

平成 22 年 6 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591218

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におけるグリア細胞の研究

研究課題名（英文）Acute encephalopathy associated with hemolytic uremic syndrome : Chemokines expressions exposed shiga toxin in normal human astrocytes

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

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 に合併する急性脳症（HUS 脳症）は死亡率が高く、しかもその病態生理は未だに不明である。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）の役割についての報告は少ない。

本研究で、我々は Stx によるヒトアストロサイトの免疫反応について検討した。Stx receptor (Gb3) は、培養ヒトアストロサイトで発現しており、炎症性サイトカイン（特に、IL-1 $\beta$ ）により、その発現が増強したことが示された。また Stx2 刺激により、ケモカイン（IL-8, MCP-1）の mRNA 発現増加と産生増加が示され、特に IL-8 は、Stx2 と IL-1 $\beta$  の同時刺激でさらに発現は増加した。

今回の研究結果から、Stx によるヒトアストロサイトの免疫反応は、ケモカイン産生に関与し、HUS 脳症の発症機序に関与する可能性が示された。

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). HUS is the most frequent cause of acute renal failure in children. 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. However, the relationship of glial cell damage and Stxs are still unclear.

In this study, we investigated that immune response of chemokines expressions exposed Stx in cultured normal human astrocytes (NHA). Stx-receptor Gb3 was expressed on the NHA, and Gb3 expression was elevated by IL-1 $\beta$ . IL-8 and MCP-1 mRNA expressions in Stx-stimulated NHAs were elevated than controlled cells. This study indicates that Stx-inducible immune responses of chemokines expression on NHAs may play a critical role in the pathogenesis of HUS encephalopathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	900,000	270,000	1,170,000
平成 20 年度	700,000	210,000	910,000
平成 21 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

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：小児神経学

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感染 (VTEC) が産生する志賀毒素 (Stx) による血管内皮障害から続発する血栓性微小血管症 (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病態である。20~30%の患者が何らかの中樞神経症状を合併し、死因の主な原因は急性脳症 (HUS 脳症) 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内毛細血管をおかす血栓形成性血管障害が認められている (Mizuguchi *Acta Neuropathol* 1996, 91:254-262)。また HUS 脳症の画像上の変化は、MRI では両側基底核病変を呈することが多く、浮腫病変や局所の血管障害による壊死性変化が考えられている。このことは、Stx の作用で脳局在性に毛細血管内皮細胞傷害にもとづく血管透過性亢進や microangiopathy が発症機序として考えられている。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べき状況にある。本研究は HUS 脳症の発症機序の解明と治療法の開発が大きな目的である。

研究代表者は、神経感染免疫疾患 (髄膜炎、急性脳炎・脳症など) の発症、進展に関与する機序を明らかにする目的で、細菌毒素による中樞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関与していることを明らかにした (小児感染免疫 2001; 13:342-346、Tohoku J Exp Med 2004; 203(2): 129-132)。さらに志賀毒素 (Stx) による HUS で合併する急性脳症 (HUS 脳症)

の発症機序に関して研究を行ってきた(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、進展に関する基礎的研究」)。国外での研究動向は、Stx によるサイトカイン発現促進は大脳血管内皮細胞でも認められることが報告されてきた (Microb Pathog. 2004 Apr;36(4):189-96.)。

2. 研究の目的

グリア細胞であるアストロサイトやミクログリアは感染、虚血、神経変性疾患などの病態時に、神経傷害部位に集積し、活性化したグリア細胞はさまざまなサイトカインやケモカインを産生し病態形成に関与することが示され、注目を集めている。さらにケモカイン遺伝子ノックアウトマウスにおいても脳細胞傷害の減弱が報告されており (J Neuroimmunol 2002;125:59-65)、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を示唆している。

【仮説】志賀毒素がアストロサイトに作用し、産生されたケモカインが脳細胞障害に関与する。

本研究では、大脳血管内皮細胞を障害して侵入した Stx が免疫細胞としての働きをもつ「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」、「NO を産生する」、「産生誘導されたケモカインが Gb3 発現能、白血球付着・移行能に影響する」、「Stx が転写因子 (NF-κB) 経路に影響する」との仮説を立て、それを証明することで HUS 脳症発症機序の一端を明らかにすることを具体的な目的とする。またケモカインの中和抗体が脳細胞傷害抑制を示すことも報告されており (Brain Res 1997 759; 103-111)、HUS 脳症で利用可能な免疫療法 (抗ケモカイン抗体中和療法) についても開発する。

### 3. 研究の方法

本研究では、溶血性尿毒症症候群 (HUS) に伴う急性脳症 (HUS 脳症) の発症機序におけるグリア細胞の関与についての基礎的研究を行う。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

志賀毒素 (以下 Stx) 刺激による正常ヒトアストロサイトでのケモカイン発現と、ケモカインが Gb3 発現能を与える影響の検討、阻害物質がケモカイン発現を抑制することについて検討する。

(1) 細胞培養: 正常ヒトアストロサイト (TaKaRa, Cambrex 社) をアストロサイト専用培地にて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で培養する。

(2) 志賀毒素 Stx 調整: 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。

(3) ケモカイン発現/real-time PCR 法: Stx2 刺激有無で培養した細胞から経時的に、total RNA を抽出する。

TotalRNA を用いて、各種濃度での IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES などのケモカインの発現を real-time PCR 法を用いて定量的に測定する。

(4) ケモカインの濃度測定: Stx 刺激での培養液中のケモカイン (IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ ) を ELISA 法で測定する。

(5) Gb3 発現の検索と濃度測定: 間接蛍光抗体法で Gb3 のヒトアストロサイトでの発現と局在を検索し、HPLC 法にて Gb3 濃度を測定する。

(6) 転写因子 NF- $\kappa$ B への影響の検討: Stx 刺激での培養液中の NF- $\kappa$ B を ELISA 法で測定する。

(7) 阻害物質でのケモカイン抑制の検討: デキサメゾンを使用して、ケモカインの発現が抑制されるかを real-time PCR 法で検討する。

### 4. 研究成果

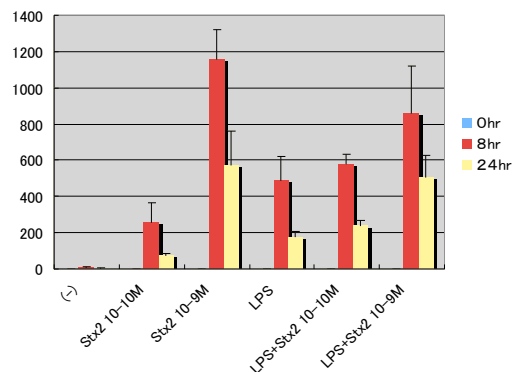
本研究では、志賀毒素(Stx)産生型腸管出血性大腸菌感染による溶血性尿毒症症候群に伴う急性脳症 (HUS 脳症) の発症機序に関するグリア細胞の役割について基礎的研究を行う。(目的) Stx 刺激による正常ヒトアストロサイト細胞での IL-8, MCP-1 などのケモカイン発現と Stx-reseptor(Gb3) 発現能に与える影響を検討した。(結果)

1. 正常ヒトアストロサイト細胞における Gb3 の発現: Gb3/CD77 抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、Gb3 の発現を確認した。  
2. 炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ )刺激による Gb3 の発現: 10<sup>-6</sup>M の IL-1 $\beta$  刺激で、Gb3 の発現は免疫染色で増強することを示した。  
3. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  刺激で、Gb3

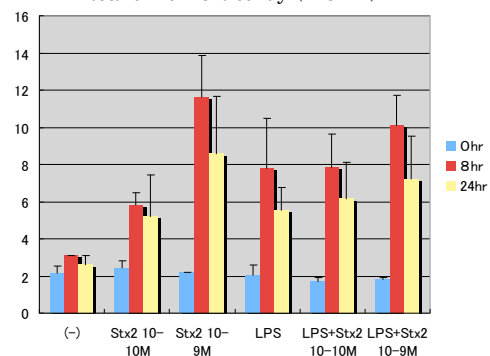
関連酵素 (GalT6) mRNA 発現誘導の確認: IL-1 $\beta$  刺激 8 時間後に、GalT6 mRNA の発現はコントロールに比べて有意に上昇していた (P<0.05)。  
4. Stx 刺激によるヒトアストロサイト細胞でのケモカイン産生: Stx で 24-48 時間刺激されたヒトアストロサイト細胞で、IL-8, MCP-1 のケモカインが ELISA 法で測定し有意に上昇していた。  
5. Stx 刺激によるヒトアストロサイト細胞でのケモカイン mRNA の誘導: 10<sup>-10</sup> ~ 10<sup>-9</sup> M の濃度に調整した Stx で 8 時間、24 時間刺激して mRNA を採取し、real-time PCR で IL-8, MCP-1 の mRNA 発現を確認した。IL-8 でコントロールに比べて 256 倍の有意な上昇を認めた。MCP-1 も 10<sup>-9</sup> M で 11 倍の上昇を認めた。  
6. Stx と IL-1 $\beta$  の両方刺激での IL-8 mRNA の発現: Stx 単独よりも Stx+IL-1 $\beta$  の方が 4 倍 IL-8 mRNA の発現は上昇していた。

(考察) HUS 脳症の発症について、志賀毒素 (Stx) がヒトアストロサイトに関与する免疫反応を検討した。ヒト大脳血管内皮細胞以外にもアストロサイトにも Gb3 が発現しており、また IL-1 $\beta$  により発現することが判明した。本実験は、Stx による内皮細胞障害で脳血液関門が破綻し、Stx が流入した時にグリア細胞であるアストロサイトも Stx に反応し、ケモカイン産生が誘導されることで、脳内での炎症の増強に関与し、HUS 脳症発症の機序に関与することが示唆された。

Real-time PCR study (IL-8)



Real-time PCR study (MCP-1)



## 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)

[学会発表] (計 1 件)

①木岡直美, 南 弘一, 田村 彰, 吉川徳茂  
溶血性尿毒症症候群に伴う急性脳症における  
ヒトアストロサイトの免疫応答に関する  
検討. 第 35 回和歌山小児神経研究会, 平成  
22 年 1 月 30 日

## 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