様　式　C−19、F−19−1、Z−19　(共通)

KAKENHI 科研費

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成２９年　６月２８日現在

機関番号：８２６０３
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014〜2016
課題番号：２６４６０５４２

研究課題名（和文）川崎病患児・急性期便から分離された新規レンサ球菌のゲノム解読と病原性解析

研究課題名（英文）Characterization of the gut microbiota of Kawasaki disease patients by metagenomic analysis

研究代表者

黒田　誠（Kuroda, Makoto）

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長

研究者番号：８０３１７４１１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：川崎病患者28人について、入院時・半年後（充分な回復期）の2ポイントで便を採取し、次世代シークエンサーによるメタゲノム解析の結果、入院急性期ではStreptococcus 属に顕著な検出率を認め、回復後の遠隔期では Ruminococcus属の増加が顕著であった。（Front Microbiol. 2015 Aug 11;6:824.）川崎病を4回再燃発症した患児の便からも同様に Streptococcus spp. が有意に検出され、上記成果と関連した結果が示唆された。(JMM Case Rep. 2016 Feb 1;3(1):e005019.)

研究成果の概要（英文）：Kawasaki disease (KD) is an acute febrile illness of early childhood. Additionally, previous culture-based studies have suggested a possible role of intestinal microbiota in KD pathogenesis. In this study, we performed metagenomic analysis to comprehensively assess the longitudinal variation in the intestinal microbiota of 28KD patients. Several notable bacterial genera were commonly extracted during the acute phase, whereas a relative increase in the number of Ruminococcus bacteria was observed during the non-acute phase of KD. The metagenomic analysis results based on bacterial species classification suggested that the number of sequencing reads with similarity to five Streptococcus spp. (S. pneumonia, pseudopneumoniae, oralis, gordonii, and sanguinis), in addition to patient-derived Streptococcus isolates, markedly increased during the acute phase in most patients. The findings of this study suggest that KD-related Streptococci might be involved in the pathogenesis of this disease.

研究分野：ゲノム微生物学

キーワード：川崎病　レンサ球菌　メタゲノム解析　腸内フローラ

１．研究開始当初の背景

川崎病は、小児の急性発熱性疾患のひとつで、その本態は急性全身性血管炎である。冠動脈に後遺症を残し得ることから、後天性心疾患の主要原因となっている。1967 年に川崎富作先生が 50 例の症例報告を発表して以来、世界各地からの類似報告の積み重ねを経て川崎病として確立されるようになった。特に東アジアでの報告頻度が高く、日本では年間約１万人（5 歳以下の小児人口の約 500 人に 1 人）が罹患している。現代科学の進歩により、川崎病の免疫学的病態、血管炎の病理学的メカニズム、罹患感受性に関わる遺伝子などが徐々に解明されつつあるが、病因については未だ不明である。免疫グロブリン大量投与（2 g/kg 体重）により症状が改善し、冠動脈後遺症の頻度を下げることが可能だが、依然として 5%前後に冠動脈病変を残すと報告され、また治療抵抗性の群も存在する。冠動脈病変を生じるか否か、治療抵抗性の有無について予測困難なことも課題のひとつである。

一方で川崎病は感染症との関連が疑われている。川崎病の発症は、生後 6 ヵ月～5 歳の小児に多い、１月をピークとした発症数の季節変動がある、細菌由来のスーパー抗原、内毒素による病態の増悪、また種々のウィルス感染と川崎病の関連を示唆する報告の特徴がある。感染症が病態憎悪に関与しているかどうか検討するため、平成 20 年度から NPO 法人川崎病研究センターより研究助成を受け、多施設共同（国立感染症研究所を含む）の研究体制を構築し、次世代シークエンサーによる網羅配列解読で病原体候補を検索してきた。これまでの成果として、急性期の川崎病患児の血清から抽出した DNA/cDNA から、腸内細菌フローラである多種類のグラム陰性菌を検出している。さらに特筆すべきこととして、患児・頚部リンパ節から特徴的なレンサ球菌の配列を検出した（業績#11 Katano H, et al.. ***Int J Clin Exp Pathol. 2012. 5(8):814-23.***）。 この結果は、血管炎を伴う全身性炎症により腸管粘膜バリアーが脆くなり、腸内フローラが血流に移行した可能性を示唆していた。これまでの報告では、川崎病患者群の血清からグラム陰性菌由来の LPS（Lipopolysacchalide）が優位に検出されることから、LPS が病態に関与している可能性が示唆されている（Takeshita S, ***et al.*** The Journal of Infectious Disease 1999; 179: 508）（Takeshita S, ***et al.*** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 2002; 9(1): 205)。

２．研究の目的

次世代シークエンサーによるメタゲノム解析にて得られた網羅的病原体カタログを基盤とし、これまでの知見を拡大する目的で本研究を計画した。この病原体カタログを有効に活用するためには病原体候補の分離・純培養が必須である。川崎病に起因すると示唆されてきたウイルス・細菌の多くは分離培養が可能であるが、申請者が見出した腸管レンサ球菌の初代培養は嫌気培養が必要であったことから、一般的な培養検査で見過ごされていてもおかしくない。見過ごしていた病原体候補の分離培養等、想定される病原体に対して漏らすことなく総合的に検討する研究計画である。

３．研究の方法

川崎病を疑われ、入院時に血液検査・尿検査・細菌培養検査（血液・咽頭ぬぐい液・尿・便）を行う。川崎病の診断が確定したら、免疫グロブリン大量静注療法・アスピリン内服による治療を開始する。免疫グロブリン大量静注療法終了後に血液検査を行う。経過観察の後、発症後 2 週間程度の時点で血液検査を行い、問題となる所見がなければ退院とする。退院後、6 ヵ月後・1 年後の外来定期受診の際に血液検査を行う。以上が、川崎病の診療

の流れである。

入院時・免疫グロブリン大量静注療法後・退院時・6 ヵ月後・1 年後の血液検査所見、入院時の尿検査所見、入院時の細菌培養検査で検出された細菌、培養検査に使用した試料（咽頭ぬぐい液・尿・便）を本研究のために使用する。これらは保険診療でまかなえる検査である。

- <u>患者群</u>

  川崎病を疑われてさいたま市民医療センター小児科および東京女子医科大八千代医療センター小児科に入院し、その後川崎病と診断が確定し治療を受けた0～6歳の小児とする。

- <u>対照群</u>

同時期に川崎病ではない他の確定診断（感染症・喘息・アレルギーなど）がついている0～6 歳の小児とする。

４．研究成果

臨床検体からダイレクトにかつ網羅的メタゲノム解析により様々な病原体の発見が報告されている。我々はメタゲノム解析により川崎病の微生物フローラの経時的変化を追跡し、急性期と遠隔期においてどのような腸内フローラの変動が見られるのか検討し、患児に生じている実像の理解を目的とした。川崎病患者 28 人について、入院時・半年後（充分な回復期)の 2 ポイントで便を採取し、次世代シークエンサーにより抽出 DNA を用いて網羅的にメタゲノム解析を行った。得られた解読リードを megablast 法にて NCBI nt データベースで検索し、 MEGAN にて Taxonomy 分類を行った。川崎病遠隔期（半年後）と入院時・急性期を LEfSe 法にて多変量解析した結果、遠隔期では Ruminococcus 属の増加が顕著であり、回復における重要な因子である可能性が示唆された。科(family)・属(genus)レベルで分類しても川崎病に関連する優位な共通因子ができなかったため、更に精度をあげ種（species）レベルで分類した結果、Streptococcus mitis group および患者由来の Streptococcus 分離株に顕著な検出率を認めた。本成果は以下の論文として掲載された。(Kinumaki et. al., Front Microbiol. 2015 Aug 11;6:824. PMID: 26322033).

川崎病を 4 回再燃発症した患児の便からも同様に Streptococcus spp. が有意に検出され、直接的な因果関係を証明できてはいないが、上記成果と関連して新たな Streptococcus 属による発症・増悪の関与が示唆された。(Hamada H, et. al., JMM Case Rep. 2016 Feb 1;3(1):e005019. PMID: 28348750)

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）

1. Kinumaki A, Sekizuka T, Hamada H, Kato K, Yamashita A, <u>Kuroda M</u>. Characterization of the gut microbiota of Kawasaki disease patients by metagenomic analysis. Front Microbiol. 2015 Aug 11;6:824. doi: 10.3389/fmicb.2015.00824. eCollection 2015. PubMed PMID: 26322033; PubMed Central PMCID: PMC4531854.
2. Hamada H, Sekizuka T, Oba K, Katano H, Kinumaki A, Terai M, Mizutani T, <u>Kuroda M</u>. Comprehensive pathogen detection associated with four recurrent episodes of Kawasaki disease in a patient during a single year using next-generation sequencing. JMM Case Rep. 2016 Feb 1;3(1):e005019. doi: 10.1099/jmmcr.0.005019. eCollection 2016 Feb. PubMed PMID: 28348750; PubMed Central PMCID: PMC5343132.

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 阿部淳，中林一彦，江畑亮太，黒田誠 川崎病患者の末梢血、咽頭、直腸スワブのメタゲノム解析 第３４回日本川崎病学会・学術集会
2. 黒田誠、関塚剛史 川崎病患児の腸内細菌フローラ解析 第８８回日本細菌学会総会

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
　黒田　誠　（KURODA Makoto）
　国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長
　研究者番号：80317411

(2)研究分担者
　(　　　)

　研究者番号：

(3)連携研究者
　(　　　)

　研究者番号：

(4)研究協力者
大場邦弘（OBA Kunihiro）
公立昭和病院・小児科・医長

濱田洋通（HAMADA　Hiromichi）
東京女子医大八千代医療センター・小児科

関塚剛史（SEKIZUKA Tsuyoshi）
国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・室長