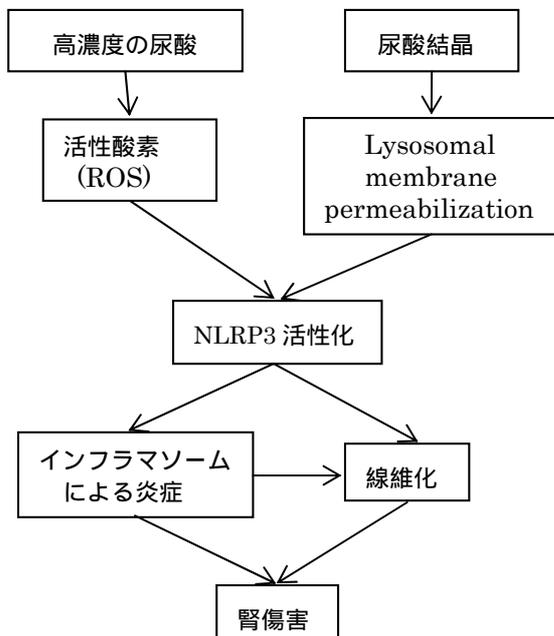


図6 オートファジー欠損近位尿細管細胞では、尿酸結晶負荷時に細胞生存率が低下している。
Atg5(+) 対照近位尿細管細胞
Atg5(-): オートファジー欠損近位尿細管細胞
UA; Uric Acid MSU: Mosodium Urate

これらの結果より、尿酸腎症において、高濃度の尿酸が ROS を発生させ、尿酸結晶が LMP を引き起こし、両者が原因となって NLRP3 インフラマソーム活性化を誘発し尿酸腎症の傷害に関与すること、ならびに、近位尿細管細胞におけるオートファジーが ROS や LMP を抑制することによって、この NLRP3 インフラマソームに対抗し、尿酸腎症の軽減に寄与していると考えられた。

(以下に、本研究から想定される尿酸腎症のメカニズムを図示する。)



<注>

・当初は NLRP3 ノックアウトマウスを使用し、NLRP3 ノックアウトマウスで尿酸腎症が軽減することにより、尿酸腎症における NLRP3 インフラマソームの関与を証明する予定であったが、腎臓における NLRP3 ノックアウトが正確に証明できなかったため、このマウスの使用を断念した。
・現段階では論文の掲載に至っていないが、論文投稿準備中である。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 篤史 (Takahashi Atsushi)
大阪大学医学部附属病院
血液浄化部・助教

研究者番号：10704786

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：