

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02655

研究課題名(和文)腎近位尿細管上皮細胞を足場とするレプトスピラの感染機構の解明

研究課題名(英文)Mechanism of renal proximal tubule epithelial cells infection by Leptospira

研究代表者

Toma Claudia (Toma, Claudia)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40325832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：レプトスピラ症の原因細菌であるレプトスピラは、皮膚から血流に入り、肺や腎臓などの標的臓器へと拡がる。一方、臓器にはもともと細胞間接着装置が隣り合う細胞どうしを密着させることで、臓器の構造と感染阻止を含む生理機能を維持する。

本研究の近位尿細管上皮細胞を用いた実験系で、レプトスピラは細胞間接着装置の中心分子であるカドヘリンを切断することを明らかにした。さらに、カドヘリンの細胞膜から細胞質への取り込みを誘導することによって、接着装置を破壊することがわかった。従って、カドヘリンの細胞内取り込みを阻害することによってレプトスピラの尿細管への移行を食い止められることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レプトスピラは、腎臓の近位尿細管に留まって長期にわたり尿中へと排出されるが、これまでは菌がどのように尿細管の管腔側へと移行するかが理解されていなかった。本研究で用いた実験系で、レプトスピラが細胞間隙を移動することを明らかにし、レプトスピラが細胞間接着装置を破壊することがわかった。本研究で得られた新規知見は、レプトスピラ症の病態形成メカニズムの理解に寄与し、新たな制御法の開発への手がかりを与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Pathogenic Leptospira enters the body through the skin and disseminates hematogenously to target organs, such as the kidney, lung and liver. In this study, we developed an in vitro model to understand the renal proximal tubule epithelial cell infection by Leptospira interorgans. Our results showed that Leptospira disassembles the apical junctional complex and that this involves E-cadherin cleavage and endocytosis. Since apical junctional complexes are important to maintain epithelial cells barrier integrity and organ function, our results suggested that inhibition of E-cadherin endocytosis might be a promising strategy to prevent bacterial dissemination in the host and organ failure complications.

研究分野：病原細菌学

キーワード：レプトスピラ 上皮細胞 細胞間接着装置

### 1. 研究開始当初の背景

人獣共通感染症であるレプトスピラ症の病原体レプトスピラは、腎臓に定着し尿中へと排出される。本菌は、皮膚・粘膜(口腔、眼など)から宿主へ侵入、宿主の防御機構からエスケープしながら、未知の分子機構によって近位尿細管上皮細胞(renal proximal tubule epithelial cell, RPTEC)に定着することがわかっていた。長年げっ歯類がレプトスピラの主な保菌動物であると考えられていたが、ヒトでも腎臓に持続感染し、慢性腎不全の原因になりうるとの報告があった。また、申請者はレプトスピラは RPTEC の微絨毛に付着し、バイオフィルムを形成することを見出していた。したがって、この感染機構を理解することはレプトスピラ症の重症化と感染サイクルを遮断するために重要であると考えた。

### 2. 研究の目的

レプトスピラが腎尿細管にどのように移行するか、また、定着にどの細菌因子・宿主因子が関わっているのかは不明であったため、本研究ではレプトスピラの尿細管上皮細胞の感染戦略を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究を遂行するにあたり、病原性レプトスピラとして、*L. interrogans* 血清型 Manilae UPMCC-NIID 株を使用し、対照として非病原性細菌の *L. biflexa* Patoc1 株を使用した。また、ヒト尿細管上皮細胞として、ヒトテロメア逆転写酵素 (hTERT) 遺伝子を初代 RPTEC に導入することによって、初代細胞の性質を保持する細胞 RPTEC/TERT1 細胞を用いた。この RPTEC/TERT1 細胞を Transwell にて培養し、安定した経上皮抵抗値を示す細胞として分化させ、基底側からレプトスピラで感染させ、下記の解析を行った (図 1) :

- (1) RNAseq にて網羅的にレプトスピラの感染によって発現が変動する宿主因子を同定した。
- (2) 透過型電子顕微鏡や FIB-SEM トモグラフィ法にて感染後のレプトスピラの局在や宿主細胞膜の変化を精査した。
- (3) ビデオ顕微鏡モニタリングや経上皮抵抗値の測定を行い、レプトスピラの RPTEC への付着とその付着が上皮バリア機能に与える影響を評価した。
- (4) 感染後に誘導される宿主因子の切断や局在の変化をイムノブロットィングと蛍光免疫染色にて調べた。

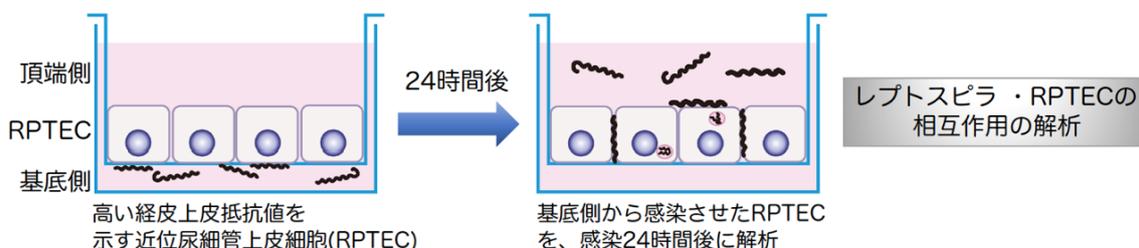


図 1. レプトスピラによる近位尿細管上皮細胞の感染戦略の解析。

RPTEC は Transwell にて培養し、基底側からレプトスピラで感染させた。継時的に RPTEC のバリア機能、レプトスピラの付着・局在と細胞間接着装置の構造を解析した。Sebastián et al., *Cellular Microbiology*, 2021, In Press<sup>‡</sup>, より改編。

### 4. 研究成果

Transwell にて培養した RPTEC に対して病原性レプトスピラまたは非病原性レプトスピラを感染させ、レプトスピラ感染依存的な細胞の変化を多面的に解析した。電子顕微鏡観察により、病原性レプトスピラは感染 6 時間後には細胞内に存在するが、感染 24 時間後には経上皮抵抗値の減少に伴い、レプトスピラは主に細胞間隙に存在することが明らかになった (図 2)。また、低い抵抗値を示す細胞では、カドヘリンとオクルディンの膜タンパク質の局在の著しい変化が誘導された。これらの結果は、レプトスピラは接着装置を破壊し、細胞間隙を通過しながら尿細管上皮細胞の頂端側へと移行することを示唆した。

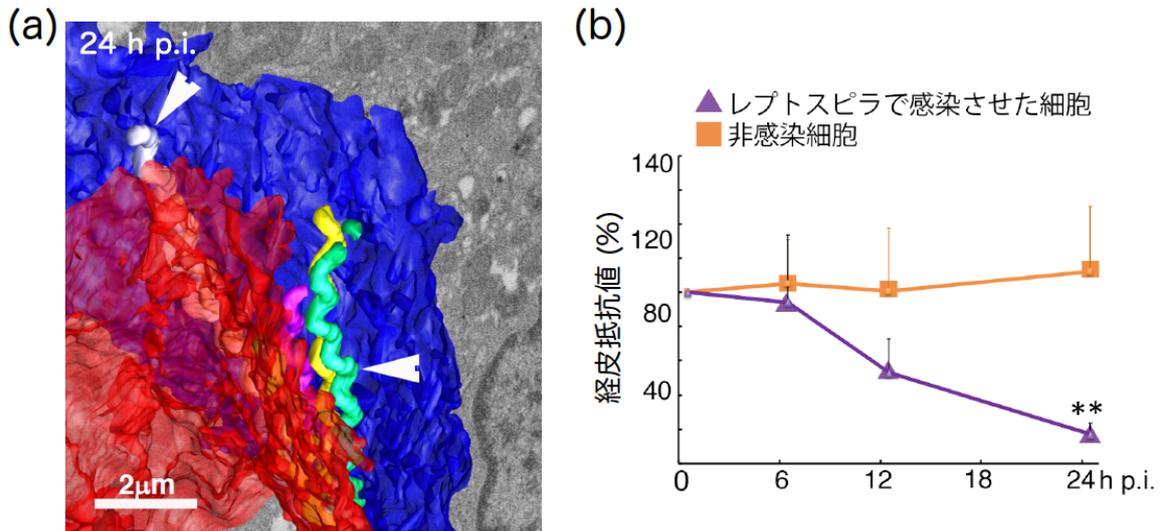


図 2. レプトスピラは細胞間隙の細胞膜に強固に付着し、経皮抵抗値の減少を誘導する。(a)感染 24 時間後の FIB-SEM トモグラフィ法でモデリングした像。白いアローヘッドは細胞間隙に局在するレプトスピラを示す。隣同士の細胞をそれぞれ人工的に赤と青にしている。(b) 感染細胞と非感染細胞の経皮抵抗値の変化を示す。感染 24 時間後には感染細胞の経皮抵抗値は優位に減少した。\*\*  $P < 0.01$ 。Sebastián et al., *Cellular Microbiology*, 2021, In Press#より改編。

次に、レプトスピラの接着装置破壊機構を明らかにするために、様々の阻害を用いた感染実験を行った。その中で、カドヘリンの細胞内取り込みを阻害する Pitstop2 を用いた感染実験では、レプトスピラによる接着装置の破壊と、レプトスピラの頂端側への移行を阻止することができた。この結果から、レプトスピラによる細胞間接着装置の破壊は、その接着に重要な細胞外領域をもつカドヘリンを細胞内に取り込むことで引き起こされることが明らかになった (図 3)。従って、カドヘリンの細胞内取り込みを阻害することによってレプトスピラの全身への広がり食い止められることが示唆された。

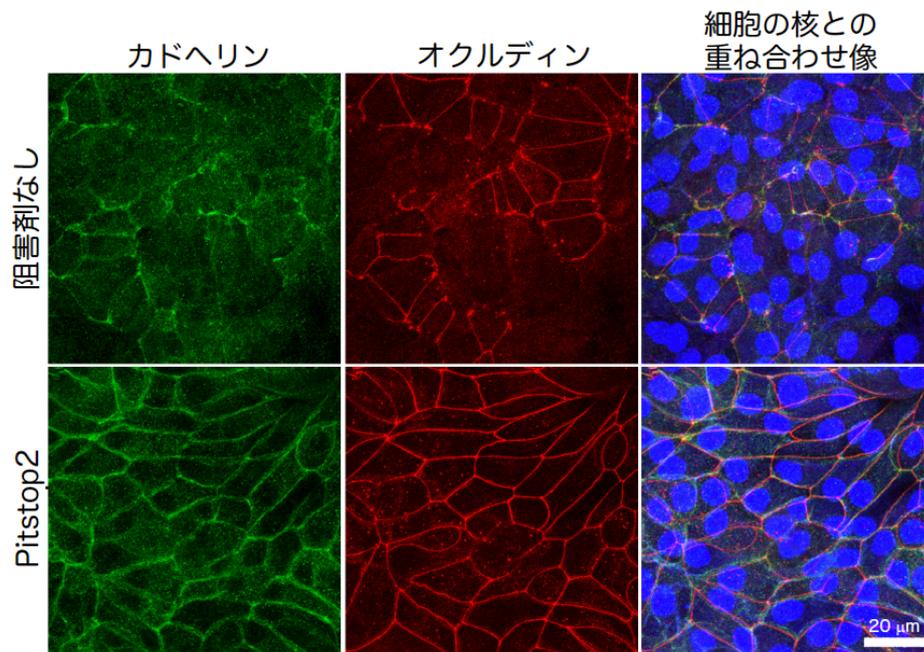


図 3. 阻害剤 (Pitstop2) で処理した細胞と非処理細胞をレプトスピラで感染させ、感染 24 時間後に蛍光免疫染色を行った。カドヘリンは緑、オクルディンは赤、細胞の核は青で染めている。レプトスピラは細胞間接着装置を破壊するためカドヘリンとオクルディンの細胞膜局在が低下するが、Pitstop2 は細胞間接着装置の破壊を阻止した。Sebastián et al., *Cellular Microbiology*, 2021, In Press#より改編。

#Sebastián I., Okura N., Humbel B.M., Xu J., Hermawan I., Matsuura C., Hall M., Takayama C., Yamashiro T., Nakamura S. and **Toma C\***. Disassembly of the apical junctional complex during the transmigration of *Leptospira interrogans* across polarized renal proximal tubule epithelial cells. Cell Microbiol. (2021) In Press.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cmi.13343>

\* 責任者

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Sato Y, Mizuyama M, Sato M, Minamoto T, Kimura R, Toma C.  | 4. 巻<br>9 (1)                 |
| 2. 論文標題<br>Environmental DNA metabarcoding to detect pathogenic Leptospira and associated organisms in leptospirosis-endemic areas of Japan                  | 5. 発行年<br>2019年               |
| 3. 雑誌名<br>Sci Rep  | 6. 最初と最後の頁<br>-               |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-019-42978-1   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Yamaguchi Takayoshi, Higa Naomi, Okura Nobuhiko, Matsumoto Arina, Hermawan Idam, Yamashiro Tetsu, Suzuki Toshihiko, Toma Claudia                   | 4. 巻<br>18                    |
| 2. 論文標題<br>Characterizing interactions of Leptospira interrogans with proximal renal tubule epithelial cells   | 5. 発行年<br>2018年               |
| 3. 雑誌名<br>BMC Microbiology   | 6. 最初と最後の頁<br>1-11            |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1186/s12866-018-1206-8  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Toma Claudia, Koizumi Nobuo, Kakita Tetsuya, Yamaguchi Takayoshi, Hermawan Idam, Higa Naomi, Yamashiro Tetsu                                       | 4. 巻<br>4                     |
| 2. 論文標題<br>Leptospiral 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase as an early urinary biomarker of leptospirosis  | 5. 発行年<br>2018年               |
| 3. 雑誌名<br>Heliyon  | 6. 最初と最後の頁<br>e00616 ~ e00616 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.heliyon.2018.e00616  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Gamage Chandika D., Sato Yukuto, Kimura Ryosuke, Yamashiro Tetsu, Toma Claudia   | 4. 巻<br>14                    |
| 2. 論文標題<br>Understanding leptospirosis eco-epidemiology by environmental DNA metabarcoding of irrigation water from two agro-ecological regions of Sri Lanka | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>PLOS Neglected Tropical Diseases   | 6. 最初と最後の頁<br>e0008437        |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1371/journal.pntd.0008437   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-                     |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Toma Claudia, Suzuki Toshihiko                          | 4. 巻<br>2134            |
| 2. 論文標題<br>Evaluation of Intracellular Trafficking in Macrophages | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Methods in Molecular Biology                            | 6. 最初と最後の頁<br>199 ~ 206 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/978-1-0716-0459-5_18          | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難                            | 国際共著<br>-               |

|  |                        |
|--|------------------------|
| 1. 著者名<br>Sebastian Isabel, Okura Nobuhiko, Humbel Bruno M., Xu Jun, Hermawan Idam, Matsuura Chiaki, Hall Malgorzata, Takayama Chitoshi, Yamashiro Tetsu, Nakamura Shuichi, Toma Claudia | 4. 巻<br>In Press       |
| 2. 論文標題<br>Disassembly of the apical junctional complex during the transmigration of Leptospira interrogans across polarized renal proximal tubule epithelial cells                      | 5. 発行年<br>2021年        |
| 3. 雑誌名<br>Cellular Microbiology  | 6. 最初と最後の頁<br>In Press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/cmi.13343  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-              |

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Claudia Toma  |
| 2. 発表標題<br>Environmental DNA metabarcoding to understand the ecology of leptospirosis. |
| 3. 学会等名<br>World Congress of Leptospirosis (招待講演)                                      |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Claudia Toma, Maria Isabel Sebastian Francisco, Nobuhiko Okura                               |
| 2. 発表標題<br>Leptospira interrogans translocation across renal proximal tubule epithelial cells monolayer |
| 3. 学会等名<br>The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)                          |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>邱一泓, 粟国慶, ヘルマワン イダム, トーマ クラウディア |
| 2. 発表標題<br>沖縄県における土壌からの病原性レプトスピラの分離        |
| 3. 学会等名<br>第60回日本熱帯医学会大会                   |
| 4. 発表年<br>2019年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Chandika Gamage, Yukuto Sato, Idam Hermawan, Gayani Ranasinghe, Pavani Senarathne, Pasan Hewavitharana, Nobuo Koizumi, Claudia Toma |
| 2. 発表標題<br>Isolation and characterization of soil inhabited Leptospira species from two agro-ecological regions of Sri Lanka                   |
| 3. 学会等名<br>第60回日本熱帯医学会大会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Maria Isabel Sebastian Francisco, Nobuhiko Okura, Idam Hermawan, Chiaki Matsuura, Claudia Toma |
| 2. 発表標題<br>Leptospira interrogans cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion                    |
| 3. 学会等名<br>第60回日本熱帯医学会大会  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>佐藤行人, Chandika Gamage, 水山 克, Idam Hermawan, トーマ・クラウディア |
| 2. 発表標題<br>環境DNA解析によるレプトスピラの宿主推定手法と沖縄及びスリランカでの適用事例                |
| 3. 学会等名<br>第57回レプトスピラ・シンポジウム                                      |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Maria Isabel Sebastian Francisco, 大倉信彦, 許 駿, 中村修一, トーマ クラウディア |
| 2. 発表標題<br>尿細管上皮細胞におけるレプトスピラのトランスロケーション: 必須因子の検討                         |
| 3. 学会等名<br>第57回レプトスピラ・シンポジウム   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hermawan Idam, 松浦 千晶、佐藤 行人、山城 哲、トーマ クラウディア |
| 2. 発表標題<br>沖縄県における土壌からの病原性レプトスピラの分離                   |
| 3. 学会等名<br>第59回日本熱帯医学会大会                              |
| 4. 発表年<br>2018年                                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hermawan Idam, Matsuura Chiaki, Sato Yukuto, Toma Claudia  |
| 2. 発表標題<br>Isolation of environmental pathogenic Leptospira from soil collected in the northern part of Okinawa |
| 3. 学会等名<br>第71回日本細菌学会九州支部総会   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Isabel Sebastian, 大倉 信彦, Bruno M. Humbel, 許 駿, Malgorzata Hall, 高山 千利, 山城 哲, 中村 修一, トーマ クラウディア |
| 2. 発表標題<br>病原性レプトスピラによる細胞間接着装置の破壊戦略   |
| 3. 学会等名<br>第94回日本細菌学会総会   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)            | 備考 |
|-----------|---|----------------------------------|----|
| 研究<br>分担者 | 中村 修一<br><br>(Nakamura Shuichi)<br><br>(90580308) | 東北大学・工学研究科・助教<br><br><br>(11301) |    |

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-----------|------------------------------------|-----------------------|----|
| 研究<br>協力者 | 大倉 信彦<br><br>(Okura Nobuhiko)      |                       |    |
| 研究<br>協力者 | ホンベル ブルーノ<br><br>(Humbel Bruno M.) |                       |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|