

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16174

研究課題名(和文)レプトスピラが宿主の脂肪組織血管内に定着する分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism by which Leptospira colonizes on host adipose tissue blood vessels

研究代表者

尾鶴 亮(OZURU, Ryo)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：70763035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、レプトスピラの脂肪組織血管内への定着メカニズムの解明を目標とした。そのため、トランスポゾンを用いたランダム挿入変異による遺伝子組み換えレプトスピライブラリーの作製を行った。これによって得られた遺伝子組み換えレプトスピライブラリーを単離し、それぞれハムスターに対する感染実験を行った。この感染実験において病原性の低下した株を2種類見出した。それら変異株のトランスポゾン挿入位置を同定すると、1つは鞭毛の構成因子に、もう1つは走化性に関わる因子にトランスポゾンが挿入されていた。今後はこれらの因子が脂肪組織定着にどのように関わっているのが解明していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レプトスピラ症は病原細菌レプトスピラの感染によって起こる人獣共通感染症(ヒト・動物に共に起こる感染症)の一つです。ヒトでは重症化すると、黄疸・肺出血・腎不全を伴うワイル病を引き起こし致命的です。これは感染早期に診断できれば抑えることができますが、迅速診断キットがないのが現状です。私たちは以前、レプトスピラが感染初期に脂肪組織血管内に定着することを見出し報告しました。本研究ではその定着メカニズムを明らかにし、迅速診断キットに応用することを目的としました。研究の結果、脂肪組織定着に関わる可能性のある分子2種を同定しました。今後これらが脂肪組織定着に関わるメカニズムを解明しようと考えています。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study was to elucidate the mechanism of Leptospira fixation in adipose tissue blood vessels. For this purpose, we first generated a recombinant Leptospira library by random insertion mutation with transposons. Some recombinant Leptospira were isolated from the library and used for infection experiments on hamsters. We found three strains with reduced virulence in these infection experiments. We identified the transposon insertion sites of these mutant strains, and found that one transposon was inserted into a component of the flagellum and the other was inserted into factors related to chemotaxis. In the future, we will elucidate how these factors are involved in adipose tissue fixation of Leptospira.

研究分野：感染制御学

キーワード：レプトスピラ症 ワイル病 脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

レプトスピラ症は、病原細菌レプトスピラによって引き起こされる世界最大の人獣共通感染症の一つである。ヒトでは重症化すると、黄疸・肺出血・腎不全を伴うワイル病を引き起こし致命的である。そのためワクチンによる予防と感染早期の診断が重要となってくる。しかしこのレプトスピラには血清型が250種類以上存在している。現存するワクチン・迅速診断キットは全て血清型特異的であるため、流行地において発生しうる血清型を網羅する必要がある、予防・診断は共に十分に行われていると言い難い現状がある。

レプトスピラ流行地では、その血清型の把握のために顕微鏡下凝集試験 (Microscopic Agglutination Test; MAT) と呼ばれる試験を行う。MATは希釈した患者血清とレプトスピラを混合し、凝集の有無を暗視野顕微鏡下で判定して抗体価を算出する手法であり、WHOのマニュアルでも確定診断に用いるよう記載されている (Terpstra, W. J., WHO, and International Leptospirosis Society, 2003)。しかし1検体あたり数十標本の鏡検が必要であり効率化が望まれている。また判定には、菌体と血清中の夾雑物の正確な識別や、凝集の目視での定量化等への習熟が必要で、標準化が難しいのが現状である。こういった側面から、流行地での(時に数十種類におよぶ)血清型の完全な把握は困難であった。

私たちのグループでは以前、レプトスピラがワイル病動物モデルであるハムスターでの感染初期に、脂肪組織血管内に定着し増殖していることを見出し報告した (Ozuru et al. PLoS ONE, 2017)。レプトスピラの炭素源は中鎖脂肪酸であることが知られており、実際にレプトスピラ感染ハムスターの尿中から脂肪酸代謝である酸化に関わる因子 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase が検出されることなどが知られている (Segawa et al. BMC Microbiol. 2014)。このためレプトスピラが感染初期に脂肪組織に定着する現象は、血清型に関わらず起こる可能性があり、その分子メカニズムを解明することは血清型に関わらないワクチン・迅速診断キットの開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

上記の背景から、ワクチン・診断キットの効率化を行うためには、血清型に関わらない、レプトスピラ共通の分子機構や抗原を標的とすることが必要になってくる。そして私たちのグループが発見した「レプトスピラが感染初期に脂肪組織の血管内に定着し増殖する」という現象は、血清型に関わらず起こる可能性がある。そこで本研究の第一の目的は「レプトスピラの脂肪組織定着の分子メカニズムを解明すること」とした。

また、上記の背景の通り、現状レプトスピラ流行地ではその血清型の完全な把握が困難であり、その原因はMATの煩雑さにあると考えられる。そこで本研究の第二の目的は「MATの効率化・標準化を目指し、機械学習法を用いた自動化手法を確立すること」とした。

3. 研究の方法

(1)レプトスピラの脂肪組織定着の分子メカニズムの解明

レプトスピラのトランスポゾン挿入変異体ライブラリーの作製

接合法を用いてレプトスピラにトランスポゾンを含むプラスミドを導入し変異体を作製した。用いた病原性レプトスピラは *L. interrogans* serovar Manilae strain UP-MMC-NIID、接合する大腸菌は *E. coli* 2163株であった。*L. interrogans* 培養液に *E. coli* 培養液を混合し、0.2 μm フィルターユニット上で液体成分を完全に除去した。除去後のフィルターを EMJH 寒天培地に乗せ 30 °C で 24 時間培養した。その後フィルターを EMJH 培地で洗浄し、洗浄後の EMJH 培地を EMJH 寒天培地上に播種して 30 °C でコロニーが観察されるまで 2 週間程度培養を行った。

トランスポゾン挿入変異レプトスピラの性状解析

によって得られたトランスポゾン挿入変異レプトスピラの性状解析を行った。得られたコロニーのうち、野生株と比較して有意にコロニー直径の小さい株を選択し、DNA 抽出後にトランスポゾンの挿入位置をシーケンスした。またトランスポゾンが挿入された遺伝子について Web データベース上で検索を行い、その機能を推定した。

トランスポゾン挿入変異レプトスピラを用いたハムスター感染実験

で性状の確認できた変異体レプトスピラを用いたハムスターへの感染実験を行った。変異体変異レプトスピラは 10^3 菌体(ハムスター1個体あたり)になるよう暗視野顕微鏡下で調製した。これらのレプトスピラをハムスター (Syrian、オス、4 週齢) の腹腔内に感染させ、最大 14 日間観察を行った。期間内に人道的エンドポイントを迎えた個体はイソフルラン吸入麻酔下で頸椎脱臼法によって安楽死を行った。

(2)機械学習法を用いた MAT 自動化手法の確立

レプトスピラ (*L. interrogans* serovar Manilae) をハムスター (Syrian、メス、4 週齢) に感染させ、感染 0 日後 (陰性サンプル) に 2 個体から、感染 7 日後 (陽性サンプル) に 1 個体から血清を採取した。得られた血清を用い MAT を行って顕微鏡画像 (陽性画像 526 枚、陰性画像

384 枚) を取得した。得られた全画像のうち 6:4 の割合で学習: 検証に用いた。取得した元画像に加え、画像をウェーブレット変換 (Wavelet Transform; WT) したものの、さらに WT 後のウェーブレット係数をヒストグラム化したもの (Histogram of Wavelet; HoW) も特徴量とした。判定手法としてはサポートベクターマシン (Support Vector Machine; SVM) を利用した。学習後の SVM に対し、陽性画像 210 枚、陰性画像 154 枚を用いた検証を行った。

4. 研究成果

(1) レプトスピラの脂肪組織定着の分子メカニズムの解明

トランスポゾン挿入変異レプトスピラの性状解析ライブラリーの作製によって得られた変異体のうち、形成するコロニー直径が野生株 (L495 株) に比べて有意に小さい変異体 2 種類 (M1、M2 株、実際のコロニー直径は図 1) を選択し解析を行った。M1、M2 株は共に鞭毛構成因子と考えられる遺伝子内にトランスポゾンが挿入されていた。そのため寒天培地中 (レプトスピラは寒天培地内にコロニーを形成する) での運動性が変化し、コロニー直径が変化したと考えられる。

トランスポゾン挿入変異レプトスピラを用いたハムスター感染実験

上記 M1、M2 に加え、走化性に関する因子へのトランスポゾン挿入変異体 (M3、M4) も加えた 4 株について、ハムスターへの感染実験を行った (表 1)。野生株 (L495) では同菌数で 14 日以内に全数死亡するが、M1 株、M3 株では最終的に 40% のハムスターが生存した。一方 M2 株 (M1 株と同遺伝子に挿入変異)、M4 株 (M3 株と同遺伝子に挿入変異) では野生株と同様全数死亡した。今回の実験結果では M1 株、M3 株の病原性低下の可能性を示しているものの、生存数に有意差があるとは言えなかった。これらいずれの菌株でも運動性・走化性に関わる因子が欠損していることから、腹腔内投与ではない感染経路 (経皮感染・経粘膜感染など) を検討する必要があると考えている。またそれぞれの変異株と同じ遺伝子が欠損している M2、M4 株では病原性の低下を認めなかった。これに関しても感染経路の検討は必要であると考え、鞭毛構成因子、走化性関連因子共にその本来の機能に重要なアミノ酸配列は限られていると推測できる。各因子のレプトスピラ内での機能に関する報告は未だなく、それらも含めた解析を今後行っていく予定である。

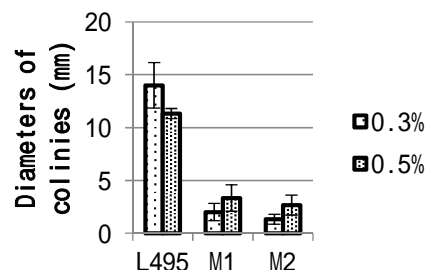


図 1: トランスポゾン挿入変異レプトスピラのコロニー直径。2 種類の寒天濃度 (0.3%・0.5%) の Korthof 寒天培地を用いた。

Strain	Survival
L495	0/5
M1	2/5
M2	0/5
M3	2/5
M4	0/5

表 1: 変異体感染ハムスターの生存率。

(2) 機械学習法を用いた MAT 自動化手法の確立

学習済 SVM を用いた検証結果を図 2 に示す。特徴量が元画像 (Image) や WT 後の画像データ (Wavelet) の場合、陰性画像を全て陽性と誤判断し (偽陽性) 感度 1、特異度 0 と分類性能は極めて低かった。これに対し、WT 後のウェーブレット係数をヒストグラム化 (HoW) して特徴量とすると、感度 0.99、特異度 0.99 と分類性能の大幅な改善が見られた。



図 2: 各特徴量における SVM での検証結果。右端の値は二値分類問題の評価指標である Matthews Correlation Coefficient (MCC)。

本研究成果は 2020 年 12 月 8 日に bioRxiv 誌にプレプリントとして発表し、その後現在 PLoS Neglected Tropical Diseases 誌で査読中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ozuru Ryo, Wakao Shohei, Tsuji Takahiro, et al.	4. 巻 28
2. 論文標題 Rescue from Stx2-Producing E.coli-Associated Encephalopathy by Intravenous Injection of Muse Cells in NOD-SCID Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 100 ~ 118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymthe.2019.09.023	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 Oyamada Yuji, Ozuru Ryo, Masuzawa Toshiyuki, Miyahara Satoshi, Nikaido Yasuhiko, Obata Fumiko, Saito Mitsumasa, Villanueva Sharon Yvette Angelina M., Fujii Jun	4. 巻 2020.12.08
2. 論文標題 A Machine Learning Approach Towards Standardizing Microscopic Agglutination Test for Diagnosis of Leptospirosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 410712
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.12.08.410712	査読の有無 無
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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 尾鶴亮、小山田雄仁
2. 発表標題 顕微鏡下凝集試験（MAT）の自動化を目指した機械学習モデルの構築
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 Yuji Oyamada , Sharon Y. A. M. Villanueva , Ryo Ozuru
2. 発表標題 An Artificial Intelligence Approach Towards a Computer-Aided Microscopic Agglutination Test
3. 学会等名 10th International Leptospirosis Society Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾鶴亮
2. 発表標題 レプトスピラの病原性と菌体回転運動の関わり
3. 学会等名 バイオメカニクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小山田 雄仁, 二階堂 靖彦, 宮原 敏, 齋藤 光正, Sharon Y.A.M. Villanueva, 増澤 俊幸, 尾鶴 亮
2. 発表標題 サポートベクターマシンを用いた顕微鏡下凝集試験 (MAT) の自動化
3. 学会等名 2020年日本バイオインフォマティクス学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾鶴 亮, 増澤 俊之, 宮原 敏, 二階堂 靖彦, 齋藤 光正, 藤井 潤
2. 発表標題 機械学習による感染症診断支援システム構築の試み~レプトスピラ感染症を例に~
3. 学会等名 第73回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾鶴亮, 小山田雄仁, 増澤俊之, 宮原敏, 二階堂靖彦, 齋藤 光正, Sharon Y. A. M. Villanueva, 藤井 潤
2. 発表標題 細菌検査を自動化する-レプトスピラ症の顕微鏡下凝集試験 (Microscopic Agglutination Test; MAT)を例に
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 尾鶴 亮, 藤井 潤
2. 発表標題 若手から見た異分野融合とその難しさ-現場の声- 2. 細菌学的に見た再生医療との異分野融合
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 顕微鏡下凝集試験のための感染診断装置および方法	発明者 尾鶴亮、小山田雄仁	権利者 国立大学法人鳥取大学
産業財産権の種類、番号 特許、2019-183164	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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

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			
オーストラリア	Monash University			
フィリピン	University of the Philippines Manila			