

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02727

研究課題名(和文) バイオイメージングで解き明かす人獣共通感染症細菌の宿主依存的病原性発現機構

研究課題名(英文) Bio-imaging reveals mechanisms of host-dependent pathogenicity of zoonotic bacteria

研究代表者

中村 修一 (Nakamura, Shuichi)

東北大学・工学研究科・准教授

研究者番号：90580308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：レプトスピラ症は、病原性レプトスピラ属によって引き起こされる人獣共通感染症である。本症の重症度は、レプトスピラの血清型と宿主種の組み合わせによって異なる。我々は、機械学習を取り入れた画像解析によって、培養腎細胞上における様々なレプトスピラ株の動態を測定した。その結果、腎細胞上を高速で這い回る運動性が重篤な症状を引き起こす傾向があることが示された。また、外膜タンパク質(OMP)を欠損した変異株の運動も解析した。臨床分離株とOMP欠損変異株の挙動から、接着性と運動性の逆相関関係が示され、この関係が感染転帰に影響する可能性が示唆された。本研究は、感染症研究における機械学習の有用性も示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、病原体の運動特性や付着性と病気の重症度を結び付け点、人獣共通感染症において重要な病原体の宿主選好性解明の手掛かりを示した点で、感染症研究としての大きな意義がある。本研究で発見した宿主細胞表面での病原体挙動に関する知見は、ユニバーサルワクチンの開発等、新しい治療・予防法の開発への貢献が期待されるものである。これに加えて、感染症研究におけるコンピュータービジョン技術の有用性を示すものであり、医学・生命科学分野と情報科学の双方の発展に寄与する。

研究成果の概要(英文)：Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by the pathogenic *Leptospira* spp. The severity of the disease differs for the combination of the leptospiral strains and host species. We measured the dynamics of various leptospiral strains over the cultured kidney cells using machine-learning-based image analysis. Our results showed that fast crawling motility on kidney cells tends to result in severe symptoms. We also analyzed the crawling of mutant strains lacking outer membrane proteins (OMPs). The behavior of clinical isolates and OMP-deficient mutants showed the inverse correlation between adhesion and motility, which could affect infection outcomes. Our computer vision technique eliminated the restriction on available bacterial strains and provided information that could help understand the mechanisms underlying motility-dependent bacterial pathogenicity.

研究分野：細菌学，生物物理学

キーワード：スピロヘータ 運動性 レプトスピラ 宿主選好性 病原性 人獣共通感染症 機械学習

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌感染症の重症度や保菌性などが宿主に依存する例は多く、病原体の宿主選びのメカニズムを理解することは感染拡大の抑止につながる重要事項である。しかし、宿主と細菌の共生や攻防は、分子レベルの複雑な相互作用によって成り立つため、十分な理解がなされていない。

本研究は、宿主選好性を有する細菌の例としてレプトスピラ症の病原体レプトスピラを取り上げ、その病原性と宿主選好性のメカニズムに迫ることを目的とした。レプトスピラ属には病原性種と非病原性種が含まれ、病原性種は組織表面に定着、細胞間に侵入し、黄疸、肺出血、腎不全を引き起こす（ヒトの重症型、ワイル病の場合）。外毒素を持たず、病原株のみが持つ多数の分子が病原因子候補として調べられてきたが、その中で、遺伝子ノックアウトによって劇的に弱毒化される決定的病原因子の1つが運動性である。しかし、運動性は非病原性種と病原性種に共通するため、これが感染、病態形成にどのように関わるかは不明であった。宿主選好性という点では、250以上の血清型に分類される本属菌は多様な哺乳動物に感染し、重症度は血清型と宿主の組み合わせに強く依存するが、研究当初はそのメカニズムが不明である。

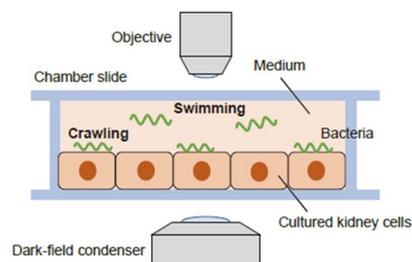


図1. *in vitro* 感染実験

2. 研究の目的

本研究は、レプトスピラ症の重症度が病原体の血清型と宿主種の組み合わせによって異なる理由を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

使用菌株・細胞 病原性レプトスピラ *Leptospira interrogans* の臨床分離株など計7株を使用した。トランスポゾンランダム変異挿入法で得た *L. interrogans* serovar Manilae 株由来の外膜タンパク質欠損株2株 (Δ LenA、 Δ LigA) も使用した。培養細胞には、ラット腎臓細胞 (NRK: 維持感染モデルとして) とイヌ腎臓細胞 (MDCK: 重症化モデルとして) を使用した。

顕微計測システム チャンバースライドに構築した培養細胞モノレイヤーにレプトスピラを感染させ、暗視野顕微鏡下で観察・録画した。顕微鏡像の録画は、チャンパー内の液相で遊泳運動するレプトスピラと、同一チャンパー内にある培養細胞層に付着して運動するレプトスピラをそれぞれ撮影した (図1)。培養細胞に付着しながら細胞表面を這いまわるように動く運動様式はクロウリング運動と呼ばれる。蛍光標識処理を行わずに腎臓細胞上のレプトスピラを検出するため、機械学習を用いた背景差分法による画像解析を行った。

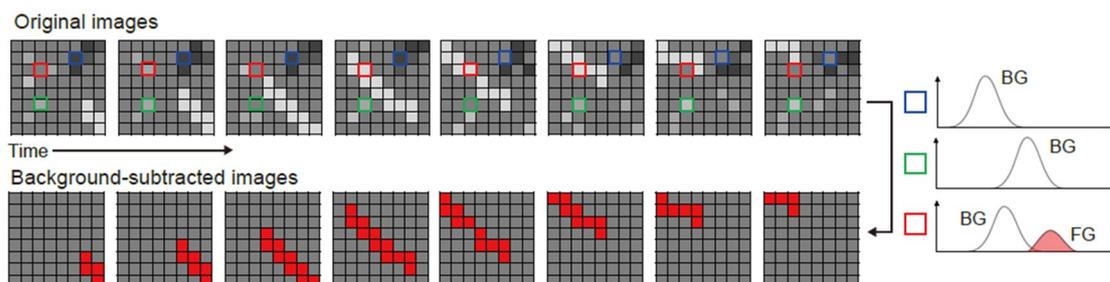


図2. 背景差分法

画像解析 監視カメラの物体検出などで実用化されている背景差分法を導入した(図2)。背景差分法は、ベイズの定理に基づいて、動かない背景(培養細胞)に対して、動く前景(レプトスピラ)を検出する手法である。はじめに、複数のガウス分布からなる分布モデルが設定される。次に、データ画像のピクセル毎に、新しいデータが分布モデルに追加される。ここでは、新しいデータが既存の分布に入るか、または新しい分布が形成され、データ追加ごとに分布のパラメータが更新される。実験データである動画の時間のうち、最も多くの時間を締めるのは背景であり、前景の時間割合は背景に比べてかなり小さいと予測される。このことから、最終的に得られた分布のうち、最も大きな分布が背景、最も小さな分布が追跡対象である前景であると判断される。この段階では、まだピクセル単位の解析であり、細菌とは認識されていない。このあと、ピクセル間のギャップを埋める膨張処理と、ノイズ除去効果のなる収縮という画像処理を行う。さらに、今回のターゲットであるレプトスピラに特徴的な菌体形状やサイズを指標にデータを選別し、最終的な重心トラッキングが行われる。以上の画像処理によって、ラット由来またはイヌ由来培養腎臓細胞上での様々なレプトスピラ菌株の遊泳運動とクロウリング運動を計測した。

4. 研究成果

In vitro 感染実験系の確立 スライドガラスチャンバー内に NRK または MDCK をシート状に培養することができた。レプトスピラ感染の直前にスライドガラスからチャンバーと取り外し、菌液を接種した後にカバーガラスをかぶせて暗視野顕微鏡で観察した。細胞シートに付着してクロウリング運動を示す菌と、細胞シートの上部にある液相で遊泳する菌をそれぞれ観察し、CCD ビデオカメラで撮影することができた。

ラベルフリー細菌トラッキング法の確立 本研究で開発した画像解析プログラムを用いて、蛍光蛋白質などで標識されていない(ラベルフリー)細菌の運動を追跡することに成功した。このシステムを用いて、様々なレプトスピラ血清型と腎臓細胞の組み合わせで実験を行った。図3に重症化傾向を示すペアと、無症状維持感染傾向を示すペアについて、代表的なデータを示した。重症化傾向を示すペアでは、細胞上のレプトスピラが進行的なクロウリング運動を示すのにな

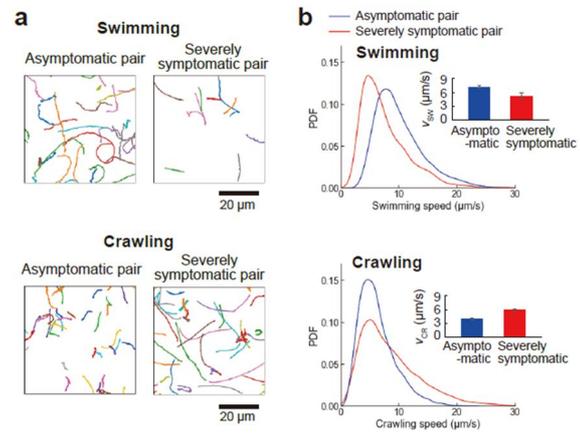


図3. 運動解析の結果。(a) 遊泳とクロウリングの軌跡。左が無症状傾向の組み合わせ、右が重症化傾向の組み合わせ。(b) 運動軌跡から求めた遊泳とクロウリングの速度分布。挿入図は平均値と標準誤差。

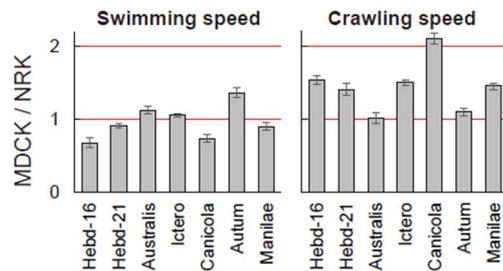


図4. MDCK(イヌ腎臓細胞)と NRK(ラット腎臓細胞)で計測された遊泳速度とクロウリング速度の比。

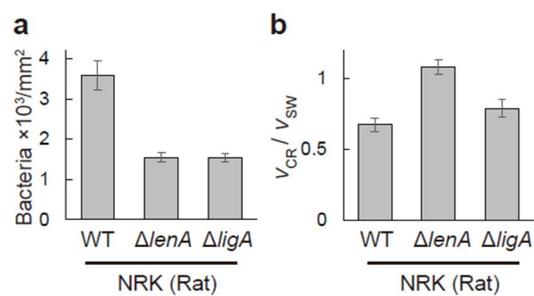


図5. MDCK(イヌ腎臓細胞)と NRK(ラット腎臓細胞)に付着した菌数。lenA と ligA は菌体外膜蛋白質の欠損株。

いし、無症状維持感染傾向のペアでは、細胞上のレプトスピラのクロウリング運動は抑制されていた。

重症化とクロウリング運動および細胞接着性の相関 図4は、NRK または MDCK に様々なレプトスピラ株を感染させ、遊泳速度とクロウリング速度を計測した結果である。重症化しやすい MDCK 上では、レプトスピラのクロウリングが活発である傾向が示された。図5は、腎臓細胞に対するレプトスピラの接着性を示している。これらの結果をまとめ、接着性

とクロウリング活性の関係をプロットした図6では、接着性が低いほどクロウリングが活発で、接着性が高いほどクロウリングが抑制されるという、接着とクロウリング運動の明らかな反相関関係が示された。さらに、重症化傾向ペアは弱い細胞接着性・高いクロウリング活性、無症状蛍光ペアは強い細胞接着性・低いクロウリング活性をそれぞれ示し、接着およびクロウリング運動と、レプトスピラ症の重症度との相関も明らかとなった。

今後の展望 同属内での病原性の差異、宿主選好性、付着、運動性はあらゆる病原性細菌で重要である。付着性およびクロウリング運動を規定する分子(遺伝子)が同定されることで、病原体の宿主嗜好性を標的とした新薬開発も期待される。

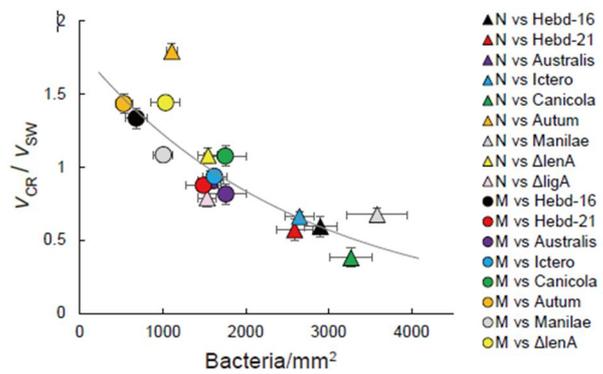


図6. 様々なレプトスピラ血清型の MDCK または NRK 上での接着と運動性を計測した結果。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Xu Jun, Koizumi Nobuo, Morimoto Yusuke V., Ozuru Ryo, Masuzawa Toshiyuki, Nakamura Shuichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Light dependent synthesis of a nucleotide second messenger controls the motility of a spirochete bacterium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6825
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10556-7	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 Keigo, Koizumi Nobuo, Nakamura Shuichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Machine learning-based motion tracking reveals an inverse correlation between adhesivity and surface motility of the leptospirosis spirochete	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7703
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-43366-0	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 Strnad Martin, Koizumi Nobuo, Nakamura Shuichi, VancovMarie, Rego Ryan O.M.	4. 巻 40
2. 論文標題 It's not all about flagella - sticky invasion by pathogenic spirochetes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Trends in Parasitology	6. 最初と最後の頁 378 ~ 385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pt.2024.03.004	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 4件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 阿部圭吾, 小泉信夫, 中村修一
2. 発表標題 腎臓細胞上におけるスピロヘータの接着と運動の反相関係
3. 学会等名 2022年度べん毛研究交流会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shuichi Nakamura
2. 発表標題 How fast? How flexible? Numbers gain our interest in bacteriology
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keigo Abe, Nobuo Koizumi, Shuichi Nakamura
2. 発表標題 Effect of the outer membrane (OM) molecules on the motility, physical property, and pathogenicity of Leptospira
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuichi Nakamura
2. 発表標題 Flagella-driven motility of bacteria
3. 学会等名 2022年度日本細菌学会関東支部インターラボセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部圭吾, 小泉信夫, 中村修一
2. 発表標題 背景分離法を利用した培養腎臓細胞上でのレプトスピラの運動解析
3. 学会等名 第58回レプトスピラ・シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuichi Nakamura
2. 発表標題 Inverse correlation between adhesivity and crawling motility in <i>Leptospira interrogans</i>
3. 学会等名 Gordon Research Conferences: Biology of Spirochetes (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Shuichi Nakamura
2. 発表標題 Exploring Bacterial Flagella and Motility with Biophysical Approaches
3. 学会等名 IEEE NANOMED 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shuichi Nakamura
2. 発表標題 Biophysics of Spirochetes
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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)	

6. 研究組織（つづき）

	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	加藤 貴之 (Kato Takayuki) (20423155)	大阪大学・蛋白質研究所・教授 (14401)	

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