

令和 6 年 9 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07842

研究課題名(和文) 内皮型一酸化窒素合成酵素に着目した下痢関連溶血性尿毒症症候群の病態解明研究

研究課題名(英文) The pathogenesis of diarrhea-related hemolytic uremic syndrome focusing on endothelial nitric oxide synthase

研究代表者

忍頂寺 毅史 (Ninchoji, Takeshi)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：10568950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞を用いた実験により、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の下流に位置する内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)がPLCを介して細胞間接着因子VE-cadherinを活性化して血管透過性が亢進する。このメカニズムはいまだ治療法の確立されていない下痢関連溶血性尿毒症症候群(D+HUS)の病態の中でも中心的な役割を果たしており、eNOSやVEGFを阻害することにより治療に役立てる可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

D+HUSは小児で好発する重篤な疾患の一つで、腸管出血性大腸菌感染後、腎糸球体血管内皮細胞にて血栓性微小血管障害を起こし腎機能障害に至る。分子レベルでの病態は未だ明らかでなく、かつ根本治療も存在しない。今回の成果で、その病態へのeNOSの関与が明らかとなった。eNOSの治療薬は動物ですでにいくつか明らかにされているため、ヒトへの応用によってD+HUSの新規治療が期待できる状況となった。

研究成果の概要(英文)：Experiments using vascular endothelial cells revealed that endothelial nitric oxide (eNOS), which is located downstream of the vascular endothelial growth factor (VEGF), activates the intercellular adhesion factor VE-cadherin via PLC and increases intercellular permeability. Vascular permeability increases. This mechanism plays a central role in the pathology of diarrhea-related hemolytic uremic syndrome D+HUS, for which no treatment has yet been established, and suggests that inhibiting eNOS and VEGF may be useful for treatment.

研究分野：小児科

キーワード：下痢関連溶血性尿毒症症候群 血管内皮細胞増殖因子 内皮型一酸化窒素合成酵素

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

D+HUS における eNOS/NO の分子生物学的メカニズムを明らかにした報告はなく、eNOS/NO シグナルが本疾患に果たす役割はこれまで報告がない。

2. 研究の目的

臨床検体で確認された eNOS/NO 関連分子につき培養細胞を使用して多角的網羅的に相互作用や関連を検証する。さらにその結果をもとに未だ根治治療の存在しない D+HUS の分子標的治療法の新規開発を目指す。

3. 研究の方法

1) 腎血管内皮培養細胞に EHEC 由来の stx を投与し eNOS 活性化および NO 産生を RNA レベル及び蛋白レベルで評価する。

2) 患者急性期の血球を用いた scRNAseq、患者血清を用いた MS による D+HUS 患者における特徴的 RNA、蛋白のプロファイリングと eNOS 関連分子の同定を行う。

3) 再度 in vitro に戻り上記 2) で明らかにした eNOS/NO 関連分子発現に関して eNOS/NO 合成阻害薬・合成促進薬を投与しその変化を評価する。

4) siRNA 等の分子生物学的手法で 3) で病態に関与すると考えられた分子の発現を抑制した培養細胞を作成し stx を投与することで病態への関与の解明を行う。

5) 患者検体にて 4) で最終的に明らかとなった関連分子を蛋白レベルで再度検証する。

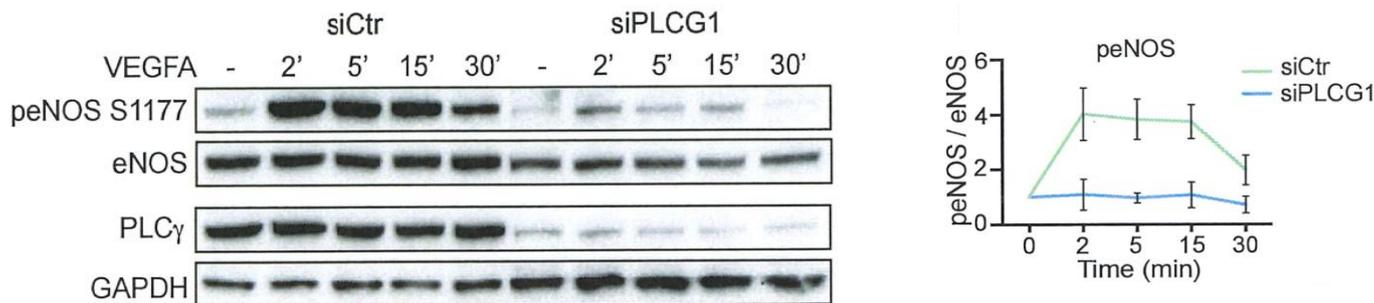
4. 研究成果

1) まずは腎血管内皮培養細胞を購入し、細胞培養を行い始めたがこれが思いのほか難航した。また残念なことに患者血球が手に入らず本来の実験が行うことが出来なかった。

そのためこれまで研究者が樹立して実験を行ってきたヒト皮膚血管内皮細胞 HDMEC を使用し、本来腎血管で行おうとしていた実験を行った。

1 ‘) eNOS 活性化経路の確認

その結果 PLC $\gamma$  の経路が関与し eNOS のリン酸化が行われることを確認した<sup>1,2)</sup>。この事実は sma11

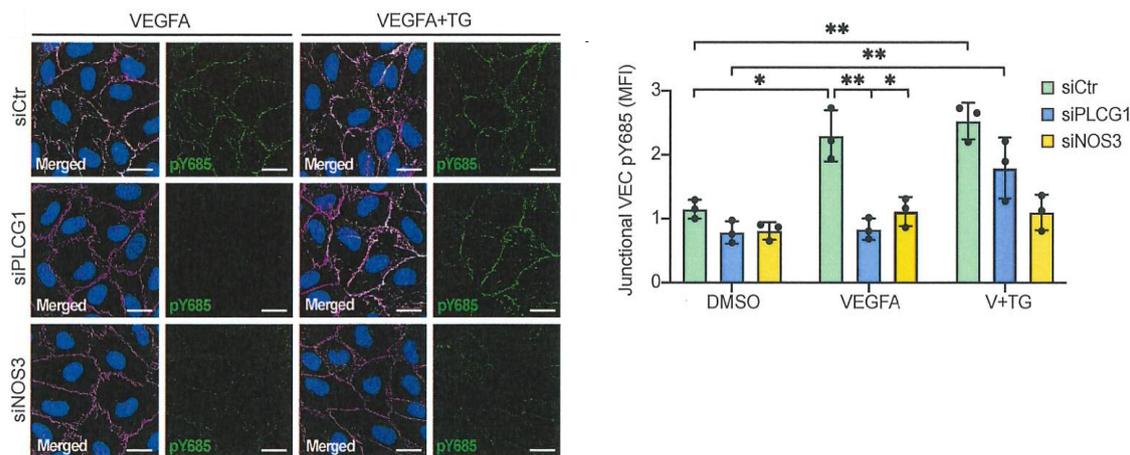


interface PLCG1 を使用した Western Blotting にても確認することができた。同様に mRNA レベルでも確認できた

3 ‘) - 4 ‘) eNOS が血管内皮における病態にどうかかわるかの解明

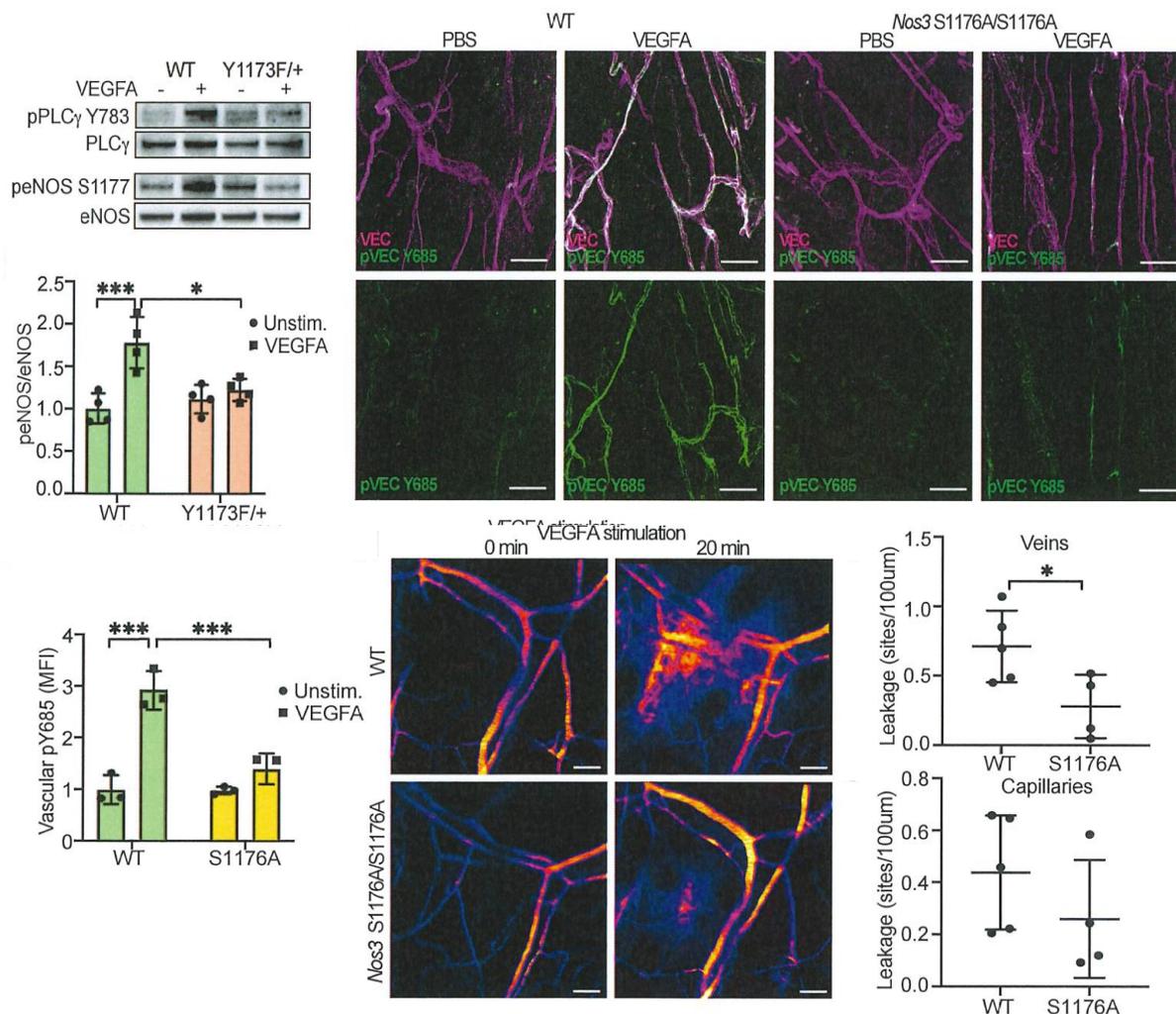
更に細胞の生理学的機能を明らかにするために、eNOS が内皮細胞における透過性に関わるかを検証することにした。すなわち D+HUS は臨床的には血管内皮細胞障害によりアルブミンを含めた血管内から third space に漏れ出てしまい、浮腫や低血圧に至ることを多く経験する。そのメカニズムに関しては依然不明であるからだ。

我々は以前の実験系から eNOS が血管内皮の接着因子である VE-cadherin に作用することが分かっていた<sup>3,4)</sup>のでこの点から研究を進めることとした。



その結果 VEGF の刺激によって VE-Cadherin のリン酸化が起こりその経路として PLC $\gamma$ -eNOS の経路が大きく関与することが明らかとなった。

更に共同研究先にてこれが減少として実際にリークを起こすことを確認した



今回残念ながら腎血管内皮細胞培養の樹立や患者血球での確認に至らなかったが皮膚の血管で確認できたことから将来的な腎血管への応用が十分期待される研究成果であったと考えられた。

#### 引用文献

- 1) Chen D, and Simons M. Emerging roles of PLC gamma in endothelial biology. *Sci Signal.* 2021; 14 (694)
- 2) Sun MY, Geyer M and Komarova YA. IP3 receptor signaling and endothelial barrier function. *Cell Mol Life Sci.* 2017; 74(22): 4189-207
- 3) Ninchoji T, Love DT, Smith RO, et al. eNOS-induced vascular barrier disruption in retinopathy by c-Src activation and tyrosine phosphorylation of VE-cadherin. *Elife.* 2010; 10
- 4) Siragusa M and Fleming I. The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction. *Pflugers Arch.* 2016; 468(7): 1125-1137

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sjoberg Elin, Melssen Marit, Richards Mark, Ding Yindi, Chanoca Catarina, Chen Dongying, Nwadozi Emmanuel, Pal Sagnik, Love Dominic T., Ninchoji Takeshi, Shibuya Masabumi, Simons Michael, Dimberg Anna, Claesson-Welsh Lena	4. 巻 133
2. 論文標題 Endothelial VEGFR2-PLC signaling regulates vascular permeability and antitumor immunity through eNOS/Src	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI161366	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
研究協力者	ドミニクラヴ  (Dominic Love)		

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		
スウェーデン	Uppsala University		