

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16320

研究課題名（和文）レプトスピラの脂肪組織定着機構を利用したレプトスピラ症新規バイオマーカーの創出

研究課題名（英文）Creation of a novel biomarker for leptospirosis using the adipose tissue colonization mechanism.

研究代表者

尾鶴 亮 (Ozuru, Ryo)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：70763035

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、人獣共通感染症の原因細菌であるレプトスピラが脂肪組織に定着する機構を解明し、新規バイオマーカーを発見することを目指すものである。本研究ではヒト皮下脂肪組織のex vivo感染モデルを確立し、レプトスピラ感染によりヒト脂肪組織から複数のアディポカインが分泌されることを確認した。さらに、マウス由来脂肪前駆細胞株3T3-L1のin vivo感染モデルでは、病原性レプトスピラが脂肪分解を引き起こし、細胞外に放出されたグリセロールを炭素源として利用していることが示唆された。これらの結果は、レプトスピラ症の診断と治療に新たなアプローチを提供する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、病原細菌レプトスピラが皮下脂肪組織に定着し、そこで増殖するメカニズムを一部解明しました。またこの際に、レプトスピラが脂肪組織に脂肪分解を起こすことも見出しました。この発見は、レプトスピラ症の早期診断に役立つ新たなバイオマーカーの開発に繋がる可能性があります。レプトスピラ症は、軽度の風邪様症状から重篤なウイルス病に進行することがあり、早期診断と治療が非常に重要です。この研究は、社会全体にとって感染症対策の向上に寄与し、農業や畜産業の経済的損失を減少させる効果も期待されます。

研究成果の概要（英文）：This study aims to elucidate the mechanisms by which *Leptospira* establishes itself in adipose tissue and to identify novel biomarkers for leptospirosis. Using an ex vivo human subcutaneous adipose tissue infection model, we observed the secretion of multiple adipokines upon *Leptospira* infection, particularly those involved in inflammatory and immune responses. Additionally, in an in vivo infection model using mouse-derived preadipocyte cell line 3T3-L1, pathogenic *Leptospira* induced lipolysis, utilizing extracellular glycerol as a carbon source. These findings suggest new diagnostic and therapeutic approaches for leptospirosis, potentially advancing the management of this significant infectious disease.

研究分野：細菌学

キーワード：レプトスピラ レプトスピラ症 脂肪組織 脂質代謝 バイオマーカー 人獣共通感染症

1. 研究開始当初の背景

病原細菌「レプトスピラ」が引き起こす「レプトスピラ症 (Leptospirosis)」は世界最大の人獣共通感染症で、ヒトだけで年間 100 万件以上報告されている (World Health Organization 2003)。日本の感染症法では四類感染症に指定されており、と畜場法においては、患畜が発生した畜産場は全頭廃棄の対象となる。そのため医学・獣医学・農学・環境学といった分野横断的に注目すべき重要な感染症である。レプトスピラ症は、病態の初期では通常の風邪様の症状だが、重症化すると黄疸・腎不全・肺出血を伴う「ワイル病」に進行し、無治療での死亡率は 5~50%程度まで跳ね上がる (Levett PN. Clin Microbiol Rev. 2001)。予防に重要なワクチンの効果は、250 種類以上知られる「血清型」に特異的であり、十分とは言い難い。そのため早期発見に重要な迅速診断法やバイオマーカーの確立が急務である。

申請者らは、レプトスピラがモデル動物であるハムスターに経皮感染した後、皮下脂肪組織の血管内で定着・増殖することを見出した (Ozuru R, et al. PLOS ONE 2017)。レプトスピラはグルコース代謝に関わる解糖系の一部酵素を欠損しており、中性脂肪の構成分子である脂肪酸 (Fatty acids; FAs) やグリセロール (Glycerol; GOL) を炭素源として利用することが知られている (Stalheim OH and Wilson JB. J Bacteriol. 1964, Ren S-X, et al. Nature. 2003)。レプトスピラが感染初期に、自身の炭素源が豊富な脂肪組織に定着し増殖することは極めて合理的である。このメカニズムを解明することは、レプトスピラ症新規バイオマーカーの創出につながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが見出したレプトスピラの脂肪組織定着機構を解明することで、レプトスピラ症新規バイオマーカーの創出につなげることを目的とした。具体的には

- (1) レプトスピラのヒト皮下脂肪組織 ex vivo 感染モデルを構築し、その解析からレプトスピラ感染時の脂肪組織由来バイオマーカー、特に脂肪細胞が産生・分泌する生理活性物質である「アディポカイン」を探索する
- (2) レプトスピラのマウス由来脂肪前駆細胞株 3T3-L1 in vivo 感染モデルを構築し、その解析からレプトスピラ感染時に起こる細胞内シグナル伝達や免疫応答を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) レプトスピラのヒト皮下脂肪組織 ex vivo 感染モデルの構築と解析

ヒト皮下脂肪組織 ex vivo 培養法の確立

ここで用いたヒト皮下脂肪組織は、福岡大学病院形成外科学分野が行う手術中に採取された余剰検体を譲受した。本研究は「福岡大学人を対象とする研究倫理審査委員会」の審査を受けて行われた (承認番号 U21-08-001)。譲受したヒト皮下脂肪組織は McIlwain ティッシュチョッパー (Cavey Laboratory) を用いて 500 μm 厚にスライスし、24 ウェルプレート内で D-MEM / 10% FBS / ITS (Insulin / Transferrin / Selenium, Sigma) メディウムで培養した。

ヒト皮下脂肪組織 ex vivo 感染モデルの培養上清中アディポカイン測定

ヒト皮下脂肪組織 ex vivo 培養開始 3 日後に、病原性レプトスピラ (*L. interrogans* serovar Manilae strain L495) を 2×10^5 菌体 / ウェル添加し、6 時間後、24 時間後にそれぞれ培養上清を回収した。回収した培養上清は遠心分離 (13,000 rpm, 5mins, 4°C) した後再度上清を回収した。その後、Proteome Profiler Human Adipokine Array Kit (R&D systems) を用い上清中の各種アディポカインを測定した。

(2) レプトスピラのマウス由来脂肪前駆細胞株 3T3-L1 in vivo 感染モデルの構築と解析

脂肪細胞誘導 10 日後の 3T3-L1 細胞を、24 ウェルプレートに 2×10^4 細胞 / ウェルで播種した。播種 2 日後に、病原性レプトスピラ (*L. interrogans* serovar Manilae strain L495) および非病原性レプトスピラ (*L. biflexa* serovar Patoc strain Patoc I) をそれぞれ MOI = 100 (2×10^6 菌体 / ウェル) で添加した。同時に、各株の加熱死菌 (56°C、30 分) を添加した群も作成した。感染後 1 日、3 日、5 日で次の操作を行なった。

3T3-L1 細胞の固定と Oil-Red-O 染色

細胞は 4% パラホルムアルデヒド含 PBS で固定した (30 分、室温)。PBS による洗浄後、Oil-Red-O を用いて細胞内中性脂肪を染色した。染色後の細胞はヘマトキシリンで後染色し形態観察を行った。また別サンプルより細胞内 Oil-Red-O を抽出し定量した。

培養上清の回収と細胞傷害解析・グリセロール定量・レプトスピラ菌量測定

回収した培養上清を遠心分離 (13,000 rpm, 5mins, 4°C) した後再度上清を回収した。細胞傷害を解析するため、上清中の Lactate Dehydrogenase (LDH) 量を CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega) を用いて定量した。さらに上清中のグリセロール量を Glycerol Cell-Based Assay Kit (Cayman chemical) を用いて定量した。さらに別サンプルを用い、培養上清中のレプトスピラの菌数を限界希釈法によって測定した。

4. 研究成果

(1) レプトスピラのヒト皮下脂肪組織 ex vivo 感染モデル

L495 感染ヒト脂肪組織の培養上清中からは、特に 24 時間時点で複数のアディポカインが検出された (図 1)。特に炎症性サイトカインである IL-6、免疫系細胞の走化性因子である IL-8、MCP-1、RANTES、MHC クラス II の抗原提示に必要な Cathepsin L/S、補体系で働く CFD など、免疫系で重要な分子群が検出された。これらは単体で検出しても他の感染症や疾患との差異がない可能性が高い。そのため、複数を組み合わせてバイオマーカー群とするなどの工夫が必要であると考えられる。

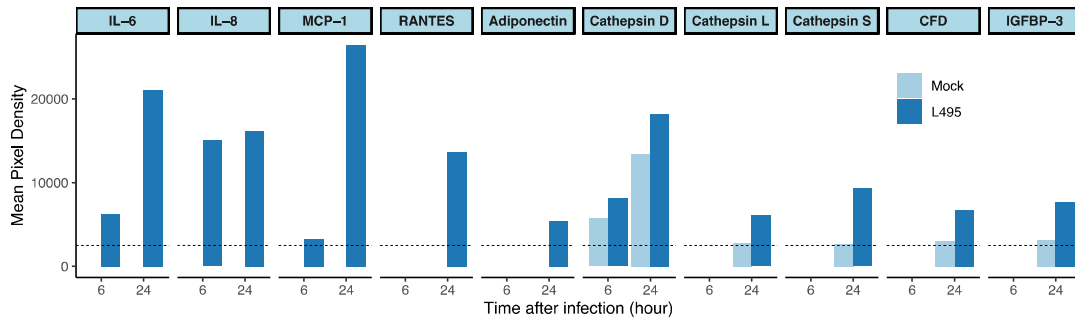


図 1 : L495 株感染脂肪組織の培養上清中のバイオマーカー候補。

(2) レプトスピラのマウス由来脂肪前駆細胞株 3T3-L1 in vivo 感染モデル

L495 (病原性株) を感染させたマウス由来脂肪前駆細胞株 3T3-L1 では、非感染群、Patoc I (非病原性株) 感染群、それぞれの加熱死菌群に比べ有意に細胞内中性脂肪量が減少し、L495 特異的に脂肪分解が起こった (図 3 A, B)。一方細胞傷害は他群と比較して差があるとは言えず、細胞傷害や細胞死による脂肪減少ではないことが示された (図 3 C)。

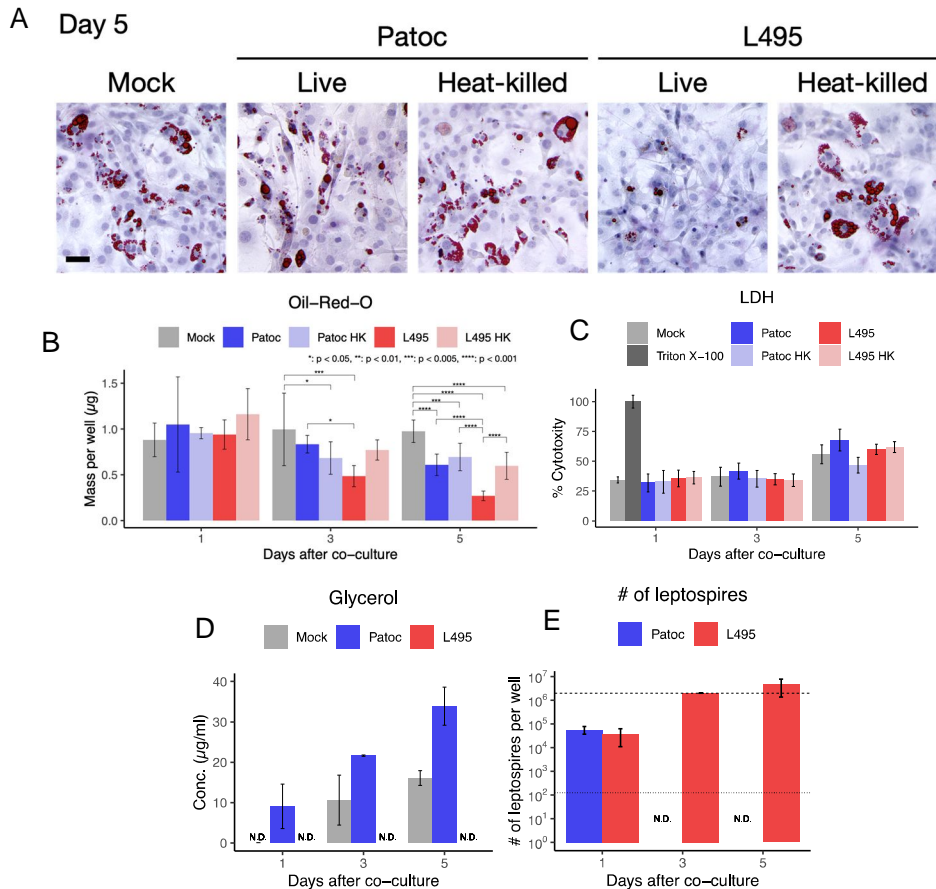


図 3 : レプトスピラの脂肪分解。(A)各感染条件における 3T3-L1 細胞の Oil-Red-O 染色像。(B)Oil-Red-O 定量。(C)細胞障害指標となる LDH (Lactate dehydrogenase) 定量。(D)培養上清中 GOL 量。(E)レプトスピラ菌量。N.D.: not detected.

非感染群、非病原性感染群の培養上清では経時的にグリセロール量が増加したが、病原性群の培養上清では全時点でグリセロールは検出されなかった（図3D）。レプトスピラの菌数は、いずれも感染1日後は初期添加量の10分の1以下まで低下し、その後非病原性群では検出限界以下まで減少した一方、病原性群では感染3日後に初期添加量と同等まで増加した。病原性レプトスピラは宿主に脂肪分解を促し、それによって細胞外に放出されるグリセロールを炭素源として利用している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sakamoto Atsuhiko, Yoshimura Michinobu, Itoh Ryota, Ozuru Ryo, Ishii Kazunari, Sechi Yusuke, Nabeshima Shigeki, Hiromatsu Kenji	4. 巻 10
2. 論文標題 Longitudinal Dynamics of SARS-CoV-2 IgG Antibody Responses after the Two-Dose Regimen of BNT162b2 Vaccination and the Effect of a Third Dose on Healthcare Workers in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 830 ~ 830
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/vaccines10060830	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 16
2. 論文標題 A machine learning model of microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0259907
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0259907	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
1. 著者名 Nakano Risa, Oyamada Yuji, Ozuru Ryo, Yoshimura Michinobu, Hiromatsu Kenji	4. 巻 222
2. 論文標題 Objectification of evaluation criteria in microscopic agglutination test using deep learning	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 106955 ~ 106955
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mimet.2024.106955	査読の有無 有
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 Yoshimura Michinobu, Sakamoto Atsuhiko, Ozuru Ryo, Kurihara Yusuke, Itoh Ryota, Ishii Kazunari, Shimizu Akinori, Chou Bin, Nabeshima Shigeki, Hiromatsu Kenji	4. 巻 139
2. 論文標題 The appearance of anti-spike receptor binding domain immunoglobulin G4 responses after repetitive immunization with messenger RNA-based COVID-19 vaccines	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1 ~ 5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijid.2023.11.028	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 Yoshimura Michinobu, Sakamoto Atsuhiko, Ozuru Ryo, Kurihara Yusuke, Itoh Ryota, Ishii Kazunari, Shimizu Akinori, Chou Bin, Sechi Yusuke, Fujikane Aya, Nabeshima Shigeki, Hiromatsu Kenji	4. 巻 10
2. 論文標題 Insufficient anti-spike RBD IgA responses after triple vaccination with intramuscular mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e23595 ~ e23595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2023.e23595	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 -

[学会発表] 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 尾鶴 亮、石井 一成、廣松 賢治
2. 発表標題 レプトスピラ感染による宿主の脂質代謝変化
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 尾鶴 亮、石井 一成、廣松 賢治
2. 発表標題 病原性レプトスピラ感染による宿主の免疫応答と脂質代謝変化
3. 学会等名 第16回細菌学若手コロッセウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Ozuru, Michinobu Yoshimura, Yusuke Kurihara, Kazunari Ishii, Kenji Hiromatsu
2. 発表標題 PATHOGENIC LEPTOSPIRES INDUCE LIPOLYSIS IN HOST ADIPOCYTES TO OBTAIN THEIR CARBON SOURCES.
3. 学会等名 12th International Leptospirosis Society Conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾鶴 亮、中野 里咲、小山田 雄仁
2. 発表標題 凝集反応検査を自動化する - レプトスピラ症における顕微鏡下凝集試験の深層学習判定モデルを基に -
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾鶴 亮、石井 一成、栗原 悠介、藤木 正太郎、吉村 芳修、廣松 賢治
2. 発表標題 アドレナリン受容体を介したレプトスピラの宿主脂質分解
3. 学会等名 第59回レプトスピラシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryo Ozuru, Risa Nakano, Yuji Oyamada, Satoshi Miyahara, Michinobu Yoshimura, Kenji Hiromatsu
2. 発表標題 Seeing is believing: Making Agglutination Tests from Qualitative to Quantitative with Deep Learning
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryo Ozuru, Michinobu Yoshimura, Shotaro Fujiki, Kazunari Ishii, Akinori Shimizu, Yusuke Kurihara, Shuntaro Kuwahara, and Kenji Hiromatsu
2. 発表標題 Percutaneously Infected Leptospira Induces Lipolysis in the Host Adipose Tissue.
3. 学会等名 13th International Leptospirosis Society Conference 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ryo Ozuru, Michinobu Yoshimura, Shotaro Fujiki, Kazunari Ishii, Akinori Shimizu, Yusuke Kurihara, Shuntaro Kuwahara, Kenji Hiromatsu
2. 発表標題 Pathogenic Leptospira induces lipolysis in the murine adipocytes in vitro and in vivo
3. 学会等名 第97回日本細菌学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ryo Ozuru, Kazunari Ishii, Shotaro Fujiki and Kenji Hiromatsu
2. 発表標題 Pathogenic leptospire induce lipolysis in the host adipocytes via adrenergic receptors to obtain their carbon sources.
3. 学会等名 The 21st Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryo Ozuru, Yusuke Kurihara, Kazunari Ishii, Shotaro Fujiki, Michinobu Yoshimura and Kenji Hiromatsu
2. 発表標題 A unique strategy for acquiring carbon sources: Leptospira induces lipolysis in the host adipocytes via adrenergic receptors.
3. 学会等名 Gordon Research Conference 2024 Biology of Spirochetes (国際学会)
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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