

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460534

研究課題名(和文) リケッチアのトロピズム決定および病原性発現の機構解明

研究課題名(英文) Study on the mechanisms of determination of the tropism and expression of the pathogenicity of Rickettsia

研究代表者

内山 恒夫 (UCHIYAMA, Tsuneo)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授

研究者番号：90151901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：リケッチアのトロピズムおよび病原性は宿主細胞への付着能・増殖能に大きく依存していると考えられている。紅斑熱非発生地域のマダニより分離した9株のリケッチアの内、7株はRickettsia japonicaに遺伝学的に非常に近縁で、高い交差抗原性を有していた。さらに、標的細胞の血管内皮初代培養細胞への付着能・増殖能を調べた結果、R. japonicaを含む病原性リケッチに比べ、いずれも非常に低かった。これらの結果は、この地域で患者が発生しないにも係らず、住民の十数%が抗R. japonica抗体を持つ事実と一致しており、紅斑熱の疫学に新たなパラダイムを提起する知見である。

研究成果の概要(英文)：It is believed that tropism and pathogenicity of rickettsiae largely depend on their abilities of adherence to and growth in their host cells. Among the nine isolates from the ticks in the area where no spotted fever rickettsiosis occur, seven strains are very close to Rickettsia japonica genetically and possess highly cross-reactive antigenicity. Moreover, the abilities of adherence to and growth in the target endothelial cell primary culture are very low comparing to those of pathogenic rickettsiae including R. japonica. These results are consistent with the fact that no spotted fever patients have been seen in the area but that more than ten percent of the habitat have antibody to R. japonica and propose a new paradigm to the epidemiology of spotted fever.

研究分野：細菌学

キーワード：リケッチア トロピズム 病原性 系統樹 紅斑熱群 疫学 マダニ 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) リケッチア群の媒介節足動物および宿主細胞トロピズム :

ほとんどのリケッチアは発疹チフス群リケッチア (TGR) と紅斑熱群リケッチア (SFGR) とに分類される。TGR の媒介節足動物 (ベクター) のシラミ、ノミなどは昆虫類に属し、SFGR のベクターのマダニ、小型ダニなどは蜘蛛類に属する。我々はマダニ由来細胞、昆虫由来細胞を用いた増殖実験により、リケッチアのベクタートロピズムが主に細胞レベルで規定されており、TGR とマダニ由来細胞、SFGR と昆虫細胞の組み合わせでは、リケッチアの細胞への付着侵入は起こるが、細胞内増殖が抑制を受けること、また、SFGR の昆虫細胞への付着侵入後に、ネクローシス様の細胞死が誘導されることを見出していた。

(2) リケッチアの病原性と増殖能 :

マダニが保有する SFGR 非病原性株の多くは哺乳動物細胞での増殖性が悪いことが分かっていた (非病原性株の *R. montanensis*、*Rickettsia* sp. LON は哺乳動物細胞内で増殖抑制を受けている)。そのため、紅斑熱患者発生地域に比べ、非発生地域ではマダニの非病原性株保有率が高いことが推測された。

(3) リケッチアの宿主細胞への付着侵入 :

リケッチアの宿主細胞への付着侵入は病原性発現には必須の過程である。通性細胞内寄生細菌のサルモネラ、赤痢菌、リステリアの付着侵入機構は詳細に解明されているが、リケッチアについては申請者らを含めたいくつかの研究しかなく、SFGR の哺乳動物細胞への付着侵入に Sca 外膜蛋白質群 (Sca0 [=rOmpA]、Sca1、Sca2、Sca5 [=rOmpB]) の関与が示されるにとどまっていた。リケッチアゲノムは進化的に縮小傾向にあるが、他の細菌と比較して有意にコピー数が多い 5 遺伝子群のうちのひとつが *sca* 遺伝子群であることから、その重要性が推測されていた。

2. 研究の目的

リケッチアのトロピズムおよび病原性は媒介節足動物、終末哺乳動物の細胞への付着侵入能および増殖能に大きく依存していると考え

えられる。紅斑熱非発生地域のマダニからリケッチアを分離し、病原性リケッチア *R. japonica* との遺伝学的近縁性、抗原性、各種細胞への付着能、増殖能を比較しながら解析し、リケッチアのトロピズム決定および病原性発現の機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

紅斑熱非発生地域でマダニを採集し、培養哺乳動物細胞、マダニ細胞を用いてリケッチアを分離した。分離株の遺伝学的解析、抗原性解析、付着能・増殖能の解析を行った。

(1) 非病原性リケッチアのマダニからの分離と性状解析 :

a) マダニからのリケッチア分離 ;

紅斑熱非発生地域で約 1,500 個体のマダニを採集した。マダニを一個体ずつすり潰し、哺乳動物細胞 (Vero)、マダニ細胞 (DALBE3、ISE6) にそれぞれ接種し、細胞変性効果、ヒメネス染色、免疫染色を指標としてリケッチアを分離した。

b) 分離株の性状解析 ;

分離株について、遺伝学的・生化学的性状、細胞付着能、細胞内増殖能を解析した。

(2) リケッチアの付着・侵入・増殖過程で機能する外膜蛋白質の同定 :

a) 病原性株、分離株の rOmpB を菌体表面に発現する組換え大腸菌の作製 ;

蛋白質発現プラスミド pET-22b(+) の *pelB* リーダー配列の下流に各 ORF を挿入したベクターで大腸菌 BL21(DE3) をトランスフォームし、組換え大腸菌を作製した。

b) 組換え大腸菌の宿主細胞への付着能の検討 ;

組換え大腸菌を哺乳動物細胞 (Vero) に接種し、その付着能を解析した。

4. 研究成果

(1) 非病原性リケッチアのマダニからの分離と性状解析 :

a) マダニからのリケッチア分離 ;

日本紅斑熱患者の発生が見られない徳島県吉野川北岸地域 (図 1) で採集したマ

ダニの内容物を接種した培養細胞より 10 株のリケッチアが分離された(表 1)。その後の解析に用いたその内の 9 株の Vero 細胞におけるブラックは、病原性株によるブラックに比べて非常に小さかった。



図 1. 徳島県における日本紅斑熱患者発生地域と非発生地域

表 1. 分離株の由来マダニおよび Vero 細胞におけるブラック形成

Pathogenic species and the isolates from ticks	Species of tick from which the isolate was derived	Plaques on Vero cells			
		Observation	Size (mm)	Shape	
P ¹	<i>R. rickettsii</i>	—	CV ³	1.5-3.0	●
	<i>R. conorii</i>	—	CV	1.5-3.0	●
	<i>R. japonica</i>	—	CV	1.5-3.0	●
I ²	V5-7	<i>Haemaphysalis flava</i> , nymph	IS ⁴	0.15-0.30	*
	D56-21	<i>Amblyomma testudinarium</i> , nymph	IS	0.40-0.60	-
	V73-6	<i>Ixodes turdus</i> , nymph	NT ⁵	—	-
	V73-23	<i>H. longicornis</i> , adult	IS	0.10-0.15	-
	V74-15	<i>H. longicornis</i> , adult	IS	0.10-0.15	-
	V74-16	<i>H. longicornis</i> , adult	IS	0.10-0.15	-
	V74-17	<i>H. longicornis</i> , adult	IS	0.10-0.15	-
	V74-19	<i>H. longicornis</i> , adult	IS	0.10-0.15	-
	V75-12	<i>H. flava</i> , nymph	IS	0.10-0.15	-
	V77-19	<i>H. flava</i> , adult	IS	0.10-0.15	-

P¹: pathogenic species. I²: the isolates. T⁵: not tested. CV³: Vero cell monolayers were fixed and stained on the day 11 and the plaques were counted. IS⁴: Vero cell monolayers were fixed on the day 11 and immunostained with antisera to *R. japonica* or the patient sera. The stained foci of cells were counted.

b) 分離株の性状解析:

b-1) 系統樹解析;

分離株 V5-7 は祖先群に属していた。また、分離株 D56-21 は *R. tamurae* (現在まで患者から分離されていない) と非常に近縁であった。他の 7 株は病原性の *R. japonica* に非常に近縁であった。

b-2) 抗原性解析 (表 2);

全ての分離株 (Lanes 1-10) が *R. japonica* 種特異的抗 rOmpA mAbs とは反応しなかった。*R. japonica* 種特異的抗 rOmpB mAbs の内、7 つの分離株 (Lanes 4-10) については反応するものとしめないものがあった。また、他の分離株 (Lanes 1-3) はいずれ

の mAbs とも反応しなかった。これらの結果から、*R. japonica* と近縁の 7 株は *R. japonica* と強い共通抗原性を持つことが分かった。

表 2. 分離株の抗原性解析

Lane	Isolate	Reactivity (+)	Reactivity (-)
1	V5-7	S1, S2	A1, A2, A3, A4, A5, A6 B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8
2	D56-21	S1, S2	A1, A2, A3, A4, A5, A6 B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8
3	V73-6	None	S1, S2 A1, A2, A3, A4, A5, A6 B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8
4	V73-23	S1, S2 B1, B4, B5, B6	A1, A2, A3, A4, A5, A6 B2, B3, B7, B8
5	V74-15	S1, S2 B1, B4, B5, B6	A1, A2, A3, A4, A5, A6 B2, B3, B7, B8
6	V74-16	S1, S2 B1, B4, B5, B6	A1, A2, A3, A4, A5, A6 B2, B3, B7, B8
7	V74-17	S1, S2 B1, B4, B5, B6	A1, A2, A3, A4, A5, A6 B2, B3, B7, B8
8	V74-19	S1, S2 B1, B4, B5, B6	A1, A2, A3, A4, A5, A6 B2, B3, B7, B8
9	V75-12	S1, S2 B1, B4, B5, B6	A1, A2, A3, A4, A5, A6 B2, B3, B7, B8
10	V77-19	S1, S2 B1, B4, B5, B6	A1, A2, A3, A4, A5, A6 B2, B3, B7, B8
11	<i>R. japonica</i>	S1, S2 A1, A2, A3, A4, A5, A6 B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8	None

Antisera:

S1=Rabbit anti serum to *R. japonica*;

S2=Patient serum, HH920807

Species-specific mAbs to heat-labile epitopes of *R. japonica* rOmpA:

A1=2Y1-D4; A2=3Y2-B9; A3=3Y3-C4; A4=3Y3-F1; A5=3Y6-E5;

A6=3Y8-C

Species-specific mAbs to heat-labile epitopes of *R. japonica* rOmpB:

B1=3Y3-A8; B2=3Y3-B5; B3=3Y6-C1; B4=3Y6-G9; B5=3Y7-C9;

B6=3Y7-H6; B7=3Y8-G7; B8=3Y10-D1

b-3) 血管内皮細胞への付着能 (図 2);

血管内皮細胞 (HUVEC、HMVEC) へのリケッチアの付着能は Vero 細胞への付着能に比べて非常に低かった。また、病原性株に比べ、分離株の血管内皮細胞への付着能はいずれも非常に低かった。

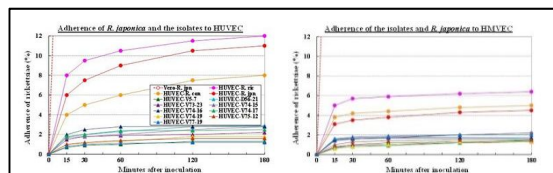


図 2. 血管内皮細胞への分離株および病原性株の付着(MOI=2.0 pfu/cell)

b-4) 血管内皮細胞での増殖能 (図 3);

分離株の血管内皮細胞 (HUVEC、HMVEC) における増殖能は *R. japonica* の増殖能に比べ低かった。

特に、HMVEC における分離株の増殖は MOI=0.01 では V5-7 および D56-21 以外は認められないようにみえたが、付着の影響を除外するため MOI=3 で感染した場合、これらの分離株でも低いながら、増殖が認められた。

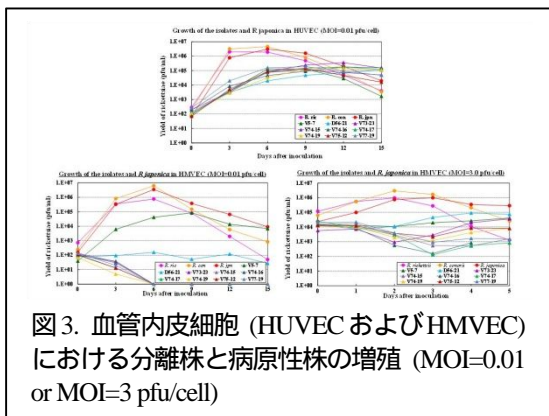


図3. 血管内皮細胞 (HUVEC および HMVEC) における分離株と病原性株の増殖 (MOI=0.01 or MOI=3 pfu/cell)

(2) リケッチアの付着・侵入・増殖過程で機能する外膜蛋白質の同定：

a) 病原性株、分離株の rOmpB を菌体表面に発現する組換え大腸菌の作製；

蛋白質発現プラスミド pET-22b(+)の *pelB* リーダー配列の下流に各分離株および病原性の紅斑熱群リケッチア *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. japonica* の *ompB* 遺伝子の ORF を挿入した発現ベクターで大腸菌 BL21(DE3) をトランスフォームし、組換え大腸菌を作製した。発現誘導により各リケッチアの rOmpB を菌体表面に発現する大腸菌を得た。

b) 組換え大腸菌の宿主細胞への付着能の検討；

各 rOmpB 発現大腸菌を哺乳動物細胞 (Vero)、に接種したところ、いずれも細胞への付着が認められた。また、病原性株の rOmpB を発現する大腸菌に比べ、分離株の rOmpB を発現する大腸菌は Vero 細胞への付着効率が低かった。

(3) 考察：

これらの結果は、分離株に感染すると発症しない程度にわずかにリケッチアが増殖して免疫が付与される可能性を示しており、吉野川北岸地域が紅斑熱非発生地域であると同時に、一部の住民 (約十数%) が *R. japonica* 抗体陽性である事実と合致していると考えられた。

また、病原性リケッチアに比べ、分離株の付着能は弱い、その理由の少なくとも一部は rOmpB の付着能の弱さに由来していると考えられた。

従来、日本紅斑熱非発生地域に生息するマ

ダニは *R. japonica* を保有しないということのみが考えられてきたが、本研究により、紅斑熱非発生地域に生息するマダニは、病原性リケッチアに近い抗原性を持つが、人での増殖能が低い非病原性と推測されるリケッチアを有することがあるという紅斑熱群リケッチア症の疫学の新しいパラダイムが提起された。

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 1 件)

1. Ogawa, M., Fukasawa, M., Satoh, M., Hanada, K., Saijo, M., Uchiyama, T., and Ando, S. 2014. The intracellular pathogen *Orientia tsutsugamushi* responsible for scrub typhus induces lipid droplet formation in mouse fibroblasts. *Microbes Infect.*16:962-966. (査読有)

[学会発表](計 7 件)

1. 内山恒夫 (2016年3月) 付着能の弱いリケッチア株の主要外膜蛋白質 rOmpB を菌体表面に発現する大腸菌の作製. 第89回日本細菌学会総会. 大阪国際交流センター (大阪府大阪市)
2. 内山恒夫, 山本 大、清水一磨 (2015年11月) 紅斑熱非発生地域のマダニより分離したリケッチアの系統樹解析. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
3. 内山 恒夫, 山本 大 (2015年3月) 紅斑熱非発生地域のマダニから分離したリケッチアの血管内皮細胞における増殖性. 第88回日本細菌学会総会. 岐阜国際会議場 (岐阜県岐阜市)
4. 内山恒夫 (2014年11月) 紅斑熱非発生地域のマダニより分離したリケッチアの性状解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
5. 内山恒夫 (2014年3月) 徳島県吉野川以北に生息するマダニから分離したリケッチアの性状解析. 第87回日本細菌学会総会. タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

6. 内山恒夫 (2013 年 11 月) 紅斑熱群リケッチアのブラックサイズ変異体の性状解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
7. 内山恒夫 (2013 年 9 月) 徳島県吉野川以北に生息するマダニからのウイルス分離. 第 22 回日本ダニ学会大会. 静岡県総合研修所もくせい会館 (静岡県静岡市)

〔図書〕(計 1 件)

1. 内山恒夫. リケッチア —紅斑熱群—. 新居士郎・倉田 毅・林 英生・本田武司・小田 紘・松本 明 編. 病原細菌・ウイルス図鑑. 北海道大学出版会. 北海道. 印刷中.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

内山 恒夫 (UCHIYAMA, Tsuneo)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号 : 90151901