

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17305

研究課題名(和文) 溶血性尿毒症症候群発症後の硬化性腎病変進展への危険因子とその制御システム解析

研究課題名(英文) Risk factors for the development of sclerosing renal lesions after the onset of hemolytic uremic syndrome.

研究代表者

久米 庸平 (Kume, Yohei)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：20835988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Shiga toxinとlipopolysaccharideを投与した溶血性尿毒症症候群様モデルマウスにおいて投与後72時間の急性期では、糸球体のメサンギウム融解像と尿細管の拡張や空胞変性を認めた。さらにmicroarrayによる分子学的な検討では遠位ネフロンに発現する遺伝子が強く低下し、このモデルマウスにおける主要な障害部位と考えられた。一方、投与6ヶ月後の慢性期モデルマウスでは一部にメサンギウム基質と細胞の増加、アミロイド様沈着が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

溶血性尿毒症症候群(HUS)の尿細管障害のメカニズムや慢性腎不全進展への影響については未だ不明な点が多い。本モデルマウスでの経過をさらに詳細に検討することでHUS発症後の尿細管を含めた腎障害の回復過程や慢性腎不全進展のメカニズムが明らかになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In a hemolytic uremic syndrome-like mouse model treated with Shiga toxin and lipopolysaccharide, glomerular mesangiolytic in glomeruli and dilation and vacuolar degeneration in renal tubule were observed at 72 hours post-treatment in the acute phase. Molecular analysis by microarray revealed a strong decrease in gene expression in the distal nephron, which was considered to be the main site of damage in this mouse model. In addition, some of the chronic phase model mice 6 months after administration were observed an increase in mesangial matrix and cells and amyloid-like deposits in glomeruli.

研究分野：小児科

キーワード：溶血性尿毒症症候群 リポポリサッカライド 志賀毒素 尿細管

1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌 (EHEC) に起因する溶血性尿毒症症候群(Hemolytic Uremic syndrome: HUS)は小児期に好発し、Shiga toxin 2(Stx2)と Lipopolysaccharide(LPS)がその発症に寄与する。EHEC 起因の HUS は、急性期に根治的な治療はなく、その死亡率は 5%程度と報告される。さらに急性期を乗り切っても 30%程度が蛋白尿を発症し、9%~18%は慢性腎不全、約 3%は最終的に末期腎不全に移行することが知られているが、HUS 後の慢性腎不全 (硬化性腎病変)に至る詳細なメカニズムは不明なままである。

2. 研究の目的

Stx 受容体の globotriaosylceramide(Gb3)はマウスとヒトで腎における局在は異なることが知られているが、LPS/Stx2 投与によるマウス腎障害モデルは、炎症経路の誘導や各種治療への反応など HUS の疾患メカニズムの解明に利用されてきた。LPS/Stx2 投与腎障害モデルマウスをヒトの HUS に応用するためにはこのモデルについてより詳細な理解が必要である。本研究では、LPS/Stx2 投与後の腎障害モデルマウスの急性期と慢性期の腎障害のメカニズムを解明することを目的とした。

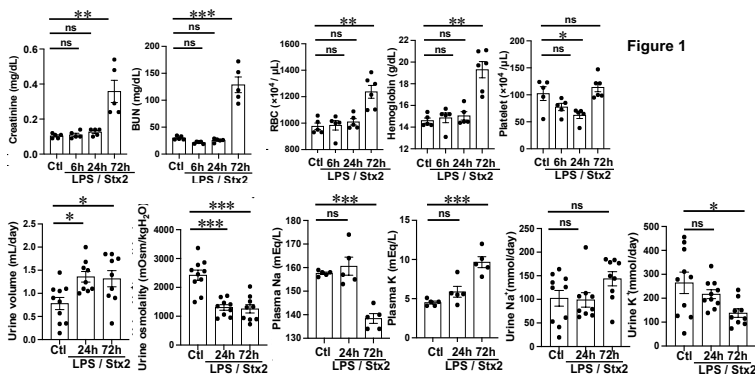
3. 研究の方法

LPS/Stx2 投与を投与した HUS 様モデルマウスの作成のため、8 週齢の C57BL/6 マウスに LPS と Stx2 の腹腔内投与を行った。急性期モデルマウスは Stx2 225ng/kg と LPS 300μg/kg、慢性期モデルマウスは Stx2 100ng/kg と LPS 100μg/kg を投与した軽症群と Stx2 200ng/kg と LPS 200μg/kg を投与した中等症群を作成した。

- ① 急性期 HUS 様モデルマウスの生理学的変化や組織学的変化に加え、マイクロアレイを用いて遺伝子発現変化の同定と Ingenuity pathway analysis(IPA)を使用して腎障害に関わるパスウェイについて検討した。
- ② 慢性期については LPS/Stx2 投与後 6 か月目におけるマウスの生理学的・組織学的変化について検討した

4. 研究成果

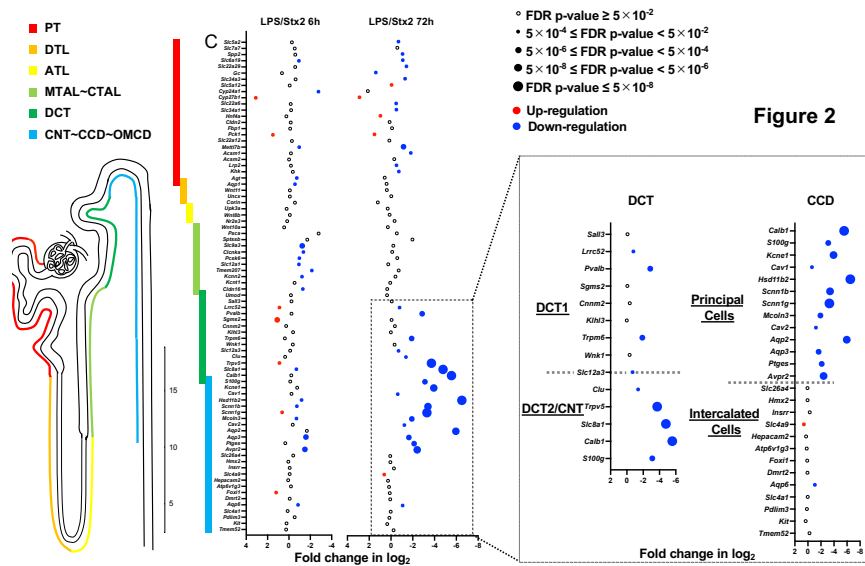
- ① LPS/Stx2 投与後に尿量増加、尿浸透圧と尿中カリウムの減少が観察され、このモデルマウスにおける遠位ネフロン障害が示唆された (Figure 1)。



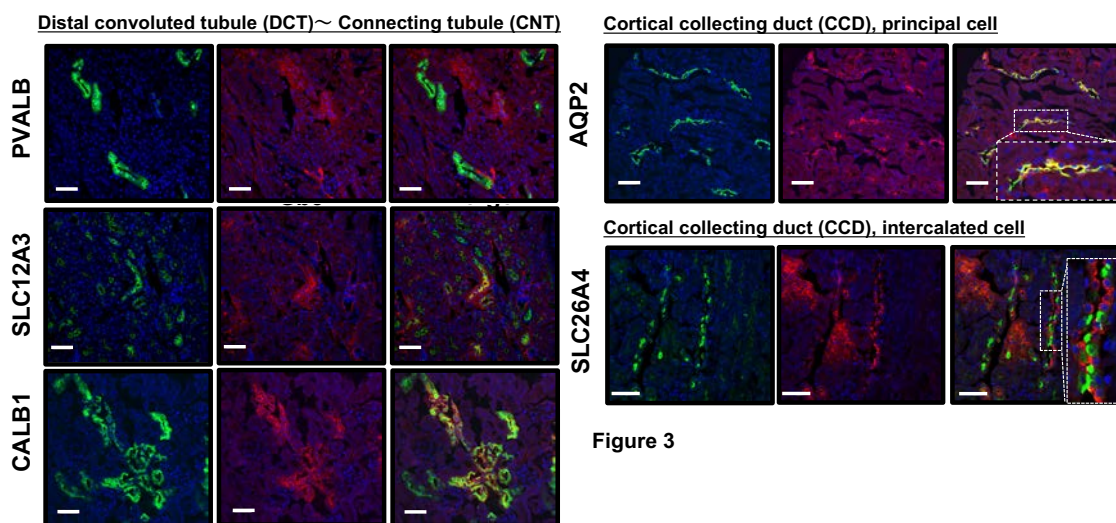
- ② LPS/Stx2 投与後 6 時間および 72 時間の急性期にお

るマウスの腎臓から抽出した mRNA によるマイクロアレイでは生理食塩水を投与した対照群と比較して、それぞれ 1212 個および 1016 個の遺伝子発現が変化した。IPA の結果では両時点で TNFR1/2、iNOS、IL-6 シグナルが活性化し、72 時間後のみ脂質代謝に関連するパスウェイが阻害されることが明らかになった。

- ③ LPS/Stx2 投与後 72 時間で強く発現低下した遺伝子は、主に遠位ネフロンで発現していた。特に、遠位尿細管(distal convoluted tubule: DCT)の後半部の DCT2 と結合尿細管(connecting tubule: CNT) および皮質集合管(cortical collecting duct: CCD)の主細胞に関連する遺伝子発現が強く低下していた(Figure 2)。



- ④ Stx 受容体である Gb3 は、特異的に DCT1 に存在する PVALB および CCD の間在細胞に特異的な SLC26A4 との共局在は見られなかったが、SLC12A3(DCT1 および DCT2 の両方に存在) および AQP2 と共局在しており、その局在はマイクロアレイで発現低下した遺伝子が存在するセグメントと一致する傾向があった (Figure 3)。



- ⑤ LPS 100 $\mu$ g/kg と Stx2 100ng/kg を投与した軽症群は day4-7 に多尿が出現し、体重が低値(-6.5 ~7.0%)となったが、ほとんどのマウスが生存した。それに対し、LPS 100 $\mu$ g/kg と Stx2 100ng/kg を投与した中等症群では day5-7 までに 6-7 割程度が死亡した。投与 6 ヶ月後の慢

性期について、生理食塩水を投与したコントロール群と比較して体重や血圧などの生理学的所見では LPS と Stx2 を投与した群では大きな差は認めなかった。腎組織所見では軽症群でごくわずかにメサンギウム基質増加、メサンギウム細胞増生を認めたが、強い変化はなく、線維化の指標である  $\alpha$ -SMA の免疫染色では尿細管間質に大きな差は見られなかった。中等症群では一部のマウスにアミロイド様の沈着と強いメサンギウム基質と細胞の増加が観察された。

- ⑥ 本研究では本モデルマウスの遠位ネフロン障害とそれに一致した Gb3 の局在が明らかになった。一方で、IPA による検討ではヒトの HUS にも関連するパスウェイを明らかにした。さらに慢性期においても一部でコントロールと比較し腎組織の変化を認めた。HUS の尿細管障害のメカニズムや慢性腎不全進展への影響については未だ不明な点が多い。本モデルマウスでをさらに検討することで HUS 発症後の尿細管を含めた腎障害の回復過程や慢性腎不全進展のメカニズムが明らかになる可能性がある。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kume Yohei, Go Hayato, Maeda Ryo, Suyama Kazuhide, Mori Tsutomu, Kawasaki Yukihiro, Hashimoto Koichi, Hosoya Mitsuaki	4. 巻 54
2. 論文標題 Gene expression profile and injury sites in mice treated with Shiga toxin 2 and lipopolysaccharide as a Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Physiological Genomics	6. 最初と最後の頁 153 ~ 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/physiolgenomics.00124.2021	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 Kume Yohei, Kawasaki Yukihiro, Suyama Kazuhide et al.	4. 巻 253
2. 論文標題 Incidence and Relapse Triggers of Childhood Idiopathic Nephrotic Syndrome between 2006 and 2016: A Population-Based Study in Fukushima, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 125 ~ 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.253.125	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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