

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860861

研究課題名(和文) 溶血性尿毒症症候群における尿細管障害の包括的病態解明研究

研究課題名(英文) The investigation for mechanism of tubular injury with diarrhea associated hemolytic uremic syndrome

研究代表者

忍頂寺 毅史 (Takeshi, Ninchoji)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10568950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はヒト尿細管培養細胞を用いて下痢関連溶血性尿毒症症候群(D+HUS)の尿細管障害機序を解明するものである。はじめにヒト尿細管培養細胞に志賀毒素(ST,1,2)を添加しアポトーシスが生じる適切な濃度と時間を検討したところ、 10^{-7} $\mu\text{g/ml}$ 、24時間で適量のアポトーシスが起ることを確認した。次にarrayPCRを用いてmRNAレベルでアポトーシス関連蛋白を解析した。一部因子の増加を認めしたが、特定のアポトーシスの経路関連因子ではなかった。またサイトカイン測定も行ったものの測定範囲内で増加は見られなかった。以上より本研究系ではD+HUSの尿細管障害機序解明は限界があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to reveal the mechanism of tubular injury with diarrhea associated hemolytic uremic syndrome (D+HUS). At first, we gave Shiga toxin (ST) 1, and 2 to human tubular cultured cell to examine the maximal concentration and duration of toxin. As the result, 10^{-7} in 24 hours of ST was most suitable condition with maximal apoptosis. Second, messenger RNA of apoptosis related protein was analyzed with array PCR method. However, few significant factors of apoptosis was not identified with the definite pathway of apoptosis. Same results was found in serum of patients with D+HUS. Third, we examine cytokines which developed during tubular injury. In our assay, there were no significant cytokines. Thus, our strategy or our assay were difficult to reveal tubular injury.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：溶血性尿毒症症候群 志賀毒素 アポトーシス サイトカイン 尿細管培養細胞

1. 研究開始当初の背景

下痢関連溶血性尿毒症症候群 (D+HUS) は溶血性貧血・血小板減少・腎機能障害を三徴とした非常に重篤な疾患で、小児では頻度が高い。主として急性腎障害(AKI)が問題となり透析療法が行われるが、近年の疫学研究で慢性腎臓病(CKD)や末期腎不全(ESKD)の重要な危険因子でもあることが示された (Kidney Int 2010)。AKI への進展抑制はCKD,ESKD 進展抑制にもつながると考えられるが、D+HUS 腎病変の病態・進行機序に関しては慢性期のみならず急性期ですら解明されていない。D+HUS は小児の急性期および慢性腎障害の主要因であり QOL や医療経済的な点からも病態解明は急務である。

D+HUS の急性期病態の中心は腸管出血性大腸菌産生ペロ毒素(stx)による血管内皮障害とされてきた。血管内皮細胞において stx がその受容体である Gb3 に結合し、アポトーシス機構による細胞死から AKI に至るといふものである。一方で Gb3 受容体が尿細管細胞にも存在するという生理学的事実や、D+HUS では糸球体や血管より尿細管の障害が顕著であるという病理学的事実 (J Infect Dis 1993) 更に多数の症例で早期から尿細管障害マーカーである 2MG が上昇するという臨床的事実は、D+HUS の腎障害に尿細管障害が関与していることを示唆する重要な知見である。にも関わらず D+HUS では尿細管など血管内皮以外の腎実質構成細胞が腎障害の進展増悪にどのように影響を与えているかについては一切検討がなされていない。

以上のことから D+HUS の尿細管障害に注目しそのメカニズムを解明すべく研究を行うこととした。

2. 研究の目的

D+HUS の病態は「腎血流低下による腎虚血と低酸素」、「LPS(リポポリサッカライド)による敗血症」、「血管内溶血」という側面があるが、D+HUS 腎障害の全容を解明するためにこれらすべての側面からのアプローチが必要と考えた。これまでに虚血低酸素・敗血症・溶血といった病態に関する検討は他の腎疾患モデルで行われており、近年これらの病態においてアポトーシス、サイトカイン、活性酸素、低酸素誘導因子が尿細管障害に関与することが明らかとなった。これらいずれの因子も D+HUS の尿細管障害の原因となりうることからこれらの因子を網羅的かつ包括的に解析することで、D+HUS 腎障害進展機序の全容を解明することを目的とした。さらにその結果をもとに未だ治療法の存在しない D+HUS の新規治療法の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

1) 尿細管障害はこれまでにアポトーシス、サイトカイン、活性酸素、低酸素誘導因子の

各種因子により惹起されることが他の病態モデルで示されている。D+HUS の病態から考えてもこれらの因子の関与は十分可能性が高くなくこれらの因子を解析対象とした。

2) 我々のこれまでの経験や実績からヒト尿細管培養細胞 (HK-2: ATCC) および臨床検体を用いて、D+HUS 尿細管における各種因子の網羅的解析を実施することとした。

尿細管培養細胞を用いたアポトーシス関連分子の解析

アポトーシス促進因子の解明と阻害薬物による尿細管アポトーシス抑制研究

尿細管培養細胞を用いたサイトカイン関連分子の解析とその抑制研究

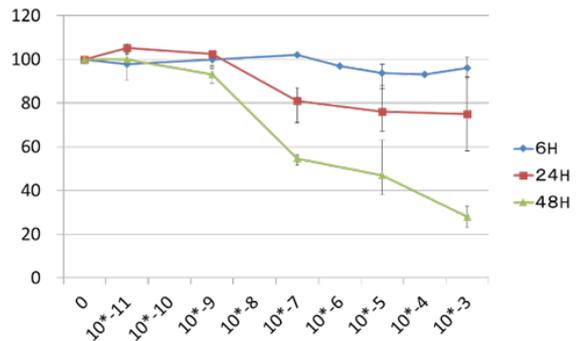
尿細管培養細胞を用いた活性酸素関連因子の解析とその抑制研究

尿細管培養細胞を用いた HIF の解析とその抑制研究

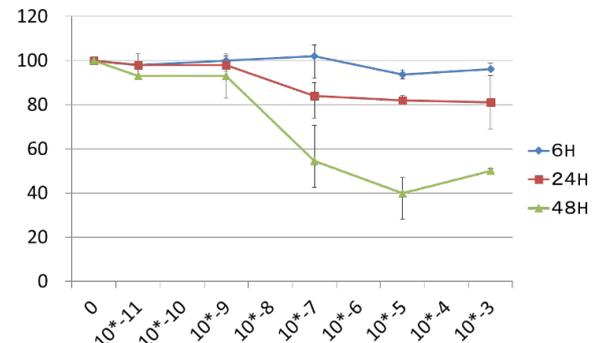
臨床情報および検体を用いた検討

4. 研究成果

(1) ヒト尿細管培養細胞(HK-2)に志賀毒素(ST-1,2)を投与し、濃度・時間による Cell Viability の測定をトリパンブルー染色にて行った。その結果 ST-1,2 ともにおおむね 10^{-7} $\mu\text{g/ml}$ 周辺の濃度で 24 時間 incubate することで適量の細胞死が起こることを確認した(図 1-1,1-2 参照)



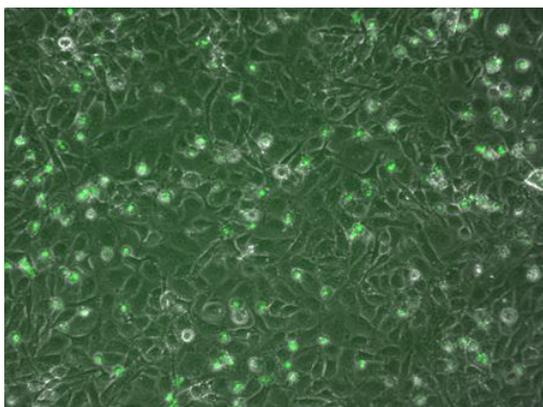
<図 1-1、ST1 の濃度・時間と細胞活性割合>
縦軸：細胞活性(%) 横軸：ST 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)



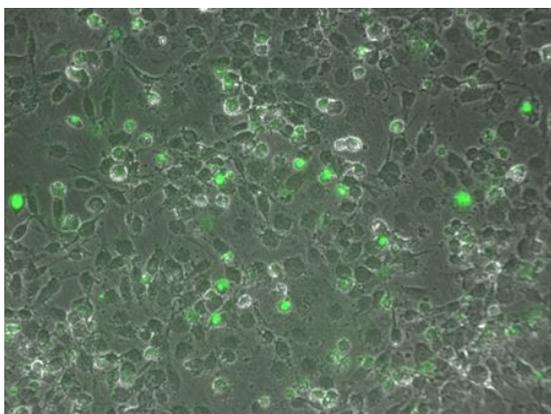
<図 1-2、ST2 の濃度・時間と細胞活性割合>
縦軸：細胞活性(%) 横軸：ST 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

この濃度はこれまでに報告されているヒト培養細胞 (血管内皮細胞) において ST 投与にて起こる細胞死の濃度と同等であり (Kidney Int 1998) 妥当であると考えられた。

(2) 次にヒト尿管培養細胞における志賀毒素投与にて生じる細胞死に対するアポトーシス関与の有無を調べるために TUNEL 染色を行った。同濃度において多くの細胞で TUNEL 陽性となり、定性的にアポトーシスの関与が考えられた (図 2-1, 2-2)



<図 2-1 ST1 TUNEL 陽性細胞>
緑：TUNEL 陽性細胞



<図 2-2 ST2 TUNEL 陽性細胞>

さらに Annexin 染色を定量的に行う事の出来る機器 (Tali assay) を使用しアポトーシスの関与を定量的に行った。ST1 で細胞死全体の 24-37% が、ST-2 で 21-33% が Annexin 陽性でありアポトーシスに関与していた。過去の他の細胞の報告 (Kidney Int 1998) よりも低め (本報告では Apo2.7 陽性細胞は VST-1 で $79.9 \pm 0.5\%$ 、ST-2 で $42.9 \pm 2.9\%$ である) だが定量的に明らかな関与が示唆される結果となった。

(3) 次に本研究の肝であるアポトーシス関連蛋白における mRNA での Realtime qPCR を array で行う arrayPCR を行った。関連蛋白 mRNA の一部 (Bcl2, Casp5, TNFSF8) に増加を認めたものの、特定のアポトーシスの経路に関連した因子が増加していたわけではなく、アポトーシスと尿管障害との関連を見出すことができなかった。

(4) in vitro での実験を進める間に重症 D+HUS 患者の血清を入手可能であった。1 例ではあったものの大量の血清であったため同様に実験を進めた。In vitro 同様に同時に

尿管培養細胞に患者血清を添加した。本患者は ST-1, 2 とともに陽性であった $10^* -2$ が最も細胞死およびアポトーシスが起っていた (Cell viability は 49%、アポトーシスが細胞死全体の 24%)。同様に arrayPCR による RT-qPCR を行ったが上記因子以外の有意な上昇は見られなかった。

(5) (1) ~ (3) の結果を受けてアポトーシスの関与を本 assay 系で追及するには限界があると考え、計画書に従いサイトカイン測定を行うこととした。ヒト尿管培養細胞と志賀毒素の濃度は (1) で使用したものをを用いた。array PCR は高額であるため preliminary にデータをだすために、まずは ELISA キットを使用した。まずは IL-10 および TNF の測定を行ったが有意な上昇はなかった。

活性酸素や HIF の検討は時間や費用の関係から行うことができなかった。

(6) 考察

(A) アポトーシスと尿管細胞死

尿管培養細胞である HK-2 細胞における ST-1, ST-2 投与とアポトーシスの関連に関してはこれまで報告はなく最大量のアポトーシスを起こしうる濃度と時間を発見できたことは新しかった。しかしこの実験に多くの費用と時間を費やしたことで後の実験が遅れた。また最大量のアポトーシスを起こしたといっても過去の他の細胞 (血管内皮細胞) でのアポトーシス割合に比して明らかに低い割合であった。FACT に比して Tali の感度は落ちるといわれているが別の要因もあると考えられた。他の in vivo の系では ST-1, 2 のみならず TNF や LPS など毒素以外のサイトカインや毒物を同時に投与して細胞死の実験系を行っている。不死化している HK-2 細胞ではアポトーシスが起こりにくくなっている可能性があるためであるかと考えた。しかし (1) の実験結果より細胞死の割合は $10^* -7$ より明らかに増加しており、他の物質の同時投与でアポトーシスでなくネクロシスが惹起される可能性もある。in vitro での解析系に限界があるとも考えられた。

また今回少数であるが実際の患者検体でも行ったがやはり Cell viability は減少しているのにも関わらずアポトーシスの関与がわずかであった。検体の保存は -70 度で行っていたがサイトカインをはじめとして各因子が変性してしまう可能性もあり検体の保存方法等実験の進め方に検討すべき事項もあると考えられた。

(B) array PCR とアポトーシスの解析

本研究では mRNA による arrayPCR にて各アポトーシス関連因子の解析を網羅的に行った。array PCR は非常に簡便に解析可能であるがあくまでも mRNA レベルでの解析である。

アポトーシスの割合も少ないためか有意な因子の増加をみることができなかった。今後は ELISA や Western Blot によって蛋白レベルでの検討も必要であるかもしれない。また (A) であったようにアポトーシスそのものの割合を増加させることで感度が上がる可能性もあるため、他の物質の添加も検討すべきと考えられる。また (A) 同様 in vitro 系の限界も考えられる。

(C) サイトカインと尿細管細胞死

今回検討したサイトカインはごく少ないが Th1, Th2 サイトカインを代表する 2 つのサイトカインである IL-10 と THF を測定した。しかしながら全く上昇を認めなかった。この原因として (A) (B) で述べたようにサイトカインが放出されにくい実験系であったのかもしれない。1 つ目として ST 添加後のサイトカイン測定時間による問題点が考えられる。ST-1, 2 によるサイトカイン放出は添加後すぐに起こると考えられるが、今回は細胞死に合わせて添加後 24 時間での測定を行っている。また細胞死の程度からやはり多くのサイトカインが出る条件は一度に大量の毒素を添加直後に発生する可能性もある。したがって細胞死の研究とは一部切り離して実験系を組み立てる必要があったかもしれない。しかしながら本研究の目的は尿細管細胞死に伴う各因子の解析と細胞死抑制による治療法の開発にある。サイトカイン測定そのものを目的とせず、「細胞死に関連したサイトカインの測定」には実験系において課題が残る結果となった。

以上より今後研究を進めるにあたって
アポトーシスが起りやすい条件設定の開発
In vivo での実験系での再検討
検体保存方法の再考
などの改良が必要と考えられた

5. 主な発表論文等 (査読有のもののみ)

[雑誌論文] (計 7 件)

Ninchoji T, Iwatani S, Nishiyama M, Kamiyoshi N, Taniguchi-Ikeda M, Morisada N, Ishibashi K, Iijima K, Ishida A, Morioka I. Current Situation of Treatment for Anaphylaxis in a Japanese Pediatric Emergency Center. *Pediatr Emerg Care*. 2016 Apr 13. PMID: 27077998

Kamiyoshi N, Nozu K, Urahama Y, Matsunoshita N, Yamamura T, Minamikawa S, Ninchoji T, Morisada N, Nakanishi K, Kaito H, Iijima K. Pathogenesis of hypokalemia in autosomal dominant hypocalcemia type 1. *Clin Exp Nephrol*. 2016 Apr;20(2):253-7. doi:10.1007/s10157-015-1160-9.

Yamamura T, Morisada N, Nozu K, Minamikawa S, Ishimori S, Toyoshima D, Ninchoji T, Yasui M, Taniguchi-Ikeda M, Morioka I, Nakanishi K, Nishio H, Iijima K. Rare renal cilopathies in non-consanguineous families that were identified by targeted resequencing. *Clin Exp Nephrol*. 2016 Mar 11. PMID: 26968886

Toyoshima D, Morisada N, Takami Y, Kidokoro H, Nishiyama M, Nakagawa T, Ninchoji T, Nozu K, Takeshima Y, Takada S, Nishio H, Iijima K. Rituximab treatment for relapsed opsoclonus-myoclonus syndrome. *Brain Dev*. 2016 Mar;38(3):346-9. doi: 10.1016/j.braindev.2015.09.002.

Fu XJ, Nozu K, Kaito H, Ninchoji T, Morisada N, Nakanishi K, Yoshikawa N, Ohtsubo H, Matsunoshita N, Kamiyoshi N, Matsumura C, Takagi N, Maekawa K, Taniguchi-Ikeda M, Iijima K. Somatic mosaicism and variant frequency detected by next-generation sequencing in X-linked Alport syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2016 Mar;24(3):387-91.

doi: 10.1038/ejhg.2015.113. 7.

Matsunoshita N, Nozu K, Shono A, Nozu Y, Fu XJ, Morisada N, Kamiyoshi N, Ohtsubo H, Ninchoji T, Minamikawa S, Yamamura T, Nakanishi K, Yoshikawa N, Shima Y, Kaito H, Iijima K. Differential diagnosis of Bartter syndrome, Gitelman syndrome, and pseudo-Bartter/Gitelman syndrome based on clinical characteristics. *Genet Med*. 2016 Feb;18(2):180-8.

doi: 10.1038/gim.2015.56.

Hisamatsu C, Maeda K, Aida Y, Yasufuku M, Ninchoji T, Kaito H, Nozu K, Iijima K, Nishijima E. A novel technique of catheter placement with fibrin glue to prevent pericatheter leakage and to enable no break-in period in peritoneal dialysis. *J Pediatr Urol*. 2015 Oct;11(5):299-300. doi: 10.1016/j.jpuro.2015.07.005.

[学会発表] (計 5 件)

Takeshi Ninchoji, Sota Iwatani, Masahiro Nishiyama, Naohiro Kamiyoshi, Mariko Taniguchi-Ikeda, Naoya Morisada, Kazuto Ishibashi, Kazumoto Iijima, Akihito Ishida, Ichiro Morioka Current Situation of Treatment for Anaphylaxis in a Japanese Pediatric Emergency Center

5th Global Congress for Consensus in Pediatrics and Child Health 2016.3.5 Xian(China)

Takeshi Ninchoji, Natsuki Matsunoshita, Nobuyuki Yamamoto, Taku Nakagawa, Mariko Ikeda-Taniguchi, Naoya Morisada, Kazuto Ishibashi, Kazumoto Iijima, Akihito Ishida, Ichiro Morioka
Clinical differences between anaphylaxis children with prehospital remission and exacerbation
European Academy of Pediatrics 2015.9.19 Oslo(Norway)

Takeshi Ninchoji, Hiroshi Kaito, Kandai Nozu, Taketsugu Hama, Koichi Nakanishi, Norishige Yoshikawa, Kazumoto Iijima.
Investigation of principal mechanism for renal sodium retention in children with idiopathic nephrotic syndrome.
American Society of Nephrology Kidney week 2013.11.8 Atlanta(USA)

Takeshi Ninchoji, Hiroshi Kaito, Natsuki Matsunoshita, Shingo Ishimori, Norishige Yoshikawa, Kazumoto Iijima,
Actual outcome and problem of cyclosporine treatment in children with steroid-sensitive nephrotic syndrome.
The 15th Congress of International Pediatric Nephrology Association. 2013.9.1 Shanghai(China)

Takeshi Ninchoji, Hiroshi Kaito, Natsuki Matsunoshita, Kandai Nozu, Koichi Nakanishi, Norishige Yoshikawa, Kazumoto Iijima,
The relation between steroid responsiveness and immunofluorescence findings in infant idiopathic nephrotic syndrome
The 48th European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association Congress, 2013.5.19 Istanbul(Turkey)

研究者番号：00240854
原 重雄(HARA Shigeo)
神戸大学大学院医学研究科(講師)
研究者番号：00240854

7. 研究組織

(1)研究代表者

忍頂寺 毅史(NINCHOJI Takeshi)
神戸大学大学院医学研究科(助教)

研究者番号：10568950

(2)連携研究者

飯島 一誠(IIJIMA Kazumoto)
神戸大学大学院医学研究科(教授)

研究者番号：00240854

野津 寛大(NOZU Kandai)
神戸大学大学院医学研究科(准教授)

研究者番号：00240854

貝藤 裕史(KAITO Hiroshi)
神戸大学大学院医学研究科(助教)