

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590515

研究課題名(和文) 受容体(Gb3)非発現細胞に対し志賀毒素はLDL受容体依存性に毒性を発現する

研究課題名(英文) LDL-dependent cytotoxicity of Shiga toxin in the cells devoid of Gb3

研究代表者

喜多 英二(kita, eiji)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90133199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：志賀毒素(Stx: Shiga toxin)産生大腸菌(STEC)が産生したStxは、腸組織の中性スフィンゴ糖脂質(GSL)と複合体を形成する。Gb3Cerを含む各種GSLとStx2で合成したGSL-Stx2 liposomeは、LDL、VLDLへの高い結合能を有し、Gb3非発現、或は低発現の培養細胞において、LDL受容体を介して細胞内に高率に取り込まれた。以上の結果から、腸管内産生志賀毒素は、Gb3Cerを含むGSLに結合し、血漿中でVLDL、LDLとの複合体を形成し、LDL受容体を介してGb3非発現細胞に取り込まれる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)： The present investigation was aimed to clarify the mechanism by which Shiga toxin (Stx) would express its biological action in the cells devoid of Gb3. Monohexosylceramide (Lc2Cer), Gb3Cer, and Gb4Cer were found in both intestinal and plasma glycosphingolipid (GSL). Plasma GSLs exhibited heterogeneity of free fatty acids in their lipid ceramide anchors. Synthesized GSL-Stx2 liposome bound to LDL and VLDL with high affinity. GSL-Stx2 liposomes with the high affinity have the relative composition of C24:0/C24:1 as Gb3Cer moiety, accounting for their heterogeneity. GSL-Stx2 liposomes capable of binding to LDL were easily taken-up by the cells devoid of Gb3 receptors.

These results indicated a new mechanism of the expression of Stx cytotoxicity to the cells, devoid of Gb3 receptors: the complex of GSL-Stx-LDL can be taken-up through LDL receptors before internalization.

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：志賀毒素 腸管感染症 HUS 腸管出血性大腸菌 中性糖セラミド リポ蛋白

1. 研究開始当初の背景

志賀毒素 (Stx: Shiga toxin) 産生大腸菌 (STEC) の主要な病原因子である Stx は腸管内から血中に移行し、標的臓器内の微小血管内皮に存在する Stx 受容体 (Gb3) と結合し、炎症性サイトカインとの共同作用下で血管内皮細胞障害を誘発し微小血栓を形成する結果、腎臓や脳等に重篤な病変を生じると考えられている。しかし、その詳細な機序は、十分な解明に至っておらず、特に Stx の腸管内から血中に移行する機構、血中での存在様式、Gb3 非発現細胞への障害機構等が、未解明であった。

ヒトにおいては、STEC 経口感染後血中に移行した Stx2 は、血清アミロイド-P (SAP) と結合し標的臓器に輸送されると推測されているが、血中に SAP が存在しないマウスでも、腎臓や脳に Stx が到達することから、ヒト・マウス共に、Stx の他の輸送担体が存在する可能性が疑われていた。

一方で、lipoprotein-associated neutral glycosphingolipids (GSLs) の一部が、Stx との親和性を有すること、しかも、GSLs の主要構成脂肪酸の種類・構成比率によって、Stx との結合親和性が変化することが 2010 年に報告された。このことから、GSLs の中に、腸管内から血中に移行した Stx の標的臓器・細胞への輸送を担う因子が存在すると考えられた。さらに、GSLs は細胞表面に存在する低比重リポ蛋白 (LDL) 受容体を介して細胞内に取り込まれることも報告され、LDL 受容体が Gb3 非発現細胞における GSL 結合 Stx 受容体になり得る可能性が推測され始めていた。

この様な研究進展背景を基に、申請者は腸管内で STEC により産生された Stx は、腸管組織の GSL と結合することで、Stx 特異受容体 (Gb3) を介する細胞への結合・細胞内移行以外に、非発現細胞へも LDL 受容体を介して取り込まれる可能性が推測された。

2. 研究の目的

STEC 感染に伴う致死合併症である脳症の発症機序を明確にする。腸内で STEC が産生した Stx は、腸上皮細胞の中性 glycosphingolipid (GSL) と結合し Stx-GSL 複合体として、腸管内から循環系に移行し、血管内皮や神経細胞に存在する低比重リポ蛋白 (LDL) 受容体を介して、Stx 受容体 (Gb3) が極めて低発現 (或は非発現) である神経細胞にも毒性を発現できることを実証する。

- (1) マウスにおける Stx 輸送体が GSL であるか、またその GSL の構成成分に Gb3Cer や GlcCer が含有されているか。
- (2) Stx-GSL 複合体が Stx 受容体非発現細胞に LDL 受容体を介して細胞毒性を発現するか、アポトーシス誘導シグナル伝達が生じるか。
- (3) サイトカイン刺激による LDL 受容体発現亢進は、細胞膜 lipid raft に局在する Stx 受容体の毒素結合能や構造に変化を与えないか。
- (4) Stx-GSL 複合体のマウス脊髄・脳内で分離せずに神経細胞やグリア細胞に取り込まれるか。

3. 研究の方法

- (1) 正常マウス小腸、脳及び血漿からの GSL 分離と中性糖セラミドの解析: マウス臓器・血漿中の GSL 中性糖セラミドの比較は、GSLs 分画分離 (J. Lipid Res. 51:2282, 2010) 後、TLC immunoblot、Stx2-overlay 解析及び GC/MS システム解析で実施した。
- (2) 感染後の GSL-Stx2 複合体分離と GSL 組成比較: STEC 経口感染、或いは精製 Stx2 静脈内接種後のマウス臓器、血漿から GSL 分画を抽出し、TLC immunoblot、Stx2-overlay 解析にて Stx2 結合 GS を回収し、GSL 組成を GC/MS システムで比較解析した。
- (3) GSL-Stx2 複合体の細胞毒性解析: 複合体に検出される中性糖セラミド (Gb3Cer or GlcCer) 含有 liposome に、精製 Stx2 を 10 nM ~ 100 nM を添加した GSL-Stx2 liposome を作成した。一部には、蛍光色

素標識 Stx2 を liposome 内に封入して用いた。GSL-Stx2 liposome の血管内皮細胞、脳神経細胞、腎尿細管上皮細胞、及びペロ細胞（陽性対象）に対する毒性を、精製 Stx2 の単独毒性と比較検討した。

- (4) LDL 受容体への GSL-Stx2 liposome の結合解析：GSL-Stx2 liposome（蛍光標識 Stx2 封入）の LDL 受容体への結合を、蛍光標識抗 LDL 受容体抗体での染色後、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。同時に、GSL-Stx2 liposome の LDL 受容体結合と細胞膜 Gb3 の raft から non-raft 移行の有無も解析した。
- (5) サイトカイン刺激による LDL 受容体発現解析：各種サイトカイン刺激後の血管内皮細胞、脳神経細胞における LDL 受容体発現変化を、real-time PCR、cell-surface biotinylation で解析した。
- (6) STEC 経口感染後の Stx2 の腸管内から脳への輸送経路解析：マウス静脈内に GSL-Stx2 liposome（蛍光標識 Stx2 封入）接種後、脊髄連続切片および脳切片を作製し、蛍光標識 Stx2 の局在を追跡した。
- (7) LDL 受容体欠損マウスにおける STEC 感染感受性と Stx2 の動態解析：本解析項目は、動物の生育上の問題があり実施できず。

4. 研究成果

- (1) 腸管上皮細胞表面には免疫染色において、Gb4 の存在は確認できたが、Gb3 の存在を確認しえなかった。しかし、neutral glycosphingolipids (nGSL) 抽出物の GC/MS 解析では、monohexosylceramide (Lc2Cer), Gb3Cer, Gb4Cer が検出された。さらに TLC 及び mass spectrometry により、腸管組織中には微量ながら Gb3 の存在が確認しえた。
- (2) 血漿タンパク中にも腸管組織と同様に、Lc2Cer, Gb3Cer, Gb4Cer が検出され、血漿タンパク中のこれら GSL の lipid ceramide anchor を構成する遊離脂肪酸には、heterogeneity の存在も確認された。
- (3) GSL-Stx2 liposome は、TLC

immunoblotting において、LDL, VLDL への高い結合能をしめしたが、HDL への結合は検出レベル以下であった。さらに、LDL, VLDL 両分画に最も強い結合能をしめした GSL-Stx2 liposome では、C24:0/C24:1 が Gb3Cer moiety の主要脂肪酸であること、lipid ceramide anchor 中の遊離脂肪酸の heterogeneity には Lc2Cer, GalCer, GlcCer が関与し、中でも GalCer が主体であることが認められた。

- (4) LDL 結合 GSL-Stx2 liposome は、Gb3 発現量の少ない血管内皮細胞において、Sx2 単独投与に比して有意に多く細胞内に取り込まれ、同時に顕著なラフト構造の変化を誘導することも確認された。この効果は、IL-1, IL-6, TNF- の存在下で増強されたが、血管内皮細胞、脳神経細胞の LDL 受容体発現は、TNF- によってのみ有意な亢進を認めた。しかし、GSL-Stx2 liposome 投与後マウスにおける Stx2 毒性は、血中サイトカイン (IL-1, IL-6, TNF-) 量との間に、明確な相関性は認められなかった。

以上の結果から、腸管内由来志賀毒素は、Gb3Cer を含む GSL に結合し、血漿中では VLDL, LDL との複合体を形成した後に、Gb3 非発現細胞（神経細胞を含む）に存在する LDL 受容体を介して細胞内に取り込まれる可能性が考えられた。血中 Gb3 は単独で血中に存在する Stx2 に対しては輸送担体として機能しないこと、結合能の低さに lipid ceramide anchor 中の遊離脂肪酸の heterogeneity が関与していることも推測された。

ヒトやマウスに共通して、血中での Stx 担体になるのが、Stx 受容体と構成成分を共有する GSL 中の Gb3Cer であり、Stx-GSL 複合体が LDL 受容体を介して細胞内に取り込まれる。この考えは、神経細胞を初めとして Stx 受容体非発現、或は低発現細胞に対する Stx 毒性の発現機構を説明するもので、今までにない独創的な研究成果であると考えられた。

申請者グループは、マウスにおいては、脳神経細胞には Gb3 の発現はなく、LDL 受容体依存的に Stx が結合・取り込みが生じると考えていた。しかし、T. Obrig 等（2010 年）は、マウス脳内の多くの領域において、神経

細胞には Gb3 が発現していることを特異免疫染色で提示した。更に、複数の研究報告から、マウス脳神経細胞では Gb3 が発現し機能していること、また Gb3 合成酵素欠損マウスでは、Stx に対する感受性が低下する事実が示され、LDL 受容体依存性 Stx の細胞内取り込みについては疑問視され、更なる解析が求められ、研究期間内での解析終了は困難なため、残念ながら国際誌における成果発表は withdraw した。

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 3件)

1. Tsutsuki K, Watanabe-Takahashi M, Takenaka Y, Kita E, Nishikawa K. Identification of a peptide-based neutralizer that potently inhibits both Shiga toxins 1 and 2 by targeting specific receptor-binding regions. Infect. Immun. Vol.81, 2013, pp. 2133-2138, DOI: 10.1128/IAI.01256-12.
2. Ommori R, Ouji N, Mizuno F, Kita E, Ikada Y, Asada H. Selective induction of antimicrobial peptides from keratinocytes by staphylococcal bacteria. Microb Pathog. Vol.56, 2013, 35-39, DOI: 10.1016/j.micpath.2012.11.005.
3. Kasahara K, Matsumura Y, Ui K, Kasahara K, Komatsu Y, Mikasa K, Kita E. Intranasal priming of newborn mice with microbial extracts increases opsonic factors and mature CD11c+ cells in the airway. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. Vol.303, 2012, L834-L843, DOI: 10.1152/ajplung.00031.2012.

[学会発表](計 6件)

喜多英二、松村羊子、東伸岳、水野文子、
「志賀毒素の受容体 Gb3 非発現細胞での

毒性機序」、近畿腸管感染症研究会
2011年6月18日、大阪

東伸岳、松村羊子、喜多英二、「ABCA1 発現低下と志賀毒素による血管内皮障害機構」、日本細菌学会関西支部総会
2011年11月19日、大阪

笠原一規、東伸岳、下嶋典子、喜多英二、
「志賀毒素と特異受容体 Gb3 及び LDL の関連解析」日本細菌学会関西支部総会
2012年11月17日、大阪

吉岡聡、一戸辰夫、下嶋典子、菱澤方勝、大森勝之、Geraghty DE、石谷昭子、高折晃史：成人 T 細胞白血病ウイルス感染者の末梢血 T 細胞における HLA-F の表面発現分画についての検討。第 21 回日本組織適合性学会、2012 年 9 月 15 日、東京

喜多英二、東伸岳、水野文子、「LDL 受容体を介する志賀毒素の取り込み」近畿感染症研究会 2013 年 6 月 17 日 大阪
東伸岳、松村羊子、水野文子、喜多英二、
「神経細胞での ABCA1 発現低下と志賀毒素活性の変化」、奈良県感染症研究会、
2014 年 1 月 12 日、奈良

[図書](計 0件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜多 英二 (KITA, Eiji)
奈良県立医科大学・細菌学・教授
研究者番号：90133199

(2) 研究分担者

水野 文子 (MIZUNO, Fumiko)
奈良県立医科大学・細菌学・講師
研究者番号：70271202

下嶋 典子 (SAGESHIMA, Noriko)
奈良県立医科大学・細菌学・助授
研究者番号：30398432

(3) 連携研究者

()

研究者番号：