

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591512

研究課題名(和文) 溶血性尿毒症症候群に合併する急性脳症の発症を防止する分子免疫的治療法の開発

研究課題名(英文) Immunomodulatory therapy of acute encephalopathy associated with hemolytic uremic syndrome

研究代表者

南 弘一 (MINAMI, KOICHI)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60301438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：溶血性尿毒症症候群(HUS)は、腸管出血性大腸菌から産生される志賀毒素(Stx)が発症に関与している。HUSの約30%に合併する急性脳症(HUS脳症)は死亡率が高い。HUS脳症の発症機序で、Stxによる大脳血管内皮細胞障害が考慮されているが、グリア細胞(アストロサイト)も関与していると考えられている。

本研究で、Cannabinoidsを用いたケモカイン産生抑制などの分子生物学的な機序を研究し、病態生理に基づいた特異的治療開発のための基礎的治験の獲得を目指した。

研究成果の概要(英文)：Infection with Shiga toxin (Stx)-producing Escherichia coli can lead to development of hemolytic uremic syndrome (HUS). Approximately 30% of patients with HUS suffer from central nervous system (CNS) complications and these patients have the poorest prognosis. It has been suggested that vascular endothelial injuries caused by Stxs play a crucial role in the development of the disease. Furthermore, the relationship of glial cell damage and Stxs is considered.

In this study, we investigated chemokine suppression mechanism using Cannabinoids in human astrocyte, and aimed to confirm the effect of disease specific therapy development based on the pathophysiology of HUS encephalopathy.

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：溶血性尿毒症症候群 急性脳症 グリア細胞 ケモカイン Cannabinoids

## 1. 研究開始当初の背景

溶血性尿毒症症候群 (HUS) は、腸管出血性大腸菌が産生する志賀毒素 (Stx) による血管内皮障害と続発する thrombotic microangiopathy がその本態で、溶血性貧血、血小板減少、急性腎不全を呈する。20~30% の患者が中枢神経症状を合併し、急性脳症 (HUS 脳症) が死因の主な原因である。HUS 脳症の病態生理はまだ不明な点が多く、Stx を投与した動物実験などから、神経細胞に対する直接の毒性と、脳局在性に毛細血管内皮細胞障害による血管透過性亢進や microangiopathy が発症機序として考えられている (Acta Neuropathol 1996, 91:254)。急性脳症は HUS の生命予後に極めて重要であり、HUS 脳症の治療法について分子生物学的な見地から検討するべき状況にある。本研究は HUS 脳症の治療法開発が大きな目的である。

研究代表者らは、神経感染免疫疾患 (髄膜炎、急性脳炎・脳症など) の発症、進展に關与する機序を明らかにする目的で、細菌毒素による中枢神経感染免疫に注目し、サルモネラ腸炎に伴う急性脳症の血液・髄液中サイトカインを測定して、高サイトカイン血症の誘導が脳症発症の病態形成に關与していることを明らかにした (小児感染免疫 2001; 13:342、Tohoku J Exp Med 2004; 203(2): 129)。さらに HUS 脳症の発症機序に關して、特に培養大脳毛細血管内皮細胞でのケモカイン発現や転写因子 (NF- $\kappa$ B) に与える影響などの基礎的な研究を行ってきた (科学研究費補助金基盤研究 C (平成 15-17 年度)「溶血性尿毒症症候群に伴う急性脳症の発症、進展に關する基礎的研究」)。

## 2. 研究の目的

ケモカインは炎症反応や免疫反応のメディエーターとして重要な役割を果たしている。脳内グリア細胞は、感染、虚血、神経変性疾患などの脳病態時に、神経傷害部位に集積し活性化され、さまざまなケモカインを産生し、病態形成に關与することが示されている。またケモカイン遺伝子ノックアウトマウスが脳細胞保護効果を示すことも明らかにされており、ケモカイン類が脳細胞傷害の増悪因子として働いていることが考えられている。

HUS 脳症におけるグリア細胞に着目し、研究を行い (基盤研究 C, 平成 19-21 年度)、グリア細胞のモデルに培養ヒトアストロサイトをを用い、Stx2 刺激によるケモカインの活性化を証明した (Kioka N, Minami K, et al. Chemokine expression in human astrocytes in response to shiga toxin 2. Int J Inflam. 2012; 2012: 135803.)。従来、HUS 脳症発症機序において脳内血管内皮細胞障害が中心と考えられていたが、Stx がアスト

ロサイトにも影響し、ケモカイン産生を増強させ HUS 脳症の新たな発症機序を明らかにした。本研究成果を踏まえて新たな研究課題を進捗する。

【仮説】Cannabinoids が、志賀毒素によってアストロサイトで産生したケモカインを抑制する。

本研究では、「Stx がアストロサイトを刺激してケモカイン産生誘導を起こす」、「産生誘導された炎症性サイトカインがアストロサイト上の Gb3 発現に影響する」など前研究の知見から、分子免疫療法としてカンナビノイド (Cannabinoids) に着目した。Cannabinoids はインドアサ *Cannabis sativa* に存在する有機物質で、様々な薬理作用をもち、精神活性を認めない合成 cannabidiol (e.g. dexamabinol) が主に使用されている。Cannabinoids は、脳実質内での免疫細胞機能を変化させる作用 (Nat Rev Immunol 2005 5:400)、炎症性サイトカイン発現を抑制する効果 (J Neuroimmunol 2006 181:57)、さらに虚血性脳障害での神経保護効果 (Neurobiology of Disease 2010 37:434) やグリア細胞での抗炎症作用 (J Neurochem 2009 116:1383) を示す。Cannabinoids は容易に脳血液関門を通過し、その受容体はグリア細胞にも発現しているため、HUS 脳症時に Cannabinoids を投与し、ケモカイン産生を抑制することで病状の進行を軽減できるという仮説を立て、ケモカイン抑制効果を分子生物学的なレベルで証明し、HUS 脳症の治療薬開発を導く。

脳傷害の神経炎症に關与する転写因子 (NF- $\kappa$ B) 活性を抑制する転写因子 (PPARs) の存在が、明らかになっている。Cannabinoids は PPARs のリガンドとして作用することで、神経保護機能を示す。Cannabinoids と PPAR アゴニスト (e.g., fenofibrate) の複合治療が、将来脳傷害の治療に主翼を担う可能性が示唆されている (PPAR Research, 2008)。今回、PPAR シグナル伝達系への影響についても研究を進める。

(1) Stx 刺激で、Cannabinoids を投与してケモカイン産生の抑制効果

(2) Cannabinoids antagonist 投与により、ケモカイン抑制阻止効果

(3) Stx による転写因子 (NF- $\kappa$ B) への影響、Cannabinoids 投与による PPARs の活性化および NF- $\kappa$ B の抑制効果

(4) Stx による I $\kappa$ B キナーゼ (IKK) MAPK シグナル伝達系への影響および Cannabinoids 投与による効果

上記について検討することにより、HUS 脳症発症時に、Cannabinoids がアストロサイトからのケモカイン発現を抑制する機序を明らかにし、脳細胞保護薬の創薬標的など免

疫療法の開発を進める。

### 3. 研究の方法

#### <研究の基本>

本研究では、実験モデルとしてヒトグリア細胞（アストロサイト）を用いる。細胞培養を行い、志賀毒素（以下 Stx）刺激により実験を遂行する。

Stx には免疫学的に Stx1 と Stx2 に分類されるが、今回は毒性の強い Stx2 で検討する。

【1】ケモカインの発現と濃度測定：Stx 刺激でのケモカイン（MIP-1, CINC-1, CX3CL-1）を real-time PCR 法や ELISA 法で測定する。

【2】Stx の刺激で、Cannabinoids を投与してケモカイン産生の抑制効果を real-time PCR 法や ELISA 法で確認する。

【3】Cannabinoids antagonist 投与により、ケモカイン抑制阻止効果を real-time PCR 法や ELISA 法で確認する。

【4】Stx による転写因子（NF- $\kappa$ B）への影響、Cannabinoids 投与による効果、PPARs の活性化および NF- $\kappa$ B の抑制効果を real-time PCR 法やウエスタンブロット法を用いて検討する。

【5】Stx による I $\kappa$ B キナーゼ（IKK）MAPK シグナル伝達系への影響、Cannabinoids による効果を cell viability assay 法や ELISA 法を用いて検討する。

### 4. 研究成果

本研究では、ヒトアストロサイトに Stx 刺激を加え、ケモカイン産生亢進が Cannabinoids を投与で抑制されるかなどの分子疫療法の基礎的な研究を行った。

Stx2 刺激によるケモカイン発現ならびにケモカイン濃度を検討した。Real-time PCR 法を用いて、MIP-1, CINC-1, CX3CL-1 の発現を定量的に調べた。いずれのケモカインも Stx2 刺激で発現促進を認めた。また細胞培養液中のケモカインにおいても、ELISA 法で産生増加を認めた。

各種濃度での Stx2 刺激により、ヒトアストロサイトの転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化や I $\kappa$ B キナーゼ（IKK）MAPK シグナル伝達系への影響をウエスタンブロット法で検討した。これまでのところ、条件を変更して行ったが、ヒトアストロサイトでの Stx2 刺激による転写因子 NF- $\kappa$ B 活性の上昇や I $\kappa$ B キナーゼ（IKK）MAPK シグナル伝達系について有意差のある結果が得られなかった。

Cannabinoids（WIN55,212-2, WIN55,212-3）をヒトアストロサイト培養液に 0 から 10  $\mu$ M

の濃度で加えて、ケモカイン発現抑制を real-time PCR 法で調べ、また培養液中のケモカインを ELISA 法で測定した。ケモカインは IL-8、MCP-1 で検討した。これまでのところ、ケモカイン発現抑制についての有意な結果が得られていない。

Cannabinoids antagonist 投与によるケモカイン発現抑制阻止効果の研究については、試薬が入手困難のために施行できなかった。

### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

1. 南 弘一, 奥谷貴弘, 津野嘉伸, 杉本卓也, 津田祐子, 田村 彰, 柳川敏彦, 吉川徳茂 広範囲の白質裂傷を伴った shaken baby syndrome の 1 乳児例 小児科臨床 66(7): 1601-1605, 2013（査読有り）

2. Kioka N, Minami K, Tamura A, Yoshikawa N. Chemokine expression in human astrocytes in response to shiga toxin 2. Int J Inflam. 2012; 2012: 135803.（査読有り）

3. 南 弘一, 五嶋文彦, 中尾直之, 大川都史香, 田村 彰, 泉 鉦吉, 木岡直美, 津田祐子, 大松泰生, 赤井美津代, 吉川徳茂 Constructive Interference in Steady State (CISS)-MRI 法が診断に有効であった前頭蓋底髄膜脳瘤の 1 例 小児科臨床 64(8): 1887-1890, 2011（査読有り）

〔図書〕（計 3 件）

1. 南 弘一 神経症候群（第 2 版）-その他の神経疾患を含めて-】 感染性疾患 細菌感染症 サルモネラ日本臨床 別冊神経症候群 795-798, 2013.12

2. 南 弘一 非チフス性サルモネラ菌, 小児感染症マニュアル 2012 日本小児感染症学会 編, 東京医学社, 東京, 132-137, 2012

3. 南 弘一 サルモネラ脳症, 小児科臨床ピクシス 28 急性脳炎・急性脳症 総編集 五十嵐 隆専門編集 塩見正司, 中山書店, 東京, 207-209, 2011

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 弘一 (MINAMI KOICHI)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60301438

(2)研究分担者

鈴木 啓之 (SUZUKI HIROYUKI)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：80196865

吉川 徳茂 (YOSHIKAWA NORISHIGE)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10158412