

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590496

研究課題名（和文）細菌感染による過剰反応を制御する生体に備った分子機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of the molecular mechanism underlying the intrinsic regulation in excess reaction induced by bacterial infections

研究代表者

八木 淳二（YAGI JUNJI）

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：70182300

研究成果の概要（和文）：staphylococcal enterotoxin A（SEA）と D-galactosamine（D-GalN）投与による毒素性ショック症候群のマウスモデルにおいて、leukocyte cell-derived chemotaxin 2（LECT2）^{-/-}マウスは、多臓器不全が増強され致死率の上昇を認めた。B6 マウスの血漿 LECT2 濃度は、SEA/D-GalN 投与後速やかに減少し、72 時間後までに正常値まで上昇した。LECT2 投与は、血漿 TNF- α 、IL-6 の著明な減少と生存率の上昇を誘導した。LECT2 は、過剰な炎症反応の内的制御因子であることが示唆された。敗血症患者では、急性期に血漿 LECT2 濃度が減少し、回復期に上昇することを認め、ヒトの炎症性疾患との関連を始めて示した。

研究成果の概要（英文）：Using the mouse model of SEA-induced toxicity, LECT2^{-/-} mouse showed exacerbation of multiple organ failure and increase of mortality. The plasma LECT2 level in B6 mouse injected with SEA/D-GalN declined rapidly and increased to the normal level until 72 hours after treatment. The administration of LECT2 suppressed remarkably plasma TNF- α and IL-6 levels and increased survival rate. LECT2 appears to be an intrinsic regulatory factor in excess inflammatory responses. In the patients with sepsis, the plasma LECT2 level decreased at acute phase, and increased at recovery phase, suggesting for the first time that LECT2 might be also associated with human inflammatory diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：基礎医学、細菌学（含真菌学）

キーワード：感染免疫、LECT2、敗血症、毒素性ショック、炎症、炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

我々は、細菌の外毒素の一部が特定の T 細胞抗原レセプターの β 鎖 V 領域 ($V\beta$) を介して莫大な数の T 細胞を活性化するスーパー抗原活性を有することを見出してきた (Yagi, J. et al. J. Immunol. 144: 892. 1990)。SEA などのスーパー抗原は、毒素性ショック症候群を誘導し、臨床での多臓器不全をきたす重篤な疾患となっている。我々は、細菌性スーパー抗原による生体異常反応について、マウスやヒトの検体を用いて、研究を続けている。

LECT2 は、1996 年山越らによって好中球の走化因子として発見された (Yamagoe, S. et al. Immunol. Lett. 52: 9. 1996)。肝臓由来の多機能な蛋白であることが示唆されてきたが、生体内の機能についてはほとんど不明であった。2004 年に、山越らの研究グループは、Con A 誘導性肝炎が LECT2^{-/-} マウスにおいて著明に増悪することを報告した。Con A がポリクロナールな T 細胞 mitogen であり、マウスの細菌性スーパー抗原投与による毒素性ショック症候群のモデルにおいても、多臓器不全の一部として重症な肝障害を認めることから、LECT2 が致死的な炎症反応を抑制する制御因子である可能性を着想するに至った。

2. 研究の目的

(1) 細菌毒素 (SEA) によるショック誘導の実験系と LECT2^{-/-} マウス (C57BL/6JJc1 (B6) バックグラウンド) を用いて、炎症の程度ともたらされる多臓器不全に対する LECT2 の効果を明らかにする。

(2) recombinant LECT2 (rLECT2) 投与の効果と併せて検討し、LECT2 の治療的効果を明らかにする。

(3) LECT2 の制御機構を細胞レベルおよび分子レベルで解明する。LECT2 の結合細胞、受容体の同定を試みる。

(4) ヒトの炎症性疾患に対する LECT2 の関与について敗血症患者の検体を用いて明らかにする。血中 LECT2 濃度の変動を解析することが診断上有効であるか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) SEA 誘導性ショックでの解析：① LECT2 の炎症反応に対する関与の解析：SEA (0.1 mg) と D-GalN の投与による LECT2 KO マウスの致死率は、B6 と比較して著明に高い。LECT2^{-/-} マウスと同等の致死率を B6 で得るためには約 10 倍量の SEA を要することを本研究の予備実験で見出していた。SEA 0.1 mg 投与の実験系において、LECT2^{-/-} マウスと B6 マウスの炎症の程度を経時的 (ショック誘導後 72 時間まで) な血中炎症性サイトカイン濃度、多臓器の機能や病理組織学的所見の解析により比較する。

② LECT2 の診断と治療的価値の解析：SEA (1.0 mg) と D-GalN の投与によるショック誘導 B6 マウスの血中 LECT2 濃度の変動を上記の各項目の変動や予後と関連づけながら解析する。B6 マウスのショック誘導開始時と 6 時間後に rLECT2 5.0 mg 注射し、治療的効果を検討する。

(2) LECT2 の細胞、分子レベルにおける機能解析：LECT2 の結合細胞をマウス、ヒトで同定する。好中球および LECT2 の結合細胞の機能 (サイトカイン産生、食能など) に対する効果を検討する。受容体について、遺伝子からの単離、ないし細胞 lysate からの単離、同定を試みる。

(3) ヒトの炎症性疾患における関与の解析：東京女子医科大学病院 ICU に敗血症の診

断で入退室した 23 名の患者の LECT2 の血漿中の濃度の変動を各種の炎症性パラメーターや感染の重症度の指標である血漿 procalcitonin の変動と関連づけて解析する。うち 4 名については、ICI 入室中に頻回採血し、LECT2 血漿中濃度の time course を検討した。LECT2 のヒトの炎症の重症度の指標となるか検討し、診断的価値を明らかにする。

4. 研究成果

B6 マウスに 1.0 mg の SEA を D-GalN とともに投与すると、24 時間後に肝臓の瀰漫性の出血と肝細胞の強度のアポトーシス誘導とともに、肺において瀰漫性の出血を観察した。0.1 mg の SEA /D-GalN 投与では、24 時間後に B6 マウスでは肝臓と肺の極軽度の出血のみを認めたが、LECT2^{-/-} マウスでは、1.0 mg SEA/D-GalN 投与 B6 マウスとほぼ同等の強度の肝、肺病変を来した。1.0 mg SEA/D-GalN 投与 B6 マウスの血漿中の LECT2 濃度の変動は、約 50 ng/ml から投与後速やかに減少し、72 時間後までに正常値まで上昇した。投与後 12 時間の血漿 LECT2 濃度の減少と血漿 TNF- α 、IL-6 および MCP-1 濃度の上昇の程度ないし 72 時間後の致死率は、正の相関を認めた。B6 マウスへの 1.0 mg SEA/D-GalN 投与の 0.5 および 6 時間後に 5.0 mg の LECT2 を投与すると、生存率の 50%の上昇と血漿 TNF- α 、IL-6 の著明な減少を誘導した。以上から、LECT2 は、毒素性ショック症候群のマウスモデルにおいて、炎症の重症度および予後の指標となる生体内因子であり、炎症性サイトカインを抑制することで治療効果の可能性が判明した。

ヒト健常者 (31 名) の血漿 LECT2 濃度は、 19.7 ± 3.4 ng/ml であり、性差、男女差、年齢差はなかった。ICU 入室時は、 5.3 ± 4.1 ng/ml と有意に減少し、退出時は、入室時と比較し有意に上昇した。matched pair test

により個人の変動を検討すると、血漿 LECT2 濃度の変動は、各種炎症性パラメーターと procalcitonin の変動とは逆に、ICU 入室時に低値を示し、全例が退室時に上昇した。血漿中の好中球 (%)、幼若白血球、CRP、IL-6 と同等の有意な変動を認めた。これらのパラメーター、LECT2 および procalcitonin について、LECT2 と CRP の組み合わせは、急性期 (ICU 入室時) と回復期 (ICU 退室時) を良く区別したが、LECT2 と procalcitonin の組み合わせは、前者の組み合わせと比較し、区別の程度が劣った。また、基礎疾患 (肝疾患、癌) の LECT2 濃度への影響は認めなかった。time course を追った 4 名の LECT2 と CRP の血漿濃度の変動は、ほぼ、mirror image を描いた。以上から、血漿 LECT2 濃度は、敗血症において炎症の重症度の指標として診断価値があることが判明した。

LECT2 の細胞・分子レベルの解析では、マウスの腹腔マクロファージに強発現、ヒトの単球に発現を認めたが、休止期および活性化 T 細胞に発現は認めなかった。受容体の単離・同定には至らなかった。機能解析では、マウスの腹腔マクロファージの各種炎症性サイトカイン産生への影響は認めず、ヒト好中球および単球の貪食能に対する効果は認めなかった。LECT2 の機能発現について、今後、細胞・分子レベルでさらに明らかにしなくてはならない。ヒトの細菌感染以外の原因による炎症性疾患との関連も明らかにしたい。これらの課題を今後解明し、LECT2 の臨床における治療的アプローチに繋げていきたい。

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 7 件)

① Yanagisawa N, Haruta I, Kikuchi K,

- Shibata N, Yagi J. Are dysregulated inflammatory responses to commensal bacteria involved in the pathogenesis of hepatobiliary-pancreatic autoimmune disease? An analysis using mice models of primary biliary cirrhosis and autoimmune pancreatitis. ISRN Gastroenterol. 査読有, 2011, 513514, DOI: 10.5402/2011/513514
- ② Haruta I, Yanagisawa N, Kawamura S, Furukawa T, Shimizu K, Kato H, Kobayashi M, Shiratori K, Yagi J. A mouse model of autoimmune pancreatitis with salivary gland involvement triggered by innate immunity via persistent exposure to avirulent bacteria. Lab Invest. 査読有. 2010, 90: 1757-1769
- ③ Dang MH, Kato H, Ueshiba H, Omori-Miyake M, Yamagoe S, Ando K, Imanishi K, Arimura Y, Haruta I, Kotani T, Ozaki M, Suzuki K, Uchiyama T, Yagi J. Possible role of LECT2 as an intrinsic regulatory factor in SEA-induced toxicity in d-galactosamine-sensitized mice. Clin Immunol. 査読有. 2010, 137: 311-321
- ④ Haruta I, Kikuchi K, Hashimoto E, Nakamura M, Miyakawa H, Hirota K, Shibata N, Kato H, Arimura Y, Kato Y, Uchiyama T, Nagamune H, Kobayashi M, Miyake Y, Shiratori K, Yagi J. Long-term bacterial exposure can trigger nonsuppurative destructive cholangitis associated with multifocal epithelial inflammation. Lab Invest. 査読有. 2010, 90: 577-588
- ⑤ Arimura Y, Ezaki T, Koyanagi M, Uchiyama T, Koyasu S, Yagi J. Reduced T cell expansion by a superantigen as a result of impaired B cell development in mice deficient for the p85a regulatory subunit of PI3K. J Leukoc Biol. 査読有. 2010, 87: 493-500
- ⑥ Li ZJ, Omoe K, Shinagawa K, Yagi J, Imanishi K. Interaction between superantigen and T-cell receptor V β element determines levels of superantigen-dependent cell-mediated cytotoxicity of CD8⁺ T cells in induction and effector phases. Microbiol Immunol. 査読有. 2009, 53: 451-459
- ⑦ Miyoshi-Akiyama T, Zhao J, Uchiyama T, Yagi J, Kirikae T. Positive correlation between low adhesion of group A Streptococcus to mammalian cells and virulence in a mouse model. Microbiol Lett. 査読有. 2009, 11: 2253-2270
- [学会発表] (計 14 件)
- ① 春田郁子他、マウスモデルを用いた NAFLD →肝発癌の病因・病態解析の試み、第 40 回日本免疫学会総会学術集会、2011 年 11 月 29 日、千葉市
- ② 柳沢直子他、自己免疫性膵炎マウスモデルの発症機構に関与する大腸菌構成因子の解明、第 40 回日本免疫学会総会学術集会、2011 年 11 月 28 日、千葉市
- ③ 上芝秀博他、非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウスにおける、慢性細菌暴露が誘引となる遠隔部皮膚病変の検討、第 94 回日本細菌学会関東支部総会、2011 年 10 月 6 日、東京都 港区
- ④ 安藤一義他、The level of LECT2 in blood associates with the severity of systemic inflammation in patients with sepsis. International Union of Microbiological

Societies 2011 Congress 2011 年 9 月 10 日、札幌

⑤ 加藤秀人他、Morphine inhibit lethal endotoxic shock. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress 2011 年 9 月 10 日、札幌

⑥ 春田郁子他、Is the dysregulation of homeostatic inflammation involved in the pathogenesis of innate-immune mediated hepato-biliary-pancreatic autoimmune disease?: Analysis using mice models of primary biliary cirrhosis and autoimmune pancreatitis. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress 2011 年 9 月 10 日、札幌

⑦ 上芝秀博他、Distant skin inflammation induced by chronic bacterial exposure to abdominal subcutaneous tissue in nonalcoholic fatty liver disease-harboring mice. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress 2011 年 9 月 10 日、札幌

⑧ 今西健一他、Studies of affinities of a superantigen, *Yersinia pseudotuberculosis* - derived mitogen to MHC class II molecule and TCR V β chain. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress 2011 年 9 月 10 日、札幌

⑨ 柳沢直子他、*Escherichia coli* induced autoimmune pancreatitis in C57BL/6 mice. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress 2011 年 9 月 7 日、札幌

⑩ 春田郁子他、細菌が誘導する自然免疫賦活は自己免疫性疾患の誘引となり得るか? - 自己免疫性膵炎及び原発性胆汁性肝硬変モデルを用いた発症機構の検討 -、第 21

回 Kyoto T Cell Conference、2011 年 6 月 11 日、京都

⑪ Imanishi K, Takahashi N, et al. Development of human CD4⁺ T cells and their responses to bacterial superantigens. 14th International congress of immunology. 2010 年 8 月 25 日、神戸

⑫ Kato H, Dang HM, et al. Possible role of LECT2 as an intrinsic regulatory factor in toxic shock syndrome. 14th International congress of immunology. 2010 年 8 月 23 日、神戸

⑬ Haruta I, Kikuchi K, et al. Do pancreatic stellate cells have features of antigen-presenting cells? 7th International congress on autoimmunity. 2010 年 5 月 6 日、Ljubljana, Slovenia

⑭ 大森深雪、安藤一義 他、敗血症における LECT2 の役割、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 4 日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木 淳二 (YAGI JUNJI)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：70182300

(2) 研究分担者

今西 健一 (IMANISHI KEN' ICHI)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20132920
有村 裕 (ARIMURA YUTAKA)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号：10281677
大森 深雪 (OMORI MIYUKI)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：30462667

加藤 秀人 (KATO HIDEHITO)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：00241084
春田 郁子 (HARUTA IKUKO)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号：80221513
上芝 秀博 (UESHIBA HIDEHIRO)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：30223449

(3) 連携研究者

尾崎 眞 (OZAKI MAKOTO)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：30160849
小谷 透 (KOTANI TORU)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00195736