

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08871

研究課題名（和文）補体活性化制御によるSTEC-HUSの治療を目指した基盤研究

研究課題名（英文）Research for the Development of a Treatment for STEC-HUS by Regulation of Complement Activation

研究代表者

尾崎 将之（Ozaki, Masayuki）

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50389459

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではマウスに志賀毒素を投与し溶血性尿毒症症候群のモデルを作成した。志賀毒素は糸球体の血小板-フィブリン血栓形成につながることを示された。このモデルにおいてMBL2阻害剤3F8を投与することにより志賀毒素により惹起される血小板-フィブリン沈着は軽減された。これらの知見は、STEC-HUSにおける補体のレクチン経路の役割を示唆しており今後治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管出血性大腸菌0157に代表され溶血性の志賀毒素産生大腸菌（STEC）の食中毒は流行が繰り返され社会問題になっている。尿毒症症候群（STEC-HUS）はこの食中毒の重篤な合併症であり、腎臓に微小血栓が形成され腎機能障害、溶結性貧血、血小板減少を呈する。本疾患は出血傾向を呈するため急性期の腎生検は禁忌となり、病理組織学的な病態解明が進まず治療法も確立していなかった。マウスモデルを用いた本研究によりレクチン経路の阻害が糸球体の血小板-フィブリン血栓形成につながることを示され今後の治療法開発に繋がる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Shiga toxin was administered to mice to create a model of hemolytic uremic syndrome. Shiga toxin was shown to lead to platelet-fibrin clot formation in glomeruli. In this model, administration of the MBL2 inhibitor 3F8 reduced platelet-fibrin deposition induced by Stx-2. These findings suggest a role for the complement lectin pathway in STEC-HUS and may lead to the development of future therapies. In addition, Shiga toxin treatment induced tubular dysfunction and histological abnormalities of the tubules in a mouse model of STEC-HUS.

研究分野：集中治療医学

キーワード：志賀毒素 溶血性尿毒症症候群 補体レクチン経路

1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌 O157 に代表される志賀毒素産生大腸菌 (STEC) の食中毒は流行が繰り返され社会問題になっていた。溶血性尿毒症症候群 (STEC-HUS) はこの食中毒の重篤な合併症であり、腎臓に微小血栓が形成され腎機能障害、溶結性貧血、血小板減少を呈する。本疾患は出血傾向を呈するため急性期の腎生検は禁忌となり、病理組織学的な病態解明が進まず治療法も確立していなかった。

2. 研究の目的

本疾患の病態に免疫系のひとつである補体の活性化が関与していることが指摘されてきた。補体系は自然免疫に分類され、特定の分子が細胞表面にあれば自己の組織に対しても傷害する作用や凝固を活性化する働きを持つ。本研究では、STEC-HUS モデルにおける腎臓組織病理を詳細に検討することと、補体活性阻害薬の腎機能障害抑制効果を検討することを目的とした。

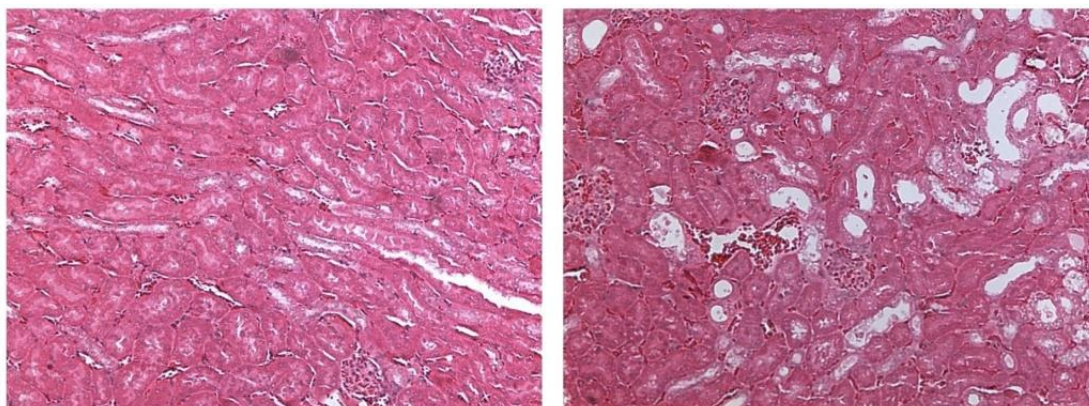
3. 研究の方法

(1) マウスへ志賀毒素投与後に摘出した腎臓に対し、HE 染色とフィブリン、血小板の抗体をもちいて免疫組織化学染色をおこなった。また補体レクチン経路を阻害するマンノース結合レクチンの抗体 (3F8) を投与したうえで志賀毒素を投与したマウスでも同様の染色を行った。また尿細管の機能を尿中 cystatin-C to creatinine ratio を用いて評価した。

(2) ヒトのマンノース結合レクチン (MBL) をノックインしたマウスを用いた HUS モデルを作成しヒト MBL に対する抗体 (3F8) の効果を組織学的に評価した。対照群のマウスには PBS を、第 2 群のマウスには志賀毒素 (Stx-2) を、第 3 群のマウスには 3F8 と Stx-2 を投与した。蛍光二重免疫法とデジタル画像解析を用いて、腎臓切片をフィブリンまたはフィブリノーゲンと CD41 (血小板のマーカー)、von-Willebrand 因子 (内皮細胞と血小板のマーカー)、ポドシン (ポドサイトのマーカー) の抗体を用いて免疫染色を行った。マウスとヒトの STEC-HUS の超薄切片を電子顕微鏡 (EM) で観察した。

4. 研究成果

(1) 志賀毒素 (Stx) をマウスの腹腔内に投与することにより STEC-HUS の疾患モデルを作成した。腎臓を採取し、腎臓の HE 染色、PAS 染色と抗 CD10 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、志賀毒素投与群とコントロール群で比較を行った。その結果 Stx 群マウスの腎臓では HE 染色で近位尿細管の脱落を認めた (図 1)。PAS 染色で遠位尿細管直部に PAS 陽性硝子円柱が認められた。抗 CD10 抗体を用いた免疫組織化学染色では CD10 陰性である遠位尿細管に円柱を認めた。コントロール群マウスの腎臓ではこれらの所見を認めなかった。



コントロール群

Stx 群

図 1

尿中クレアチニン濃度と尿中シスタチン C 濃度を測定し、志賀毒素を投与されたマウスにおいて尿中 cystatin-C to creatinine ratio の悪化が認められた (図 2)。モデルマウスにおける尿

細管機能の低下が示唆された。本モデルにおける飲水量の変化を調べたところ STEC-HUS モデルでは尿量の増加とともに飲水量が増加し、慢性期になってもコントロール群に比し飲水量が多いことが判明した。

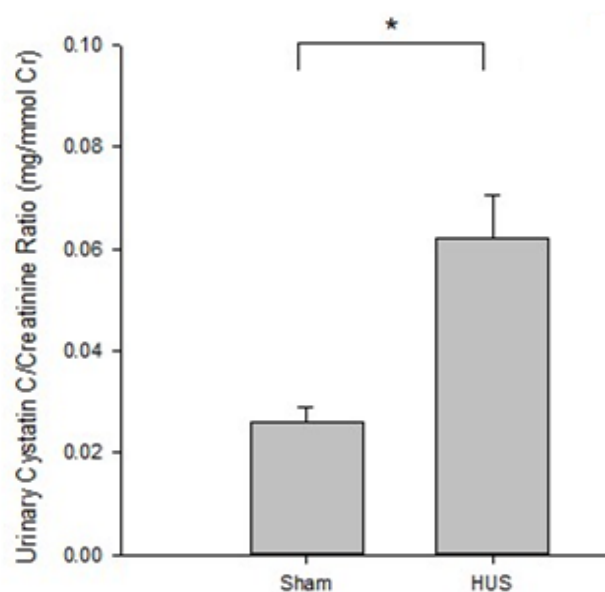


図 2

(2)糸球体におけるポドシンと CD41 の染色を以下に示す (図 3)。抗ポドシン抗体 (A、赤) と抗 CD41 抗体 (B、緑) を用いたマウス腎臓切片の二重免疫蛍光とそのオーバーレイ (C) である。糸球体 (アスタリスク) はポドシンによって描出した。これによりポドサイトの存在を確認した。

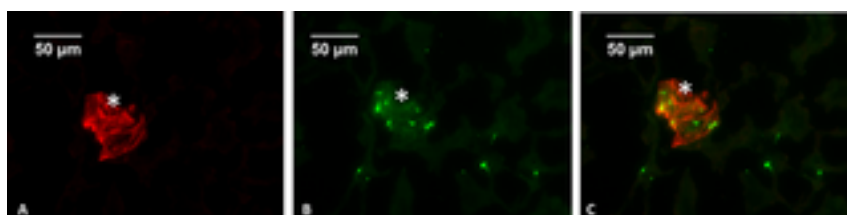


図 3

糸球体におけるフィブリンと CD41 の染色を以下に示す (図 4)。

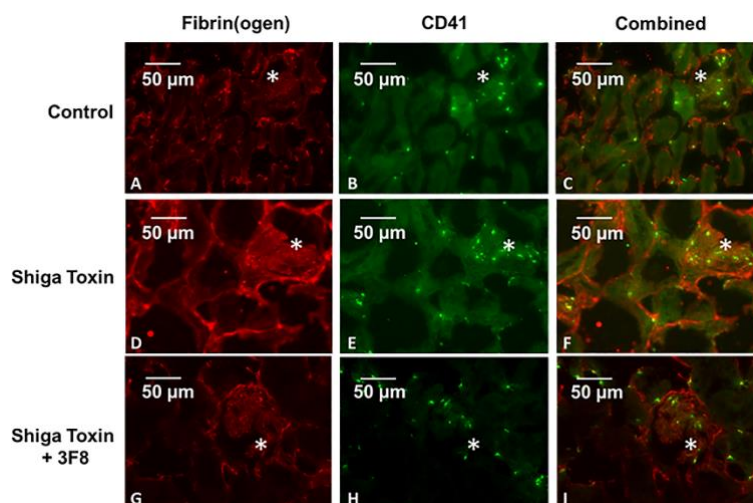


図 4

糸球体のフィブリン (ogen) と CD41 のいずれも Stx-2 投与後に有意に増加した (図 4)。3F8 を Stx-2 と一緒に投与した場合、フィブリン (ogen) と CD41 いずれも有意に減少した。次に von-Willebrand 因子とフィブリンの染色を示す (図 5)。vWF-フィブリン(ogen)の共局在 (黄色) と共分布が糸球体で見られる (アスタリスク)。3F8 投与後 (I) の糸球体におけるフィブ

リン (ogen) は減少した。

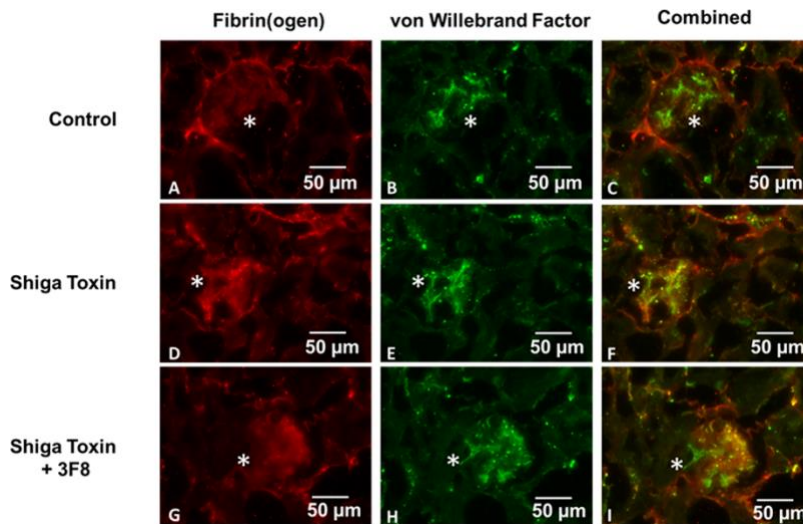


図 5

電子顕微鏡により、免疫染色で観察された CD41 陽性の構造が血小板であることが確認された。以上の所見は、Stx-2 が糸球体の血小板-フィブリン血栓形成につながることを示している。MBL 阻害剤 3F8 と Stx-2 の併用は血小板-フィブリン沈着を予防した。これらの知見は、STEC-HUS における補体のレクチン経路の役割を示唆しており、今後治療法の開発につながる可能性がある。

志賀毒素は組織学的にも機能的にも尿細管を障害すること、また、志賀毒素は血小板とフィブリンを糸球体に沈着させ、これは MBL の阻害薬によって低減されることが本研究により示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 尾崎 将之, 春日井 大介, 松田 直之, Gregory Stahl	4. 巻 1
2. 論文標題 マンノース結合レクチン阻害薬は志賀毒素による尿細管障害を軽減する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 補体	6. 最初と最後の頁 33
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 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kushak R. I., Boyle D. C., Rosales I. A., Ingelfinger J. R., Stahl G. L., Ozaki M., Colvin R. B., Grabowski E. F.	4. 巻 14
2. 論文標題 Platelet thrombus formation in eHUS is prevented by anti-MBL2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0220483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0220483	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾崎 将之, 中村 元気, 安田 祐真, 井上 卓也
2. 発表標題 外傷性凝固障害における補体活性化の関与
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾崎 将之, 春日井 大介, 松田 直之
2. 発表標題 マンノース結合レクチン阻害薬は志賀毒素による尿細管障害を軽減する
3. 学会等名 日本補体学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾崎将之
2. 発表標題 マウス志賀毒素投与モデルにおける尿細管間質障害の組織学的検討
3. 学会等名 第46回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap https://researchmap.jp/read0201600
--

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
研究分担者	田北 無門 (Takita Mumon) (60814613)	聖マリアンナ医科大学・医学部・助教 (32713)	

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		
米国	Massachusetts General Hospital		
デンマーク	University of Copenhagen		