

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17290

研究課題名(和文) Acute-on-chronic腎障害における炎症細胞死の病態解明

研究課題名(英文) Inflammatory cell death during acute-on-chronic kidney injury

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞死は周囲にシグナル伝達を誘導する生理的活性を持つが、CKDにおいては、さらなる傷害刺激が加わることで腎細胞や炎症細胞の細胞死を誘導し、腎機能増悪をきたしうる。インフラマソームは、自然炎症反応とパイロトーシスと呼ばれる細胞死を誘導する。AKIおよびAcute-on-chronic腎障害において、傷害腎のマクロファージのインフラマソーム形成が認められた。危険信号である二本鎖DNAは、様々な分化したマクロファージでIL-1を放出せずにパイロトーシスを起こすことがわかった。死細胞の分化状態が炎症伝播を規定し、Acute-on-chronic腎障害に寄与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

CKD腎という病的腎において、炎症細胞死の役割は未だ不明な点が多い。インフラマソームを介した炎症細胞死を制御することで、CKDの治療・進展予防に役立つ可能性がある。本研究の成果により、二本鎖DNAが様々なマクロファージでパイロトーシスを誘導する可能性が示唆された。AKIおよびCKDは心血管病など様々な疾患の危険因子であり、有効な治療法が期待されている。CKD腎の炎症細胞死の重要性を示した本研究により、CKDのさらなる病態解明に向けて学術的・社会的な意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cell death is a physiologically functional process that regulates signals to the surrounding cells. During CKD, the overriding insults can cause cell death of intrinsic kidney cells and immune cells and contribute to worse kidney outcomes. Inflammasomes are multi-protein complexes which regulate innate immune response and cell death called pyroptosis. We examined immune cell death in AKI and acute-on-chronic injury kidneys. Inflammasome formation and pyroptotic cell death in macrophages developed in the injured kidneys. We showed that a possible danger-associated molecular pattern (DAMP), double-stranded DNA, induced pyroptosis in kidney macrophages in the Aim2-dependent manner. We further demonstrated that many types of macrophages engaged in DNA-induced pyroptosis without releasing inflammasome-dependent cytokines. The differentiation status of dead macrophages seemingly determines the propagation of inflammation and contributes to the outcomes of acute-on-chronic kidney injury.

研究分野：腎臓病学

キーワード：慢性腎臓病 急性腎障害 マクロファージ パイロトーシス

1. 研究開始当初の背景

急性腎障害 (AKI) は、虚血や腎毒性物質などによる腎細胞死を来すことで、短時間に腎機能が低下して生命に関わる重篤な病態である。AKI は病理学的に急性尿細管壊死を示し、それに伴う過剰なサイトカイン産生が病態に関与すると考えられている。既存の CKD は AKI 発症の大きなリスク因子であり、CKD 患者に発症した AKI (Acute-on-chronic 腎障害) は通常の AKI よりも予後が悪いことが明らかになっている¹。CKD 腎ではマクロファージを主体とした炎症細胞浸潤が認められるが、そのような病的腎に起きる AKI が重症化する機序は不明である。生体内危険信号のセンサーである細胞質内パターン認識受容体 (PRR) のうち、NLRP3 や Absent in melanoma 2 (AIM2) などは病原体によらない無菌性炎症を引き起こす。これらの PRR は、アダプター分子 ASC とカスパーゼ-1 と共にインフラマソームと呼ばれる複合体を形成し、カスパーゼ-1 活性化を介して強力な炎症性サイトカイン IL-1 β や IL-18 を成熟化・分泌し、炎症と細胞死を惹起する。同時に、ガスダーミン D (GSDMD) を切断して N 末端断片が細胞膜に孔を形成することで細胞死 (パイロトーシス) が誘導される。申請者は、CKD 腎に充満する炎症細胞が AKI 刺激によって死に至ると、その成分が組織傷害を拡大するという仮説を立てた。マクロファージは死細胞を認識して貪食するが、申請者は近年、CKD で壊死細胞由来二本鎖 DNA によりインフラマソームを介した炎症が誘導されることを見出した²。そこで、CKD 腎上に新たに発症する AKI によって炎症細胞死が誘導されると、インフラマソーム活性化によって腎組織障害が増悪することを考え、それを検証した。

2. 研究の目的

本研究では、炎症細胞でのインフラマソームの活性化、細胞壊死による炎症の伝播が Acute-on-chronic 腎障害に果たす役割を検証することを目的とする。CKD 腎の炎症細胞インフラマソームに着目した動物モデルを作製し、これまで不明であった病態解明を目指す。

3. 研究の方法

1) AKI 腎における炎症細胞死の解析：

8-10 週齢の雄性マウス (B57BL/6J) に対して横紋筋融解症における AKI (RIAKI) 腎モデルを作製し、野生型 (WT), AIM2 ノックアウト (AIM2^{-/-}) について炎症細胞死を評価した。

2) Acute-on-chronic 腎障害マウスモデルの解析：

本研究では、5 週齢の雄性マウス (B57BL/6J) に対して 3 週間のアデニン食による CKD を誘導し、そのマウスに虚血時間 40 分の片側腎虚血再灌流 (IRI) を行った。Acute-on-chronic 腎障害の動物モデルの解析は、血清学的・組織学的に行った。

2) マクロファージ細胞死による周囲細胞への影響の解析：

CKD 腎に浸潤する、様々なサブタイプのマクロファージにパイロトーシスを誘導し、炎症惹起機能を解析した。

4. 研究成果

1) AKI 腎における炎症細胞死の解析：

RIAKI 腎においては、細胞外二本鎖 DNA が病態に関与する。そこで、二本鎖 DNA を認識する PRR である AIM2 に着目し、WT と AIM2^{-/-} の RIAKI 腎における炎症細胞死を解析した。フローサイトメトリーおよび TUNEL 染色にて、RIAKI 腎では AIM2 依存的なマクロファージの細胞死が認められた (図 1)。さらに RIAKI 腎から抽出したマクロファージは、二本鎖 DNA によって AIM2 依存的なパイロトーシスが誘導され、RIAKI 腎では広範な腎マクロファージでパイロトーシスが起き、病態に関与することがわかった。

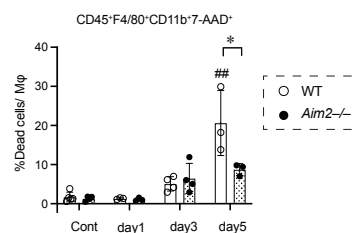


図1: RIAKI腎ではAIM2依存的なマクロファージ細胞死を認める
mean \pm SD; *p < 0.05 and ##p < 0.01 vs Cont

2) Acute-on-chronic 腎障害マウスモデルの解析：

CKD を有するマウスについて腎 IRI7 日後の腎組織を解析した。CKD 腎では LTL で染色される近位尿管の脱落、筋線維芽細胞 (α -SMA+細胞) 増生が認められ、シリウスレッド染色でも線維化の増加が認められた。非 CKD・CKD とともに、IRI 後のマクロファージ浸潤が有意に増加

した。免疫染色では、Acute-on-chronic 障害腎において浸潤した白血球でインフラマソーム形成を示す ASC 凝集体が検出された (図 2)。従って、ACKI 腎では、炎症細胞でインフラマソームが形成され、マクロファージ浸潤に関与していることが示唆された。

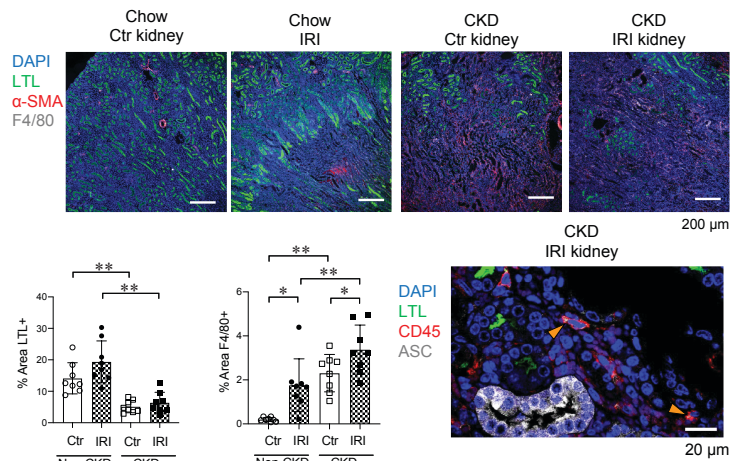


図2:非CKD腎・CKD腎ともにIRI後ではマクロファージ浸潤が増加し、炎症細胞にインフラマソーム形成(矢頭)が認められる mean ± SD; *p < 0.05 and **p < 0.01

3) マクロファージ細胞死による周囲細胞への影響の解析:

CKD においては、浸潤したマクロファージが、壊死細胞二本鎖 DNA を取り込んで AIM2 インフラマソームを活性化する。

CKD では様々な分化したマク

ロファージが集簇しているため、二本鎖 DNA によるパイロトーシスが、異なるマクロファージで誘導され得るかを細胞実験で検証した。未分化マクロファージ (M(-)) 炎症性マクロファージ

M1 (M(LPS/IFN γ)), 組織修復に関わる非炎症性マ

クロファージ M2 (M(IL-4), M(TGF β)) で二本鎖 DNA による細胞死が誘導された。GSDMD の活性化が認められ、いずれもパイロトーシスであることが確認された (図 3)。

一方で、短時間分化させた M1 でのみ炎症性サイトカインである IL-1 β , IL-1 α , IL-18 を活性化し、M0, M2 ではこれらのサイトカインの活性化が認められなかった。危険関連分子パターン (Danger-associated molecular pattern; DAMP) である HMGB1 や ASC の流出は、M1, M2 ともに認められた。パイロトーシス後の培養上清をマウス尿細管細胞やマクロファージに添加したところ、M1 パイロトーシスの培養上清でのみ、炎症性サイトカインとケモカインの発現上昇が誘導された (図 4)。従って、広範なマクロファージで二本鎖 DNA によるパイロトーシスが起きるものの、M1 パイロトーシスが、周囲細胞への炎症を拡大する作用がより強いことが示唆された。

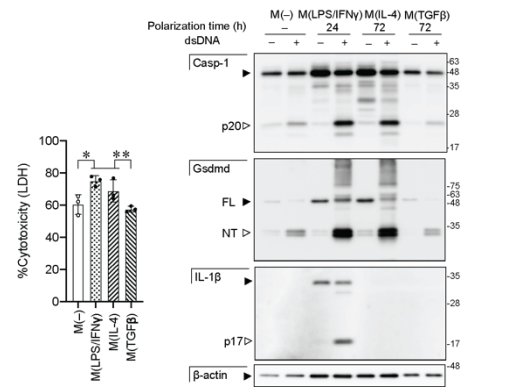


図3:様々なマクロファージ(M0, M1, M2)が二本鎖DNAによって細胞死を起こす

以上より、AKI, Acute-on-chronic 腎障害ではマクロファージでのインフラマソーム形成が示唆され、広範なマクロファージで AIM2 依存的なパイロトーシスが起きる可能性が考えられた。パイロトーシスによる炎症惹起作用は M1 マクロファージで強く認められる。M2 マクロファージのパイロトーシスの影響について、さらなる解析が必要である。CKD 腎における炎症細胞死の病態解明によって、インフラマソームを標的とした CKD 進行や Acute-on-chronic 腎障害の予防と治療につながることを期待できる。

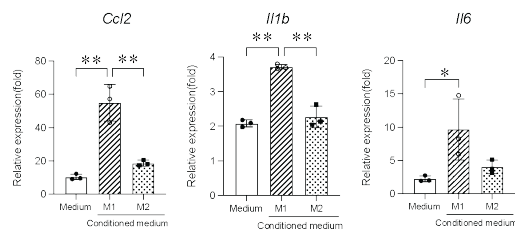


図4:パイロトーシスを起こしたM1マクロファージの培養上清は、腎尿細管細胞に炎症を起こす

mean ± SD; *p < 0.05 and **p < 0.01

<引用文献>

1. Pannu, N. *et al.* Modification of Outcomes After Acute Kidney Injury by the Presence of CKD. *Am J Kidney Dis* 58, 206–213 (2011).

2. Komada, T. *et al.* Macrophage Uptake of Necrotic Cell DNA Activates the AIM2 Inflammasome to Regulate a Proinflammatory Phenotype in CKD. *J Am Soc Nephrol* 29, 1165–1181 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7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 Anzai Fumiya, Karasawa Tadayoshi, Komada Takanori, Yamada Naoya, Miura Yutaka, Sampilvanjil Ariunaa, Baatarjav Chintogtokh, Fujimura Kenta, Matsumura Takayoshi, Tago Kenji, Kurosu Hiroshi, Takeishi Yasuchika, Kuro-O Makoto, Takahashi Masafumi	4. 巻 5
2. 論文標題 Calciprotein Particles Induce IL-1 / ?Mediated Inflammation through NLRP3 Inflammasome-Dependent and -Independent Mechanisms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 602 ~ 614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/immunohorizons.2100066	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 駒田敬則, Chintogtokh Baatarjav, 高橋将文	4. 巻 36
2. 論文標題 横紋筋融解症による急性腎障害における DNA を介した炎症の制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本透析医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 312-318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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, Kimura Hiroaki, Karasawa Tadayoshi, Hisata Shu, Sadatomo Ai, Inoue Yoshiyuki, Yamada Naoya, Aizawa Emi, Hishida Erika, Kamata Ryo, Komada Takanori, Watanabe Sachiko, Kasahara Tadashi, Suzuki Takuji, Horie Hisanaga, Kitayama Joji, Sata Naohiro, Yamaji-Kegan Kazuyo, Takahashi Masafumi	4. 巻 205
2. 論文標題 NLRP3 Inflammasome Activation in Lung Vascular Endothelial Cells Contributes to Intestinal Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Lung Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1393 ~ 1405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2000217	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 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, Komada Takanori, Karasawa Tadayoshi, Kamata Ryo, Yamada Naoya, Kimura Hiroaki, Dezaki Katsuya, Ohmori Tsukasa, Takahashi Masafumi	4. 巻 531
2. 論文標題 ASC regulates platelet activation and contributes to thrombus formation independent of NLRP3 inflammasome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 125 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.07.063	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 235
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 7554 ~ 7566
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 Baatarjav Chintogtokh, Komada Takanori, Karasawa Tadayoshi, Yamada Naoya, Sampilvanjil Ariunaa, Matsumura Takayoshi, Takahashi Masafumi	4. 巻 29
2. 論文標題 dsDNA-induced AIM2 pyroptosis halts aberrant inflammation during rhabdomyolysis-induced acute kidney injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Death & Differentiation	6. 最初と最後の頁 2487 ~ 2502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41418-022-01033-9	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 Karasawa Tadayoshi, Komada Takanori, Yamada Naoya, Aizawa Emi, Mizushina Yoshiko, Watanabe Sachiko, Baatarjav Chintogtokh, Matsumura Takayoshi, Takahashi Masafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Cryo-sensitive aggregation triggers NLRP3 inflammasome assembly in cryopyrin-associated periodic syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e75166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/elife.75166	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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Chintogtokh Baatarjav, Takanori Komada, Masafumi Takahashi
2. 発表標題 AIM2-dependent pyroptosis is crucial for resolution after rhabdomyolysis-induced acute kidney injury (RIAKI)
3. 学会等名 the 64th Annual Meeting of the Japanese Society of Nephrology (JSN2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chintogtokh Baatarjav, Takanori Komada, Masafumi Takahashi
2. 発表標題 AIM2-dependent pyroptosis is crucial for resolution after rhabdomyolysis-induced acute kidney injury (RIAKI)
3. 学会等名 the 64th Annual Meeting of the Japanese Society of Nephrology (JSN2021)
4. 発表年 2021年

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