

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	若松 拓也
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 835 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Indoxyl Sulfate Promotes Macrophage IL-1 $\beta$ Production by Activating Aryl Hydrocarbon Receptor/NF- $\kappa$ /MAPK Cascades, but the NLRP3 inflammasome Was Not Activated (インドキシル硫酸は、アリルハイドロカーボン受容体/NF- $\kappa$ /MAPK 経路の活性化を介して IL-1 $\beta$ の発現を亢進させるが、NLRP3 インフラマソームを活性化しない。)
論文審査委員	主査 教授 片貝 智哉 副査 教授 成田 一衛 副査 准教授 矢尾板 永信

博士論文の要旨

【背景と目的】

慢性腎臓病 (CKD) 患者では一般人口と比較して死亡率、心血管病発生率が高く、その病態には古典的因子に加え CKD 特有の因子が関連する。中でも血液透析では十分な除去が困難な蛋白結合性尿毒症物質 (UT) の蓄積は重要である。代表的な UT であるインドキシル硫酸 (IS) は血中での増加が心血管死の増加に関連すると報告されている。さらに腎障害マウスでは動脈硬化巣内での IS 沈着に伴い炎症性サイトカインが増加し硬化巣が進展する。申請者らは、過去に IS がマクロファージに作用し活性酸素種とインターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 等の炎症性サイトカイン産生を促進させることを示した。

既報では IS が aryl hydrocarbon 受容体(AhR)、mitogen-activated protein kinase (MAPK)、nuclear factor (NF)  $\kappa$ B を介して細胞の炎症を誘発することが示されたが、マクロファージに関する知見はほとんどない。

申請者らはマクロファージに IS を反応させた時の AhR/NF- $\kappa$ B/MAPK と NLRP3 インフラマソームの動態を明らかにした。

【方法】

加熱処理した 10%胎児ウシ血清を含む RPMI1640 培地で THP-1 ヒト単球性白血病細胞株を 7 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>で培養した。THP-1 細胞 1 $\times$ 10<sup>6</sup> /mL を 50 ng/mL の phorbol 12-myristate 13-acetate に 72 時間曝露しマクロファージに分化させた。マクロファージを IS 1 mM (213  $\mu$ g/mL) または lipopolysaccharide (LPS) 100 ng/mL に 24 時間曝露し、また BAY11-7082 10  $\mu$ M を添加して IS のマクロファージ毒性の変化を観察した。上清の human IL-1 $\beta$ 、human caspase-1 の濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で同定した。細胞の RNA を回収しリアルタイム PCR でヒト pro-IL-1 $\beta$ 、AhR、チトクローム P450 1A1 (CYP1A1)、チトクローム P450 1B1 (CYP1B1)、aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR)、ARNT、NLRP3、GAPDH を定量した。

細胞内 Pro-IL-1 $\beta$ 、ASC、NLRP3、AhR の産生および ERK1/2、p38、JNK、NF- $\kappa$ Bp65 のリン酸化をウェスタンブロットで検索した。25mM Tris-HCl (pH 7.5)、150mM NaCl、1% NP-40、0.1% デオキシコール酸を含む RIPA バッファーを作成し、RIPAbuffer 10mL にプロテアーゼ阻害薬 1 錠、ホスフ

アターゼ阻害薬 1錠を加え、lysis buffer とした。Lysis buffer により細胞を溶解し回収した。回収液は 25 ゲージ針を 15 回通して懸濁し、4°C、15000rpm で 30 分間遠心させ上清のみ蛋白溶解液として使用した。蛋白 20g ずつを NuPAGE 4-12% SDS ポリアシルアミドゲルに分注して泳動し、ポリビニリデンフルオライド膜に転写した。ブロッキング液には 5% 脱脂粉乳含有のトリス緩衝液添加食塩液 (TBST) を用いたが、リン酸化の検出時には 5% ウシ血清アルブミン含有 TBST で代用した。膜を 4°C で一晩一次抗体と反応させ、その後常温で 1 時間 HRP 標識二次抗体と反応させた後に発色させ信号強度を検出した。ImageJ で結果を定量化した。

すべての結果を統計学的に解析し平均値±標準偏差で示した。統計学的有意差はスチューデントの t 検定または分散分析で評価し  $p < 0.05$  を有意と考えた。

#### 【結果】

IS (1 mM, 213 $\mu$ g/mL) は pro-IL-1 $\beta$  の RNA 発現と成熟 IL-1 $\beta$  の産生を惹起した。IS による pro-IL-1 $\beta$  発現は LPS (100 ng/mL) と同程度であったが、成熟 IL-1 $\beta$  の産生量は LPS でより高値であった。IS は、AhR 活性化経路である AhRR、CYP1A1、CYP1B1 の RNA 発現を亢進させた。IS は MAPK 経路である p38、JNK のリン酸化を促進させたが、ERK1/2 のリン酸化は促進させなかった。一方、IS は NF- $\kappa$ Bp65 のリン酸化も促進させた。また BAY11-7082 は IS で誘導される pro-IL-1 $\beta$  の増加を抑制した。NLRP3 インフラマソームは宿主免疫応答に重要な経路であり caspase-1 の活性化を介して IL-1 $\beta$  の成熟化を促進する。IS はマクロファージの NLRP3 蛋白発現を抑制したが、ASC と pro-caspase-1 の蛋白発現は抑制しなかった。また、caspase-1 は LPS で増加したが IS では増加しなかった。

#### 【考察】

マクロファージに IS を加えた時の IL-1 $\beta$ 、AhR、NF- $\kappa$ B、MAPK 反応経路および NLRP3 インフラマソームをリアルタイム PCR、ウェスタンブロット、ELISA で評価した。IS は IL-1 $\beta$  の RNA 発現を著増させたが成熟 IL-1 $\beta$  増加はわずかであった。IS は AhR と AhR 活性化に関連する分子の RNA 発現を亢進させた。また、IS は NF- $\kappa$ B p65 と MAPK のリン酸化を促進させた。NF- $\kappa$ B 反応の上流の I $\kappa$ B/IKK を阻害する BAY11-7082 を用いると、IS による NF- $\kappa$ B p65 活性化と IL-1 $\beta$  発現亢進は共に抑制された。すなわち IS は AhR/MAPK/NF- $\kappa$ B シグナル経路を活性化し pro-IL-1 $\beta$  の発現を亢進させることが示唆された。一方、IS は NLRP3 を減少させ ASC、pro-caspase 1、caspase-1 を増加させないことから、LPS 等の炎症誘発物質と異なりインフラマソーム活性化、IL-1 $\beta$  成熟化を生じないことが示唆された。

本研究により、CKD 患者の微弱な慢性炎症に尿毒症物質が関与するメカニズムの一部が示された。

#### 審査結果の要旨

慢性腎臓病 (CKD) 患者では一般人口と比較して死亡率、心血管病発生率が高く、その病態には古典的因子に加え CKD 特有の因子が関連する。中でも、血液透析では十分な除去が困難な蛋白結合性尿毒症物質 (UT) の蓄積が重要で、代表的な UT であるインドキシル硫酸 (IS) は血中での増加が心血管死の増加に関連すると報告されている。さらに、腎障害マウスでは動脈硬化巣内での IS 沈着に伴い炎症性サイトカインが増加し硬化巣が進展する。申請者らは、過去に IS がマクロファージに作用し活性酸素種とインターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 等の炎症性サイトカイン産生を促進させることを示した。また既報では、IS が aryl hydrocarbon 受容体 (AhR)、mitogen-activated protein kinase (MAPK)、nuclear factor (NF)- $\kappa$ B を介して細胞の炎症を誘発することが示されているが、マクロファージに関する知見はほとんどない。

本研究において申請者らは、ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 を用いて、マクロファージに IS を反応させた時の AhR/NF- $\kappa$ B/MAPK と NLRP3 インフラマソームの動態を解析した。

IS は pro-IL-1 $\beta$  の RNA 発現を著増させたが、LPS とは異なり成熟 IL-1 $\beta$  増加はわずかであった。IS は AhR と AhR 活性化に関連する遺伝子の RNA 発現を亢進させた。また、IS は NF- $\kappa$ B p65 と MAPK のリン酸化を促進させた。NF- $\kappa$ B 反応の上流の I $\kappa$ B/IKK を阻害する BAY11-7082 を用いると、IS による NF- $\kappa$ B p65 活性化と IL-1 $\beta$  発現亢進は共に抑制された。すなわち IS は AhR/MAPK/NF- $\kappa$ B シグナル経路を活性化し pro-IL-1 $\beta$  の発現を亢進させることが示唆された。一方、IS は NLRP3 を減少させ ASC、pro-caspase 1、caspase-1 を増加させないことから、LPS 等の炎症誘発物質と異なりインフラマソーム活性化、IL-1 $\beta$  成熟化を生じないことが示唆された。

本研究により、マクロファージに対する IS の作用機序の一部が明らかになった。これは CKD 患者の微弱な慢性炎症に尿毒症物質が関与することを示唆するものであり、博士論文としての十分な価値を認める。