

## 低カリウム誘発性炎症反応における新規自然炎症経路インフラマソームの役割の解明

高橋 将文

自治医科大学分子病態治療研究センター

**概要** 【背景】 心血管病や生活習慣病における炎症反応の重要性が示されている。近年、この炎症反応が、NLRP3 インフラマソームと呼ばれる細胞内分子複合体を介して誘導されてくることが明らかになってきた。本研究では、NLRP3 インフラマソーム活性化機構における細胞内カリウム(K)イオンの関与について検討した。

【方法】 細胞実験では、マウスマクロファージ J774 細胞株および腹腔由来マクロファージを用いて、LPS priming の後、Nigericin あるいは Ouabain で刺激を行った。IL-1 $\beta$  の産生や、その前駆体から成熟型へのプロセッシング、mRNA 発現は、ELISA 法やウェスタンブロット法、リアルタイム RT-PCR 法で評価した。細胞内 K 濃度は原子吸光光度計を用いて測定した。動物実験では、野生型(WT)とNLRP3 欠損(NLRP3-KO)マウスにLPSを投与した後(priming)、Ouabainを腹腔内投与し、心臓超音波法を用いて心機能を評価するとともに、血漿および心組織中 IL-1 $\beta$  を評価した。

【結果】 マクロファージにおいて、K イオノフォアである Nigericin は細胞内 K の流出(K efflux)を引き起こすと同時に、NLRP3 インフラマソーム活性化と IL-1 $\beta$  産生を誘導した。Na-K ポンプの阻害剤である Ouabain は、マクロファージにおいて IL-1 $\beta$  のプロセッシングと産生を誘導したが、この IL-1 $\beta$  産生は、NLRP3-KO マウス由来マクロファージでは著明に抑制されていた。また、Ouabain による IL-1 $\beta$  産生は、KATP チャンネル阻害剤(glibenclamide)および細胞外への高濃度 K の添加による K efflux 阻害によって抑制された。さらに、Ouabain は細胞内 K 濃度を有意に低下させた。WT マウスに LPS priming 後に Ouabain を投与したところ、心機能の有意な低下を認めたが、NLRP3-KO マウスでは心機能の低下を認めなかった。

【結論】 Ouabain が、K efflux を介して NLRP3 インフラマソームを活性化し、IL-1 $\beta$  を産生させることで炎症反応を惹起すること、さらにこの炎症反応が、心機能障害を誘導する可能性が示された。

### 1. 研究目的

心血管病や腎臓病、生活習慣病といった様々な疾患における炎症反応の重要性が注目されている。これらの疾患での炎症は、病原体の関与がないことから無菌性炎症と称されているが、その炎症惹起機序はこれまで不明であった。近年、この無菌性炎症がインフラマソーム(inflammasome)と呼ばれる新規の自然炎症経路を介して惹起されることが明らかとなってきた。インフラマソームとは、カスパーゼ-1 の活性化を誘導する細胞内分子複合体であり、主として NLRP3 (Nod-like receptor [NLR] family, pyrin domain-containing 3) インフラマソームが様々な無菌性炎症に関与することが報告されている。NLRP3 インフラ

マソームは、Nod 様受容体である NLRP3 とアダプター分子 ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), Casp1 から構成され、その活性化により強力な炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ : interleukin-1 $\beta$ ) の産生が誘導される。我々はこれまで、心筋梗塞や動脈硬化といった心血管病や急性腎傷害、慢性腎臓病などの動物モデルを用いて、これら病態における無菌性炎症が NLRP3 インフラマソームを介して惹起され、NLRP3 インフラマソームを阻害することで病態が改善されることを報告してきた。これらの解析から、インフラマソーム活性化が細胞内カリウム(K)イオンの変化によって誘導されることがわかってきた。そこで、今回、インフラマソ

ム活性化機構における細胞内 K イオンの関与について検討し、さらに、細胞内 K の細胞外への流出(K efflux)によって誘導されるNLRP3 インフラマソームの活性化がマウス心機能に与える影響について検討を行った。

## 2. 研究方法

### <細胞培養実験>

マウスマクロファージ細胞株(J774細胞)およびチオグリコレートにより誘導したマウス腹腔マクロファージを、10% FCS/DMEM培地で培養した。LPS (lipopolysaccharide)を10 ng/mL, 12時間処理し、LPS primingとした。NigericinあるいはOuabainで刺激した後、3時間で細胞上清やタンパク、RNAを回収して解析した。GlibenclamideやKCl, NaClはOuabain刺激の30分前に前処理した。また、インフラマソーム活性化の陽性コントロールとしては、ATP (Adenosine triphosphate) 刺激を用いた。

### <IL-1 $\beta$ タンパクの測定>

細胞上清中およびマウス血漿中のIL-1 $\beta$ 産生は、サンドイッチ法によるELISAキット(R&D Systems)を用いて測定した。

### <IL-1 $\beta$ mRNA発現の評価>

細胞よりISOGEN (Nippon Gene)を用いてRNAを抽出した。Il1bとNlrp3 mRNAの発現は、リアルタイムRT-PCR法により測定し、Gapdh発現を内部標準として解析した。

### <ウェスタンブロット法>

IL-1 $\beta$ 前駆体 (pro-IL-1 $\beta$ ) および成熟型IL-1 $\beta$  (mature IL-1 $\beta$ ) の発現は、RIPAバッファーにより細胞溶解液を作製し、SDS-PAGEを行った後、ウェスタンブロット法により解析した。内部コントロールとして、 $\beta$ -アクチン発現を用いた。

### <細胞内K濃度の測定>

細胞内K濃度は、偏光ゼーマン原子吸光光度計 (Hitachi, Z-5010)を用いて測定した。

### <マウス実験プロトコール>

野生型 (WT) マウス (C57BL/6J・雄性・8週齢) およびNLRP3欠損 (NLRP3-KO) マウスにLPS (3 mg/kg, 腹腔内) を前投与し、その12時間後にOuabain (2 mg/kg, 腹腔内) を投与して12時間後に心機能を評価するとともに、血液や組織を回収した。

### <マウス心機能の評価>

マウスにイソフルランにより吸入全身麻酔を行い、小動物用超音波高解像度イメージングシステム Vevo2100 (Visual Sonics社)を用いて、心臓超音波検査を施行して心収縮能である左室内径短縮率(% FS)を評価した。

## 3. 結果

### <Nigericinは細胞内K流出を引き起こし、IL-1 $\beta$ 産生を誘導する>

NLRP3 インフラマソーム活性化における細胞内 K 濃度の変化の影響を検討するため、少量の LPS で priming して pro-IL-1 $\beta$  合成を誘導した J774 細胞に、K イオノフォアである Nigericin (3.4  $\mu$ M) を処理した後、上清中に産生される IL-1 $\beta$  を評価した。LPS priming では、IL-1 $\beta$  産生がほとんど誘導されないが、Nigericin の刺激によって著明な IL-1 $\beta$  の産生が引き起こされた (図 1A)。また、Nigericin 刺激によって、実際に細胞内 K 濃度が減少しているかを確認するため、原子吸光光度計を用いて細胞内 K 濃度を測定したところ、Nigericin 処理した細胞では、有意に細胞内 K 濃度が低下していた (図 1B)。

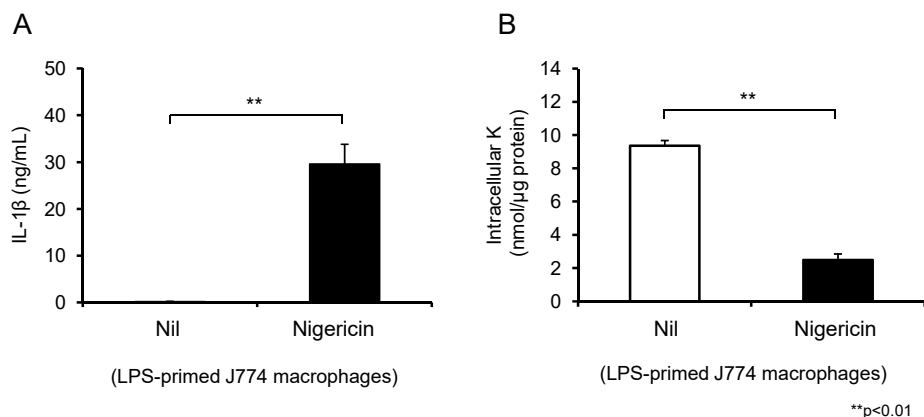


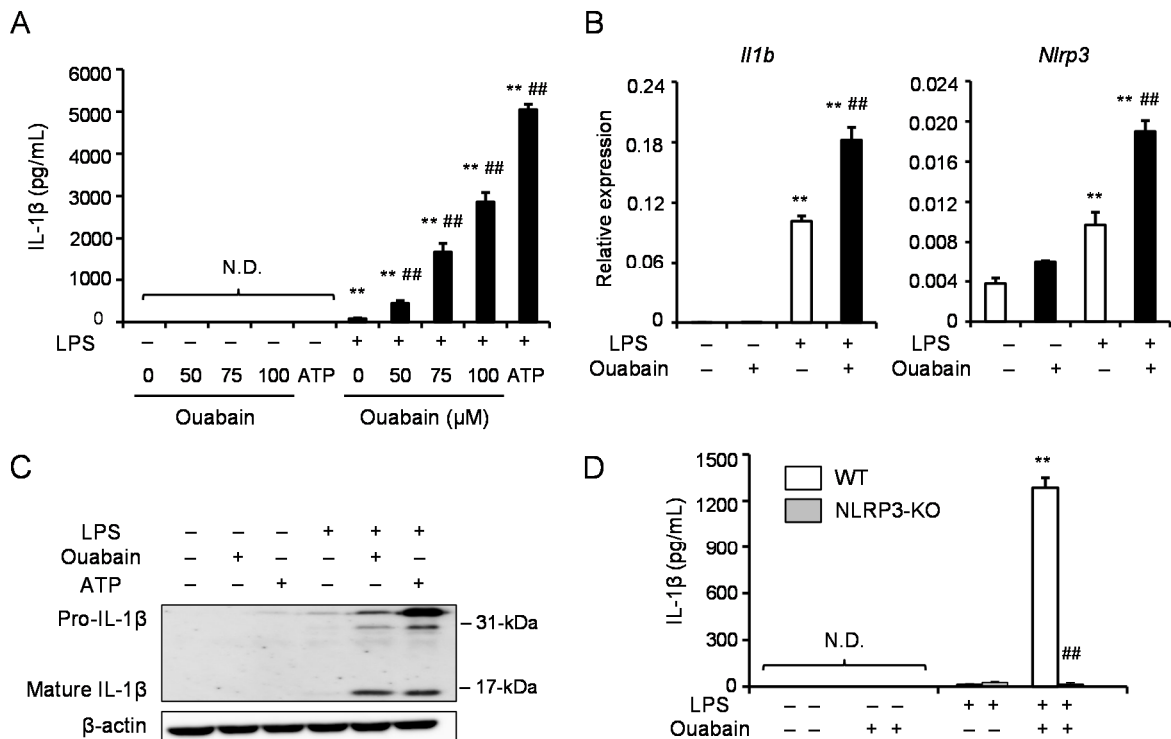
図 1. Nigericin は細胞内 K 流出を介して IL-1 $\beta$  産生を誘導する

### <OuabainはNLRP3インフラマソーム活性化する>

Ouabainは強心配糖体の一つであり、Na-KポンプであるNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseを阻害して細胞内K濃度を低下させることが知られている。そこで、Ouabain刺激によってNLRP3インフラマソームが活性化されるかを検討した。LPSでprimingしたJ774細胞では、Ouabain刺激によって用量依存性(20-100 μM)にIL-1βの産生が誘導された(図2A)。一方、LPS primingなしのOuabain単独で刺激した細胞では、IL-1βの産生を全く認めなかった。また、陽性コントロールとして用いたATP(5 mM)刺激でも著明なIL-1βの産生を認めた。次に、リアルタイムRT-PCR法を用いてIL-1β mRNAの発現を検討した。未刺激のJ774細胞では、IL-1β mRNAの発現を検出できなかったが、これまで報告されているように、LPS primingによってIL-1β mRNAの発現が誘導された。また、Ouabain(100 μM)単独ではその発現を誘導しなかったが、LPS primingした細胞にOuabainで刺激を入れると、IL-1β mRNAの発現がさらに増加することが示された(図2B)。一方、NLRP3インフラマソームの構成分子であるNLRP3の発現は、LPS primingによって増加す

る傾向を示し、Ouabain刺激によってさらに増加した。

IL-1β産生はインフラマソーム活性化の一つの指標となり得るが、Casp-1活性化によるIL-1β前駆体(pro-IL-1β: 31-kDa)から成熟型(mature IL-1β: 17-kDa)へのプロセシングがより直接的な指標となる。そこで、ウェスタンブロット法を用いて、このプロセシングを検討した。LPS primingによってpro-IL-1βの発現が弱く検出され、この発現はOuabain刺激によって増加し、さらにmature IL-1βが検出された(図2C)。また、陽性コントロールとして使用したATPによってもIL-1βのプロセシングが確認された。一方、タンパク量の内部コントロールであるβ-actinの発現には変化を認めなかった。WTマウスの腹腔から採取した初代培養マクロファージにおいても、Ouabain刺激によって有意なIL-1βの産生を認めた(図2D)。一方、NLRP3-KOマウスから採取したマクロファージでは、このIL-1β産生はほぼ完全に抑制されていた。これらの結果から、OuabainがNLRP3インフラマソームを活性化してIL-1β産生を誘導することが明らかになった。



N.D., not detected; \*\*p<0.01 vs. WT (LPS+, Ouabain-); ##p<0.01 vs. WT (LPS+, Ouabain+)

図2. OuabainはNLRP3インフラマソームを活性化してIL-1β産生を誘導する

### <OuabainによるNLRP3インフラマソーム活性化は細胞内K流出を介している>

OuabainによるNLRP3インフラマソームの活性化が、細胞内からのK effluxを介しているのかを検証するため、細胞外(培養液)に高濃度K(KCl,130mmol/L)を添加することで、K effluxを抑制して検証した。KCl添加により、IL-1 $\beta$ の産生が有意に抑制されたが、高濃度Na(NaCl,130mmol/L)の添加では、その抑制効果を認めなかった(図3A)。さらに、KATPチャネルの阻害剤であるGlibenclamide(50  $\mu$ M)の前処理でも、OuabainによるIL-1 $\beta$ 産生が有意に抑制された。実際に、Ouabainで刺激した細胞において細胞内K濃度を測定したところ、Ouabain刺激によって有意な細胞内K濃度の低下を認めた(図3B)。このことから、OuabainによるNLRP3インフラマソームの活性化は、細胞内から細胞外へのK effluxを介して誘導されることが明らかになった。

### <Ouabainによる炎症誘導が生体における心機能に対する影響>

OuabainによるNLRP3インフラマソームを介した炎症反応の誘導が、生体においても役割を果たしているかを検証するため、培養細胞実験と同様に、マウスにLPSを腹腔内投与することによりprimingした後、Ouabainを投与して心機能を評価した。WTマウスおよびNLRP3-KOマウスのいずれにおいても、LPS primingのみでは% FSで評価した心収縮能に有意な変化を認めなかったが、LPS primingにてOuabainを投与したWTマウスでは、心収縮能の有意な

低下を認めた(図4A)。一方、NLRP3-KOマウスでは、Ouabain投与によっても心収縮能に変化を認めなかった。

血漿中および心組織中のIL-1 $\beta$ を測定したところ、血漿ではLPS primingのみでもIL-1 $\beta$ の上昇が認められ、Ouabain投与によってさらに有意にIL-1 $\beta$ が増加しており、これらの増加はNLRP3-KOマウスでは著明に抑制されていた。一方、心組織中では、Ouabain投与によってIL-1 $\beta$ が増加傾向を示し、これらの増加は血漿中と同様にNLRP3-KOマウスでは有意に抑制されていた。以上の結果から、Ouabainによって誘導される心機能障害は、NLRP3インフラマソームの活性化を介していることが示唆された。

## 4. 考察

近年、細菌やウイルスといった病原体の関与がない炎症反応は無菌性炎症と呼ばれ、心血管病や生活習慣病などの様々な病態において重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。これまで、その無菌性炎症が惹起される機序はほとんどわかっていなかったが、最近、いくつかの疾患における無菌性炎症が、インフラマソームと呼ばれる細胞内に形成される分子複合体を介して惹起されることが明らかとなってきた。特に、無菌性炎症に関わるインフラマソームとして、NLRP3インフラマソームが最もよく研究されており、これはアダプター分子ASCを中心としてNLRに属するNLRP3とCasp-1の複合体から構成される。

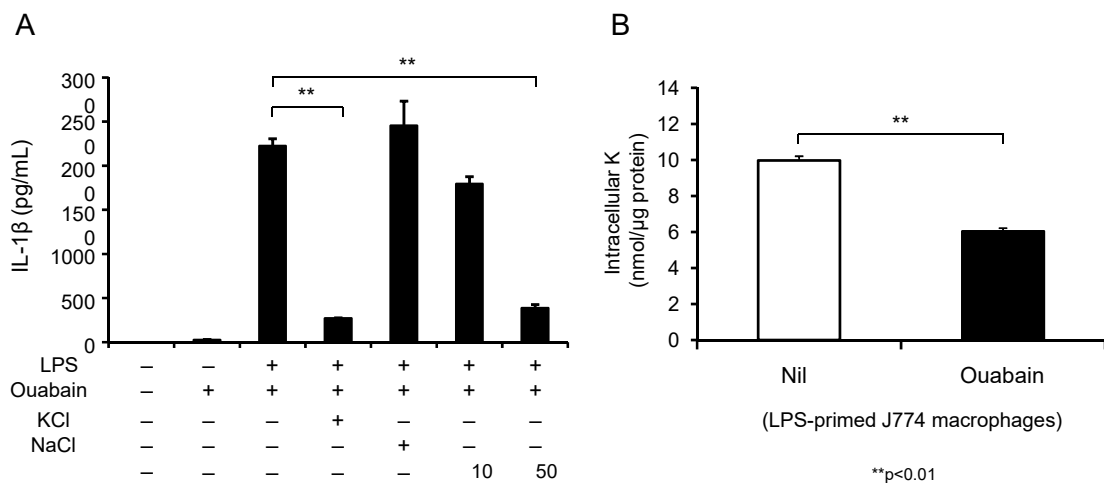


図3. OuabainによるNLRP3インフラマソーム活性化は細胞内K流出を介している

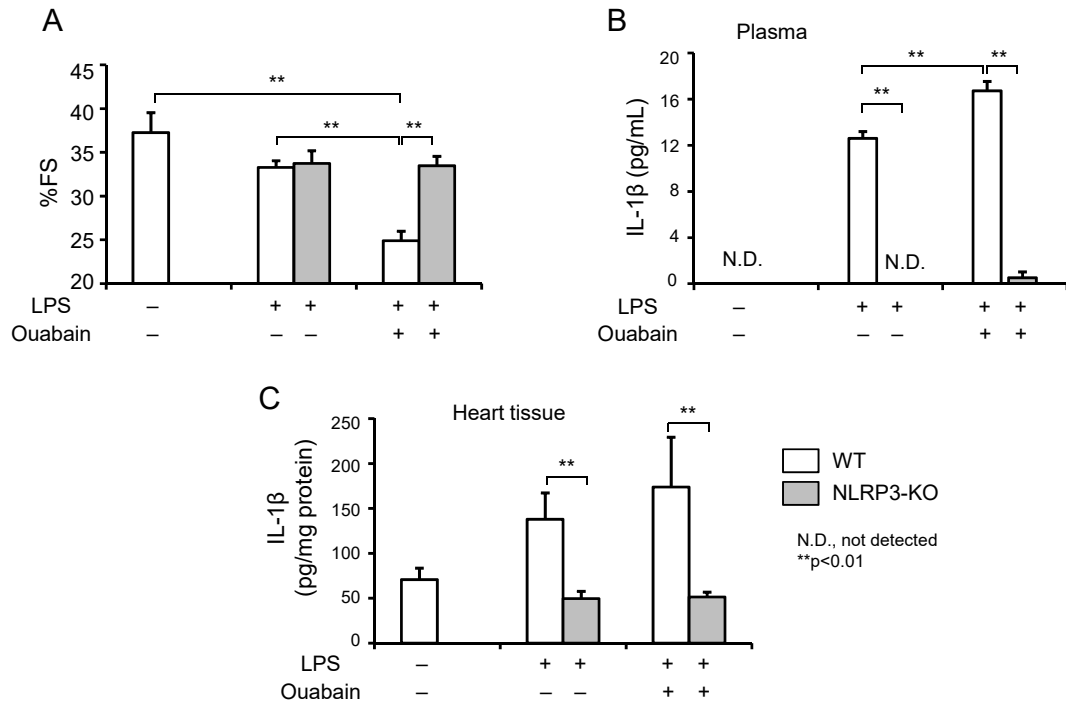


図 4. Ouabain は NLRP3 インフラマソームを介して心機能を低下させる

カスパーゼ-1は、IL-1 $\beta$ 変換酵素 (ICE:IL-1 $\beta$ -converting enzyme) と呼ばれたプロテアーゼであることから、活性化されるとIL-1 $\beta$ を前駆体から成熟型へとプロセシングして放出し、炎症反応を惹起する。この転写レベルでのpor-IL-1 $\beta$ 合成とインフラマソーム活性化によるタンパク質レベルでのプロセシングという2段階での制御を受けているIL-1 $\beta$ の産生機構はサイトカインの中でもIL-1ファミリーに特徴的であり、炎症惹起において非常に強い活性を持つIL-1 $\beta$ の分泌を厳密に制御する上で重要であると考えられる。今回、我々は、インフラマソーム活性化機構における細胞内Kイオンの関与について検討を行い、NigericinやOuabainが細胞内からのK effluxを誘導してNLRP3インフラマソームを活性化し、IL-1 $\beta$ を産生することを示した。また、マウスへのOuabain投与により心機能障害が誘導され、これがNLRP3の欠損によって抑制されることも明らかとなった。

NLRP3 インフラマソームの活性化機構には未だ不明な点が多いが、本研究で示された K efflux 以外にもミトコンドリアの活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) の産生、リソソームの傷害が重要な経路であることが示されている。ミトコンドリア由来の ROS 産生は電子伝達系の阻害

や、オートファジーを介したミトコンドリアの浄化機構であるミトファジーの低下により異常ミトコンドリアが蓄積することで引き起こされる。一方、リソソーム傷害に起因する機序には多くの結晶性分子が関わっており、コレステロール結晶や尿酸結晶などの内在性の結晶性分子の他、シリカやアスベストなどの外因性の粒子もこれを引き起こすことが明らかにされている。これらの結晶や粒子を取り込んだマクロファージにおいて、リソソームの破綻が起こってプロテアーゼであるカテプシン B が細胞質内へと放出され、NLRP3 インフラマソームの活性化を引き起こすと考えられている。K efflux を引き起こす機序では、死細胞から細胞外へと放出される ATP がプリン受容体である P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> 受容体を介して K efflux を引き起こすことや、Nigericin のような細菌由来の毒素による細胞膜孔の形成も直接の原因となる。本研究では、Na-K ポンプ阻害薬である Ouabain が NLRP3 インフラマソームを活性化して IL-1 $\beta$  を産生し、炎症反応を惹起すること、さらに、この Ouabain によって誘導される NLRP3 インフラマソームを介した炎症反応が心機能抑制に寄与する可能性を示した。Ouabain は強心配糖体であり、同様の作用を示すジギタリスは心不全などの心血管病に対する治療薬としても使用されている。従って、

本研究で示された Ouabain による炎症惹起や心機能傷害が, ヒトの病態にも関与するのかについて, 今後, さらに詳細に研究を行っていく必要がある。

## 5. 参考文献

1. Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a novel player in

myocardial infarction. *Int Heart J* 55: 101-105, 2014

2. Kobayashi M, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Kimura H, Mizushina Y, Shirasuna K, Mizukami H, Kasahara T, Hasebe N, Takahashi M. NLRP3 reduces macrophage interleukin-10 production and enhances the susceptibility to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Sci Rep* 6: 26489, 2016

## NLRP3 Inflammasome Activation and Inflammation : Effect of Ouabain-Induced Potassium Efflux in Macrophages

Masafumi Takahashi

Jichi Medical University

### Summary

**Background:** Inflammation plays a crucial role in the pathophysiology of cardiovascular disease and life-related disease. Recent evidence indicates that the inflammation is mediated through an intracellular multi-protein complex, termed as NLRP3 inflammasome. In the present study, we investigated the role of potassium in activation of the NLRP3 inflammasome.

**Methods and Results:** Treatment with nigericin (a potassium ionophore) induced potassium efflux and interleukin (IL)-1 $\beta$  production in low-dose lipopolysaccharide (LPS)-primed J774 macrophages. Treatment with ouabain (a Na-K pump inhibitor) also induced pro-IL-1 $\beta$  processing and subsequent IL-1 $\beta$  production in LPS-primed J774 and murine primary macrophages, and this production was almost completely inhibited in the macrophages derived from NLRP3-knockout (KO) mice. The processing of pro-IL-1 $\beta$ , determined by western blot analysis, was confirmed in the cells treated with ouabain. *In vivo* experiments showed that ouabain treatment induced cardiac dysfunction in LPS-pretreated wild-type mice, but not in NLRP3-KO mice.

**Conclusion:** Our findings demonstrate that ouabain induces NLRP3 inflammasome activation and IL-1 $\beta$  production through potassium efflux, leading to inflammatory responses, which are involved in cardiac dysfunction.