

宮崎県のダニ媒介性感染症に関する重症化因子の探索及び疫学分析

微生物部：成田翼、新田真依子、水流奈己、鬼塚咲良、矢野浩司
宮崎大学産業動物リサーチセンター：岡林環樹

1

背景

- ▶ 宮崎県はSFTS患者の発生が全国で最も多い
 - ▶ SFTSは日本で最初の患者発生より10年以上経っているが、重症化のメカニズム等不明なことが多い
 - ▶ 近年、SFTSにPyroptosis（炎症性プログラム細胞死）が関わっているとの報告が相次いでなされている
- ※プログラム細胞死：アポトーシス、ネクロトーシスなど

2

研究目的

昨年まで当初で行なっていたSFTSVの全ゲノム解析データ、臨床データ及びPyroptosis因子や炎症性因子に関するELISAデータを用いて統計解析を行い、SFTSの重症化因子を探索すること。

※ここでの重症化の定義は患者の生存/死亡

なぜ患者が亡くなるのかを調べる!!

3

対象と方法

対象

2012年から2025年までに当所でSFTS陽性が確認された患者から得られたゲノムデータ、臨床データ及びPyroptosis因子や炎症性因子に関するELISAデータ。

方法

①SFTSVゲノムと特徴

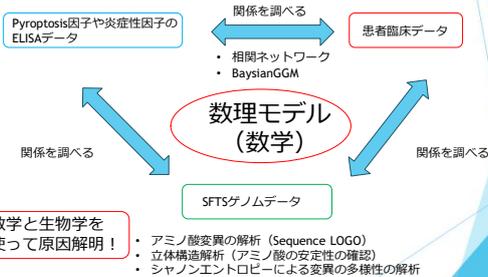
Sequence LOGOの作成、シャノンエントロピーの計算、SFTSVの立体構造の確認

②患者データ及びELISAデータを用いた重症化因子の探索

相関ネットワーク解析を用いた因子同士のコミュニティの特定、エンリッチメント解析 (KEGG/GO)

4

研究の流れ（数理モデルで重症化の原因を調べる）



5

シャノンエントロピーって何？

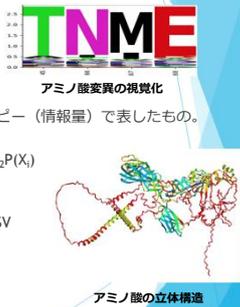
- ▶ 乱雑さを示す指標（今回の場合は、**アミノ酸変異の多様性**）
- ▶ エントロピーとは、物理用語の1つ
- ▶ 自然界ではエントロピーは増大する（乱雑な）方向に向かう（エントロピー増大の法則）→物理学的には熱力学第二法則
- ▶ 身近の例：
 1. 部屋はほっておくと散らかってしまう（秩序のある方向に向かうにはエネルギー（片付け）が必要）
 2. **熱いものは放っておけば冷たくなるが、冷たいものは放っておいても熱くならない**（熱くするにはエネルギー（加熱）が必要）

アミノ酸配列のエントロピーが高い=アミノ酸配列のパターンが沢山ある=アミノ酸変異が多様

6

SFTSVゲノムと特徴

- ▶ Sequence LOGO
アミノ酸の変異を視覚化したもの
- ▶ シャノンエントロピー
アミノ酸の変異の乱雑さ(多さ)をエントロピー(情報量)で表したもので、シャノンエントロピー=情報量の期待値
 $H(X) = -\sum P(X_i) \log_2 P(X_i)$
- ▶ SFTSVの立体構造
AI(alphafold2)により、アミノ酸配列からSFTSVの立体構造の推定
→ウイルス側の**病原性予測**に必要



アミノ酸変異の視覚化

アミノ酸の立体構造

7

患者データ及びELISAデータを用いた重症化因子の探索

- ▶ 相関ネットワーク
相関のある因子を線で繋いで因子同士の関係性を視覚化
ネットワーク構造から同一グループを特定
→線が引かれていない場合、関係は薄い
- ▶ BayesianGGM
基本的な考え方は相関ネットワークと同じ
直接的に相関のある因子同士を線で繋いで関係性を視覚化(直接的でない関係の例: 風が吹けば桶屋が儲かる)
- ▶ KEGG/GO
相関ネットワークで作成されたグループの中の項目がどういった生体反応に関係しているかを確認
これにより、Pyroptosis因子や炎症性因子が**重症化に関わっているか**を判別



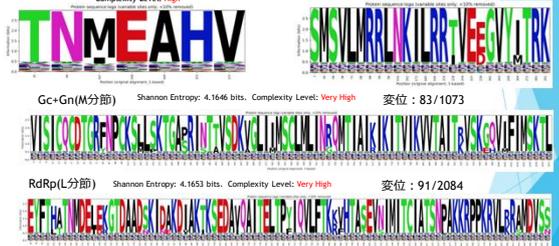
相関ネットワーク

8

ゲノムの変異

遺伝子型を区別せずに解析しているため、シャノンエントロピーは高めにしている

NP(5分節) Shannon Entropy: 4.0750 bits, Complexity Level: High 変位: 7/245	NSs(5分節) Shannon Entropy: 4.1443 bits, Complexity Level: Very High 変位: 26/293
Gc+Gn(M分節) Shannon Entropy: 4.1646 bits, Complexity Level: Very High 変位: 83/1073	RdRp(L分節) Shannon Entropy: 4.1653 bits, Complexity Level: Very High 変位: 91/2084

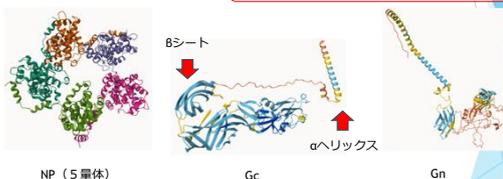


SFTSVのゲノムには多数の変異あり

9

立体構造予測(遺伝子型J3)

赤→青と変わっていくに従い、立体構造の信頼性!



NP (5量体) Gc αヘリックス βシート Gn

立体構造の把握による重症化に関わる部位の候補の検討
Covid19では、重症化とアミノ酸変異の関係が判明

10

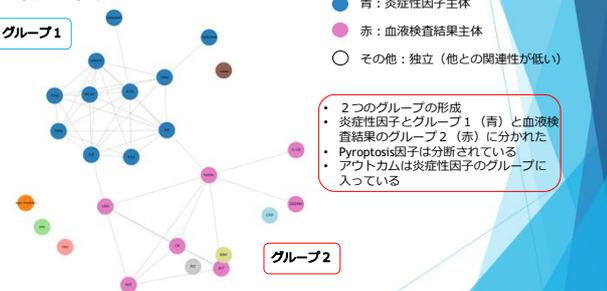
相関ネットワーク

- 青: 炎症性因子主体
- 赤: 血液検査結果主体
- その他: 独立(他との関連性が低い)

グループ1

- ・ 2つのグループの形成
- ・ 炎症性因子とグループ1(青)と血液検査結果のグループ2(赤)に分かれた
- ・ Pyroptosis因子は分断されている
- ・ アウトカムは炎症性因子のグループに入っている

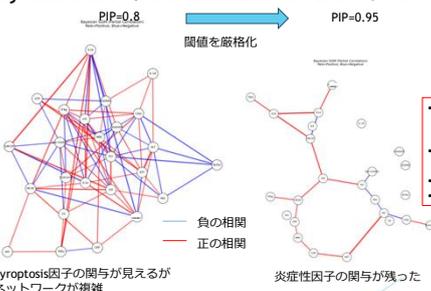
グループ2



11

BaysianGGM (ガウシアン・グラフィカルモデル)

PIP=0.8 → 閾値を厳格化 → PIP=0.95



- 病態にPyroptosisの関与が見られるが、検体搬入時の患者の状況は炎症性因子主体
- アウトカムはウイルス量と直接相関
- HMG81とIL1αの相関
- HGMG1とIL1αはDAMPsの一つ

Pyroptosis因子の関与が見えるがネットワークが複雑

炎症性因子の関与が残った

負の相関 (青線)
正の相関 (赤線)

12

KEGG/GO解析 (グループ 1)

KEGG

Cytokine-cytokine receptor interaction
Coronavirus disease
NOD-like receptor signaling pathway
Neurotosis
Human cytomegalovirus infection
Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor
Toll-like receptor signaling pathway
T cell receptor signaling pathway
NF- κ B signaling pathway
Natural killer cell mediated cytotoxicity
JAK-STAT signaling pathway
Chemokine signaling pathway

GO

cellular response to lipopolysaccharide (GO:0071222)
cytokine-mediated signaling pathway (GO:0018231)
inflammatory response (GO:0006954)
cellular response to cytokine stimulus (GO:0071345)
apoptotic process (GO:0006915)
receptor signaling pathway via JAK-STAT (GO:0097696)
receptor signaling pathway via JAK-STAT (GO:007259)
macrophage activation (GO:0042116)
chemokine-mediated signaling pathway (GO:0070098)
cellular response to chemokine (GO:1995889)
extrinsic apoptotic signaling pathway (GO:0097191)
macrophage activation involved in immune response (GO:0002281)
pyroptosis (GO:0070292)
acute inflammatory response (GO:0002526)
extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors (GO:0006623)
cellular response to virus (GO:0008586)
cellular response to virus (GO:0008586)
T-sppall kinase/NF- κ B signaling (GO:0007248)

グループ1の解析では、炎症に関わる項目が多い (赤字) (Pyroptosisも出現)

KEGG : 分子間の相互作用ネットワークに基づいて機能を定義
GO : 遺伝子の機能からの定義

13

KEGG/GO解析 (グループ 2)

KEGG

NOD-like receptor signaling pathway
Salmonella infection
African trypanosomiasis
Malaria
Legionellosis
Cytosolic DNA-sensing pathway
Inflammatory bowel disease
Rheumatoid arthritis
Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor
Yersinia infection
Influenza A
Tuberculosis
Neutrophil extracellular trap formation
Pathogenic Escherichia coli infection
Lipid and atherosclerosis
Shigellosis
Cytokine-cytokine receptor interaction

regulation of NK T cell proliferation (GO:0051140)
cellular response to interleukin-13 (GO:0071935)
positive regulation of NK T cell activation (GO:0051135)
regulation of natural killer cell proliferation (GO:0026817)
interleukin-13 mediated signaling pathway (GO:0056555)
regulation of granulocyte macrophage colony-stimulating factor production (GO:0032845)
pore complex assembly (GO:0046931)
pyroptosis (GO:0070292)
lipopolysaccharide-mediated signaling pathway (GO:0031663)
positive regulation of T cell cytokine production (GO:0002726)
regulation of chemokine production (GO:0028242)
positive regulation of chemokine production (GO:0032722)
positive regulation of interleukin-1 beta production (GO:0032731)
positive regulation of tyrosine phosphorylation of STAT protein (GO:0042531)
positive regulation of interleukin-1 production (GO:0032732)
regulation of interleukin-1 beta production (GO:0028511)
positive regulation of inflammatory response (GO:0000728)
cellular response to lipopolysaccharide (GO:0071222)
positive regulation of NF- κ B transcription factor activity (GO:0051092)
regulation of inflammatory response (GO:0000727)
inflammatory response (GO:0006954)

グループ2の解析では、Pyroptosisに関わる項目が散見される (赤字)

14

相関ネットワークおよびKEGG/GO解析から推察した病態の流れ

ウイルス感染

↓

インフラマソーム活性化

↓

Pyroptosis

↓

サイトカインストーム

血小板のPyroptosis様反応が血小板減少に関係か?

Gastriem D-dependent platelet pyroptosis exacerbates NET formation and inflammation to spore septa rupture (cardiovascular research) Maingui Su et al. 2020

15

重症化因子探索における課題

- ①アミノ酸変異が多く、重症化予測モデル構築には**変数の削減**が必要
 - ▶ アミノ酸立体構造予測: 重要な変異をピックアップ、構造が不安定な部分は**変数から除外**
 - ▶ NSs領域の変異: 全体的に構造が不安定なため**変数候補から除外** (機能的にも除外が妥当)
 - ▶ Gn領域の変異: 不安定なため基本的には**変数候補から除外** (場合によっては安定領域のみ候補)
 - ▶ RdRp領域: アミノ酸が長く、分割して立体構造を予測し**候補を絞る**が必要あり
 - ▶ NPとGc領域: 36の変異があり、予測モデルが**不安定**になる可能性あり
→共進化部分の除外などによりさらに**変数候補を絞る**が必要あり
- ②ゲノムが読めていない検体: 予測モデル構築のために何らかの**補充**が必要
- ③炎症化因子のELISAデータが**不足**
- ④臨床データの1つであるフェリチンのデータが**不足**→予測モデルでは除外?

16

まとめ

- ▶ SFTSの病態にはPyroptosisの関与が疑われる
- ▶ SFTS患者はサイトカインストームを起こしている (Covid19もサイトカインストームによる重症化が報告されている)
- ▶ 患者の病日は一週間程度 (中央値 5日) で、すでにサイトカインストームによる炎症のフェーズに入っているものが多い
- 重症化患者にアピガンがあまり効かない報告の理由
- ▶ 重症化因子の探索は、立体構造などを参考に**変数の数を絞る**必要がある

17

今後

- ▶ 炎症性因子のELISA検体数の増加
- ▶ D-dimerのELISA実施
- ▶ ゲノムが読めなかった検体の再解析
- ▶ 重症化予測モデルの構築と重症化因子の特定
- ▶ 予測モデルに使用する変異の絞り込み
- ▶ L分節の立体構造把握

18