

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16380

研究課題名（和文）口腔レンサ球菌の網羅的比較ゲノム解析による感染性心内膜炎起因菌の遺伝的特徴の探索

研究課題名（英文）Comprehensive comparative genomic analysis of oral streptococci to explore the genetic characteristics of the pathogen causing infectious endocarditis

研究代表者

奥野 未来（Okuno, Miki）

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：30814462

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は感染性心内膜炎の発症メカニズムの解明、予防および治療の開発に繋がる知見を得ることを目的として、口腔レンサ球菌を対象とした感染性心内膜炎の起因菌と口腔常在菌の比較ゲノム解析を実施した。S. mutansとS. gordoniiとともに感染性心内膜炎起因菌と口腔常在菌に系統的な偏りは見られず、起因菌に偏在する遺伝子も確認されなかった。感染性心内膜炎の発症に関わる因子は特定の遺伝子の獲得または欠損ではなく、遺伝子のバリエーションや発現制御領域による差異である可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染性心内膜炎の発症率は3-7/10万人・年と推定されており、決して多くはないが、いったん発症すると重篤な転帰をたどり、手術や長期入院を要するために患者の負担が大きい疾患である。また、高齢者の罹患率が高いことから、超高齢化社会を迎える本邦では患者の増加が予想されており、発症メカニズムの解明や効果的な予防法の実現に取り組む必要がある。本研究は、そのための基盤となる起因菌のゲノム情報の整備および比較ゲノム解析を実施した。

研究成果の概要（英文）： To gain insight into the pathogenesis of Infectious endocarditis and the development of prevention and treatment, I performed a comparative genomic analysis between the causative bacteria of infectious endocarditis and oral commensals. No phylogenetic bias was observed between the causative bacteria and oral commensals of both S. mutans and S. gordonii, and no genes were identified that were characteristic of the causative bacteria. It has been suggested that the factors involved in causing infectious endocarditis may not be the acquisition or loss of specific genes, but differences due to gene variants or regulatory regions of expression.

研究分野：比較ゲノム解析

キーワード：口腔レンサ球菌 比較ゲノム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感染性心内膜炎 (IE) は、細菌が心臓の内腔を覆う心内膜の表面または弁膜に付着し、疣腫と呼ばれる感染巣を形成することで発症する。持続的な菌血症を生じ、弁破壊など心臓の組織に障害を与えるだけでなく、疣腫が全身に散布されることで血管塞栓や膿瘍などの播種性病変をきたす。IE の推定発症率は 3~7/10 万人・年 (Baddour et al., *Circulation*, 2015) と多くはないが、いったん発症すると重篤な転帰をたどり、手術や長期入院を要するために患者の負担が大きい。また、高齢者の罹患率が高いことから、超高齢化社会を迎える本邦では患者の増加が予想される。

IE の主要な起因菌としては、黄色ブドウ球菌、口腔レンサ球菌、腸球菌が挙げられる。しかし、IE の発症には単一の毒素ではなく、組織侵入、組織破壊、宿主免疫系回避、血管内増殖、付着因子、バイオフィーム形成、血液凝固などに関わる病原因子が複合的に働くと考えられるが、どのような菌種、どのような系統、どのような遺伝的特徴をもつ菌株が、どのようなメカニズムで IE を引き起こすのかは明確になっていない。

これまでに IE 患者由来口腔レンサ球菌の比較ゲノム解析がいくつかの研究グループにより実施されているが、いずれも IE 起因菌特異的な病原因子の特定には至っていない (Hinse et al., *BMC Genomics*, 2011; Kilian and Tettelin, *mBio*, 2019; Iversen et al., *Sci. Rep.*, 2020)。その理由として、1. 解析規模が小さい、2. IE 起因菌のみの比較解析である、3. IE 起因菌と口腔内常在菌との単純な遺伝的差異の探索に留まっている、などが挙げられる。

2. 研究の目的

本研究は、本邦の主要な IE 起因菌の一つである口腔レンサ球菌に焦点を当て、IE 起因菌のゲノム配列情報の取得および IE 起因菌 口腔内常在菌の比較ゲノム解析により、IE 起因菌の遺伝的特徴を明らかにすることを目指す。本研究で明らかにしたいことは以下の 3 点である。

- (1) IE 起因菌と常在菌に系統進化学的な差異は存在するのか
- (2) IE 起因菌の遺伝的特徴 (遺伝子、変異、ゲノム構造など) は何か
- (3) IE 起因菌はどのようにして IE を発症するのか

3. 研究の方法

当初の計画を以下に示す。

(a) 感染性心内膜炎起因菌の比較ゲノム解析

IE の起因菌の全ゲノムシーケンスを実施し、ゲノム情報および遺伝子セットを用意した。久留米大学病院、東京女子医科大学にて過去に分離されたレンサ球菌を分与いただき、すべての株について Illumina データを取得した。また、同一患者由来の口腔内由来株と血液サンプル由来株に関しては完全長ゲノムを構築するために Oxford Nanopore データを取得した。次に、比較対象として公開データの口腔レンサ球菌の配列およびメタ情報を収集した。*S. mutans* に関しては日本人健康者の口腔内から分離された 75 株を利用した。株数が確保できた *S. mutans* と *S. gordonii* に関してこれらの配列データを用いて、core-gene による系統推定、既知の病原因子の予測、pan-GWAS 解析を実施した。

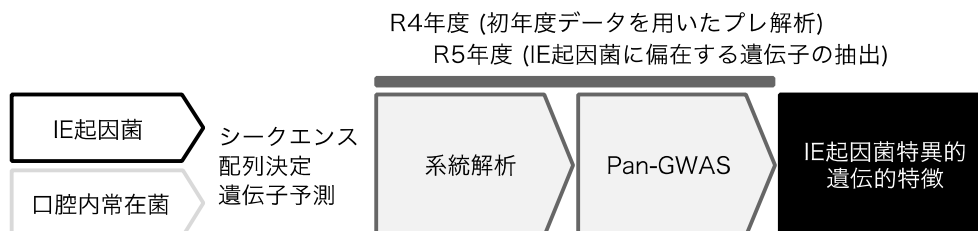


図 1 研究計画の概要

今回の研究を進めていく中で、さらに以下の 2 点に取り組んだ。

(b) 感染性動脈瘤を引き起こした B 群レンサ球菌のゲノム解析

感染により動脈壁構造が破壊されて生じる瘤を感染性動脈瘤と呼び、非感染性動脈瘤に比して破裂頻度が高く、極めて重篤な病態である。2021 年、B 群レンサ球菌 (*S. agalactiae*) による感染性動脈瘤を発症した患者から分離された株のゲノム解析を実施し、莢膜型・ST を決定し、病原因子を探索した。

(c) 配列アライメント可視化ツールの開発

2つの配列間にある大規模な構造変異の検出および可視化はゲノム進化の理解への助けとなりうる。より簡便に、多数の配列を扱うことを想定し、アライメントの可視化の主要な手法である Linear-comparison と dot-plot の2つに関して可視化ツールの開発に取り組んだ(図2)。python3 matplotlib ライブラリを使用し、既存のアライメントツールの出力結果を入力データとして受け付けるため、配列アライメントからデータの可視化までをマニュアル作業なしに行えるようにした。

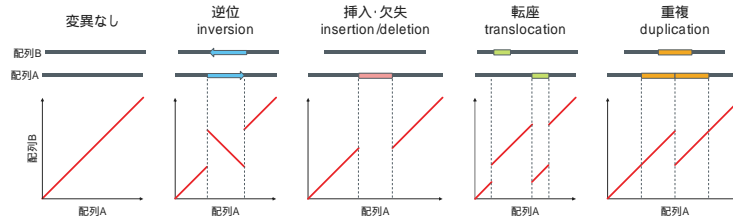


図2 linear-plot(上段)と dot-plot(下段)の比較

4. 研究成果

(a) 感染性心内膜炎起因菌の比較ゲノム解析

IE患者の口腔内または血液、疣腫由来の32株と公開データの日本人健常者の口腔から分離された *S. mutans* 75株の合計107株による系統推定を実施したところ、口腔内とIE起因菌に遺伝的な偏りは見られなかった(図3)。5名の患者の口腔内とIE起因菌が疑われる血液サンプルから分離された株はいずれも同一クローンと言えるほど近縁であり、この患者らは口腔内常在 *S. mutans* が血液に侵入し、IEを引き起こしたことが強く疑われた。VFDBに登録されている既知の病原因子を探索したが、IE起因菌のみが保有する遺伝子は確認されなかった(図3)。

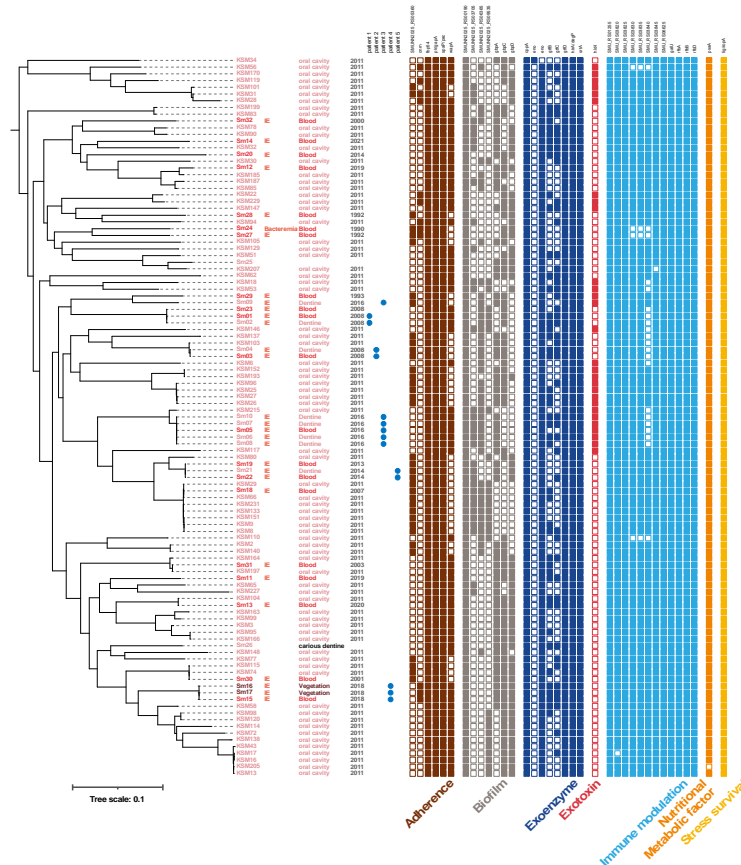


図3 *S. mutans* の系統樹と病原因子プロファイル

次に、IE患者の血液サンプル由来菌(23株)と健常者口腔内常在菌(75株)の2群間で、片方の群に偏在するような遺伝子を網羅的に探索したが、有意差のある遺伝子は見つからなかった。IEを引き起こすポテンシャルを有する株の違いは特定の遺伝子の獲得または欠損ではなく、遺伝子のバリエーションや発現制御領域による差異である可能性が考えられた。

健常者の口腔常在菌 12 株と IE 患者の血液サンプル由来の 26 株の計 38 株の *S. gordonii* による系統解析の結果、*S. mutans* と同様に口腔内と IE 起因菌に遺伝的な偏りは見られず、片方の群に偏在するような遺伝子も確認されなかった(図 4)。

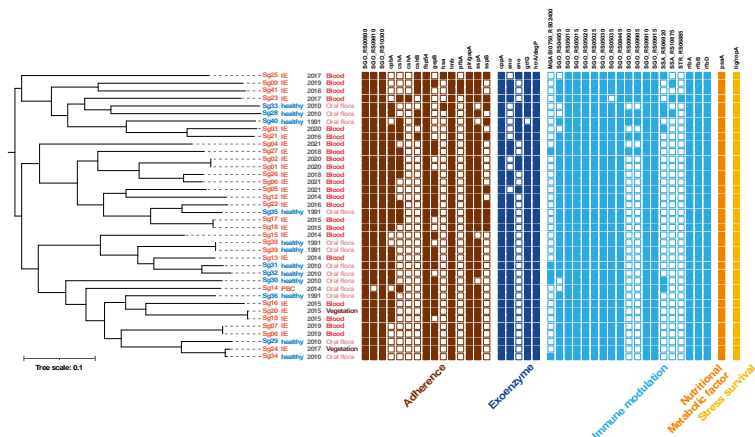


図 4 *S. gordonii* の系統樹と病原因子プロファイル

本研究は IE 起因菌のゲノム配列を決定し、口腔内常在細菌との比較を実施した。これだけの株数での IE 起因菌のゲノム比較解析はこれまでに報告がなく、また IE 起因菌、口腔内常在菌ともに日本人から分離された株を使用することができたので、データセットとしては十分なものであったと考える。しかし、今回の研究では年齢や人工弁の置換術の履歴など IE 患者側の背景を十分に考慮することができなかつたため、IE 起因菌の遺伝的特徴を突き止めることができなかったものと考えられる。この問題点を解決するには、患者情報をもとに IE 起因菌の病原性がテシャルを細分化し解析をするか、菌の溶血性や細胞付着性などの表現型の情報を実験的に取得し、それらを踏まえて解析する必要があると考えられる。今後、これらを踏まえた解析を進める予定である。

(b) 感染性動脈瘤を引き起こした B 群レンサ球菌のゲノム解析

ゲノム解析の結果、感染性動脈瘤を起こした B 群レンサ球菌は莢膜型 III, ST335(CC19)であることが分かった(図 5)。また、2017 年、壊死性筋膜炎と感染性心内膜炎を呈した重症侵襲性感染症の成人患者からも本菌と同じ莢膜型 III, ST335 が分離されており、両株は非常に高度に保存されていた。B 群レンサ球菌は一般的には新生児の髄膜炎起因菌として知られており、小児感染症では CC17 が多いことが報告されている。B 群レンサ球菌による成人の侵襲性感染症が増加傾向であることから、今後の動向を注視する必要があると考えられる。

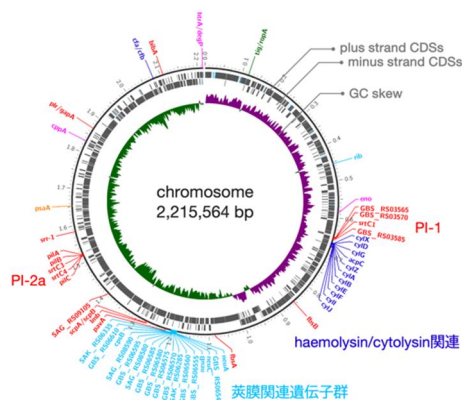


図 5 感染性動脈瘤を引き起こした B 群レンサ球菌の染色体マップ

(c) 配列アライメント可視化ツールの開発

Linear-comparison は多数のツールが開発されているが、本ツールは blastn, lastz, mummer の出力結果を入力として扱うことができる。配列のレイアウトに関しては自由度を維持しつつ、必須のオプションを最小限にし、解析段階での「とりあえず可視化してみる」の労力を下げたことで研究の効率化が期待される。

既存の dot-plot 描画ツールは複数のサンプルを扱うことを想定していない。また、linear-comparison の場合も、比較可能な配列は上下の配列のみになるため、複数の配列を比較する場合は、読み取れる情報が配列の順序に依存しかねない。本研究で開発した blastn2dotplots は、アライメントツールの中で使用頻度の高い blastn の出力結果を入力として、複数サンプルの dot-plot 図を 1 枚のシートに出力する(図 6)。また、必要に応じて subplot 間の間隔や目盛の幅、最小のアライメント長、配列相同性の最小値などをオプションで変更可能とした。プラスミドから真核生物の染色体まで扱うことができ、種内・種間における配列比較の可視化をより簡便に行うことを実現した。

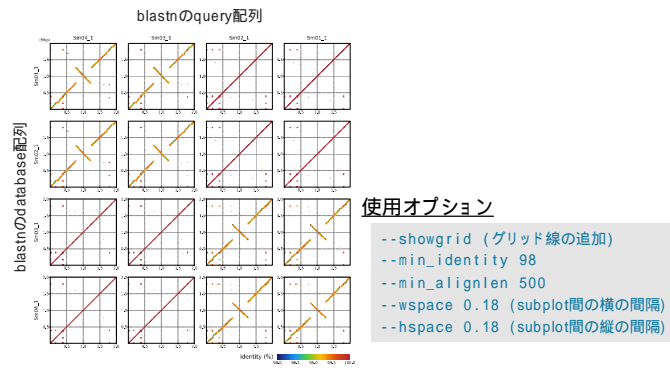


図 6 blastn2dotplots の出力例

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有水 遥子、奥野 未来、長崎 洋司、星子 裕貴、山本 武司、小椋 義俊
2. 発表標題 感染性動脈瘤を引き起こした Streptococcus agalactiae のゲノム解析結果
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥野 未来、山本 武司、星子 裕貴、小椋 義俊
2. 発表標題 ゲノム配列アライメント可視化ツールの開発と紹介
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム 2023
4. 発表年 2023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
---------	---------