

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：84505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08462

研究課題名(和文) 大腸癌の成長に關与するD群レンサ球菌の多株比較解析に基づく病原性因子に關する研究

研究課題名(英文) Comparative analysis for elucidation of pathogenic factors of group D streptococci involved in colon cancer.

研究代表者

野本 竜平 (Nomoto, Ryohei)

神戸市環境保健研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：60642238

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)：本研究では新興の人獣共通感染症が疑われる細菌であり、ヒトの大腸癌との因果関係も予測されているレンサ球菌(SG)の系統学的な位置の整理と分子疫学、また病原性因子の解明を目指した。全ゲノム情報を明らかにし、そのDNAの相同性からSGが動物とヒトとの感染が起こりうる細菌である事を示した。病原性と関連する莢膜を作る遺伝子群について探索し、大きく7つの型があることを見出した。また、コラーゲンへの接着性とバイオフィルム形成能を評価し、SGが心内膜炎を形成するメカニズムの一端を明らかにした。ヒトの腸管内におけるSGの分布を調査し、これまで不明であったSGのヒトへの適応に関する知見を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed to comparative genomic analysis of Streptococcus gallolyticus (SG), which is suspected causative agent of an emerging zoonotic infectious disease and predicting a causal relationship with human colon cancer, for organizing the phylogenetic position and elucidating pathogenic factors. The whole genome information of all SG strains were obtained, and core genome analysis was performed. The phylogenetic analysis was shown that SG is a bacterium that can cause both of animal and human infection. We analysed for capsule biosynthesis gene cluster related to pathogenicity and found that there are 7 types. In addition, the adhesion to collagen and biofilm formation ability were evaluated, and the mechanism of SG forming endocarditis was clarified. We investigated the distribution of SG in the intestinal tract of humans and obtained knowledge on adaptation of SG to humans which was unknown so far.

研究分野：病原微生物学

キーワード：ゲノム比較解析 ゲノム関連解析 分子疫学 人獣共通感染症 レンサ球菌

1. 研究開始当初の背景

Streptococcus gallolyticus (SG)はヒトや動物の腸内に常在する Lancefield D 群のレンサ球菌の一種である。本菌は散発的にヒトの心内膜炎、髄膜炎、敗血症などの臨床検体から分離されるが、2000 年前後より欧州において本菌による鶏を含む家禽類の敗血症事例が頻発しており、我が国でも 2006 年以降、鹿児島、熊本、山口県等の食鳥処理場・と畜場で発見された鶏や豚の心内膜炎病変部から純培養的に本菌が分離されたことが報告されている。こうした状況から本菌が新たな家畜の疾病、さらには新興の人獣共通感染症の起因細菌として我が国の食の安全の脅威となることが危惧されている。現在 *S. gallolyticus* には 3 つの亜種 { ssp. *gallolyticus* (SGG), ssp. *pasteurianus* (SGP), ssp. *macedonicus*) が提唱されており、その中で臨床検体より分離されるのは SGG 及び SGP である。SG の 3 亜種は元来 *S. bovis* biotype I 及び biotype II/2 に属するとされていた菌群が 2003 年に再分類されたものであるが未だ呼称や分類法が定着しておらず、その疫学的な情報に不正確な点が多々見受けられる。

そこで我々は SG の Multilocus sequence typing (MLST) 法を開発した。野外分離株及び臨床分離株を用いて MLST 法による疫学解析を行ったところ、SG は亜種間で明確にクラスターが分岐する事が明らかとなった。同じく人獣共通感染症原因菌である *S. suis* では MLST 法により臨床分離株が遺伝的に近縁な集団に集約されることが明らかになっているが、SGG はクローナルな集団に臨床分離株と野外分離株が混在しており、MLST 法で同亜種内の臨床的にリスクの高い株を判別する事は困難であった。一方 SGP は分離時期・場所共に大きく異なる臨床株でもクローナルな集団に集約されており、ある特定の病原性の高い株、即ち何らかの病原因子を有する株から進化した可能性が考えられる。

他方、本菌によるヒトへの感染症例の特筆すべき点として、90%以上が心内膜炎の症状を呈する患者で、更に大腸がんを併発しているケースが 70%以上の割合で確認されている事が挙げられる。SG と大腸がんの発症との因果関係ははっきりと解明されていないが、本菌が他のレンサ球菌と比較して腫瘍細胞へ集落を形成する能力が高いことや、大腸がんや炎症性腸疾患を罹患したヒトの糞便中で SG の菌数が優位に上昇することなどが報告されている。また、本菌の細胞表面抽出物が腸管細胞の炎症性サイトカインの発現を亢進し腫瘍細胞の成長を促進させることや、本菌が細胞表面にセレクチンリガンドである糖鎖シアリル Lex 抗原を発現しそれが宿主細胞への定着へ寄与していることが議論されているが、これらの原因因子や生合成遺伝子に関する報告は未だ存在しない。このように SG は人獣共通感染症起因菌として

のみならず、大腸内における菌数が大腸がんを始めとした腸疾患の診断マーカーとしての側面も併せ持つ臨床重要細菌である。

連携研究者の丸山は A 群レンサ球菌の多株比較ゲノム解析により、プロファージ領域が病原性の獲得に重要であることや、特定の強毒株が特定の病原性遺伝子上に SNP を持つことなどを明らかにしているが、SG においてはこのような解析を行うために十分なゲノム情報が蓄積されていない。SG の疫学研究や病原因子に関する研究が遅滞している一因が、未だドラフト配列を含めて 5 株しかデータベースに登録されていない当該ゲノム情報の不足にある事は明白である。以上の背景から SG の大規模ゲノム情報を取得し、多株比較ゲノムと臨床的なメタデータを併せて解析する事で本菌の病原性遺伝子の分布の傾向を明らかにすると共に、申請者らが確立している培養細胞を用いた実験系により腫瘍細胞への接着や活性化に関与している特異的因子を抽出できるとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では新興の人獣共通感染症起因菌でありヒトの大腸癌との因果関係が予測されている SG の病原因子及び腫瘍細胞の活性化因子の解明と、それらの獲得・進化機構の解明を目指す。そのために、

1) 臨床検体分離株と健康なヒト・動物由来株間の大量ゲノム情報解析を用いて、メタデータとの比較により疾病の発症や炎症系の活性化に関連のある候補遺伝子群を明らかにする。

2) 培養細胞実験、遺伝子組換え体を用いた解析により、候補遺伝子の機能解析を行い、SG の病原性発揮機構の解明と宿主への接着および炎症系に与える影響を明らかにする。

3) ゲノム解析で得られたデータを下し、未だ分類学上混乱がある SG の亜種特異的な PCR 法を開発し、ヒトにおける SG の分布状況を調査する。

3. 研究の方法

1) 申請者の研究室で所有する SG 菌株及び外部機関より提供を受けた株のドラフトゲノム配列を取得する。

2) 取得した大量ゲノム配列を用いてコアゲノム解析を実施する。コアゲノム系統解析を行い、菌株の由来や臨床症状の違いが系統的に反映されるかどうか検討する。またコアゲノム解析で得られたデータと、菌株のメタデータを基にゲノムワイド関連解析を実施し、各表現型と関連のある遺伝子群を抽出する。

3) 2)で表現型に特徴的な遺伝子群が抽出された場合は候補遺伝子の高発現株を選抜し、腸管上皮細胞を用いた実験系により候補遺伝子の発現量と細胞への接着性・炎症誘導活性

の因果関係を検証し、病原性因子と接着・炎症誘導促進因子を絞り込む。

4) ゲノムデータを基に SGG、SGP それぞれに特異的な PCR 法を開発する。健康人の糞便から抽出した DNA に対し PCR を行い、ヒト腸管内における SG の分布状況を調査する。

4. 研究成果

(1) ゲノム配列の決定

研究期間中、新たに取得した菌株を加えて計 98 菌株の SG のドラフトゲノム配列を決定した。SG の平均ゲノムサイズは SGG が 2,384,896 bp、SGP が 2,139,979 bp であり SGG が SGP に比べやや長大なゲノムを保有していた。得られた配列のうち 60 株ほどを DDBJ のゲノムデータバンクへ登録した。

(2) コアゲノム解析・系統解析

全 SG 菌株(99 株)、SGG 菌株(62 株)、SGP 菌株(32 株)のコアゲノム解析の結果それぞれ SG で 1116 個、SGG で 1411 個、SGP で 1458 個のコア遺伝子が見いだされた。コア遺伝子のアライメントから最尤法により系統樹を作製したところ、全ての SG 菌株は *Streptococcus* 属間で独立したクラスターを形成した。SG のみで作製したコアゲノム系統樹を図 1 に示す。

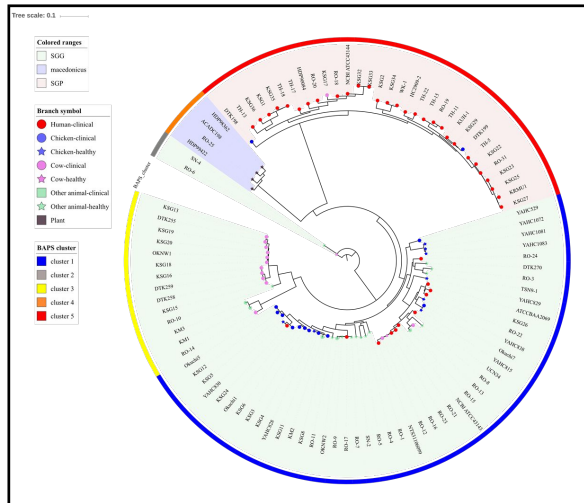


図 1. SG のコアゲノム系統樹

MLST 解析結果と同様に、SGP は分離年、宿主、臨床症状に関わらず非常にクローナルな集団を形成した。一方で SGG に関しては大きく 2 つのクラスターが形成され、一方のクラスターではウシの臨床検体を由来とする株が偏って存在していた。もう一つのクラスターでは家禽由来株とヒト由来株混在しており、臨床症状の有無に関わらず家禽由来株はヒトの臨床検体由来株と系統的に非常に近縁である株が多く存在した。このことは SGG が人獣共通感染症としての側面を持つことを強く支持している。ウシ由来株が独自のクラスターを形成した理由として、ルーメン内環境に適応するための進化の結果であ

ると考えられる。ゲノム配列から種の系統を判定する Average nucleotide identity (ANI) 値を計算したところ、全菌株が同種と判定される 95% 以上を示し、改めて SG の 3 亜種が分類学的に同種であることが示された。一方で ANI 値は亜種間で明確な違いもみられた。

(3) 病原性関連遺伝子の探索

ゲノム情報を基に病原性に関与すると考えられる遺伝子群について探索した。コーゲン結合に寄与し、心内膜炎の発症に関与すると予想される推定線毛クラスターは 3 つ存在し、クラスター II, III は殆どの SGG 株が保有していたが、クラスター I については保有状況に差がみられた。SGP の多くは pili クラスターを保有していないか、II のみ保有していた。薬剤耐性関連遺伝子は tet(M) が最も高頻度に検出された。SGP はマクロライド系、アミノグリコシド系の耐性遺伝子を複数保有している株も存在した。

多くのレンサ球菌で病原性に関与するとされる莢膜合成遺伝子群は 7 つの遺伝子型が確認された。SGG は Type I ~ IV の遺伝子型を保有しており、SGP は Type V ~ VII の遺伝子群を保有していた。SG においては血清型による型別は確立していないが、抗血清を作製した場合はこの莢膜遺伝子群で血清型が大別されると考えられる。莢膜遺伝子型の分布をゲノム系統樹に適用したものを図 2 に示した。

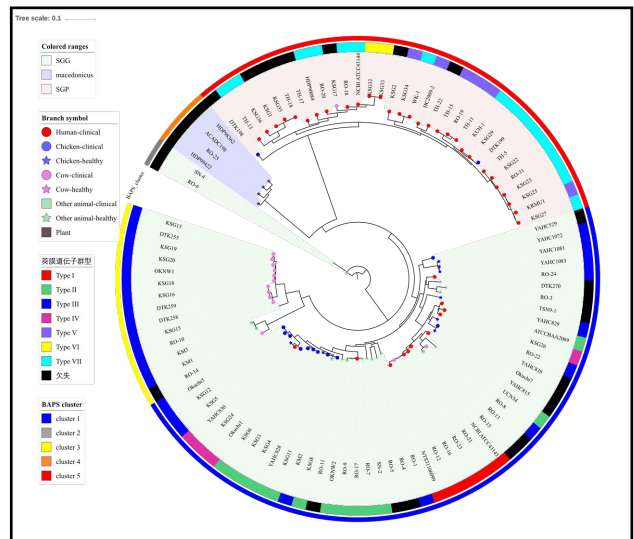


図 2. 莢膜遺伝子型の分布

莢膜遺伝子型はゲノム系統解析のクラスターとは関連が無く分布しており、可動性因子による組換えで水平伝播していることが示唆された。また、莢膜遺伝子型と臨床症状に関連性は見られなかった。

また、バイオフィルムの形成に重要な役割を果たすとされるグリコシルトランスフェラーゼである *gtfA*, *gtfB* は全ての SGP 株で欠失していた。これらの事は、SGP はコーゲン細胞への接着能力やバイオフィルム形成によるコロナイゼーション能力が低い事を

示唆していた。SGP が心内膜炎ではなく髄膜炎菌として分離されることが多い理由はこの遺伝子の存在に起因する可能性がある。

(4) ゲノムワイド関連解析

菌株の由来や臨床検体であるかどうか、または臨床症状そのものなどといったメタデータ（表現型）と、特定の遺伝子の存在状況を関連させて表現型に有意 ($P < 0.05$) に特徴的な遺伝子を抽出するゲノムワイド関連解析 (GWAS) を実施した。その結果、SGG に特徴的に存在する遺伝子は 367 遺伝子見出され、SGP に特徴的な遺伝子は 273 遺伝子であった。ヒト由来株や家禽由来株に特徴的な遺伝子については、いくつか候補はあるものの直接関連があると見られる遺伝子は見出せなかった。ウシ由来株に特徴的な遺伝子は 140 遺伝子が見出された。

臨床検体や臨床症状についても解析を実施したが、臨床検体特異的な遺伝子群は抽出できなかった。これは SG が日和見病原体であり通常細菌叢を構成している菌株と、病気を引き起こす菌株に大きな違いが無いためであると考えられる。このことから当初予定していた標的遺伝子を決定しその遺伝子の破壊実験を行う計画が困難となったため、いくつかの表現型を観察しその表現型に関連のある遺伝子群を見出すことを試みた。

(5) ムコイド形成とバイオフィルム形成試験

SG の臨床症状の多くに心内膜炎の形成があげられるため、SG のバイオフィルム形成能を評価した。バイオフィルムの形成に関与すると考えられる菌体外多糖の生産を確認したところ、SGG の多くの株が 1% スクロース添加の条件で著しいムコイドコロニーの形成を確認した。一方で SGP はムコイドコロニーを形成しなかった。ムコイドコロニーの形成と関連ある遺伝子上記の関連解析で解析したところ、グリコシルトランスフェラーゼである *gtfA* の存在と強い相関が確認されたため、この多糖体の生産には *gtfA* が必須であると考えられる。

心内膜炎は心筋に多く存在するコラーゲンに細菌が接着しバイオフィルムを形成することで生じるとされている。そこでコラーゲンをコートしたプレート上でバイオフィルム形成能を確認したところ、図 3 の結果が得られた。バイオフィルムを形成した株は SGG が多く、またその由来は全て心内膜炎を引き起こした株であった。SGG でも髄膜や脳から分離された菌株はバイオフィルムを形成しなかった。SGP には若干のバイオフィルム形成を認める株もあったが、心内膜炎由来の株でも全くバイオフィルムを形成しない株も確認された。バイオフィルム形成能と関連する遺伝子群を解析したが有意に特徴的な遺伝子は見出せなかった。このことはバイオフィルムの形成に遺伝子の存在だけでは

ない別の要因が関与している可能性が考えられる。

これらのことから、少なくとも SGG の心内膜炎の発症にはコラーゲン上でのバイオフィルム形成能が強く関与していると考えられ、大腸がんなどでタイトジャンクションが崩壊した長官から血流に進入した SGG が心筋細胞に定着し心内膜炎を引き起こしているという感染モデルが推察される。

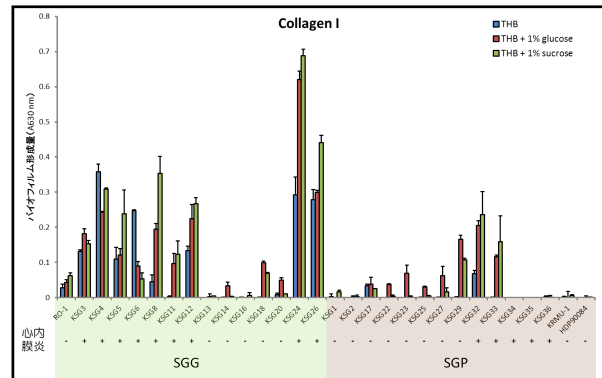


図 3. SG のバイオフィルム形成能

(6) ヒト腸管内における SG の分布

ゲノム配列と関連解析の結果から、SGG、SGP に焦点を当て、それぞれを特異的に検出するプライマーを設計し、新生児から 100 歳以上の男女合計 400 人以上の糞便サンプル DNA に対して PCR を行った。その結果、SGP に関しては授乳期の乳児の糞便中からは 5% の検出率であったのに対し、離乳後から 10 代までの糞便中には 30% を超える割合で存在していた。以後は老齢まで約 10% 程度の検出率を維持していた。SGP は出生後数カ月程度の新生児での臨床検体からの分離報告が殆どであったことを考えると非常に興味深い結果となった。また、男女間での差異は認められなかった。一方で SGG は 90 名の女性からのみ分離され全体での検出率は約 0.7% であった。

この結果からヒトにおける SG の生活環について下記のようなモデルが考えられる。SGP については産後に一定数が新生児の腸管に存在しており、これが何らかの要因で体内に浸潤すると稀に髄膜炎などの症状を引き起こす。離乳後は腸管内に定着しやすくなるが、宿主の生態防御の発達のためか病気を引き起こすことはあまり無くなり、老齢になり免疫反応が低下すると再び臨床症状を呈する事が増えてくる。一方で SGG は健康人の腸管には定着できず、非常にマイナーな菌種であるが、大腸がんや潰瘍性大腸炎などの大腸疾患を呈する患者の腸管ではその菌数が勃興し、崩壊した組織から体内へ浸潤し心内膜炎を引き起こすのであろう。そのため SGG の心内膜炎を呈した患者は高確率で大腸疾患を罹患しているという状況が生まれていると考えられる。今回開発した SGG に対する特異的 PCR は大腸疾患の早期発見のためのマーカーとして使用できる可能性も

示唆された。

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8件)

Ryoko, Y., Le, H.T.T., Arai, S., Tohya, M., Ishida-Kuroki, K., Nomoto, R., Kim, H., Suzuki, E., Osawa, R., Watanabe, and T., Sekizaki, T. Development of PCR for identifying *Streptococcus parasuis*, a close relative of *Streptococcus suis*. *The Journal of Veterinary Medical Science* (in press) [査読有]

Nomoto R., Takano S, Tanaka K, Tsujikawa Y, Kusunoki H, and *Osawa R. Isolation and identification of *Bifidobacterium* species from feces of captive chimpanzees. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. 36:91-99, 2017 [査読有]

Okura M, Osaki M, Nomoto R., Arai S, Osawa R, Sekizaki T, Takamatsu D. Current Taxonomical Situation of *Streptococcus suis*. *Pathogens*. Jun 24;5(3). pii: E45. doi: 10.3390/pathogens5030045, 2016 [査読有]

Nomoto R., Maruyama F., Ishida S., Tohya M., Sekizaki T., and Osawa R. Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22, and 26: *Streptococcus parasuis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 65:438-443, 2015 [査読有]

[学会発表](計5件)

野本竜平、丸山史人ほか「*Streptococcus gallolyticus* の種内・亜種内比較ゲノム解析による病原性因子の探索」第49回レンサ球菌研究会、2017年

野本竜平、丸山史人、大倉正稔、大澤朗「*Streptococcus gallolyticus* の病原因子の解明を目指した比較ゲノム解析」第90回日本細菌学会総会、2017年

野本竜平、小田巻俊孝ほか「ヒト腸管内における *Streptococcus gallolyticus* の分布に関する研究」第89回日本細菌学会総会、2016年

野本竜平、柴田裕介、大澤朗「*Streptococcus gallolyticus* の MLST 法と亜種判定のための Multiplex-PCR 法の開発」第47回レンサ球菌研究会、2015年

6. 研究組織

(1)研究代表者

野本竜平 (NOMOTO, Ryohei)

神戸市環境保健研究所・感染症部・研究員
研究者番号：60642238

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

丸山史人 (MARUYAMA, Fumito)

京都大学大学院・医学研究科・準教授

研究者番号：30423122

(4)研究協力者

()