

氏 名	小森 さと子
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 734 号
学位授与年月日	令和 7 年 3 月 17 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	低カリウム血症性腎症における自然免疫経路の役割に関する研究
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教授 黒尾 誠
	(委 員) 教授 秋元 哲
	教授 小宮根 真弓

論文内容の要旨

1 研究目的

低カリウム血症は、慢性化すると低カリウム血症性腎症を発症し腎障害をきたすほか、既存の慢性腎臓病の増悪因子となることが知られている。組織学的には腎の炎症・細胞死・線維化を呈するが、その病態機序は不明である。炎症・細胞死を制御する自然免疫経路にインフラマソームとよばれる細胞質内たんぱく複合体が関与することが知られている。インフラマソームは、危険信号を認識する NLRP3 や AIM2 などのパターン認識受容体と、アダプター分子 ASC、エフェクター分子である炎症性カスパーゼからなり、活性化すると炎症性サイトカイン成熟化による炎症と Gasdermin D 活性化による細胞膜孔形成、細胞死を引き起こす。NLRP3 活性化には細胞外へのカリウム流出が関与するとされるが、生体のカリウム異常症との関わりは不明である。本研究は、低カリウム血症性腎症と腎インフラマソームの関わりを解明し、慢性腎臓病の進展抑止および新規治療法を開発することを目的として研究を行った。

2 研究方法

野生型マウスに対し、正カリウム食（カリウム含有量 0.5%）または低カリウム食（同 0.003%）を最大 6 週までの設定した期間与えて経時的変化を観察し、低カリウム血症性腎症モデルを作製した。続いて、インフラマソーム構成分子（NLRP3、ASC、Caspase-1/11）の欠損マウスを用いて低カリウム食を 4 週間与え、インフラマソーム経路の関与を評価した。骨髓由来炎症細胞の関与を評価するため、野生型と NLRP3 欠損型間の骨髓キメラマウスや骨髓単球系細胞特異的 NLRP3 欠損マウスに対して低カリウム食を与え、表現型の違いを比較した。さらに、低カリウム血症性腎組織の多重免疫染色を行い、インフラマソーム構成分子の発現と局在について解析した。マウス腎組織から初代尿細管上皮細胞を単離し、炎症性サイトカインの発現機序について検討を行った。

また、低カリウム血症性腎症の予後について検討するため、野生型マウスに低カリウム食を 6 週間与え、その後標準食（カリウム含有量 0.9%）に戻してさらに 6 週間観察し、カリウム補正前と補正後の表現型を比較した。

3 研究成果

低カリウム食開始 2 日後には尿中カリウム排泄は著減し、2 週間には血清カリウム値および腎組織 K^+ 値が有意に低下した。腎傷害が経時的に進行し、組織学的評価では早期から尿細管間質への炎症細胞浸

潤を認め、その後線維化の進行と細胞死の増加を認めた。また、インフラマソーム構成分子である NLRP3 や ASC の遺伝子発現は経時的に増加した。インフラマソーム構成分子の欠損マウスを用いて野生型マウスと比較すると、NLRP3 欠損および ASC 欠損により低カリウム血症性腎の炎症・傷害・線維化が軽減したが、Caspase-1/11 欠損では軽減されなかった。フローサイトメトリー法を用いて腎組織の浸潤細胞を解析すると、炎症細胞の中でも特に M1 様マクロファージや CCR2 陽性マクロファージが早期から増加していた。これらの炎症細胞浸潤は NLRP3 欠損および ASC 欠損により抑制されたが、Caspase-1/11 欠損では抑制されなかった。

骨髓由来炎症細胞の関与を検討するため、野生型と NLRP3 欠損型間の骨髓キメラマウスや骨髓単球系細胞特異的 NLRP3 欠損マウスを用いて比較したところ、非骨髓細胞由来の NLRP3 が病態形成に重要であることが明らかとなった。また、低カリウム血症性腎組織の多重免疫染色では、遠位ネフロンと集合管の一部で ASC の発現が増強しており、責任細胞と考えられた。

マウス初代尿細管上皮細胞を単離し、カリウム欠乏下における炎症誘導機序について検討した。尿細管細胞では Lipopolysaccharide (LPS) 刺激により CCL2 や TNF α の遺伝子発現が誘導され、これらの反応は NLRP3 欠損細胞および ASC 欠損細胞では抑制された。さらにカリウム濃度の異なる培地で培養すると、カリウム欠乏下では NF- κ B 活性化が誘導されたが、NLRP3 欠損細胞および ASC 欠損細胞では抑制傾向を認めた。

低カリウム血症性腎症の予後について検討するため、野生型マウスに低カリウム食を 6 週間与えた後、標準食に戻してさらに 6 週間観察した。血清カリウム値は速やかに補正され尿細管傷害やケモカイン産生は改善したが、炎症細胞浸潤は残存し、線維化が進行した。

4 考察

低カリウム血症性腎症モデルマウスの解析とインフラマソーム構成分子の欠損マウスおよび骨髓キメラマウスを用いた比較から、低カリウム血症性腎症では早期に始まる尿細管間質の炎症が重要であり、腎固有細胞の NLRP3、遠位ネフロン・集合管の ASC がインフラマソーム非依存的に病態形成に関与することが明らかとなった。また、カリウム欠乏下において尿細管細胞の NLRP3 や ASC が NF- κ B 活性化を介して炎症促進因子の産生を誘導することが示唆された。尿細管細胞は様々な刺激に反応して炎症促進因子や線維化促進因子を放出し、尿細管間質の炎症や線維化を誘導すると考えられている。細胞外カリウム欠乏が NF- κ B 活性化を誘導する機序や NLRP3 および ASC との関わりは未だ不明であり、今後さらなる検討が必要である。

また低カリウム血症性腎症の予後についての検討から、血清カリウム値を補正しても一度確立された線維化病変は不可逆的かつ進行性であることが示唆された。低カリウム血症性腎症による慢性腎臓病の進展を予防するためにも、低カリウム血症の早期発見と尿細管傷害に対する適切な早期治療が重要であり、NLRP3 や ASC を標的とした治療は 1 つの選択肢に成り得ると考えられた。

5 結論

低カリウム血症性腎症では早期からみられる炎症が重要であり、腎固有細胞の NLRP3、遠位ネフロン・集合管の ASC がインフラマソーム非依存的な経路でこの炎症促進に関与することが明らかとなった。さらに、NLRP3 および ASC は尿細管細胞において NF- κ B 活性化を介してケモカインや炎症性サイトカインの産生を誘導することが示唆された。低カリウム血症性腎症の病態におけるインフラマソーム構成分子の関与についての報告はまだなく、本研究は NLRP3 および ASC の重要性を示した初めての報告である。

また、低カリウム血症性腎症の予後に関する報告は乏しく、本研究の結果からカリウム補正後も線維化が進行し慢性腎臓病へ進展する可能性が考えられ、低カリウム血症の早期発見と尿細管傷害に対する早期治療の重要性が示唆された。本研究成果を通じて、低カリウム血症性腎症の病態機序解明と新規治療法の開発につながることを期待される。

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、低カリウム血症に伴って発生する腎障害（低カリウム血症性腎症）の分子機構の解明を目指し、小森氏が主体となって行った動物実験の成果をまとめた論文である。

マウスにカリウム欠乏食を与えて低カリウム血症を誘導すると、腎間質に炎症が惹起され、それに引き続いて線維化が誘導される。小森氏は、この低カリウム血症性腎症モデルマウスにおける腎障害には、インフラマソームの活性化による炎症反応が寄与しているのではないか、という仮説を立てた。この仮説を検証するため、インフラマソーム構成蛋白（NLRP3、ASC、Caspase-1/11）の欠損マウスにカリウム欠乏食を与え、野生型マウスと比較して腎障害が軽減するか検討した。その結果、NLRP3 欠損マウスとASC 欠損マウスでは間質の炎症・線維化が軽減したが、予想に反してCaspase-1/11 欠損マウスでは野生型マウスと同程度の腎障害が発生した。さらに野生型マウス、NLRP3 欠損マウス、ASC 欠損マウスから尿細管細胞を初代培養して培地中のカリウム濃度を下げると、野生型マウス由来の尿細管細胞ではNF κ B が活性化されるのに対し、NLRP3 欠損マウスおよびASC 欠損マウス由来の尿細管細胞では活性化されないことを見出した。

これらの結果から小森氏は、低カリウム血症性腎症における炎症反応は、NLRP3 およびASC に依存するがインフラマソームには依存しない、と結論した。当初の仮説とは異なる結論となったが、NLRP3 やASC は最近、インフラマソーム非依存性の経路を介して多彩な作用を発揮することが報告されており、低カリウム血症性腎症の分子機構にもこの経路が寄与することを示したことは新規性および学術的意義が高い、と評価できる。

本学位論文には大きな問題点はないが、本研究の背景となっている一般的な知識を論文の冒頭で紹介すれば、専門外の者にもより理解しやすい論文になると考えられたので、インフラマソームや腎臓におけるカリウムの動態に関する一般知識をまとめた図と解説を追加するように指導した。

本学位論文は、仮説を検証するための高度な実験が論理的に順序立てて分かりやすく述べられており、得られた知見も新規性・学術的意義が高く、全体的に非常に優れた内容となっており、学位論文に相応しい。合格と判定する。

最終試験の結果の要旨

本学位論文は、低カリウム血症に伴って発生する腎障害（低カリウム血症性腎症）の分子機構の解明を目指し、小森氏が主体となって行った動物実験の成果をまとめた論文である。

マウスにカリウム欠乏食を与えて低カリウム血症を誘導すると、腎間質に炎症が惹起され、それに引き続いて線維化が誘導される。小森氏は、この低カリウム血症性腎症モデルマウスにおける腎障害には、インフラマソームの活性化による炎症反応が寄与しているのではないか、という仮説を立てた。この仮説を検証するため、インフラマソーム構成蛋白（NLRP3、ASC、Caspase-1/11）の欠損マウスにカリウム欠乏食を与え、野生型マウスと比較して腎障害が軽減するか検討した。その結果、NLRP3 欠損マウスと

ASC 欠損マウスでは間質の炎症・線維化が軽減したが、予想に反して Caspase-1/11 欠損マウスでは野生型マウスと同程度の腎障害が発生した。さらに野生型マウス、NLRP3 欠損マウス、ASC 欠損マウスから尿細管細胞を初代培養して培地中のカリウム濃度を下げると、野生型マウス由来の尿細管細胞では NF κ B が活性化されるのに対し、NLRP3 欠損マウスおよび ASC 欠損マウス由来の尿細管細胞では活性化されないことを見出した。

これらの結果から小森氏は、低カリウム血症性腎症における炎症反応は、NLRP3 および ASC に依存するがインフラマソームには依存しない、と結論した。当初の仮説とは異なる結論となったが、NLRP3 や ASC は最近、インフラマソーム非依存性の経路を介して多彩な作用を発揮することが報告されており、低カリウム血症性腎症の分子機構にもこの経路が寄与することを示したことは新規性および学術的意義が高い、と評価できる。

プレゼンテーションは、提出された学位論文のデータの解説を中心に行われた。論文にない図表も適切に配置し、専門外の者にも分かりやすいように配慮した発表であった。審査員の質問も正確に理解し、適切に回答していた。

本学位論文は、仮説を検証するための高度な実験が論理的に順序立てて分かりやすく述べられており、得られた知見も新規性・学術的意義が高く、全体的に非常に優れた内容となっており、学位論文に相応しい。また、プレゼンテーションも明快で分かりやすく、質疑応答においても本研究の背景に関する深い学識が伺われた。以上、小森氏の学位論文および発表内容を総合的に判断し、学位を授与するに相応しいと評価する。合格と判定する。