

平成23年3月31日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591293

研究課題名（和文）好中球を介した志賀毒素輸送機構に関する研究

研究課題名（英文） Studies on the neutrophil-mediated transport of Shiga toxins

研究代表者

綱脇 祥子（TSUNAWAKI SHOHKO）

（独）国立成育医療研究センター研究所・母児感染研究部・室長

研究者番号：00211384

研究成果の概要（和文）：腸管出血性大腸菌（EHEC）は、小児出血性大腸炎の主要病原菌であり、溶血性尿毒症（HUS）や脳症を引き起こす。EHECの産生する志賀毒素（Stx1およびStx2）はGb3を高発現している標的細胞を傷害するが、腸管から標的細胞へのStxs輸送機構は明らかでない。本研究では、Stxsが好中球のLacCerに結合し、リソソームやゴルジ体へは移行せずに核に取り込まれる事が分かった。HUS患者の腎糸球体には多くの好中球が浸潤しており、腸管でStxsと結合した好中球が標的細胞へStxsを運搬する可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), a major pathogen of pediatric hemorrhagic colitis, cause hemolytic uremic syndrome (HUS) and encephalopathy. Shiga toxins (Stx1 and Stx2) produced by EHEC damage target cells which highly express Gb3, but the transport mechanism of Stxs from the intestinal tract to the target cells is unclear. In this study, we demonstrate that Stxs bind to LacCer in neutrophils and accumulate in the nucleus bypassing lysosomes and Golgi bodies. In view of neutrophil accumulation in glomeruli of patients with HUS, they should transport Stxs to target cells from the intestinal tract.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：好中球・志賀毒素・スフィンゴ糖脂質・溶血性尿毒症・ラクトシルセラミド

1. 研究開始当初の背景

非侵襲性細菌である EHEC は、2 種類の外毒素 (Stx1 および Stx2) を産生する。Stxs は A サブユニット 1 分子と B サブユニット 5 分子から成る AB 型毒素であり、腎糸球体血管内皮細胞や尿細管上皮細胞は Stxs に強い親和性を示す Gb3 (globotriaosylceramide) を高発現しているため、感受性が高く標的細胞になる。Gb3 に結合した Stxs は、逆行性輸送によって rRNA に到達してこれを切断し、組織傷害を引き起こす。Stxs による腎障害は HUS へと重症化し、脳症を引き起こして死に至る場合もある。従って、腸管から体循環系を介した標的細胞への Stxs 輸送は、EHEC 感染症に於ける重症化の決定的要因である。HUS 患者の血漿中にフリーの Stxs が検出されず、Stxs 運搬体として血小板、赤血球、単球、リポタンパク等が候補にあげられたが結論は得られていない。腎糸球体に多くの好中球が浸潤している事実を踏まえると、好中球が標的組織への Stxs 運搬を担う可能性は高いと考えられる。最近、HUS 患児好中球への Stxs 結合も報告されている。しかし、好中球に Stxs レセプターである Gb3 は発現しておらず、腸管から標的細胞への Stxs 輸送機構は解明されていない。

2. 研究の目的

好中球が腸管から標的細胞への Stxs 輸送を担っているか分子レベルで明らかにするため、(1) 末梢血球中、好中球が Stxs と結合するか確認する。(2) 好中球に於ける新奇 Stxs レセプターの同定、更に、質量分析法を用いて構造解析を行う。(3) 好中球の新奇レセプターに結合した Stxs が、どのような細胞内移行を示すのか明らかにする。標的細胞の Gb3 に結合した Stxs は、逆行性輸送によりエンドソーム、ゴルジ体、小胞体を経由して細胞質へ到着し、rRNA 切断酵素として働いてタンパク質合成を阻害し、アポトーシス等の細胞傷害を引き起こす。しかし、好中球は専ら異物処理を行う食細胞であるため、リソソームは発達しているがタンパク質合成を担う小胞体は未発達であり、細胞傷害を受けにくいと考えられる。この様に特化した好中球では Stxs がリソソーム内で分解される可能性も考えられる。

3. 研究の方法

(1) 試薬および抗体

Stx1 および Stx2 はデンカ生研株式会社より供与され、Alexa Fluor 488 monoclonal antibody labeling kit (Molecular probe) を用いて蛍光ラベルした。Gb3 および LacCer (lactosylceramide) 標準試料は Matreya より

購入した。抗 Stxs 抗体はミエローマ抗体産生細胞の上清 (13C4: against Stx1B; 11E10: against Stx2A) を用いた。PI (propidium iodide)、Hoechst 33342、抗ヒト CD16 抗体、抗 LAMP2 抗体、rhodamine 標識抗マウス Ig 抗体は、それぞれ Sigma、同仁化学、DakoCytomation、BD Pharmingen、Chemicon より購入した。C-Six-Lim、Polymorphoprep、FACS lysing solution は Lymphocyte Isolation Media、AXIS-SHIEL、Becton Dickinson より購入した。Brefeldin A は Sigma、HPTLC (high performance thin-layer chromatography) プレートは Merck、PVDF (polyvinylidene fluoride) は Millipore から購入した。

(2) ヒト好中球および赤血球の分離

糖脂質の抽出実験では、血液 (2 ml) を C-Six-Lim (2.5 ml) に重層して遠心し、上清に分離された血小板、リンパ球、単球を取り除いた後、沈殿画分の好中球と赤血球を PBSG に懸濁した。次に、methyl cellulose (final 0.2%) を加えて選択的に赤血球を沈殿させた後、上清の好中球画分を回収し、溶血後 PBSG に懸濁した。FACS 解析に用いた赤血球は C-Six-Lim 遠心後、沈殿画分の上層にある好中球を除去した下層部分から回収した。共焦点レーザー顕微鏡実験では、血液 (5 ml) を Polymorphoprep (4 ml) に重層して遠心し、分離した赤血球、好中球、単球の 3 層から好中球層を回収した。分離した好中球は 1 % BSA-PBSG⁺ (0.9mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂) に懸濁した。

(3) FACS 解析

Stx1 および Stx2 は Alexa Fluor 488 で蛍光標識し、血球に対する結合実験は冷暗所下で行った。ヒト血液 (100 μ l) に Alexa-Stx1 あるいは Alexa-Stx2 (0.5 μ g) を加え、氷上で 60 分間反応させた。次に、FACS lysing solution (2 ml) を加えて細胞を固定すると共に赤血球を溶血させ、PBS で遠心洗浄後 0.5% パラホルムアルデヒドを含む PBS に懸濁し、FACS 解析 (FACSort B0259) に供した。好中球集団の確認には CD16 抗体を用いた。

(4) TLC (thin-layer chromatography)

Bligh and Dyer 法を用いて好中球から糖脂質を抽出し、0.2 N NaOH アルカリ処理 (40 min at 56 °C) にてリン脂質を除去した。最終的に溶媒クロロホルムを窒素ガスにて飛ばし、乾燥した試料の重量を測定した後クロロホルム/メタノール (2:1) に溶かして 1 mg/ml 溶液

とした。Gb3 および LacCer 標準試料も同様に 1 mg/ml 溶液とした。好中球由来糖脂質 (100 µg)、Gb3 (50 ng)、LacCer (10 µg) を HPTLC プレートにスポットした後、クロロホルム/メタノール/0.2% CaCl₂ (60:35:8) 下で展開した。全脂質はプリムリン染色、糖脂質はオルシノール染色で検出した。

(5) Far-Eastern プロテティング

糖脂質をスポットした HPTLC プレートを展開・乾燥した後、イソプロパノール/メタノール/0.2% CaCl₂ (40:7:20) から成るプロテティング液に 15 秒間浸した。その後、約 180 °C のアイロンを用いて PVDF 膜に糖脂質を 30 秒間転写し、PBST (0.05% Tween 20 in PBS) に浸した。5% milk-PBST でブロッキングを行った後、1 晩 4 °C で Stxs (1 µg/ml) と反応させた。次に、1 次抗体 (抗 Stxs 抗体)、2 次抗体 (HRP 標識抗マウス Ig 抗体) と反応させ、ECL 法で検出した。抗 Stxs 抗体はミエローマ抗体産生細胞の上清 (13C4: against Stx1B; 11E10: against Stx2A) を用いた。

(6) 質量分析

HPTLC プロテティング後、オルシノールと反応した PVDF 膜上の糖脂質バンドを切り出して高速原子衝突法 (FAB: Fast atom bombardment) 法を用いて質量分析した。分析は、東京医科歯科大学機器分析センターの笠間健嗣助教授に依頼した。

(7) Stxs の細胞内輸送

好中球 (1×10⁵ cells/ml) を polylysine でコートしたガラスボトムディッシュに撒き (30 min at 37 °C) 接着させた。次に、Alexa-Stxs (0.5 µg in 1%BSA-PBSG⁺) を添加し、暗所下 37 °C あるいは 4 °C で各時間静置した後パラホルムアルデヒドで固定した。ゴルジ体を介した小胞輸送の阻害は brefeldin A (5 µg/ml) 処理 (30 min at 37 °C) で行った。核染色は Hoechst 33342 (20 min at RT)、あるいは、PI (10 min at RT) を用いた。リソソーム染色は、パラホルムアルデヒド固定した後、サポニン (0.2% in 20% FCS-PBS) 処理した好中球に 1 次抗体 (抗 LAMP2 抗体)、2 次抗体 (rhodamine 標識抗マウス Ig 抗体) を添加して行った。細胞内移行の解析は共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus LSM-GB200) で行った。最後に、4 °C に於ける Stxs の細胞内移行は、好中球と Alexa-Stx1 (0.5 µg) を反応させた後 (60 min on ice)、氷冷 PBSG およびその氷片を加えて温度が上昇しないよう注意しながら共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

4. 研究成果

(1) Stxs 輸送に関わる血球成分の同定

HUS 患者の血清にフリーの Stxs は検出

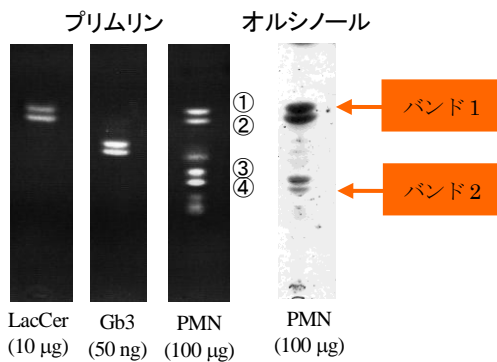
されておらず、腸管から標的細胞への Stxs 運搬体として血小板、赤血球、単球、リボタンパク等が候補にあげられたが結論は得られていない。一方、HUS 患児好中球への Stxs 結合が報告されている。そこで、蛍光色素 Alexa で標識した Stxs と全血をインキュベートした後、FACS で解析して Stxs を運搬する血球成分の同定を試みた。まず forward scatter および side scatter で白血球を好中球 (Gate1)、単球 (Gate2)、リンパ球 (Gate3) の 3 集団にゲーティングした後、励起波長 488 nm のアルゴンレーザーを照射して Alexa-Stxs の蛍光を検出した。その結果、全白血球中、Stx1 および Stx2 は専ら好中球にのみ結合し、単球およびリンパ球には結合しなかった。分離した赤血球を用いて Stxs の結合実験を行ったが、Stx1 および Stx2 は共に結合しなかった。

細胞形状の違いによるゲーティングにより Stxs が好中球のみに結合することが示唆された。そこで、好中球マーカーである抗 CD16 抗体を用いてゲーティングを行い、Stxs が好中球に特異的に結合するか確認した。その結果、抗 CD16 抗体および Stxs は共に好中球領域である Gate1 に特異的に結合することが分かった。これらの結果より、好中球が腸管から標的細胞への Stxs 運搬を担うことが示された。

(2) 好中球の糖脂質解析

標的細胞の Stxs レセプターである Gb3 は、スフィンゴシンに脂肪酸と 3 つの糖鎖が結合した中性糖脂質である。そこで、好中球から中性糖脂質を抽出し、TLC で展開した。オルシノールで糖部分を発色させたところ、主な 2 つのバンドが認められた (バンド 1 およびバンド 2) (図 1)。これらがダブルバンドであるのは、細胞内の複数種の acyltransferase により異なる脂肪酸が結合し、HPTLC 上で移動度が異なるためである。バンド 1 は R_f 値より LacCer であると推定されるが、Gb3 と考えられるバンドは存在しなかった。そこで、Gb3 および LacCer 標準試料と好中球より抽出した糖脂質を再度 TLC 展開し、プリムリンで脂質部分を発色させたところ、バンド 1 は、LacCer 標準試料と同じ位置に確認できた。しかし、Gb3 標準試料と同じ位置にバンドは検出されなかった。バンド 2 の糖脂質は依然未知数であるが、好中球には多くの LacCer が発現されていることが分かった。

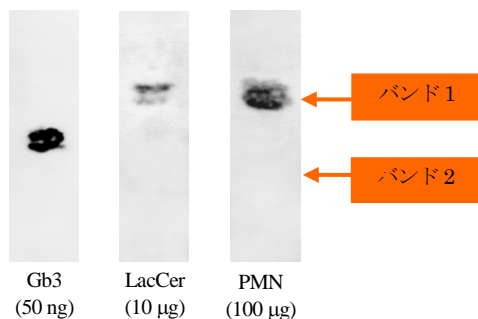
図1 ヒト好中球糖脂質の検出



(3) 好中球糖脂質と Stxs の結合

Stxs が好中球由来の糖脂質バンド 1 およびバンド 2 のどちらに結合するか Far-Eastern プロテティングにより確認した。HPTLC プレート上のバンドを PVDF 膜に転写し、1 µg/ml の Stx1 と 1 晩 4 °C で反応させた。その後、抗 Stx1 抗体、次に、HRP 標識 2 次抗体で処理し、ECL 法で検出した。その結果、Stx1 は LacCer と考えられるバンド 1 とのみ結合しバンド 2 とは結合しなかった (図 2)。従って、LacCer は Gb3 と同様に Stx1 に結合することが示された。Stx2 でも同様の実験を行い、バンド 1 と LacCer 標準試料に結合した。以上、Stxs は Gb3 とのみ結合するとされていたが、親和性の高い微量の Gb3 (50 ng) に加え親和性の低い LacCer (10 µg) 標準試料にも結合することが明らかになった (図 2)。従って、Stxs に対する親和性は低いが大いに LacCer を含む好中球は、腸管から標的細胞への Stxs 運搬を担う血球成分であると考えられる。

図2 中性糖脂質に対する Stx1 結合



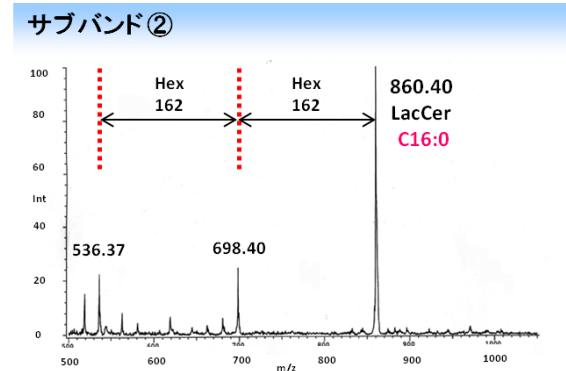
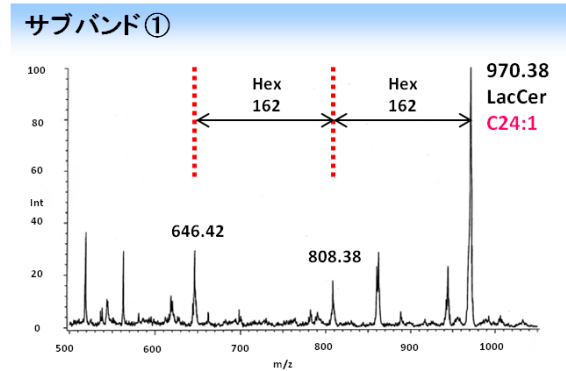
(4) 好中球 Stxs レセプターの構造解析

Stxs が結合した好中球由来の糖脂質 (バンド 1) は、LacCer 標準試料と同じ Rf 値を示

すことから LacCer と推定されるが決定的ではない。そこで、HPTLC プロテティングによって PVDF 膜に転写した糖脂質バンドを切り出し、高速原子衝突法を用いて質量分析した。質量分析では、横軸にイオン分子量 (m/z)、縦軸にイオン強度 (Int) を示す。最大ピークは分子全体の分子量であり、糖鎖が解離する毎に分子量 162 が減少するピークが現れる。全糖鎖が解離したピークがセラミドの分子量であり、そこからスフィンゴシンの分子量 (mw = 299) を引いたものがスフィンゴシンとアミド結合した脂肪酸側鎖の分子量になる。脂肪酸側鎖の分子量から炭素数と不飽和結合の数を計算することでその構造が特定できる。

好中球より抽出した糖脂質の各ダブルバンドをそれぞれ①~④までのサブバンドに分けて質量分析を行った (図 1 参照)。その結果、好中球由来バンド 1 のサブバンド①は 2 個の糖とアシル基にナルボリック酸 (C24:1) を持ち、サブバンド②は 2 個の糖とアシル基にパルミチン酸 (C16:0) を持つ LacCer であることが確認された (図 3)。バンド 2 のサブバンド③④は末端に N-アセチルグルコサミンが結合し、アシル基にリグノセリン酸 (C24:0) およびパルミチン酸 (C16:0) を持つラクトリアシルセラミド (Lc₃Cer) であることが確認された。

図3 好中球バンド 1 の質量分析



(5) Stxs の好中球細胞内移行

好中球に Gb3 は存在せず、LacCer が Stxs レセプターであることが分かった。標的細胞の Gb3 に結合した Stxs は、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、逆行性輸送でゴルジ体を介して小胞体まで輸送され、最終的に細胞質で rRNA 切断酵素として働き細胞傷害を引き起こす。そこで、LacCer レセプターに結合した Stxs が好中球内でどのような細胞内移行を示すか調べた。

好中球と同じ食細胞であるマクロファージでは、Stxs は初期エンドソーム、後期エンドソームを介してリソソームへ輸送され、分解された断片が細胞質に放出されて MHC class I 上に抗原提示されると考えられている。そこで、好中球に於いて Stx1 がリソソームへ輸送されるかどうか、リソソームマーカーである抗 Lamp2 抗体を使って解析した。Alexa-Stx1 と好中球をインキュベート (15 min および 30 min at 37 °C) したが、Stx1 は両時間とも抗 Lamp2 抗体と異なる領域に存在し、リソソーム内で分解されないことが分かった。

Alexa-Stx2 を好中球 (15 min および 60 min at 37 °C) および標的細胞である腎臓癌由来細胞 ACHN (60 min at 37 °C) とインキュベートした後、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。その結果、LacCer を介する好中球では、Stx2 は 15 分後細胞質に、60 分後は Hoechst と同じ核領域、Gb3 を介する ACHN では、60 分後核の周辺に存在する小胞体領域に認められた。ACHN に於ける小胞体への Stxs 移行はゴルジ体経由であり、好中球に於ける核への Stxs 移行も同様にゴルジ体を介するかもしれない。そこで、ゴルジ体による小胞輸送を阻害する brefeldin A (5 µg/ml) で好中球を前処理 (10 min at 37 °C) した後、Alexa-Stx2 を加えてインキュベート (60 min at 37 °C) した。その結果、brefeldin A 処理しても未処理好中球と同様に Stx2 は核に移行した。従って、好中球に於ける Stxs の細胞内移行はゴルジ体を介さずに核へ輸送されることが分かった。

通常、レセプターと結合した Stxs は、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれるが、この反応は 4 °C では起こらない。そこで、Stxs の細胞内移行を阻害するため、好中球および ACHN を Stx1 と氷上で 60 分間反応させた後、細胞を固定せずに氷冷 PBSG および PBSG 氷片を加えて温度が上昇しないよう注意しながら共焦点レーザー顕微鏡で解析した。Stx1 は標的細胞である ACHN では明瞭に細胞膜に止まっておりエンドサイトーシス経由であることが明らかであるが、好中球では既に細胞内へ移行していた。近年、温度に依存せず自動的に細胞内へ取り込まれるタンパク質群 (CPPs: cell-permeable peptides) が発見されている。どのようなメカニズムで細胞内に取り込まれるか詳細は不明だが、細胞膜のミセル形成など物

理的な作用が関与していると考えられている。今回、好中球に於いて Stx1 が 4 °C で取り込まれたことから、Stxs が CPPs 機能を持ち、LacCer と結合した後自動的に細胞内へ取り込まれ、更に、静電的に核へ移行したかもしれない。以上、好中球は LacCer を介して Stxs を腸管から標的細胞へ運搬すると考えられる。

5. 主な発表論文等

「雑誌論文」(計 3 件)

- ① Yoshimura K, Miyamoto Y, Yasuhara R, Maruyama T, Akiyama T, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Tsunawaki S, Tachikawa T, Baba K, Kamijo R. Monocarboxylate transporter-1 is required for cell death in mouse chondrocytic ATDC5 cells exposed to interleukin-1b *via* late-phase activation of nuclear factor κB and expression of phagocyte-type NADPH-oxidase. *J Biol Chem.* 286: 14744-14752, 2011
- ② Dohi K, Ohtaki H, Nakamachi T, Yofu S, Satoh K, Miyamoto K, Song D, Tsunawaki S, Shioda S, Aruga T. Gp91^{phox} (NOX2) in classically activated microglia exacerbates traumatic brain injury. *J Neuroinflammation.* 7: 41-51, 2010
- ③ Yoshida LS and Tsunawaki S. Expression of NADPH oxidases and enhanced H₂O₂-generating activity in human coronary artery endothelial cells upon induction with tumor necrosis factor-α. *Int. Immunopharmacol.* 8: 1377-1385, 2008.

「学会発表」(計 3 件)

- ① 網脇祥子、内田友祐、吉田ルシア幸子、守屋美恵. Dynamic analysis of the Nox family NADPH oxidases in the pathogenesis of Kawasaki disease. 第 82 回日本生化学会大会、神戸、10 月 21-24 日、2009
- ② 守屋美恵、吉田ルシア幸子、網脇祥子. Is the neutrophil NADPH oxidase (Nox2) involved in the pathogenesis of Kawasaki disease? 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 9-12 日、2009
- ③ Tsunawaki S and Yoshida LS. Expression of Nox family NADPH oxidases and enhanced ROS-generating activity in human coronary artery endothelial cells upon induction with

tumor necrosis factor- α .
Gordon Research Conference (meeting for Nox
family NADPH oxidases) New London, New
Hampshire, USA, June 1-6, 2008.

「図書」(計1件)

- ① 網脇祥子: 白血球機能検査 2009-2010. 臨床検査ガイド「Medical Practice 編集委員会編」, 文光堂, 2009; 593-598 (2010)