

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16637

研究課題名(和文) Whole genome sequencing analysis of Streptococcus pneumoniae strains to suggest the mechanism of drug resistances and serotype switch based on recombination events

研究課題名(英文) Whole genome sequencing analysis of Streptococcus pneumoniae strains to suggest the mechanism of drug resistances and serotype switch based on recombination events

研究代表者

中野 哲志 (Nakano, Satoshi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30794987

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)：肺炎球菌は菌血症や髄膜炎といった予後が悪い感染症を引き起こすため、ワクチンが乳幼児に定期接種されている。しかし同ワクチンの定期接種化後、ワクチンが効かない型の肺炎球菌や抗菌薬に耐性を示す肺炎球菌が増加した。本研究では肺炎球菌の遺伝子配列を網羅的に解読することにより、上記のような表現形の変化がどのようにして起きたかを明らかにした。カルバペネム系抗菌薬に対する耐性は主にpbp1a領域の変化によって発生していたが、一部異なる機構による耐性メカニズムもあった。またマクロライド耐性は様々なタイプのトランスポゾンが挿入されることにより引き起こされていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は全ゲノム解析を用いて、肺炎球菌ワクチン導入後にどのようなゲノムを持つ肺炎球菌が増加したかを、抗菌薬耐性やワクチン無効の莢膜型の観点から明らかにする研究である。肺炎球菌は遺伝子組み替えを起こしやすい菌であることが知られている。これにより容易にワクチンが効果を示さなくなる。現在肺炎球菌ワクチン開発は莢膜型の疫学情報に基づいて開発が行われている。ゲノムの組み替えのメカニズムや菌の伝播様式が明らかになれば、より効果的なワクチン開発が可能となる。本研究はそのゲノムの組み替えメカニズムや地域をまたいだ伝播様式を明らかにするための基礎的な研究である。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus pneumoniae is one of the major pathogens in community-acquired infections. After the introduction of pneumococcal conjugate vaccines, pneumococci with non-vaccine types and/or antibiotic resistance increased globally. Our study aimed to clarify the mechanism of the resistance and its molecular epidemiology. Our analysis showed that the most of the carbapenem-resistant pneumococci have altered pbp1a (pbp1a-13), suggesting that the gene is circulating among several clones. With regard to macrolide resistance, we found several transposon types that had macrolide resistance gene(s). This results indicated that a high rate of macrolide resistance in Japan was caused by not horizontal transmission of the genes but the antibiotic selection pressure.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：肺炎球菌 カルバペネム耐性 マクロライド耐性 ペニシリン結合タンパク PBPタイピング

## 1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌は $\alpha$ 溶血を示すグラム陽性の双球菌である。同菌は市中肺炎、髄膜炎、中耳炎、関節炎、腹膜炎など、様々な感染症を引き起こす。肺炎においては肺炎球菌は起炎菌の第一位であり、本邦における死亡原因の第三位が肺炎であることを念頭に置くと、非常に重要な病原体となる。また、小児領域においては肺炎球菌性髄膜炎は予後が悪く、その予防、治療法の確立が重要である。小児の侵襲性肺炎球菌感染症を予防するため、世界中で結合型肺炎球菌ワクチン(PCV)が定期接種化されている。本邦でも2013年に同ワクチンが定期接種化されている。ただ、現在使用されているPCVはこれまでに100種類以上発見されている莢膜型のうち13種類をカバーしているに過ぎない。

肺炎球菌は遺伝子組み換えを頻繁に起こす菌として知られ、グリフィスは1928年に肺炎球菌を用いて遺伝子組み換えによる形質転換を証明している。この易形質転換性が現在肺炎球菌における公衆衛生上の問題となっている。すなわち、上記のPCV定期接種化によって肺炎球菌が容易にPCVがカバーしていない莢膜型に形質転換してしまうのである。これはPCVの効果の低下を意味する。海外からの報告では、PCVの導入によって侵襲性肺炎球菌患者数は7-8割程度減少したが、多くの国ではすでに下がり止まりが観察され、一部の国では患者数の再増加が観察されている。将来の肺炎球菌感染症の再増加を食い止めるために、新規戦略の構築が必要な状況となっている。

## 2. 研究の目的

肺炎球菌が形質転換により非ワクチン莢膜型に変化し、ワクチンが無効となってしまうことは上記の通りである。これに対する戦略の一つとして、我々は肺炎球菌の遺伝子組み換えメカニズム解明に取り組むことにした。

まず、ペニシリンバイndingプロテイン(PBP)領域の遺伝子組み換えにより生じていると考えられる肺炎球菌の抗菌薬耐性について、その疫学情報を取得し、PBP領域の遺伝子組み換え様式を明らかにする。

次にマクロライド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質に耐性を示す*mefE*遺伝子、*ermB*遺伝子、*tetM*遺伝子に着目し、これを保持しているTn916-like ICEの構造を明らかにする。

さらに2012年以降に本邦で小児患者において流行している肺炎球菌クローンを特定し、その地域間伝播様式を明らかにし、遺伝子学的背景を解明する。

## 3. 研究の方法

2012年から2017年にかけて、我々は全国小児肺炎球菌感染症サーベイランスを行い、小児患者から約1500株の肺炎球菌を収集した。本研究では同菌株を用いた研究を行った。これまでの先行研究で、本邦における肺炎球菌のペニシリン耐性、セファロsporin耐性、カルバペネム耐性には*pbp1a*-13獲得が関与していることが疑われたため、この由来の検索を行った。海外からの報告では*pbp1a*-13は一部の莢膜型19A株が保有していることが知られているため、本邦で最も検出頻度の多い莢膜型19AST3111株について分子疫学解析を行う事とした。サーベイランス収集菌株の中の19A-ST3111、計119株についてilluminaプラットフォームを用いたドラフトゲノム解析を行った。具体的にはNextseq500を用いて150bps $\times$ 2のペアエンドドラフトゲノムを取得し、アセンブリした後、PBP typing、各種耐性遺伝子の検出、Tn916-like-ICEの構造解析、Core genomeを用いた系統解析を行った。

また、本邦では2015年以降、莢膜型12Fによる侵襲性肺炎球菌感染症が急増している。そのため、同菌株についても全ゲノム解析を行った。子の解析ではサーベイランスで収集した莢膜型12F株、計75株を解析した。上記の19A株解析と同様にNextseq500を用いてドラフトゲノムを取得した後、解析を行った。12FについてはすでにNCBIデータベースにリファレンスゲノムの登録があったため、系統解析についてはこれを用いたマッピングを用いた方法を採用した。本解析では上記のPBP typing、各種耐性遺伝子の検出、Tn916-like-ICEの構造解析に加え、遺伝子組み換え領域の推定、分岐年代推定、Phylogeographic analysisを行った。

## 4. 研究成果

### ①19A-ST3111クローンに関する研究

本邦で検出された19A-ST3111株の約67%がペニシリンに耐性であり、約15%が広域抗菌薬であるメロペネムにも非感受性であった。典型的な耐性遺伝子のプロファイルは*ermB*遺伝子陽性、*tetM*遺伝子陽性、*mefE*遺伝子陽性、*pil1I*陽性、*ermTR*遺伝子陰性、*tet0*遺伝子陰性、*folP*遺伝子陰性、*folA*遺伝子内置換陰性、*folP*遺伝子内挿入陰性、*pili2*陰性であった。PBPプロファイルは*pbp1a:pbp2b:pbp2x=13:24:112*が最も主流で、47株(40%)がこのプロファイルを示した。

次いで、2:0:112 (n=29)、JP2:16:112 (n=22) と続いた。pbp1a-13 を保有する 19A-ST3111 株の 96% はペニシリンに耐性を示した、メロペネム耐性率は 32% であった。

系統解析では、本邦における薬剤耐性 19A-ST3111 株は 4 つのクラスターで構成されていることが判明した。その 4 つの中で最も大きなクラスターは *pbp1a-13* を保有しており、本邦における薬剤耐性 19A-ST3111 においても *pbp1a-13* の関与が示唆された。一方、本邦で検出される 19A-ST3111 株が広く *pbp1a-13* を保有しているわけではないことも判明した。そのため、*pbp1a-13* のリザーバーは他クローンに存在していると推測される。

また、本邦の 19A-ST3111 株は Tn2017 を保有している事が判明した。このトランスポズンは腸球菌から発見されたテトラサイクリン耐性遺伝子を持つ Tn916 を基本構造としているが、ORF6 内に、マクロライド耐性遺伝子の一つである *mefE* 遺伝子を含む MEGA element が挿入されていた。また、ORF9 内には同じくマクロライド耐性遺伝子である *ermB* 遺伝子を含む Tn917 が挿入されており、この 3 つの耐性遺伝子 (*tetM*、*ermB*、*mefE*) をセットで外来耐性遺伝子として獲得しクローン性拡散していると考えられた。

## ②本邦で急増した 12F 株に関する研究

本解析では 12F の検出が 2015 年以降急増したが、同株は比較的良好な薬剤感受性を示し、薬剤耐性が急増の原因ではないと考えられる。ペニシリンに対しては一部の菌が耐性を示すが、そのほとんどは MIC=0.12µg/ml であり、軽度耐性である。一方、本邦で検出される肺炎球菌株の大半がそうであるように 12F 株もマクロライド系抗菌薬に対しては高度耐性を示した。

本邦の 12F 株も *pbp1a-13* を保有していた。これまでの研究結果と総合すると、*pbp1a-13* の保有のみでは大幅な薬剤耐性化は起こらないが、これに追加して *pbp2b* や *pbp2x* に変異が起こるとペニシリン、セファロsporin、カルバペネムに対して耐性化すると考えられる。

本邦で流行している 12F 株には ST4846 とその double locus variant である ST6945 が存在することが判明した。検出数は ST4846 の方が多く、これが主要な遺伝子型であった。いずれの ST についても菌株間の平均 SNP 数は数十程度であったため、クローン性を持って国内に伝播拡散していると考えられる。また、ST 別の系統樹解析を行った結果、ST4846 内により近縁株で構成されるクラスター (PC-JP12F) が存在することが判明した。分岐年代推定によると、同クラスターは 2012 年ごろに分岐発生しており、近年出現したクローンが本邦に拡散していた。また伝播経路をベイズ解析により推定してみると、同クラスターに属する株は関東地方から各地域 (東北、東海、近畿、山陰、九州地方) に伝播した推察された。

Tn916-like-ICE の構造解析では、12F 株は Tn6002 を保有していることが判明した。Tn6002 は ORF19-20 間にマクロライド耐性遺伝子 *ermB* が挿入されており、このトランスポズンの挿入により高度マクロライド耐性を獲得したと考えられる。同領域の核酸配列を基に系統樹を作成してみると、PC-JP12F、それ以外の ST4846 株、ST6945 株の Tn916-like-ICE 領域はこれに一致してクラスターを構成した。これは今回解析した 12F 株において、Tn916-like-ICE が各クラスターが分岐した後に挿入され、クローン性に拡散していることを意味している。同一国内で検出される同一莢膜型、近縁遺伝子型クローン内においても Tn916-like-ICE が複数回挿入されていることは、同トランスポズンの伝播様式を解明するうえでも重要な知見である。

本邦の 12F 株はどのように発生したのか、海外から流入してきたのか。このような疑問のもとに、世界における本邦の 12F 株の位置づけを今回明らかにした。本邦の 12F 株を肺炎球菌のグローバルデータベースに登録されている株と比較してみた結果、同株は本邦独自のクローンであることが判明した。近縁株としては香港から 1 株、ポーランドから 2 株登録があったが、これらの株との関連性は不明である。系統樹解析によると、この 3 株は本邦の ST6945 株とより近縁であり、数十年前 (分岐年代推定によると 1942 年ごろ) に ST4846 と ST6945 が分岐した後に、ST6945 から分岐発生している可能性が考えられる。

今回の一連の研究で以下の事が判明した。

- ① 本邦の β ラクタム系抗菌薬耐性には *pbp1a-13* が関与していると考えられるが、実際には *pbp1a-13* を保有し、さらに *pbp2b* あるいは *pbp2x* に追加で変異が発生すると薬剤耐性が表現型として観察される。
- ② *pbp1a-13* の由来は依然として不明であるが、本邦で 2012 年最も検出の多かった 19A-ST3111 が由来ではなかった。また、ペニシリンに耐性を示さない株 (12F 株) にも *pbp1a-13* を認めるため、感受性株にも広く *pbp1a-13* が拡散している可能性がある。これはすなわち、本邦の肺炎球菌は薬剤耐性化を容易に引き起こす素因を保有している可能性を示唆している。
- ③ 本邦で検出される肺炎球菌はマクロライド系抗菌薬耐性率が他国と比較して非常に高率であるが、これは同一のトランスポズンの伝播に起因するものではない可能性が高い。すなわ

ち、現時点では高マクロライド耐性率は遺伝子学的側面よりも抗菌薬の非適正使用に起因する可能性が高い（マクロライド系抗菌薬の高頻度使用による選択圧）。しかし、これについては証拠が不十分であり、より詳細な検討が必要であると考えます。

- ④ 肺炎球菌感染症において、一つのクローンによる国全体への拡散が数年といった短期間に起こりうる（実際に起きていた）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakano Satoshi, Fujisawa Takao, Ito Yutaka, Chang Bin, Matsumura Yasufumi, Yamamoto Masaki, Suga Shigeru, Ohnishi Makoto, Nagao Miki	4. 巻 63
2. 論文標題 Penicillin-Binding Protein Typing, Antibiotic Resistance Gene Identification, and Molecular Phylogenetic Analysis of Meropenem-Resistant Streptococcus pneumoniae Serotype 19A-CC3111 Strains in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e00711-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.00711-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Satoshi, Fujisawa Takao, Ito Yutaka, Chang Bin, Matsumura Yasufumi, Yamamoto Masaki, Suga Shigeru, Ohnishi Makoto, Nagao Miki	4. 巻 26
2. 論文標題 Streptococcus pneumoniae Serotype 12F-CC4846 and Invasive Pneumococcal Disease after Introduction of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine, Japan, 2015-2017	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 2660-2668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3201/eid2611.200087.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中野 哲志
2. 発表標題 PCV13導入後に増加した肺炎球菌莢膜型12Fの分子疫学解析
3. 学会等名 第52回日本小児感染症学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年～2021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
---------	---------