

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590484

研究課題名（和文）人獣共通病原菌レプトスピラのマクロファージを利用した感染戦略の解明

研究課題名（英文）Strategy used to infect macrophages by the zoonotic bacteria *Leptospira*

研究代表者

Toma Claudia (TOMA CLAUDIA)

琉球大学・医学研究科・助教

研究者番号：40325832

研究成果の概要（和文）：

病原性レプトスピラのマクロファージ感染機構について解析を行った。貪食された病原性レプトスピラは、小胞内に存在した。しかし、この小胞とライソゾームの融合は非病原性レプトスピラのファゴソームよりは遅延していた。また、感染24時間では非病原性レプトスピラは消化されているのに対し、病原性レプトスピラはスピロヘータの形状を保持したまま小胞内で生存していた。さらに、一部の菌は細胞外へ遊離することも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We examined in this study the mechanism of macrophage infection by pathogenic *Leptospira*. Pathogenic leptospires were found within phagosomes. However, acquisition of lysosomal markers lagged behind that of non-pathogenic leptospires-containing phagosomes. In macrophages infected with pathogenic leptospires, intact leptospires were found within vacuoles at 24 hours post infection, while non-pathogenic leptospires were degraded. Furthermore, a population of pathogenic leptospires was released to the extracellular milieu.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：病原性

1. 研究開始当初の背景

病原性レプトスピラ (*Leptospira interrogans*) は、人獣共通感染症であるレプトスピラ症を引き起こす。ヒトには、経皮・経口的に感染し、全身感染症を発症する。本菌は、自然免疫機構を回避し、いろいろな臓器（肝臓、腎臓、肺、脳、目等）に移行する。

それまでの研究からは溶血毒素や、宿主細胞外マトリックスへの接着に関与している外膜タンパク等が病原性に関与する可能性が示唆されてきた。また、動物感染モデルの肺や腎臓の組織所見では、出血や炎症性細胞の浸潤が観察され、スピロヘータは腎臓のボウマン嚢腔内・尿細管腔内、肺ではマクロファ

ージ内で確認され、病原性レプトスピラは食
食系細胞に対して殺菌抵抗性を示す可能性
が報告されていた。さらに、病原性レプトス
ピラの全ゲノム配列が決定されていたが、レ
プトスピラ遺伝子がコードするアミノ酸配
列の約 41%は他の微生物のタンパクと有意
な相同性を示さず、独自のライフサイクルと
宿主感染機構を有していると考えられてい
た。

レプトスピラ感染患者は世界で年間 30-50
万人と推定されており、中南米、東南アジア
などの熱帯、亜熱帯地域ではマラリアやデ
ング熱に次いで重要な感染症である。また、地
球温暖化の影響により、発生地域の北上も憂
慮されている。したがって、レプトスピラ症
の病態形成を理解することは、レプトスピラ
症に対する新たな診断・治療・制御法の開発
のために重要である。

2. 研究の目的

本研究では、病原性レプトスピラの自然免
疫回避機構を明らかにすることを目的とし、
マクロファージへの感染機構に注目した。
マクロファージが細菌を消化・殺菌するまで
にはいくつかのファゴソームの成熟過程が
ある。病原細菌はこれらの成熟過程を操作す
ることによって、殺菌作用から回避している
と考えられる。マクロファージによる殺菌シ
ステムからのエスケープ機構は様々ではなく、
それぞれの病原細菌が独自の機構を進化
させてきている。本研究において新たなマ
クロファージ感染機構を明らかにすること
を目指した。

3. 研究の方法

(1) 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 を使用し、対照として非病原性細菌
の *L. biflexa* を使用した。また、個体感染モ
デルとして TLR4 シグナルが欠損している
C3H/HeJ マウスを用いた。病原性レプトス
ピラは継代培養の数が增えるにつれて病原性
を失うため、マウスへの感染実験系を確立し、
感染マウスの腎臓から菌を分離することによ
り病原性を保持した株を常時準備した。

(2) マウス骨髄由来マクロファージに病原
性レプトスピラおよび非病原性レプトスピ
ラを感染させた。その後、いったん細胞外の
菌を洗浄して除き抗菌薬にて処理を行った。
細胞外・細胞内の菌を時系列的に抗-レプト
スピラ抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。

(3) ファゴソームの成熟の解析は、レプト
スピラに対する抗体およびファゴソームの各
成熟過程のマーカーに対する抗体による免疫
染色を行い、感染マクロファージを時系列的
に解析した。初期エンドソームのマーカーと
して抗 EEA1 抗体、後期エンドソームやライソ

ゾームのマーカーとしては LAMP1 およびカテ
プシン D の抗体を用いた。また、酸性オルガ
ネラ内に濃縮される LysoTracker プローブと
FITC 標識したレプトスピラの共局在も時系列
的に解析した。

(4) レプトスピラがファゴゾームから細胞質
へエスケープする可能性も考えられたため、
透過型電子顕微鏡による解析を行った。

(5) 菌数の定量化は、リアルタイム PCR 法
および暗視野顕微鏡による算定によって行
った。

4. 研究成果

マウス骨髄由来マクロファージに病原性
レプトスピラおよび非病原性レプトスピラ
を感染させた結果、病原性レプトスピラで感
染させたマクロファージでは感染 4 時間経過
しても細胞内のファゴソームの数が減少し
ないのに対して、非病原性レプトスピラで感
染したマクロファージでは約 34%が菌を排
除していた。さらに、非病原性レプトスピラ
が感染 4 時間後にはマクロファージ内で消化
されているのに対して、病原性レプトスピラ
はスピロヘータの形体を保持したまま小胞
内で存在していた (図 1)。

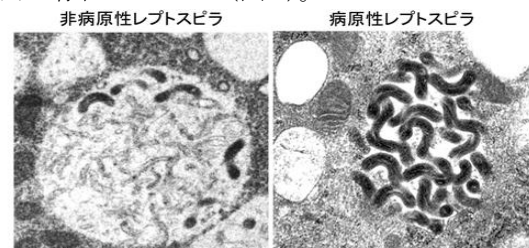


図1.感染4時間後の電子顕微鏡像

マクロファージに感染したレプトスピラ
が食後小胞内で生存する可能性が示唆
されたことから、この小胞が通常ファゴソ
ームと同様の経路をたどるのかあるいは特
殊な経路をたどるのかどうか調べるため
に、ファゴソームマーカータンパクの抗体
を用いて解析した。この小胞は初期エン
ドソームのマーカーである EEA1 と共局在
した。しかし、リソソームとの融合は非
病原性レプトスピラのファゴソームと
リソソームの融合よりは遅延している
ことが分かった。

次に、病原性レプトスピラがマクロ
ファージ内で生存できるかを明らかに
するためにマクロファージを 48 時間感
染させ、感染後の細胞内および細胞外
のサンプルを採取し、リアルタイム
PCR にてレプトスピラ由来の DNA
を定量的に解析した。感染 24 時間、
48 時間後のマクロファージでは病原
性レプトスピラでは細胞内の菌が検出
されたが、非病原性レプトスピラでは
検出されなかったため、病原性レ
プトスピラは細胞内で生存できる
ことが示唆された。また、病原性レ
プトスピラでは細胞外への菌の遊離
が認められた。リアルタイム PCR 法
では生菌と死菌が定量化

されるため、生菌数を算定するために、感染 24 時間および 48 時間後の細胞内および細胞外のサンプルを採取し、EMJH 培地にて 5~8 日間培養し、暗視野顕微鏡にて定量化した。その結果、病原性レプトスピラで感染したマクロファージでは感染 48 時間でも菌が培養可能であることが分かった。

以上の結果から、病原性レプトスピラはマクロファージに貪食された後、細胞内で生存し、一部の菌は細胞外へ再び遊離されることを明らかにした(図2)。これは、菌を含んだままマクロファージが体内を移動し全身感染や標的臓器への輸送を行う可能性を示唆した。

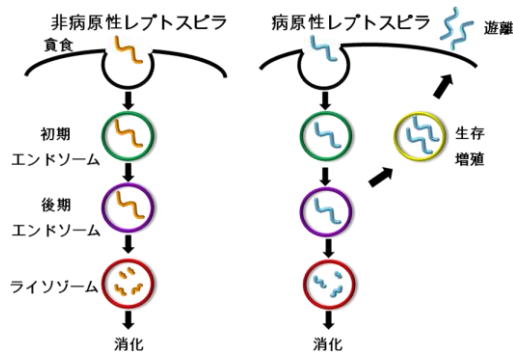


図2. マウス骨髄由来マクロファージでのライフサイクル

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5件)

- ① Koizumi Y, Toma C, Higa N, Nohara T, Nakasone N, Suzuki T. (2012) Inflammasome activation via intracellular NLRs triggered by bacterial infection. **Cell Microbiol.** 14: 149-154. 査読有
- ② Toma C, Okura N, Takayama C, Suzuki T. (2011) Characteristics features of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. **Cell Microbiol.** 13: 1783-1792. 査読有
- ③ Nakasone N, Toma C, Higa N, Koizumi Y, Ogura Y, and Suzuki T. (2011) Detergents enhance EspB secretion from *Escherichia coli* strains harboring the locus for the enterocyte effacement (LEE) gene. **FEMS Microbiol. Lett.** 315: 109-114. 査読有
- ④ McCoy AJ, Koizumi Y, Toma C, Higa N, Dixit V, Taniguchi S, Tschopp J, Suzuki T. (2010) Cytotoxins of the human pathogen *Aeromonas hydrophila* trigger, via the Nod-like receptor family, pyrin containing 3 inflammasome,

caspase-1 activation in macrophages.

Eur. J. Immunol. 40:2797-2803. 査読有

- ⑤ Toma C, Higa N, Koizumi Y, Nakasone N, Ogura Y, McCoy AJ, Franchi L, Uematsu S, Sagara J, Taniguchi S, Tsutsui H, Akira S, Tschopp J, Nunez G, Suzuki T. (2010) Pathogenic *Vibrio* activate NLRP3 inflammasome via cytotoxins and TLR/nucleotide-binding oligomerization domain-mediated NF- κ B signaling. **J. Immunol.** 184: 5287-5297. 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① Toma C, Koizumi Y, Okura N, Nakasone N, Higa N, Ogura Y, Takayama C, Suzuki T. *Leptospira interrogans* intracellular survival induces TRIF-dependent apoptosis in murine macrophages. IUMS 2011 (International Union of Microbiological Societies 2011 Congress). September 6-10, 2011. Hokkaido.
- ② Toma C, Koizumi Y, Okura N, Nakasone N, Higa N, Ogura Y, Takayama C, Suzuki T. Mechanisms of macrophage infection by *Leptospira interrogans*. 第83回日本細菌学会総会、2010年3月29日、パシフィコ横浜。
- ③ Toma C, Koizumi Y, Okura N, Nakasone N, Higa N, Ogura Y, Takayama C, Suzuki T. Mechanism of macrophage infection by *Leptospira interrogans*. Gordon Research Conference, Biology of Spirochetes, Ventura, CA, January 31-February 5, 2010.
- ④ Toma C, Koizumi Y, Okura N, Nakasone N, Higa N, Ogura Y, Takayama C, Suzuki T. Mechanism of macrophage infection by *Leptospira interrogans*. The 1st Conference on Intracellular Logistics. Okinawa, November 9-12, 2009.

[その他]

ホームページ等

- ① 細菌学講座ホームページ

<http://w3.u-ryukyu.ac.jp/bacteriology/>

- ② 琉球新報記事

<http://ryukyushimpo.jp/news/storyid-181369-storytopic-1.html>

- ③ 琉球大学医学部ホームページ

<http://www.med.u-ryukyu.ac.jp/category/new-information>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

Toma Claudia (TOMA CLAUDIA)

琉球大学・医学研究科・助教
研究者番号：40325832

(2) 研究分担者

鈴木 敏彦 (SUZUKI TOSHIHIKO)
琉球大学・医学研究科・教授
研究者番号：10292848

(3) 連携研究者

小泉 信夫 (KOIZUMI NOBUO)
国立感染症研究所・医学系・主任研究官
研究者番号：10333361