

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07100

研究課題名(和文)レプトスピラ症病原体の宿主選好メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) Mechanism of host preference of the zoonotic spirochete *Leptospira*

研究代表者

中村 修一 (NAKAMURA, Shuichi)

東北大学・工学研究科・助教

研究者番号：90580308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：人獣共通感染症レプトスピラ症の病原体レプトスピラ属細菌は250以上の血清型に分類され、感染後の症状はレプトスピラの血清型と宿主の組み合わせに依存するが、そのメカニズムは不明である。本研究では、レプトスピラの宿主選好性を決める可能性因子として、「宿主細胞への接着性」と「接着後の運動性」を挙げ、これらを実験的に検証した。3種のレプトスピラ株と6宿主種由来の腎臓細胞を組み合わせ、腎臓細胞に感染させた細菌の動態を顕微計測したところ、重症化しやすいペアほど、レプトスピラは強い細胞接着性と指向的で持続的な細胞表面運動を示すことが分かった。細菌の運動性と宿主依存的病原性を実験的に結び付けた重要な成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レプトスピラが感染する動物種の一部は、病原体を無症状のまま腎臓に長期保菌して尿とともに断続的に排出するため、感染症拡大の原因となる。本研究の成果は、レプトスピラの宿主選好性のメカニズムを理解する重要な手掛かりであり、本菌の感染予防や、保菌動物の発生抑制のための戦略提案につながることを期待される。また、本研究が発信する病原体と宿主の相互作用や維持感染に関する新知見は、接着と運動が必須病原因子とされる様々な細菌病原体に関する研究の推進に寄与し、種間競合や異種共生といった生命システムに普遍的な問題の解決にも役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The zoonosis leptospirosis is caused by the genus *Leptospira*. The pathogenic *Leptospira* comprises more than 250 serovars, and the resultant symptom is roughly related to the preference of *Leptospira* species and leptospiral serovars. However, the mechanism of the host preference of *Leptospira* is not fully elucidated. *Leptospira* can crawl even while attached to solid surfaces. In this study, focusing on the adhesivity and mobility of *Leptospira* on host tissues, we investigated the relevance of the *Leptospira* dynamics with pathogenicity. We infected cultured kidney cells of six mammalian species by three leptospiral strains independently (18 pairs in total) under microscope and analyzed the adhesivity and crawling of individual leptospire. Higher adhesivity and directive crawling were observed in the host-pathogen pairs that cause severer symptom, suggesting that the pathogen's mobility on the host tissue could be a crucial factor of the host-dependent pathogenicity of *Leptospira*.

研究分野：生物物理学, 細菌学

キーワード：細菌 運動性 細菌べん毛 一分子計測 分子モーター スピロヘータ 細菌感染症 光学顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

(1) レプトスピラ症は、レプトスピラ属細菌を病原体とする人獣共通感染症で、ヒトの重症型(ワイル病)では、黄疸、肺出血、腎不全が現れる。レプトスピラ属は、250以上もの血清型に分類され、様々な哺乳動物に経皮的に感染する。感染後の症状は動物種によって異なり、一部の動物ではレプトスピラが腎臓に持続的に感染し、保菌動物となる。保菌動物は本症拡大の主因であるため、「どの血清型がどの動物に持続感染できるか」という各血清型の“好み”(宿主選好)を理解することは、感染拡大の抑止を狙う創薬においても重要課題である。しかし、本研究開始当初には、そのメカニズムは明らかにされていなかった。

(2) レプトスピラは、スピロヘータ目に特徴的な螺旋形菌体の内部にべん毛を持つ。べん毛遺伝子の破壊などにより運動性を失った病原性株は著しく弱毒化することから、運動性は本菌の必須病原因子であると考えられてきた。しかし、我々の以前の研究によって、非病原性株も病原性株と同等の運動性を示すことが分かっていたため(Takabe et al., 2013, Microbiol. Immun.), レプトスピラの感染ならびに病態形成における運動の実質的寄与は不明であった。

(3) 2014年に、ハムスターの肝臓組織に螺旋形菌体の一端を突き刺すレプトスピラを捉えた電子顕微鏡写真が報告された(Miyahara et al., 2014, Int. J. Exp. Path.). この結果から、運動を利用した組織侵入モデルが提唱された。組織侵入の前段階として、組織表面の接着、続いて接着しながらの運動性が必要である。レプトスピラが固体表面で這うように運動することは、約40年前に手書きのスケッチで報告され、その表面運動はクロウリングと名付けられた(Cox & Twigg, Nature 1975)。その後、レプトスピラのクロウリング運動は本菌の運動研究の対象とされなかったが、2018年、我々の研究グループはスライドガラス表面に抗リポ多糖抗体を修飾することによってレプトスピラのクロウリングが加速されることを発見した(Tahara et al., 2018 Sci Adv.)。我々はこれらの知見を結び付け、宿主-血清型の組み合わせによって異なる細胞表層の「相性」が付着性・運動性の多様性を生み、宿主選好性につながるのではないかと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、レプトスピラの宿主選好メカニズムを明らかにすることを目的として行われた。研究計画に際し、「組織表面への接着性」と「組織接着後の運動性(表面滑走)」が血清型-宿主ペアを決める二重の選別ステップであるという仮説を立てた。この仮説は、「運動性を必須の病原因子とする」、「固体表面でも表面の性質依存的に運動する」、「組織細胞間に侵入する」という知見に基づいて立てられた。

3. 研究の方法

(1) 細菌株と宿主細胞: 3種のレプトスピラ血清型と6宿主由来の腎臓細胞を組み合わせ、合計18ペアで総当たりの実験を行った。使用したレプトスピラ株は、*Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae strain WFA135 (病原性), *L. interrogans* serovar Manilae strain UP-MMCNIID (病原性), *L. biflexa* serovar Patoc strain Patoc I (非病原性)である。使用した腎臓細胞は、MDCKNBL2(dog), NRK-52E (rat), Vero (monkey), MDBK-NBL1 (cow), TCMK-1 (mouse), and HK-2 (human)である。腎臓細胞に接着している個々のレプトスピラ菌体の動態を解析するため、すべてのレプトスピラ株に緑色蛍光蛋白質(GFP)をプラスミドから発現させた。

(2) 細菌運動解析: チャンバースライド上に腎臓細胞の単層膜を形成する手法を確立した。腎臓細胞シート上にGFP発現レプトスピラを感染させ、落射型蛍光ビデオ顕微鏡(BX50, Splan 40x, NA 0.75, Olympus)で腎臓細胞上での細菌動態を撮影した(図1)。図2に示す作業モデルをもとに、感染させた細菌の状態を「腎臓細胞に接着せずに遊泳している菌(Swimming)」、「接着して動かない菌(Adhesion)」、「細胞上でクロウリングしている菌(Crawling)」の3グループに分類した。また、画像解析ソフトImageJ

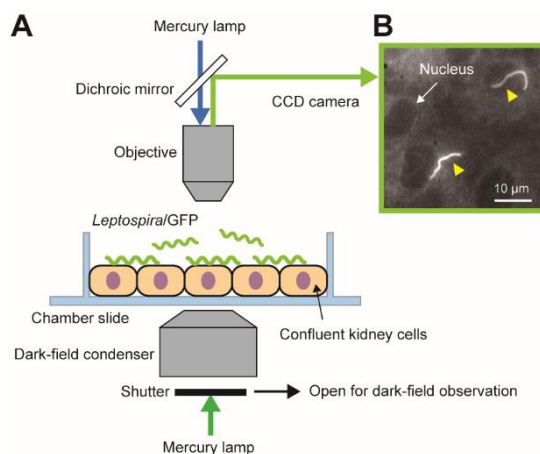


図1. (A) 培養細胞シート上での細菌動態を観察するビデオ顕微鏡システム。暗視野顕微鏡に落射蛍光装置を取り付けたものを使用した。(B) 腎臓細胞に接着しているGFP発現レプトスピラ(黄色三角)。

(NIH, MD, United States) で解析し個々の細菌の重心移動を求めたのち、本研究で開発した Visual Basic マクロによって、個々の細菌のクロウリング速度や運動の一方向性（指向性）を解析した。運動の指向性は、粒子重心の平均二乗変位 (mean square displacement, MSD) を時間に対して両対数プロットし、その傾きから判断した。指向性のないブラウン運動であれば、両対数 MSD プロットの傾きは 1 で、ある方向にバイアスがかかると 2 に近づくため、腎臓細胞上でのレプトスピラ運動の指向性を評価できると考え、この解析法を導入した。

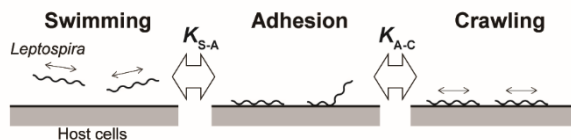


図 2. 本研究の作業モデル。レプトスピラは遊泳 (Swimming) で宿主組織に集まり、組織表面に接着し (Adhesion)、このように運動する (Crawling)。各状態の割合の比から状態間遷移の平衡定数 (K) が得られる。

4. 研究成果

(1) 腎臓細胞に感染させた細菌の定常解析：細菌-宿主 1 ペアについて 2700 菌体以上のデータを収集した。各ペアのビデオ画像からレプトスピラの状態を定常と仮定して「遊泳」、「接着」、「クロウリング」の 3 つに分類し、さらに病原性/非病原性を指標に比較したところ、非病原性株 (*L. biflexa*) に比べて病原性株 (*L. interrogans* Manilae と同 *Icterohaemorrhagiae*) のほうがクロウリング状態にある菌の割合が多いことが分かった (図 3A-B)。ヒト腎近位尿管細胞株 (PRTEC) を用いた *in vitro* 感染実験でも同様の結果が得られた。

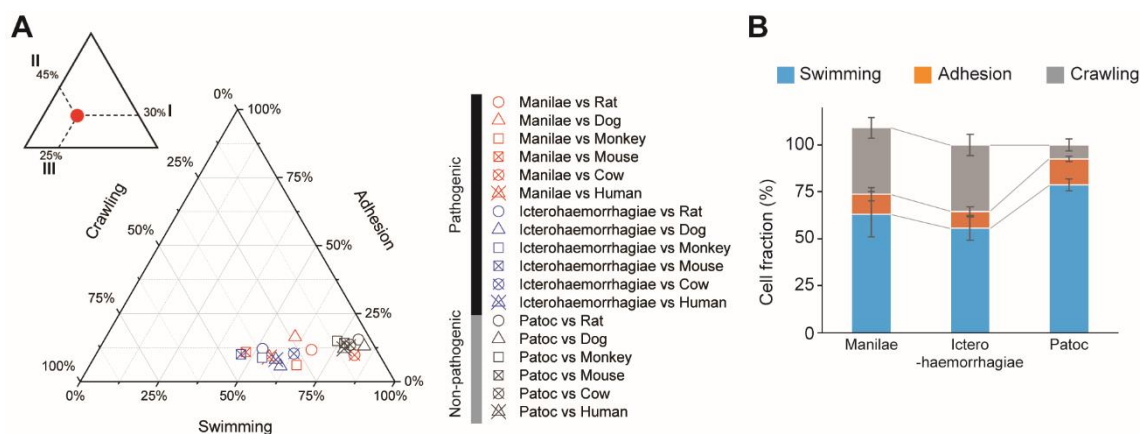


図 3. (A) 細菌状態の定常解析結果の三角プロット。左上に三角プロットの見方を示した：この例は状態 I が 30%、状態 II が 45%、状態 III が 25% (計 100%)。右側のリストは、レプトスピラ血清型 vs 宿主種を、レプトスピラの病原性/非病原性によって分けたもの。(B) A の結果をレプトスピラ株ごとに棒グラフ化したもの。Manilae と *Icterohaemorrhagiae* が病原性、Patoc が非病原性である。

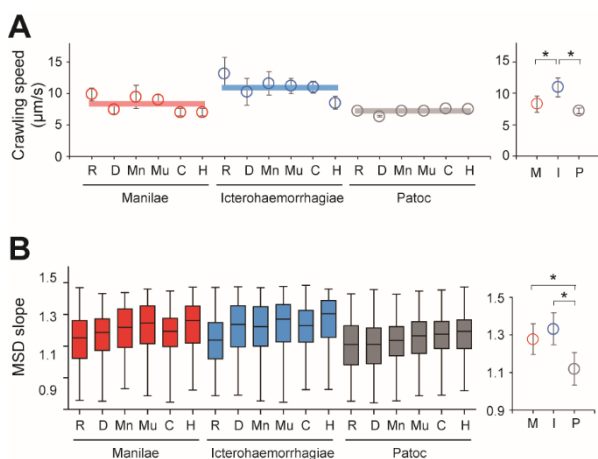


図 4. クロウリング運動の解析結果。(A) クロウリング速度と病原性の関係。(B) クロウリングの指向性、持続性を示す両対数 MSD プロットの傾きと病原性の関係。

(2) クロウリング解析：個々のレプトスピラ細菌のクロウリング運動を定量解析したところ、クロウリング速度と病原性の関連性は見られなかった (図 4A)。一方、MSD 解析によって、非病原性株に比べて病原性株のクロウリングのほうが有意に強い指向性を示すことが分かった (図 4B)。この結果は、病原性株が腎臓細胞上でより広範囲を移動できる可能性を示唆するものである。

(3) 重症度と接着/運動の関係：図 3 で得た 3 状態の割合から状態間の平衡定数 (K) を細菌-宿主ペアごとに計算し、各ペアの MSD 解析の結果 (図 4) と対して図 5A のようにプロットした。その結果、クロウリング状態に遷移しやすいペア (平衡定数 K_{AC} 値が高いペア) ほど、細胞上での細菌の運動指向性も高い (MSD slope 値が高い) 傾向にあることが分かった (図 5A の右上に集まっているデータ点)。さらに、

文献情報をもとに、各ペアで予想される症状の重症度と K_{AC} 値および MSD slope 値の関連に注目したところ、重症ペアほどいずれの値もハイスコア (例えばイヌ腎臓細胞 vs 病原性株 *Icterohaemorrhagiae* は K_{AC} 値 \sim 5, MSD slope 値 \sim 1.4) であるのに対して、非病原性の *L.*

biflexa を含むペアはいずれも低スコアに集中していた。

(4) まとめ：運動性が必須病原因子であることは、コレラ菌、ピロリ菌、サルモネラ属細菌、ライム病ボレリアなど様々な細菌種で報告されている。レプトスピラについては、パストゥール研究所の M. Picardeau やモナッシュ大学の B. Adler らの研究グループが、運動変異体が顕著に弱毒化されることを動物実験で示している (Lambert et al., 2012, Infect.Immun.)。しかし、本研究開始当初は、レプトスピラの運動性の実際的な役割、すなわち感染から病態形成に至るどのステップで、どのように運動性に関わるかは全くのブラックボックスであった。本研究の結果は、宿主細胞に対してレプトスピラがより強い細胞接着性とクロウリングの指向性を示すほど重症化しやすいことを示唆した (図 5B)。これは、*in vitro* 実験ながら、細菌の運動性と宿主依存的病原性を実験的に結び付けた重要な成果である。本研究では感染後数時間の間にかかる病原体の動態に注目したが、今後は長い時間スケールで宿主側の応答も併せてより調べることにより、保菌動物での維持感染なども含む宿主-細菌相互作用の分子機構を解明できるものと期待している。

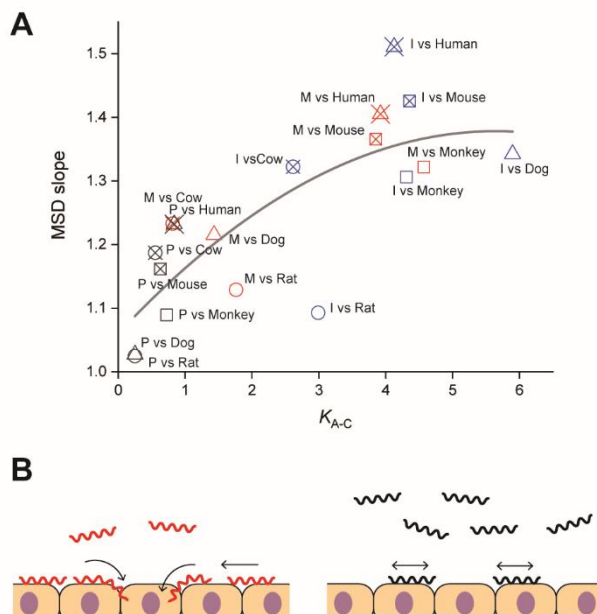


図 5A. (A) クロウリング状態への遷移しやすさを示す平衡定数 K_{A-C} 値とクロウリングの指向性、持続性を表す MSD slope 値の関係。図中の I, M, P はレプトスピラの血清型 *Icterohaemorrhagiae*, *Manilae*, *Patoc* を示す。(B) 本研究の結果が示唆する運動性と病原性との関係。左は病原性レプトスピラ (赤) が強い接着性とクロウリング指向性を利用して組織細胞間に侵入する様子を描いている。重症化しやすい宿主種-細菌株ペアほど、この傾向が強いと思われる。右は、非病原性レプトスピラ (黒) は接着性が弱く、細胞上での指向的クロウリングも起こりにくいことを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakamura S, Minamino T	4. 巻 9
2. 論文標題 Flagella-driven motility of bacteria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 279
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom9070279	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 中村修一	4. 巻 74
2. 論文標題 細菌の運動機構に関する研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 細菌学雑誌	6. 最初と最後の頁 157,165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3412/jsb.74.157	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Xu J, Koizumi N, Nakamura S	4. 巻 11
2. 論文標題 Crawling motility on the host tissue surfaces is associated with the pathogenicity of the zoonotic spirochete <i>Leptospira</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.01886	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Sebastian I, Okura N, Humbel BM, Xu J, Hermawan I, Matsuura C, Hall M, Takayama C, Yamashiro T, Nakamura S, Toma C	4. 巻 e13343
2. 論文標題 Disassembly of the apical junctional complex during the transmigration of <i>Leptospira interrogans</i> across polarized renal proximal tubule epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cmi.13343	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Nakamura S	4. 巻 10
2. 論文標題 Spirochete flagella and motility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10040550	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Abe K, Kuribayashi T, Takabe K, Nakamura S	4. 巻 10
2. 論文標題 Implication of back-and-forth motion and powerful propulsion for spirochetal invasion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70897-z	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

[学会発表] 計12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Jun Xu, Nobuo Koizumi, Shuichi Nakamura
2. 発表標題 Analysis of Adhesion and Crawling Behavior of Leptospira on the Host animal cells
3. 学会等名 11th International Leptospirosis Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keigo Abe, Kyosuke Takabe, Shuichi Nakamura
2. 発表標題 Simultaneous measurement of force and velocity of Leptospira swimming
3. 学会等名 11th International Leptospirosis Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Xu, Nobuo Koizumi, Shuichi Nakamura
2. 発表標題 Involvement of adhesion and motility in pathogenicity of Leptospira
3. 学会等名 第56回レプトスピラ・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Xu, Nobuo Koizumi, Shuichi Nakamura
2. 発表標題 Adhesion and motility of Leptospira on animal cultured cells
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部圭吾, 高部響介, 中村修一
2. 発表標題 レプトスピラにおける遊泳力発生の粘度依存性
3. 学会等名 第57回レプトスピラ・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Xu, Nobuo Koizumi, Shuichi Nakamura
2. 発表標題 レプトスピラの病原性における接着と運動の関わり
3. 学会等名 第57回レプトスピラ・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuichi Nakamura
2. 発表標題 Biophysical aspect of bacterial infectious diseases
3. 学会等名 第60回熱帯医学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Xu, Nobuo Koizumi, Shuichi Nakamura
2. 発表標題 Involvement of adhesion and motility in pathogenicity of Leptospira
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿部圭吾、高部響介、中村修一
2. 発表標題 らせん細菌レプトスピラの遊泳力
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部圭吾、高部響介、中村修一
2. 発表標題 レプトスピラ遊泳の力と速度の関係
3. 学会等名 2018年度べん毛研究交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sebastian I, Okura N, Humbel BM, Xu J, Hermawan I, Matsuura C, Hall M, Takayama C, Yamashiro T, Nakamura S, Toma C
2. 発表標題 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 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuichi Nakamura
2. 発表標題 Motility-dependent pathogenicity of a spirochetal bacterium
3. 学会等名 BioActive fluids seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Nobuo Koizumi, Mathieu Pircardeau (Editors), Nakamura S (Chapter 13)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 291
3. 書名 Methods in Molecular Biology 2134: Leptospira spp. Methods and protocols	

〔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	小泉 信夫 (KOIZUMI Nobuo) (10333361)	国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官 (82603)	

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
---------	---------