

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K17406

研究課題名（和文）多剤耐性淋菌のゲノム解読に基づくサーベイランスと進化・伝播の解析

研究課題名（英文）Genomic surveillance and evolutionary analysis of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*

研究代表者

矢原 耕史 (Koji, Yahara)

国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター・室長

研究者番号：70542356

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：世界初の高度耐性株が報告された地域由来の淋菌のゲノムと薬剤感受性のデータを解析し、主要な薬剤耐性因子の系統的な分布を明らかにした上で、2つの主要な耐性菌の系統が相異なる進化をしてきた様相を明らかにした (Yahara et al., 2018, *Microbial Genomics*)。次に、日本を起源として世界へ拡散した耐性遺伝子の進化に焦点を当て、それが二段階の遺伝子の組み換えによって生じたこと等を明らかにした (Yahara et al., 2021, *Genome Medicine*)。さらに、検査センターと連携したスクリーニングにより、新型の耐性遺伝子が国内でまだ拡散していないことを確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本を起源とし世界に拡散した薬剤耐性淋菌の系統と遺伝子がどのように進化したのかを、ゲノムデータと薬剤感受性データの統合解析によって明らかにし、その成果を一流国際誌に2本の論文として発表することが出来た。特に2本目の論文は、ハーバード大学およびオックスフォード大学の研究グループと新たに取り組んだ、最先端の国際共同研究の成果として大変意義深いものになった。さらに、検査センターと連携したスクリーニングを約2年に渡って継続し、新型の耐性遺伝子が国内でまだ拡散していないことまで確認し、薬剤耐性淋菌の監視と制御に貢献した、社会的に意義深い研究になったと言える。

研究成果の概要（英文）：First, by analyzing the genome and antimicrobial susceptibility data of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from the region where the world's first highly resistant strain was reported, the phylogenetic distribution of major drug resistance factors was elucidated. This analysis revealed that two major resistant lineages have undergone different evolutionary paths (Yahara et al., 2018, *Microbial Genomics*). Next, focusing on the evolution of the resistance gene that originated in Japan and spread globally, we revealed that its evolution occurred through a two-step gene recombination process (Yahara et al., 2021, *Genome Medicine*). Furthermore, through screening in collaboration with commercial clinical laboratories, we confirmed that the new FC428-type resistance gene has not yet spread domestically.

研究分野：薬剤耐性菌のゲノム疫学

キーワード：薬剤耐性 進化 組換え 最近 淋菌 ゲノム 疫学 系統

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病原菌の薬剤耐性の進行は、世界の公衆衛生上の最重要課題の1つとなっており、薬剤耐性菌に起因する死者数は、2050年には年間1000万人を超え、癌による死者数を超えると推定されている。薬剤耐性菌のうち、警戒レベルが米国CDCで最高(喫緊)とされ、WHOでも第二位(高)とされているのが、淋菌であった。

日本の定点報告でも、年間1万近い淋菌感染症例が報告されている。加えて日本は、1)淋菌治療の第一選択薬である第3世代セファロスポリンに対する世界初の高度耐性株が2009年に分離され、2)これまでに世界で報告された耐性株の半数以上が分離され、3)米国で現在蔓延している耐性株の起源とされる、極めて重要な国となっていた。日本で分離された第3世代セファロスポリン高度耐性株と、その他の耐性株の半数近くは、他の代替薬剤にも耐性を示す多剤耐性株であり、その監視(サーベイランス)と伝播防止が喫緊に必要とされていた。そのためには、臨床分離株のゲノムを多数解読し、薬剤耐性を引き起こす複数の薬剤耐性因子(遺伝子型)を網羅的に解析する必要があった。

しかし、ゲノム解読に基づく淋菌のサーベイランスは、米国のグループが2014年と2016年に行った、過去に分離された菌株を対象としたものに留まっていた。従って、上記の点で淋菌の薬剤耐性にとって極めて重要な位置を占める日本において、1)主要薬剤に対する耐性因子が、そもそも現在どのように分布しどれだけ広まっており、それによって耐性度(表現型)をどれだけ説明できるのか、2)それらのゲノム上の薬剤耐性因子が、いつ獲得されどのように広まったのか、はいずれも未説明のままであった。

2. 研究の目的

(A) 世界初の高度耐性・多剤耐性株が分離された京都・大阪地域にまず焦点を当て、同地域に由来する淋菌のゲノムと薬剤感受性のデータから、主要薬剤に対して耐性を示す菌株の割合を明らかにし、近年も同地域で憂慮すべき高度耐性・多剤耐性株が検出されるかを明らかにする。また、主要薬剤に対する耐性因子(遺伝子型)と耐性度(表現型)の関係を明らかにし、耐性因子(遺伝子型)によって耐性度(表現型)をどれだけ説明できるかを明らかにする。さらに、国立感染症研および地方衛生研究所に保存されている古い日本株のゲノムと薬剤感受性のデータと統合解析することにより、日本を起源とし世界に拡散した2つのセファロスポリン低感受性系統がどのように進化してきたのかを明らかにする。

(B) 日本を起源とする2つのセファロスポリン低感受性系統に引き続き注目し、海外で分離された菌株のゲノムと薬剤感受性のデータと統合解析することで、当該系統の有する耐性遺伝子・変異がいつ、どのように生じ、海外に解散していったのかを明らかにする。

(C) 日本各地に由来する株を対象とした、前向きスクリーニング検査を継続することにより、新型の薬剤耐性遺伝子が国内でどれだけ拡散しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(A) 京都・大阪地域で2015年に分離された204株のゲノムデータと薬剤感受性データを解析した。加えて、日本のその他の地域でその他の年代に分離された67株のゲノムデータと薬剤感受性データも追加し、特に2つのセファロスポリン低感受性系統(ST-1901とST-7363)に焦点を当て統合解析した。

(B) セファロスポリン低感受性を司るモザイク型 *penA* 遺伝子が ST-1901、ST-7363 でそれぞれどのように進化してきたのかを探るために、モザイク型 *penA*-34 遺伝子を保有する ST-1901 で2005年に日本で分離された株をロングリードシーケンサーで解読すると同時に、計35カ国で分離された ST-1901 の1075株のゲノムデータを入手した。一方、ST-7363 について、1996年から2005年の間に日本で分離された103株(うち15株は本研究で新たに解読)のゲノムデータを入手した。そして、ST-1901、ST-7363 それぞれの横軸を実年代とした系統樹を構築し、統合解析を行った。

(C) 新型(FC428型)セファロスポリン耐性 *penA* 遺伝子を、民間検査センターの日常検査の中でスクリーニングして頂いた。具体的には、セフトリアキソンとセフィキシムへの感受性をディスク法で検査して頂き、セフトリアキシソンの阻止円径 39mm かつセフィキシムの阻止

円径 23mm の場合に陽性株とみなし、株を感染研に輸送してゲノムを解読するという体制を構築した。

4. 研究成果

(A) 主要薬剤に対して耐性を示す菌株の割合をまず明らかにした。特に、第一選択薬であるセフトリアキソンに耐性を示す新たな菌株は見つからないことを確認した。その一方で、セファロスポリン系薬剤に対する感受性の低下を引き起こす主要な因子であるモザイク型 *penA* 遺伝子について、通常はそれを有する ST-7363 系統の一部に、組換えによって感受性型の *penA* 遺伝子に戻っているサブ系統が存在し、維持されていることを明らかにした。また、キノロン系薬剤への耐性は、85%の菌株で見られ、DNA ジャイレースサブユニット A の 91 番目と 95 番目のリンクしたアミノ酸置換によって、感度 99%・特異度 100%で判別できることを明らかにした。欧米で第二選択薬として採用されているアジスロマイシンについては、約 10%の菌株が耐性を示し、上記の 2 種類の薬剤に比べてその因子は明瞭でなかった。さらに、セファロスポリン低感受性の二大系統（上記の ST-7363 および ST-1901）に注目し、日本の他の地域で過去（1996 年以降）に分離された計 67 株のゲノムと薬剤感受性のデータを追加して解析することで、両者が相異なる進化をしてきたことを明らかにした。具体的には、ST-7363 系統でモザイク型 *penA*-10 遺伝子が一度獲得された後、ST-1901 系統ではモザイク型 *penA*-10 および *penA*-34 遺伝子が複数回独立に獲得されたことを明らかにした。この論文は、査読の過程で、当初予定していなかったデータおよび解析を加えて、*Microbial Genomics* 誌に出版した。また、国立遺伝学研究所の研究集会、薬剤耐性菌研究会、さらにゲノム微生物学会の奨励賞受賞講演の一部で口頭発表した。

(B) 初年度に出版した論文を踏まえ、日本から世界に拡散していったと考えられている二大系統（ST-1901、ST7363）を対象に、発展的な解析に着手した。まず、セファロスポリン耐性を主に司るモザイク型 *penA*-34 遺伝子に焦点を当て、それを有する ST-1901 の株で 2005 年に日本で最初に分離され保存されていた 3 株のゲノムを MinION で解読し、Illumina リードで補正した完全長のゲノムの塩基配列を得た。それを、ハーバード大学、オックスフォード大学との共同研究により、世界各地（37 カ国）で分離された ST-1901 の約 1000 株分のゲノムの塩基配列データと統合し、横軸を実年代とした系統樹を、最新の手法とスーパーコンピューターを用いて初めて構築した。一方、別のモザイク型 *penA*-10 遺伝子を主に有する ST7363 についても、1996 年から 2005 年に日本で分離された 103 株のゲノムを解読し、過去に解読した 88 株のゲノムの塩基配列データと統合し、横軸を実年代とした系統樹を構築した。*penA*-34 を有する ST-1901 のサブ系統の起源が 1990 年から 1999 年であることを推定した上で、*penA*-34 が、2 段階の組換えによって生じたと考えられることを明らかにした。さらに、キノロン耐性について、ST7363 が *penA*-10 を獲得した後、1996 年から 1998 年という短期間で GyrA 95 と ParC 87-88 のアミノ酸置換を起こしたことを明らかにした。さらに、文献および過去のアンケート調査に基づき、これらの耐性因子と当時の抗菌薬使用状況の関係に関する考察を進めた。以上の成果を、トップジャーナルである *Genome Medicine* 誌に、全査読者から高い評価を得て出版すると同時に、英国 Wellcome Trust の薬剤耐性国際カンファレンスや細菌学会で発表した。

(C) 令和 5 年の 9 月末まで、約 2 年間に渡り民間検査センターでのスクリーニングを継続し、合計で 27 都道府県から 564 株（ただしそのうち 343 株は東京、78 株は埼玉、47 株は神奈川由来）をスクリーニングしたが、全て陰性株であった。この結果から、新型（FC428 型）セファロスポリン耐性遺伝子を保有する薬剤耐性淋菌は幸い、日本では今のところ拡散していないと結論付けられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yahara Koji, Ma Kevin C., Mortimer Tatum D., Shimuta Ken, Nakayama Shu-ichi, Hirabayashi Aki, Suzuki Masato, Jinnai Michio, Ohya Hitomi, Kuroki Toshiro, Watanabe Yuko, Yasuda Mitsuru, Deguchi Takashi, Eldholm Vegard, Harrison Odile B., Maiden Martin C. J., Grad Yonatan H., Ohnishi Makoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Emergence and evolution of antimicrobial resistance genes and mutations in <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genome Medicine	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13073-021-00860-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Koji Yahara, Shu-ichi Nakayama, Ken Shimuta, Ken-ichi Lee, Masatomo Morita, Takuya Kawahata, Toshiro Kuroki, Yuko Watanabe, Hitomi Ohya, Mitsuru Yasuda, Takashi Deguchi, Xavier Didelot, Makoto Ohnishi	4. 巻 4
2. 論文標題 Genomic surveillance of <i>Neisseria gonorrhoeae</i> to investigate the distribution and evolution of antimicrobial-resistance determinants and lineages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbial Genomics	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/mgen.0.000205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Osnes Magnus N, Dorp Lucy van, Brynildsrud Ola B, Alfsnes Kristian, Schneiders Thamarai, Templeton Kate E, Yahara Koji, Balloux Francois, Caugant Dominique A, Eldholm Vegard	4. 巻 38
2. 論文標題 Antibiotic Treatment Regimes as a Driver of the Global Population Dynamics of a Major Gonorrhoea Lineage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 1249 ~ 1261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/molbev/msaa282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Koji Yahara, Kevin C. Ma, Tatum D. Mortimer, Ken Shimuta, Shu-ichi Nakayama, Aki Hirabayashi, Masato Suzuki, Michio Jinnai, Hitomi Ohya, Toshiro Kuroki, Yuko Watanabe, Mitsuru Yasuda, Takashi Deguchi, Vegard Eldholm, Odile B. Harrison, Martin C. J. Maiden, Yonatan H. Grad, Makoto Ohnishi
2. 発表標題 Emergence and evolution of antimicrobial resistance genes and mutations in <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
3. 学会等名 SMBE everywhere（国際学会）
4. 発表年 2023年

1 . 発表者名 Koji Yahara, Kevin C. Ma, Tatum D. Mortimer, Ken Shimuta, Shu-ichi Nakayama, Aki Hirabayashi, Masato Suzuki, Michio Jinnai, Hitomi Ohya, Toshiro Kuroki, Yuko Watanabe, Mitsuru Yasuda, Takashi Deguchi, Vegard Eldholm, Odile B. Harrison, Martin C. J. Maiden, Yonatan H. Grad, Makoto Ohnishi
2 . 発表標題 Emergence and evolution of antimicrobial resistance genes and mutations in <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
3 . 学会等名 NgoRS (国際学会)
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Koji Yahara, Kevin C. Ma, Tatum D. Mortimer, Ken Shimuta, Shu-ichi Nakayama, Aki Hirabayashi, Masato Suzuki, Michio Jinnai, Hitomi Ohya, Toshiro Kuroki, Yuko Watanabe, Mitsuru Yasuda, Takashi Deguchi, Vegard Eldholm, Odile B. Harrison, Martin C. J. Maiden, Yonatan H. Grad, Makoto Ohnishi
2 . 発表標題 Emergence and evolution of antimicrobial resistance genes in <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
3 . 学会等名 日本ゲノム微生物学会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Koji Yahara, Kevin C. Ma, Tatum D. Mortimer, Ken Shimuta, Shu-ichi Nakayama, Aki Hirabayashi, Masato Suzuki, Michio Jinnai, Hitomi Ohya, Toshiro Kuroki, Yuko Watanabe, Mitsuru Yasuda, Takashi Deguchi, Vegard Eldholm, Odile B. Harrison, Martin C. J. Maiden, Yonatan H. Grad, Makoto Ohnishi
2 . 発表標題 Emergence and evolution of antimicrobial resistance genes in <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
3 . 学会等名 日本細菌学会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Koji Yahara, Kevin C. Ma, Tatum D. Mortimer, Ken Shimuta, Shu-ichi Nakayama, Aki Hirabayashi, Masato Suzuki, Michio Jinnai, Hitomi Ohya, Toshiro Kuroki, Yuko Watanabe, Mitsuru Yasuda, Takashi Deguchi, Vegard Eldholm, Odile B. Harrison, Martin C. J. Maiden, Yonatan H. Grad, Makoto Ohnishi
2 . 発表標題 Emergence and evolution of cephalosporin-resistance genes and fluoroquinolone-resistance mutations spreading worldwide in <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
3 . 学会等名 Wellcome Trust Conference "Antimicrobial Resistance - Genomes, Big Data and Emerging Technologies 2020 (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1. 発表者名 矢原耕史
2. 発表標題 種内・近縁種間での遺伝情報の水平移動 - ウイルスと薬剤耐性菌を例に -
3. 学会等名 遺伝研・研究集会「自然界の生物種間における遺伝情報の多様性をもたらす"DNA水平伝播"の解析と活用法」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koji Yahara, Shu-ichi Nakayama, Ken Shimuta, Ken-ichi Lee, Masatomo Morita, Takuya Kawahata, Toshiro Kuroki, Yuko Watanabe, Hitomi Ohya, Mitsuru Yasuda, Takashi Deguchi, Xavier Didelot, Makoto Ohnishi
2. 発表標題 Genomic surveillance of Neisseria gonorrhoeae to investigate the distribution and evolution of antimicrobial-resistance determinants and lineages
3. 学会等名 薬剤耐性菌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢原耕史
2. 発表標題 Population genomic studies of microbial recombination, phylogeny, and population structure
3. 学会等名 ゲノム微生物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ハーバード大学			
英国	オックスフォード大学			
ノルウェー	国立公衆衛生研究所			