

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500497

研究課題名(和文) 感染性脳症の新規治療法として骨髄間葉系細胞を用いた再生医療の挑戦的研究

研究課題名(英文) Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on encephalopathy caused by Shiga toxin 2c-producing Escherichia coli infection in mice

研究代表者

藤井 潤 (FUJII, Jun)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：60271441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄間葉系幹細胞から分離したMultilineage-differentiating stress-enduring (Muse)細胞とnon-Muse細胞を、腸管出血性大腸菌を経口感染して脳症を引き起こすマウスモデルに静注してその効果を調べた。その結果、Muse細胞を受注した感染マウスは、脳にMuse細胞が生着しており、non-Muse細胞は生着しなかった。また、脳内のアポトーシス細胞を調べた結果、Muse細胞を静注した感染マウスは、non-Muse細胞に比べ有意に減少していた。Muse細胞を静注した感染マウスでは、アストロサイトの活性化も見られず、aquaporin 4も血管周存在していた。

研究成果の概要(英文)：We transplanted Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells or non-Muse cells intravenously to the mouse model that impaired blood brain barrier caused by an oral infection of Stx2c-producing E. coli (E32511). We investigated the effects of Muse and non-Muse cells on encephalopathy caused by E32511 infection. Only Muse cells engrafted in the pons and medulla and non-Muse cells did not engraft in any area of the whole brain. As the results, caspase-3 activation was statistically decrease in the mouse brain transplanted Muse cells in the E32511-infected mice. The water channel aquaporin 4 (AQP4) is located in the perivascular end-feet of astrocytes (ASTs) in the brain. Furthermore, reactive ASTs and down-regulation of AQP4 were not detected in the brain transplanted Muse cells although reactive ASTs and down-regulation could be detectable in the brain transplanted non-Muse cells.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：腸管出血大腸菌 脳症 再生医療 Muse細胞 骨髄間葉系幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 平成 21 年の腸管出血性大腸菌感染症者は 3,889 例にもおよび、平成 20 年の調査によれば、腸管出血性大腸菌 O157(O157)感染症により発症した 94 例の溶血性尿毒症症候群発症例において計 5 人の死亡が報告されている。また意識障害 13 例、脳症 9 例、けいれん 8 例や、後遺症として、てんかん、精神遅滞なども報告されている。

(2) O157 感染症の死因のほとんどが、ペロ毒素がもたらす急性脳症によると考える。私は感染症研究の重要なプロセスとして、コッホの 4 原則の「分離した微生物を感受性のある動物に感染させて同じ病気を起こせること」を重視し、1. O157 感染させて急性脳症発症マウスモデルを確立して病態の解析を行うとともに、開発した動物モデルで、2. 治療、3. ワクチン開発にまで研究の幅を広げてきた。

### 2. 研究の目的

(1) 私達が開発した急性脳症発症マウスモデルを用いて、急性脳症の病態メカニズムをさらに詳しく解析を行う。

(2) ヒトの骨髄間葉系幹細胞から得られた Multilineage-differentiating stress ending (Muse) 細胞と non-Muse 細胞を尾静脈から、急性脳症発症マウスに移植して、その効果を調べる。

(3) 急性脳症発症マウスモデルを使って、マクロライド系抗菌薬であるアジスロマイシンや漢方薬大黃の効果調べる。

(4) 腸管出血性大腸菌感染を予防するためにワクチンを作成し、その効果をマウスで確認する。

### 3. 研究の方法

(1) 4 週齢 ICR マウスに、ストレプトマイシン (SM) を 3 日間飲ませ、その後、ストレプトマイシンとマイトマイシン C (MMC) に耐性のペロ毒素 (Stx2c) 産生大腸菌 O157 (E32155/HSC 株; E32511 と略) を  $10^{11}$ CFU (Colony Forming Unit) 経口投与し、同時に MMC を 2.5mg/kg 腹腔内投与 (i.p.) すると 100% のマウスは四肢麻痺を生じて死亡した。この感染モデルを E32511 モデルとした。また 4 週齢 ICR マウスに Lipopolysaccharide (LPS) を 500  $\mu$ g/kg、1 日 1 回 3 日間、i.p. した。これを LPS モデルとした。

マウスは E32511 感染 5 日目に灌流固定され、脳を取り出された。次にパラフィン包埋ブロックからパラフィン切片を作成して免疫染色を行った。

免疫染色の一次抗体は

アポトーシスの検出のため、polyclonal

anti-cleaved caspase-3 抗体、

アストロサイトの検出のため polyclonal rabbit anti-GFAP 抗体、

aquaporin 4 (AQP4) の検出のために polyclonal rabbit anti-AQP4 抗体、

マイクログリアの検出のために polyclonal antibody rabbit anti-Iba1 抗体 を使用した。

(2) マウスをヒトの細胞が移植できる NOD-SCID マウスに変え、E32511 モデルと同様な方法で、E32511 を経口感染させ、MMC を i.p. し、6 時間後に Muse 細胞または non-Muse 細胞を  $1.6 \times 10^4$  個尾静脈から移植した。感染から 4 日後に脳を取り出して、上記 ~ の免疫染色を行った。

(3) E32511 モデルに菌を感染させた後、2 時間後にアジスロマイシンを経口投与して、生存率や生存期間を他の抗菌剤と比較して調べた。また、アジスロマイシンに大黃を併用投与し、糞便中からの排菌された菌量を調べた。抗菌薬はアジスロマイシン (AZM)、ホスホマシリン (FOM)、ノルフロキサシン (NFLX)、カナマイシン (KM)、オフロキサシン (OFLX)、シプロキサシン (CPFX) を用いた。また各抗菌剤の効果を比較するため、MIC (Minimal Inhibitory Concentration) を基準として調べた。in vitro では、E32511 の培養上清に、 $0.5 \times$  MIC の抗菌物質を加え、E32511 から Stx2c の産生量を測定した。

マウスに SM を 3 日間飲ませ、その後、SM に耐性の Stx2d 産生 O91:H21 (B2F1 株) を 100CFU 経口感染させると、マウスはすべて死亡する。このモデルを B2F1 モデルとした。

(4) ペロ毒素 2 型 B サブユニット遺伝子を BCG に組み込んだ、リコンビナント BCG (rBCG) を作成する。BALB/c マウスに rBCG を i.p. して、B2F1 モデルによるチャレンジテストを行い、その効果を調べた。コントロールにはベクターのみ組み込んだ BCG (vBCG) を用いた。血清中と糞便中の抗ペロ毒素抗体を ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) で調べた。

### 4. 研究成果

(1) E32511 モデルでは、感染後 5 日目に、脊髄前角細胞のアポトーシス (caspase-3 の活性) を認めた。また延髄網様体にもアポトーシスを認めた。

延髄網様体で、アストロサイトを観察した結果、コントロールと LPS モデルでは、アストロサイトの突起は脳血管周囲を取り巻くように正常であった。一方、E32511 マウスにおいてアストロサイトは、活性化しており、

血管周一面に拡大して広がっていた。延髄網様体においてコントロール、LPS モデルでは、AQP4 が脳血管周囲に明白に認められた。一方、E32511 モデルでは脳血管周囲に AQP4 が消失していた。

E32511 モデルでは、ミクログリアの活性を認めなかった。

免疫染色から、ペロ毒素により延髄毛様体神経と脊髄全角運動神経が、アポトーシスを引き起こしたことが明らかとなった。延髄網様体が障害されると、循環障害や呼吸不全を来して死亡する場合がある。脊髄全角運動神経が障害されると四肢麻痺、呼吸筋麻痺を引き起こす。これらアポトーシスや血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) の破綻には、アストロサイトの活性が関わっており、ペロ毒素がミクログリアを介さず、直接的にアストロサイトを活性化した可能性が考えられた。アストロサイトの突起は脳血管内皮細胞と AQP4 を介して連結しており、電解質や H<sub>2</sub>O をコントロールして脳血管内皮細胞を強力にサポートしている。今回の研究結果から、E32511 モデルにおいて脳血管周囲の AQP4 が消失しており、アストロサイトからのサポートが受けられなくなって脳血管内皮細胞が破綻し、さらなる BBB の破壊につながったと考えられた。

(2) Muse 細胞を移植されたマウスの脳を調べた結果、橋や延髄に Muse 細胞は生着しており、non-Muse 細胞は脳のどの部分にも生着していなかった。Muse 細胞や non-Muse 細胞を移植された脳のアポトーシス細胞を数えた結果、non-Muse 細胞を移植されたマウスの脳に比べ、Muse 細胞を移植された脳では、アポトーシス細胞の数は有意に減少していた。また Muse 細胞を移植されたマウスの脳では、non-Muse 細胞を移植された脳に比べ、アストロサイトの活性が抑制され、AQP4 が維持されていた。このことはペロ毒素による BBB の破壊が、Muse 細胞によって抑制されたことを意味する。腸管出血性大腸菌感染による脳症は、死因にもなりうる場合があり、その治療法は今も確立していない。また、きびしい脳症から回復しても、てんかんや精神遅滞などの後遺症を残す場合も少なくない。本研究は、腸管出血性大腸菌感染に伴う脳症の画期的治療法でもあり、脳症の後遺症に対しても再生医療として効果が期待できる。

(3) 0.5 × MIC の抗菌剤存在下において AZM は E32511 からのペロ毒素産生を強く抑制した。その他の抗菌剤は、ペロ毒素の産生が何も抗菌剤を加えなかったコントロールと同じであった、またはコントロールに比べ有意

に増加していた。25 × MIC の抗菌薬を E32511 マウスモデルに経口投与すると、AZM は 100% 生存し、NFLX と KM は 80% 生存した。他の抗菌薬は生存率において効果を認めなかった。以上の結果から AZM は E32511 からのペロ毒素産生を抑制し、マウスモデルで有効な治療効果を示めた。

B2F1 マウスモデルを使って調べた結果、大黄は、マウスの腸管において、B2F1 の定着を抑制した。また、B2F1 経口感染させた後、翌日から大黄を 5 日間経口投与すると B2F1 マウスモデルは、すべて生き残った。なお大黄には B2F1 に対して抗菌活性を持たないことも確認した。E32511 モデルにおいて、糞便中の E32511 株の菌数を調べた結果、AZM と大黄を併用した群は AZM のみ経口投与した群に比べ、菌数は有意に減少していた。以上の結果から、腸管出血性大腸菌感染による無症状保菌者の除菌には、副作用の少ない大黄を投与することを提案したい。また、AZM は、グラム陰性菌に対する抗菌活性が弱いため、大黄と併用することにより、よりスムーズに排菌を促し、腸管出血性大腸菌感染症の重症化を抑えられると考えられた。

(4) BALB/c マウスに、rBCG を 10<sup>7</sup> および 10<sup>8</sup> CFU の菌量を 2 週間に 1 回、合計 2 回 i.p. して B2F1 モデルで生存率、生存期間を調べた。その結果、rBCG を投与した群の生存率は約 60% であり、vBCG に比べ有意に生存率が高く生存期間も長かった。また、rBCG を i.p. した群では、血清中 (IgG) や糞便中 (IgA) の抗ペロ毒素抗体が、rBCG を投与しなかった BALB/c マウスに比べ有意に上昇していた。以上の結果からペロ毒素 2 型に対する有効なワクチンを作成することができた。

#### 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 5 件 )

1. 藤井 潤、腸管出血性大腸菌、臨床と研究、査読無、Vol. 90、No. 12、2013、pp49-54.

2. 藤井 潤、人獣共通感染症としての腸管出血性大腸菌、G. I. Research、査読無、Vol. 21、No. 6、2013、pp14-21.

3. Amran MY, Fujii J, Kolling GL, Villanueva SYAM, Kainuma M, Kobayashi H, Kameyama H, Yoshida. Proposal for effective treatment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in mice. *Microb Pathog.* 査読有、Vol. 65, No. 10, 2013, pp57-62.

<http://www.sciencedirect.com/science/articl>

e/pii/S0882401013001356

4. Aran MY, Fujii J, Suzuki SO, Kolling GL, Villanueva SYAM, Kainuma M, Kobayashi H, Kameyama H, Yoshida. Investigation of encephalopathy caused by Shiga toxin 2c-producing *Escherichia coli* infection in mice. PloS one. 査読有、Vol. 8, 2013, e58959.  
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0058959>

5. Fujii J, Naito M, Yutsudo T, Matsumoto S, Heatherly DP, Yamada T, Kobayashi H, Yoshida S, Obrig T: Protection by recombinant *Bacillus Calmette-Guérin* vaccine expressing Shiga toxin 2B subunit against Shiga toxin producing *Escherichia coli* in mice. Clin. Vaccine Immunol. 査読有、Vol. 19, No. 12, 2012, pp1932-1937.  
<http://cvi.asm.org/content/19/12/1932.long>

〔学会発表〕(計5件)

1. 藤井 潤、腸管出血性大腸菌による脳症の病態解明と新規治療法の開発、第87回日本細菌学会総会シンポジウム口頭発表、2014年3月27日、東京

2. 藤井 潤、Effects of Muse cells differentiated from mesenchymal stem cells on the encephalopathy caused by STEC infection in mice、日米医学協力研究会コレラ・細菌性腸管感染症専門部会日本側総会、2013年8月8日、京都

3. Fujii J, Amran MY, Yoshida S: Investigation of acute encephalopathy caused by Shiga toxin 2c-producing enterohemorrhagic *E. coli* O157 in mice. U.S.-Japan cooperative medical science program, 2012年12月12日、千葉

4. Fujii J, Mizoue T, Nakada Y, Ugajin S, Naya Y, Nakamura T, Saitoh K, Maruyama Y, Tada Y, Okabe N and Yoshida S. Risk factors for hemolytic uremic syndrome caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Japan. 8<sup>th</sup> International Symposium on Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infection. 2012年5月8日, Amsterdam, The Netherlands.

5. Amran MY, Fujii J, Yoshida S: Effectiveness azithromycin and/or Chinese medicine in the early and late stage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-infected mouse models. 8<sup>th</sup>

International Symposium on Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infection, 2012年5月8日, Amsterdam, The Netherlands.

〔図書〕(計1件)

藤井 潤 他、南山堂、戸田新細菌学 改訂34版、2013、共著、1104 (pp317-327)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 潤 (FUJII, Jun)  
鳥取大学・医学部・教授  
研究者番号：60271441

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

出澤 真理 (DEZAWA Mari)  
東北大学大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：50272323