

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08467

研究課題名(和文) 病原性レプトスピラによる上皮細胞感染戦略

研究課題名(英文) Mechanisms of epithelial cells infection by *Leptospira interrogans*

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：病原性レプトスピラは多くの哺乳動物に感染し、腎尿細管で増殖し尿中へと排出される。ヒトは、この尿との直接的な接触、あるいは尿に汚染された水や土壌との接触により感染する。本研究において、病原性レプトスピラの上皮細胞の感染機構に焦点を当て、その分子メカニズムを解明することを目的とした。

高病原性を保持した株と人工培地にて継代を長期間繰り返すことによって得られた弱病原性株の比較解析を行い、病原性レプトスピラが上皮細胞の細胞死を抑制する機構をもつことを明らかにした。また、LP株は感染21日後には、近位尿細管に微絨毛に強固に付着し、バイオフィルム様構造を形成することを見出した。

研究成果の概要(英文)： *Leptospira interrogans* is a pathogenic, spirochetal bacterium that is responsible for leptospirosis, an emerging worldwide zoonosis. Leptospire colonize the renal proximal tubules and chronically infect the kidney. Live bacteria are excreted into urine, contaminating the environment. In the present study, we compared the interactions between a virulent, low passage (LP) strain and a cultured-attenuated, high passage (HP) strain with epithelial cells.

Our results suggested that *L. interrogans* are able to manipulate the host oxidative stress response of epithelial cells. During the long-term colonization, leptospire aggregated and attached to the brush border and membrane vesicles which are involved in the formation of a biofilm-like structure.

研究分野：病原細菌学

キーワード： *Leptospira* infection epithelial cells

## 1. 研究開始当初の背景

病原性レプトスピラ (*Leptospira interrogans*) は多くの哺乳動物に感染し、腎尿細管で増殖し尿中へと排出される。しかしながら、病原性レプトスピラの尿細管上皮細胞の感染機構の詳細についてはほとんど理解されていなかった。

宿主側からみて病原体の感染の足場となる上皮細胞を除去する感染防御システムは重要であり、病原体は宿主の異物排除機構を回避し、感染を成立・持続させることが明らかになっていた。赤痢菌やピロリ菌等、病原細菌の様々な上皮細胞バリアーを回避する感染戦略が報告されていた(Kim et al, *Cell Host Microbe*, 2010)。病原性レプトスピラと尿細管上皮細胞の相互作用については、不明な点が多かった。

## 2. 研究の目的

尿細管上皮細胞の感染機構に焦点を当て、その分子メカニズムを解明することを目的とした。まずは、*in vitro* の系で病原性レプトスピラの感染によって宿主細胞の細胞死が抑制されるかを明らかにし、その様式を解析することを目的とした。さらに、動物感染モデルを用いて *in vivo* における病原性レプトスピラと尿細管上皮細胞の相互作用を解析することにした。

## 3. 研究の方法

(1) マウスから分離した高病原性レプトスピラ (Low Passage, LP 株) と、分離後に人工培地で 65 回以上継代し病原性を低下させた低病原性レプトスピラ (High Passage, HP 株) を用いた。

(2) 腎臓内での菌の動きは、LP 株または HP 株を C57BL/6 マウス腹腔内に投与し、時系列的に腎臓に定着した菌を定量するためのリアルタイム PCR 法および臓器中の菌の培養を行った。また、蛍光免疫染色と電子顕微鏡にて観察した。

(3) 病原性レプトスピラの腎臓内動態を調べるために、レプトスピラと尿細管上皮細胞に存在するレセプター (キュービリン) との 2 重蛍光免疫染色を行った。

(4) 菌の感染が細胞死を阻害するかを TUNEL 染色によって調べた。さらに、各細胞死誘導経路の阻害剤にて細胞を前処理し、阻害剤の抑制効果を解析した。

## 4. 研究成果

LP 株で感染させたマウスは感染後 1 日目から 21 日目まで、腎臓からレプトスピラが分離され、その数は時間と共に増加した。また、腎臓の切片サンプルも免疫染色し、LP 株が感染 21 日目には尿細管上皮細胞に定着していることが分かった。一方、人工培地で 60 回以上継代を行った HP 株で感染させたマウスは、菌の腎臓への定着が認められなかった (図 1A と 1B)。

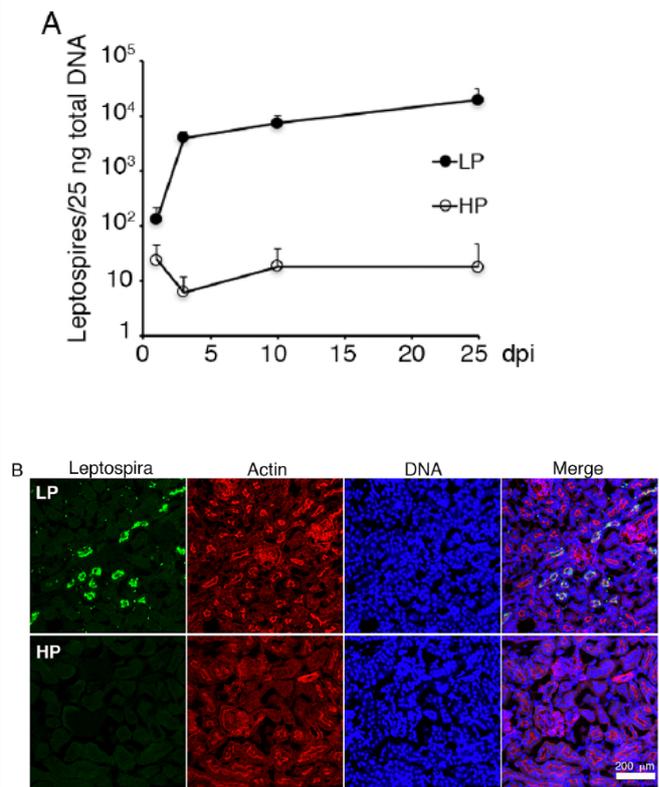


図 1. 感染マウスの腎臓におけるレプトスピラの増殖。A) リアルタイム PCR 法。B) 蛍光免疫染色。緑: レプトスピラ、赤: アクチン、青: 細胞の核。

レプトスピラとキュービリンの 2 重蛍光免疫染色によって、感染 25 日後にレプトスピラはキュービリンと共局在することがわかった。しかし、レプトスピラが存在しない尿細管も多数あった (図 2)。レプトスピラが限定的な尿細管に持続感染する現象はレプトスピラの微絨毛への付着が、ある特定のスレッショールドを超えた際にタンパク質発現が「持続感染モード」へと切り替えられることを示唆した。

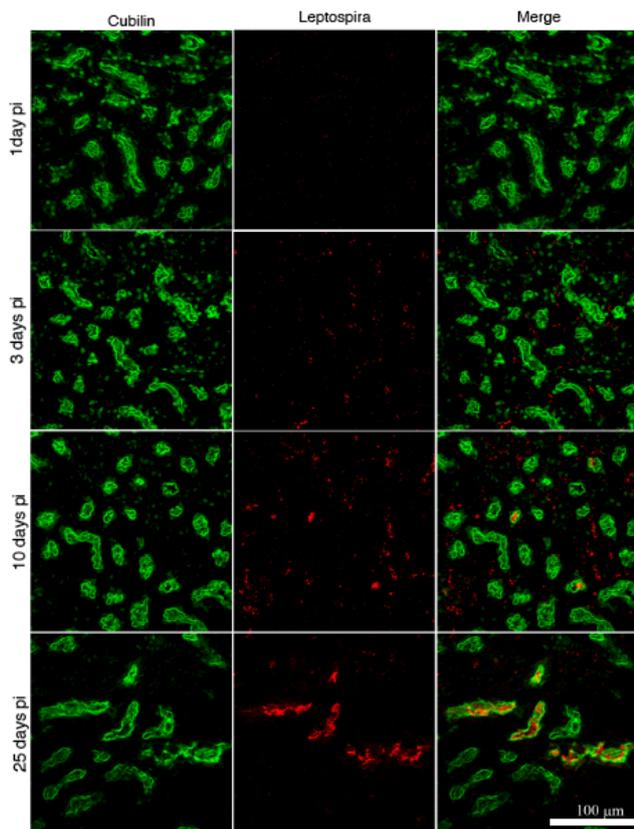


図2. 感染マウスの腎臓の蛍光免疫染色。緑：キュビリン、赤：レプトスピラを示す。

電子顕微鏡の観察においては、レプトスピラが腎臓に長期感染することによって微絨毛が消失することが示唆された（図3）。

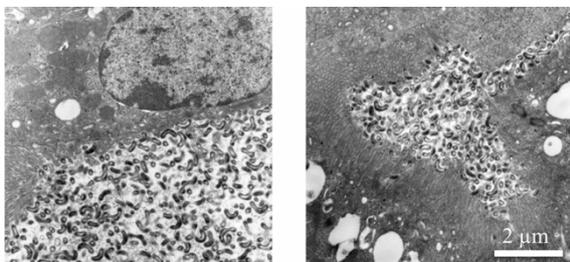


図3. 感染21日目に腎臓の尿細管上皮細胞に定着するレプトスピラの電子顕微鏡像。

マウス尿細管上皮細胞をLP株またはHP株で感染させた結果、HP株で感染させた細胞では次第に細胞膜のブレブ形成等の変化が現れ、細胞死が認められた（図4）。また、細胞死の過程で生じる断片化DNAを検出するTUNEL染色によって、HP株で感染させた細胞では約30%のTUNEL陽性細胞が検出された。さらに、菌の蛍光免疫染色では、LP株で感染させた細胞にはスピロヘータの形状を保持した菌が細胞に付着していることがわかった（図4）。

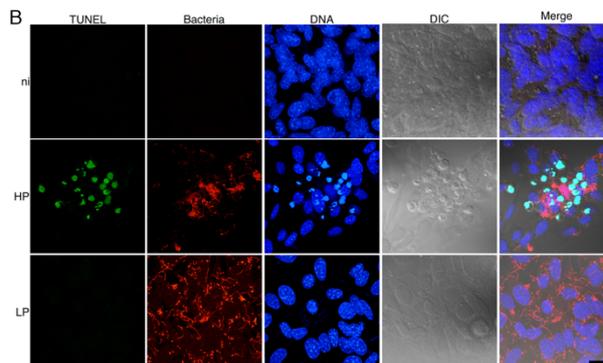


図4. 感染細胞のTUNEL染色及び抗レプトスピラ抗体を用いた蛍光免疫染色。緑：断片化した細胞のDNA、赤：レプトスピラ、青：細胞の核。DIC: differential interference contrast。

各種細胞死阻害剤にてTCMK-1細胞を処理し、HP株で感染した結果、細胞死は、(ADPリボース)ポリメラーゼ-1 (PARP-1) 阻害剤であるPJ34で完全に阻害された（図5A）。PARP-1活性化によってアポトーシス誘導因子、apoptosis-inducing factor (AIF)がミトコンドリアから核へと移行し、H2AXのリン酸化によってDNAの断片化が活性化されることが知られている。HPで感染させた細胞の蛍光免疫染色にてAIFがミトコンドリアから核に移行したため、HPが誘導する細胞死はPARP-1依存的であることが示唆された（図5B）。

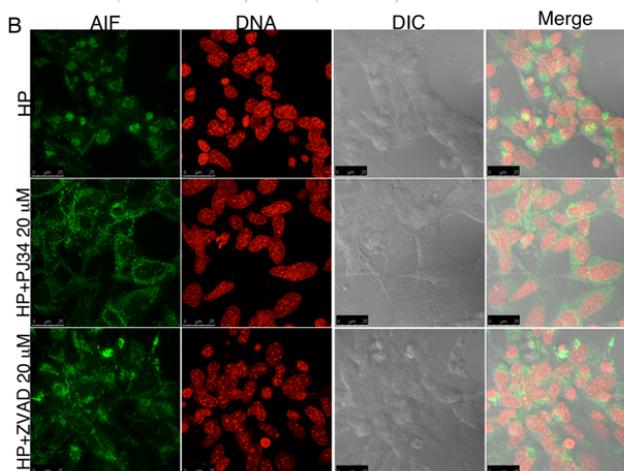
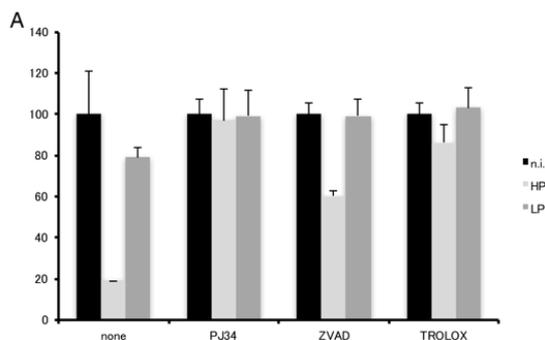


図 5. レプトスピラの感染によって誘導される細胞死の解析。A: 各種阻害剤の効果をクリスタルバイオレット染色で評価した。ni: non infected, 感染していない細胞。B: 感染 48 時間後に AIF の核移行を蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。緑: AIF, 赤: 細胞の核、DIC: differential interference contrast (微分干渉)。(微分干渉)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Toma C, Koizumi N, Kakita T, Yamaguchi T, Hermawan I, Higa N, Yamashiro T. (2018) Leptospiral 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase as an early urinary biomarker of leptospirosis. **Heliyon** 4: e00616. doi:10.1016/j.heliyon.2018.e00616. (査読有)
- ② Nakasone N, Higa N, Toma C, Ogura Y, Suzuki T, Yamashiro T. (2017) Epigallocatechin gallate inhibits the type III secretion system of Gram-negative enteropathogenic bacteria under model conditions. **FEMS Microbiol Lett.** 364 (13). doi:10.1093/femsle/fnx111. (査読有)
- ③ Nakasone N, Ogura Y, Higa N, Toma C, Koizumi Y, Suzuki T, Yamashiro T. (2017) Hot-PBS extract of *Vibrio vulnificus* induces NF- $\kappa$ B activation. **EJBio.** 13:131-134. (査読有)
- ④ 鈴木 敏彦、トーマ・クラウディア、高江洲 義一、比嘉 直美、仲宗根 昇 (2016) 「病原細菌の感染と宿主応答の分子論-細菌感染によるインフラマゾーム活性化機構およびレプトスピラの持続感染機構」 **化学療法の領域**、32 (2): 109-114. (査読無)

[学会発表] (計 7 件)

- ① トーマ・クラウディア. 腎近位尿管上皮細胞を足場とするレプトスピラの感染戦略. 第 91 回日本細菌学会総会. 2018 年 3 月.
- ② 水山 克、佐藤 行人、サトウ 恵、源 利文、トーマ・クラウディア. 沖縄本島北部におけるレプトスピラ環境 DNA に関

する研究. 第 55 回レプトスピラ・シンポジウム. 2018 年 3 月.

- ③ Toma C, Koizumi N, Kakita T, Kyan H, Hermawan I, Higa N, Yamashiro T. Evaluation of a leptospiral enzyme for diagnosis of acute leptospirosis. 10<sup>th</sup> International Leptospirosis Society Meeting. 2017 年 11 月.
- ④ トーマ・クラウディア、山口 孝治、柿田 徹也、小泉 信夫、松本 亜里奈、仲宗根 昇、比嘉 直美、村上 明一、小林 潤、山城 哲. レプトスピラ症の迅速診断法の開発. 第 54 回レプトスピラ・シンポジウム. 2017 年 3 月.
- ⑤ Toma C, Yamaguchi T, Higa N, Matsumoto A, Okura N, Nakasone N, Suzuki T, Yamashiro T. Interaction of virulent *Leptospira interrogans* with renal epithelial cells. 第 90 回日本細菌学会総会. 2017 年 3 月.
- ⑥ 山口 孝治、トーマ・クラウディア、比嘉 直美、仲宗根 昇、山城 哲. 病原性レプトスピラの腎臓内における長期感染のメカニズム解析. 第 69 回日本細菌学九州支部会. 2016 年 9 月.
- ⑦ トーマ・クラウディア、山口 孝治、比嘉 直美、松本 亜里奈、水山 克、高江洲 儀一、仲宗根 昇、鈴木 敏彦. 病原性レプトスピラの持続感染機構. 第 53 回レプトスピラ・シンポジウム. 2016 年 3 月.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: レプトスピラ症の診断に用いるレプトスピラ抗原検出用抗体  
 発明者: トーマ・クラウディア  
 権利者: 国立大学法人琉球大学  
 種類: 特許  
 番号: 特許願 2017-226148  
 出願年月日: 平成 29 年 11 月 24 月  
 国内外の別: 国内

名称: 病原性レプトスピラ抗原検出抗体  
 発明者: トーマ・クラウディア、山口孝治  
 権利者: 国立大学法人琉球大学  
 種類: 特許  
 番号: 特許願 2016-020623  
 出願年月日: 平成 29 年 2 月 7 月  
 国内外の別: 国内

[その他]  
ホームページ等  
<http://bacteriology-u-ryukyu.com>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

Toma Claudia (TOMA Claudia)  
琉球大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号： 40325832