

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06568

研究課題名(和文) 溶連菌細胞溶解毒素による腎血管機能障害と急性糸球体腎炎

研究課題名(英文) Renal vascular dysfunction and acute glomerulonephritis by haemolytic exotoxin from *Streptococcus pyogenes*

研究代表者

竹谷 浩介 (Takeya, Kosuke)

岡山理科大学・獣医学部・講師

研究者番号：20586862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではStreptolysin O (SLO) がPSAGN増悪に与える影響を検討した。SLOは細胞破壊や炎症反応を引き起こすことが知られているが、SLO単独投与したラットの腎臓ではPSAGN様病変は認められなかった。摘出した腎輸入細動脈・輸出細動脈に対するSLOの作用検討では、輸入細動脈ではAngII誘発性収縮を抑制し、ACh誘発性弛緩を増強する一方、輸出細動脈には影響を与えなかった。摘出腎灌流実験では、SLOはAngIIによる血管収縮を抑制せず、ACh誘発性二相性弛緩を誘導した。以上、SLOは腎微小循環系に影響を与えることが明らかとなったが、PSAGN増悪に関与するかは不明である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

溶連菌感染後急性糸球体腎炎(PSAGN)は、小児から成人まで幅広い年齢層に影響を与える腎疾患である。多くの症例は自然治癒するが、一部の患者では慢性腎不全へと進行する。PSAGNの増悪メカニズムは完全には解明されておらず、治療戦略確立への解明が期待されている。これまでPSAGN発症機序は溶連菌の外毒素の一部(スーパー抗原)がIII型アレルギーを誘発し、糸球体の細胞に炎症を引き起こすメカニズムが明らかとなっている。本研究では、溶連菌が産生する細胞外毒素の一つであるStreptolysin O (SLO) が腎血管機能を変調することが明らかとなり、PSAGNの増悪プロセスに関わる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of the streptococcal toxin Streptolysin O (SLO) on the exacerbation of PSAGN. While SLO is known to form pores in cell membranes, causing cell destruction and inflammatory responses, no PSAGN-like lesions were observed in the kidneys of rats administered SLO alone. When examining the effects of SLO on isolated renal afferent and efferent arterioles, it was found that SLO suppressed Angiotensin II-induced contraction and enhanced Acetylcholine-induced relaxation in the afferent arterioles, without affecting the efferent arterioles. In isolated kidney perfusion experiments, SLO did not inhibit Angiotensin II-induced vasoconstriction but induced biphasic relaxation in response to Acetylcholine. These results reveal that while SLO affects renal microcirculation, it did not demonstrate a direct involvement in the exacerbation of PSAGN.

研究分野：生理学

キーワード：腎微小循環 溶連菌毒素 Streptolysin O

1. 研究開始当初の背景

溶連菌感染後急性糸球体腎炎 (PSAGN) は、溶血性連鎖球菌 (特に A 群溶血性連鎖球菌) 感染後に発症する腎疾患であり、小児から成人まで幅広い年齢層に影響を及ぼす。発症機序は溶連菌の外毒素の一部 (スーパー抗原) が III 型アレルギーを誘発し、糸球体の細胞に炎症を引き起こすと考えられている。多くの症例では数週間から数か月で自然に回復する。しかし、一部の患者では症状が急速に悪化し、慢性腎不全へと進行することがある。このような増悪のメカニズムは未だ完全には解明されておらず、その解明が治療戦略の確立につながると期待される。

我々は最近、溶連菌が産生する細胞溶解性毒素 Streptolysin O (SLO) が、腸間膜動脈の内皮機能を傷害することで、免疫系を介さずに直接血管弛緩を抑制することを見出した¹⁾。溶連菌感染後に一過的に上昇する SLO が腎血管内皮を障害し、急性腎障害 (特に糸球体腎炎) を増悪させる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、溶連菌が産生する細胞外毒素 SLO が PSAGN の増悪プロセスにどのような影響を与えるかに注目した。SLO は溶連菌の主要な毒素の 1 つであり、細胞膜に結合してポアを形成することにより、細胞膜の透過性を高めることが知られている。この孔形成により、細胞内部のイオンバランスが崩れ、細胞が破壊される。また、SLO によって引き起こされる細胞障害や溶血は、体内で強い炎症反応を誘発し、組織損傷や疾患の増悪に寄与する可能性がある。一方、前述したように我々は SLO が腸間膜動脈の内皮機能を傷害することで、免疫系を介さずに直接血管弛緩を抑制することを見出した¹⁾。溶連菌感染後の糸球体腎炎において、免疫系の過剰反応以外の第 2 の機序として、「溶連菌外毒素 SLO は腎血管機能を変調させ、糸球体損傷を引き起こす」という仮説 (図 1) を立て、その立証を目指した。

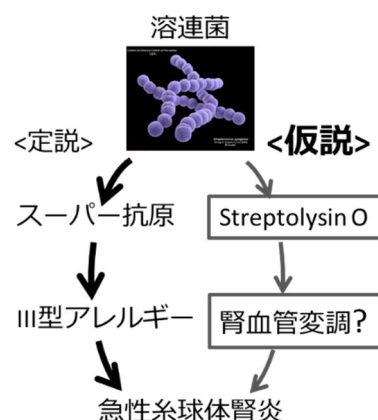


図 1 研究コンセプト
右経路が本研究で検証する仮説

3. 研究の方法

実験動物

すべての実験には Wistar ラット (オス、9 週齢以上) を用いた。実験は岡山理科大学全学動物実験管理委員会の承認を得て、日本学会『動物実験の適正な実施に向けたガイドライン』に従って実施した。

SLO による摘出灌流腎の動態評価

イソフルラン麻酔下で開腹したラットの左腎に大動脈から挿入したカニューレを介して 80 mmHg の定負荷で DMEM (10 mg/dL クレアチニン含有) を *in situ* 灌流を行った。灌流開始後、カニューレを左腎動脈まで前進させ、シルク糸で強く固定した。尿採取のため左尿管に PE-10 と PE-50 を繋げたチューブを挿入し、シルク糸で固定した。灌流を継続したまま左腎を摘出し 37 に維持された恒温ヒーター上にマウントした (図 2)。灌流測定器を接続後、流量及び圧力が安

定するまで待機し、安定したところから灌流圧と灌流量の記録を開始した。灌流圧は腎動脈に挿入したカニューレの先端にプローブを置き、血圧トランスデューサーでモニターした。灌流量は灌流ラインに接続した流量計でモニターした。尿はカニューレを介して10分間隔でマイクロチューブに採取し、採取された尿の重量から尿量を決定した。また、尿と灌流液に含まれるクレアチニン濃度は jaffe 法（ラボアッセイクレアチニン、富士フィルム和光純薬）を用いて測定し、式1に従って単位腎重量当たりの GFR を計算した。

$$(式1) \quad GFR = \frac{1 \text{ 分間尿量} \times \text{尿中クレアチニン濃度}}{\text{灌流液クレアチニン濃度} \times \text{腎重量}}$$

腎灌流動態に対する SLO の作用の測定では10分間 DMEM 液を灌流したのち、SLO を灌流しアンジオテンシン II 並びにアセチルコリンを累加的に添加して灌流した。

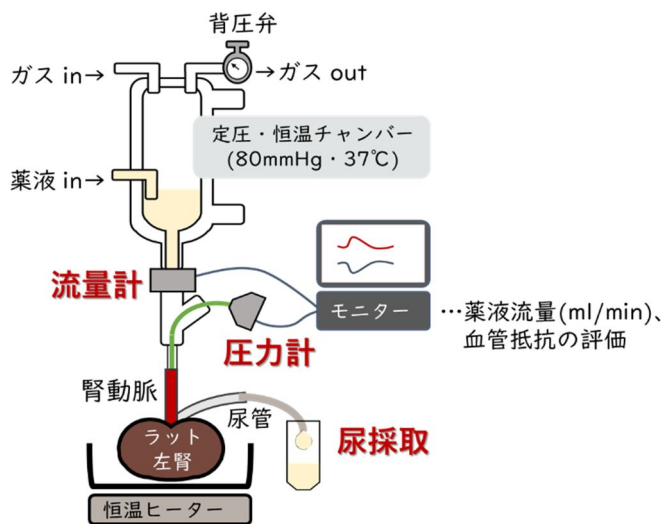


図2 摘出腎の定負荷灌流装置の概略図 各種薬剤を含む灌流液を定圧・恒温チャンバーから摘出した腎臓に灌流した。腎臓の手前に流量計、および圧力トランスデューサーを設置し、流量と圧力変化をモニターした。また、尿管にカニューレを固定し、10分ごとに尿を採取した。

SLO による単離腎血管への作用評価

ラットの腎細動脈は既報の論文^{2, 3)}に従って単離した。イソフルラン吸入麻酔により不動化したラットを開腹し、左腎を露出させた。大動脈を経由して左腎動脈に挿入したカニューレから Diltiazem を含有した ATM MEM を灌流し腎血管を弛緩させた後、1.5%アガロースを含む ATM MEM を灌流した。アガロース灌流腎を摘出し、速やかに ATM MEM 中で氷冷した。アガロースが重合したところで、組織スライサーを用いて腎皮質部位をスライスし、37 で加温した酵素液 (Collagenase IV, Dispase, DNase, Trypsin Inhibitor/ATM MEM) 中で 30-40 分間結合組織の消化処理を行った。結合組織の消化後、スライスを破砕し顕微鏡下で細動脈を単離した。

単離した輸入細動脈、輸出細動脈をチャンバーディッシュにセットした並べてカバーガラスに接着した。栄養液を灌流用の modified-MEM (10⁻⁵ M Ibuprofen 含有)に置換し、5% CO₂/20% O₂/75% N₂ 混合ガス雰囲気下で 32 に加温した。その後 Agarase を添加し、32 で 10 分間アガロース消化反応を行った。血管の収縮・弛緩反応は倒立顕微鏡にセットしたチャンバーディッシュに種々の濃度の SLO や薬剤を含む Modified MEM (10⁻⁵ M Ibuprofen 含有)を灌流 (3.5 mL/min、37)しながら観察し、任意のタイミングで写真を撮影した。得られた画像から血管径を cellSence(オリパス株式会社, ver. 1.18) を用いて測定した。

SLOによるラット腎臓の病理評価

ラットの皮下に浸透圧ポンプを埋め込み、SLO (46.8 pg/kg/min) で1週間投与した。1週間後、イソフルラン麻酔下で灌流固定を行い、左右の腎臓を摘出してパラフィンに包埋した。薄切した組織をHE染色し、糸球体の状態を観察した。

当初、カチオン化ウシ血清アルブミンを投与して糸球体腎炎モデルラットを作成する予定であったが、モデルラットの作成には至らなかった。

4. 研究成果

SLOによる摘出灌流腎の動態評価

摘出腎を用いた灌流実験ではSLOはAngiotensin IIによる血管収縮に伴う灌流量の有意には低下させなかった。一方、Angiotensin II収縮後にacetylcholineで弛緩させたところSLO存在下では2相性の弛緩が見られた。初期相ではSLO非存在下と同程度の弛緩が見られたのに対し、その後弛緩が減弱していった。

SLOによる単離腎血管への作用評価

単離したラットの腎輸入細動脈・輸出細動脈のに対してAngiotensin II誘発性収縮に対するSLOの作用を検討したところ、輸入細動脈において若干の収縮抑制がみられた。一方、輸出細動脈においてはSLOによる影響は観察されなかった。このことは輸入細動脈と輸出細動脈それぞれでSLOの作用が異なることを示しており、作用メカニズムの解明の手掛かりになると期待される。他の血管で見られたacetylcholine誘発性弛緩にたいするSLOの抑制作用を検討したところ、輸入細動脈において予想に反して弛緩を増強する傾向が見られた。これはAngiotensin IIに対する収縮抑制の結果と一致しており、SLOがほかの血管に対する作用とは異なる作用機序を持っている可能性を強く示唆している。

SLOによるラット腎臓の病理評価

SLOを慢性投与したラットの糸球体ではPSAGN様の病変は確認できなかった。このことはSLO単独ではPSAGNが誘発されないことを示している。

結論

以上の結果より、SLOが腎微小循環系に影響を与えることが明らかとなったが、PSAGN増悪に関与する可能性を示すことはできなかった。今後、糸球体腎炎モデル動物に対するSLOの増悪作用を検討することが求められる。

参考文献

- 1 Mukohda M, Nakamura S, Takeya K, et al.: Streptococcal Exotoxin Streptolysin O Causes Vascular Endothelial Dysfunction Through PKC β Activation. *J Pharmacol Exp Ther* **379**: 117–124, 2021.
- 2 Loutzenhiser K, Loutzenhiser R: Angiotensin II-induced Ca⁽²⁺⁾ influx in renal afferent and efferent arterioles: differing roles of voltage-gated and store-operated Ca⁽²⁺⁾ entry. *Circ Res* **87**: 551–7, 2000.

- 3 Takeya K, Kathol I, Sutherland C, et al.: Expression of troponin subunits in the rat renal afferent arteriole. *IUBMB Life* 71: 1475–1481, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	三河 翔馬 (Mikawa Shoma) (20845664)	岡山理科大学・獣医学部・助教 (35302)	

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