

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18923

研究課題名(和文)ヘリコバクター・シネディの疫学と病態解明に関する研究

研究課題名(英文)Study on epidemiology and pathology of Helicobacter cinaedi

研究代表者

中島 純子(富田純子)(Nakashima (Tomida), Junko)

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号：10454323

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):ヘリコバクター・シネディはゲノム内にCRISPR-Cas領域を保持している。この領域には外来遺伝子の一部を獲得して自身のゲノム中に組み込んだスペーサー部位が存在し、獲得免疫機構として機能している。外来遺伝子由来のスペーサー分布は疫学解析に応用が可能であると考えられたため、本研究では菌株間の比較解析を行った。国内外分離株について検討したところ、スペーサーの欠損や獲得を明らかにすることで、他の疫学手法では区別できなかった菌株同士を識別することが可能となった。また、菌株の分離された年代とスペーサーの変化から、同一施設内での感染拡大の様子を推察することができ、菌株の変遷を辿ることが可能であった。

研究成果の概要(英文):The CRISPR-Cas system provides adaptive immunity against foreign genetic elements. I investigated the CRISPR-Cas system to assess the potential of the CRISPR-based microevolution of Helicobacter cinaedi strains. Analysis of the organization and sequence similarity of the spacers of the H. cinaedi strains showed that CRISPR arrays could be divided into 7 different genotypes. Each genotype had a different ancestral spacer, and spacer acquisition/deletion events occurred while isolates were spreading. Spacer polymorphisms of conserved arrays across the strains were instrumental for differentiating closely-related strains collected from the same hospital. CRISPR sequences constitute a valuable basis for genotyping, provide insights into the divergence and relatedness between closely-related strains.

研究分野：細菌分類学

キーワード：ヘリコバクター・シネディ 疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) ヘリコバクター・シネディは、腸肝在位菌に含まれる菌種であり、感染症状としては発熱や下痢、蜂窩織炎、敗血症などが挙げられる。本菌種は複数の医療施設で院内感染を引き起こし、それらの施設では断続的に本菌の分離が続いている。過去 10 年間にわたり本菌種が患者から分離されている医療施設もある。しかし、ヘリコバクター・シネディはどのような経路で感染し、どのようにして感染力を保ち数年間も同一施設で蔓延しているか明らかにされていない。

(2) ヘリコバクター・シネディ感染症は、およそ 35% の患者で再発が見られる。抗菌薬投与後、症状が寛解しても、しばらくすると再発する症例が数多く報告されている。生体内防御機構および抗菌薬作用から回避した菌体が生体内に留まり続け、何らかの作用により再度増殖し再発を引き起こしていることが予想される。このような病態を引き起こす病原性の解析は行われておらず、本菌種については不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) 院内感染を引き起こしているヘリコバクター・シネディの感染源・感染経路の究明および二次感染予防のためには分子疫学的手法を確立する必要がある。本菌種の Multilocus sequence typing (MLST) 法を利用した系統解析が報告されているが、この結果を検討すると十分な識別能力があるといえない。同一医療施設内での伝播や国内での分布状況を把握するには不十分であり、手法を見直す必要がある。申請者らは国内の病院において分離された菌株を積極的に受け入れ、その確定同定と保存を行ってきた。これまで数年間にわたり、北海道から九州まで日本国内の多数の医療施設から約 250 株を収集しており、さらに、海外で分離された菌株も保有している。そこで、これらの菌株を利用して疫学解析法を確立させ本菌種の遺伝的多型と分布状況を明らかにして感染動態を把握し、院内伝播経路を解明し感染予防や対策につなげることを目的とする。

(2) 寛解・再発を繰り返す症例からヘリコバクター・シネディは抗菌薬投与後も生体内に留まり生存していると考えられる。感染巣が認められない敗血症の症例から、本菌種による Bacterial translocation の関与が示唆され、本菌種の細胞内侵入性が予想される。そこで、細胞への侵入性を検討し、「再発性」という特徴的な病態を解明することを目的とする。また、ヘリコバクター・シネディはゲノム解析により、他のヘリコバクター属菌種とは異なる遺伝子群を保有していることが明らかとなっている。染色体上には 130 kbp 程度の特異的な領域を持ち、CRISPR/Cas や VI 型

分泌装置 (T6SS) の遺伝子クラスターが含まれている。ヘリコバクター・シネディにおける T6SS の役割は全く解明されておらず、病原性への関与も考えられる。そこで本菌種に特異的であるこの T6SS 遺伝子群に注目し、この分泌装置がどのような役割を果たしているかを解明する。

3. 研究の方法

(1) CRISPR 領域は新規の獲得免疫機構であり、細菌ゲノム上に存在する反復配列である。CRISPR のスペーサー配列比較により、過去に攻撃を受けたと考えられる外来遺伝子を特定することができる。獲得した外来遺伝子は生息環境に対応するため、CRISPR 領域の比較は疫学解析にも応用が可能であると予想された。そこで、CRISPR のスペーサー領域の塩基配列を決定し、スペーサー分布を比較した。CRISPR による解析結果を検証するために、細菌の最も標準的な分類手法である 16S rRNA 塩基配列解析および *Helicobacter* 属の分類において有用性が報告されている GyrA アミノ酸配列解析の結果を比較した。さらに、23S rRNA, ppa, aspA, aroE, atpA, tkt, cdtB の 7 つのハウスキープング遺伝子の塩基配列についても決定し、MLST 解析を行い、分離株の遺伝的多型性を明らかにし、遺伝子型の地域特異性、類似性を比較した。

(2) ヘリコバクター・シネディの再発機構は食細胞内抵抗性または細胞内侵入性であると予測されるため、細胞内に留まっていた菌体が腸管内部に侵入し、リンパ節に流入することで再発を誘導していると考えられる。これらの推察を検討するために、腸管上皮様細胞株 (Caco-2 細胞) およびマクロファージ様細胞株 (U937 細胞) への感染実験を行った。細胞内に侵入した本菌種は特異的プロンプを用いて蛍光標識し、蛍光顕微鏡にて挙動を観察した。さらに、本菌種が保持している分泌装置の機能を明らかにするために、分泌装置の遺伝子欠損株の作製を行った。

4. 研究成果

(1) ヘリコバクター・シネディは CRISPR 1 および CRISPR 2 の二つの CRISPR 領域を有していることがゲノム解析により報告されている。CRISPR system の種類を調べたところ、CRISPR 1 の上流には cas2, cas1, cas9 遺伝子があり、CRISPR 1 は type-II system であった (図 1)。また、Cas9 の塩基配列解析により、サブタイプに分類されている。系統樹を作成すると、本菌種は *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* NCTC 11168 株と相同性が高く、サブタイプ II-C subcluster に分類された。CRISPR 2 は RAMP 遺伝子の存在から、type-III system であると考えられた。

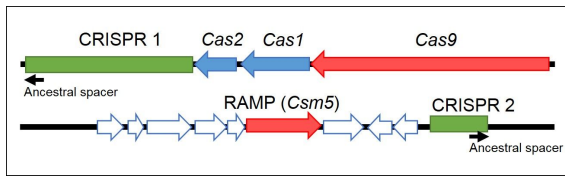


図1 CRISPRの構造

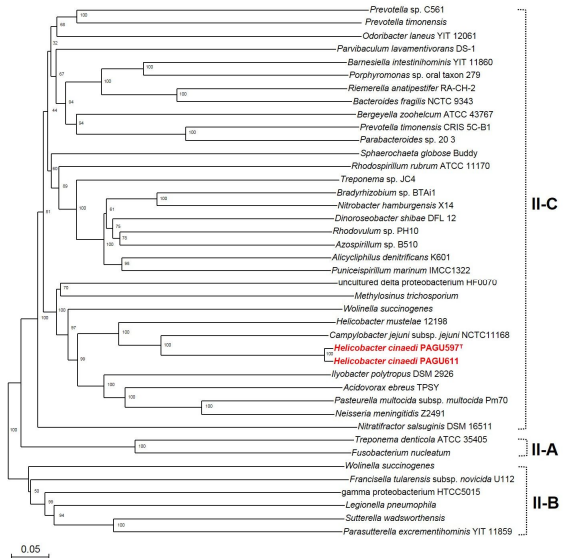


図2 Cas9によるサブタイプ分類

(2) CRISPR 領域は外来性遺伝子侵入を記憶し、獲得免疫機構として機能するため、過去に獲得した外来遺伝子は生息環境に対応する。獲得した遺伝子はスペーサーとして一定方向に挿入されるため、スペーサーの分布を比較することで、菌株間の識別を行うことが可能である。CRISPR 1 および CRISPR 2 のスペーサー配列を決定し、共通の祖先スペーサーを保有する菌株を同一グループとしてスペーサー分布を比較した。CRISPR 1 の分布パターンにより 20 の遺伝子型に分類され、CRISPR 2 では 16 の遺伝子型にそれぞれ分類された。42 株の菌株は祖先スペーサーとスペーサーの共通性から 7 つのグループに分類されることが明らかとなった (図 3)。

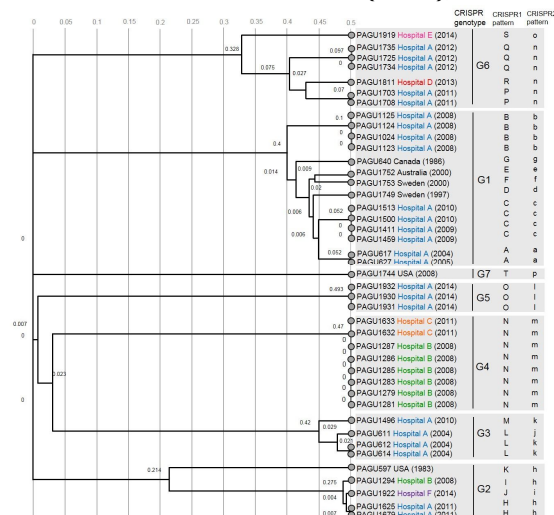


図3 CRISPR 1 および CRISPR 2 のスペーサー分布による UPGMA dendrogram

海外で分離された株 (6 株) は、1 株を除き、国内分離株と共通の祖先スペーサーを有していた。1 株は国内分離株と全く異なるスペーサーを保持しており、海外では異なる遺伝子型の菌株も蔓延していると考えられた。

(3) 国内外分離株の 16S rRNA 塩基配列および GyrA アミノ酸配列を決定し、系統樹を作成した。ヘリコバクター・シネディの 16S rRNA 遺伝子は、菌株間で変異に富んでおり、識別能力が優れているという他の菌種にない特徴を持っていた。しかし、CRISPR 解析ほど菌株間の差異を認識できないことが分かった。GyrA アミノ酸配列は、*Helicobacter* 属の分類において有用性が報告されているが、本研究で使用した菌株間で差は見られず、属内における菌種の確定に有用であるが、菌株間の識別は難しいと考えられた。

(4) 国内外分離株 42 株の 7 つのハウスキーピング遺伝子の塩基配列を決定し、MLST 解析を行ったところ、12 の Sequence type (ST) が存在し、7 つの Clonal complex (CC) に分類された (図 4)。

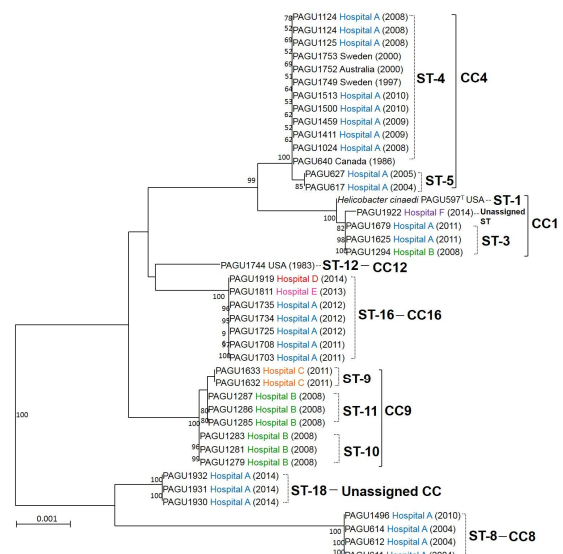


図4 MLST 解析による系統樹

表1 MLST と CRISPR 解析の比較

Clonal complex	Sequence type	No of isolates	Allelic profile							CRISPR		
			23S	ppa	aspA	aroE	atpA	txA	cdtB	Genotype	CRISPR1 pattern	CRISPR2 pattern
CC1	ST-1	(1)	1	1	1	1	1	1	1	G2	K	h
CC1	ST-3	(3)	1	1	1	1	1	1	4	G2	H, I	h
CC1	-	(1)	UA	1	1	1	1	4	1	G2	J	i
CC4	ST-4	(12)	3	3	3	1	2	2	1	G1	B, C, D, E, F, a, b, c, d, e, f, g	
CC4	ST-5	(2)	3	3	3	1	4	2	1	G1	A	a
CC8	ST-8	(4)	3	4	4	3	2	3	2	G3	L, M	j, k
CC9	ST-9	(2)	3	2	2	2	2	1	2	G4	N	m
CC9	ST-10	(3)	4	2	2	2	2	1	2	G4	N	m
CC9	ST-11	(3)	2	2	2	2	2	1	2	G4	N	m
CC12	ST-12	(1)	5	5	2	5	5	1	3	G7	T	p
CC16	ST-16	(7)	4	3	2	6	4	3	6	G6	P, Q, R, S	n, o
UA	ST-18	(3)	6	3	6	3	3	1	3	G5	O	i

CRISPR のスペーサー分布による解析では、MLST 解析による菌株の ST よりも多くの遺伝子型に分類された (表 1)。したがって、CRISPR 解析は、スペーサーの欠損や獲得を明らかにすることで、MLST では区別できな

かった菌株同士を識別することが可能となり疫学調査に有用であると考えられる。

(5) ヒトマクロファージ様細胞株 U937 に菌血症患者から分離されたヘリコバクター・シネディ PAGU611 株を感染させ、FISH 法を用いて蛍光プローブと細菌を反応させ、マクロファージ内における菌量変化と感染の持続性を経時的に観察した。感染 1、3、5、7 日後のマクロファージを観察すると、感染 7 日後もマクロファージ内でラセン菌が観察されたため、ヘリコバクター・シネディは生存し続けていることが確認された。感染 7 日後のマクロファージ内における細菌数を計測すると、同属のヘリコバクター・ピロリと比較してシネディは細胞内における菌量が多く、マクロファージに対する抵抗性が高いことが示された。マクロファージ内での生存性は、除菌治療に対する抵抗性と関連し、この性質が高い再発率に繋がっていると考えられた。また、腸管上皮様細胞株 (Caco-2 細胞) に対しても侵入性があることが観察された。

(6) ヘリコバクター・シネディのゲノム解析により 6 型タンパク質分泌機構が存在していることが明らかとなった。T6SS の構成タンパク質のひとつである IcmF の homologue をコードする遺伝子について、*sacB* 遺伝子をコードする suicide vector を用いた相同組み換えにより、遺伝子欠損株を作製することができた。

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)

Tomida J, Morita Y, Shibayama K, Kikuchi K, Sawa T, Akaike T, Kawamura Y.
Diversity and microevolution of CRISPR loci in *Helicobacter cinaedi*.
PLOS ONE 12(10):e0186241, 2017. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0186241.

[学会発表](計 4 件)

富田純子、森田雄二、河村好章.
Helicobacter cinaedi における CRISPR 領域の多様性と菌株の変遷.
第 91 回日本細菌学会総会、2018 年

富田純子、森田雄二、河村好章.
Helicobacter cinaedi の CRISPR 領域を用いた分子疫学的解析.
第 29 回日本臨床微生物学会総会、2018 年

富田純子、森田雄二、河村好章.
Helicobacter 属菌種の分類と腸肝在位菌 *H. cinaedi* の特徴.

第 90 回日本細菌学会総会、2017 年

Tomida J, Morita Y, Kawamura Y.
Analysis of the fluoroquinolone antibiotic resistance mechanism of *Helicobacter cinaedi* isolates.
IUMS 2017、2017 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 純子 (TOMIDA, Junko)
愛知学院大学・薬学部・講師
研究者番号: 10454323