

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590527

研究課題名(和文)川崎病患儿における細菌叢の経時的変動解析

研究課題名(英文)Characterization of the gut microbiota of Kawasaki disease patients by a follow-up study with 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) 4,200,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：川崎病患儿の腸内や咽頭に内在するあらゆる病原体を網羅的に把握するため、H25年度に20名のデータを加え、計28名の川崎病患儿の微生物フローラ・メタゲノム解析を行った。川崎病急性期の腸内にはビフィドバクテリウム属が少なく、特徴的なレンサ球菌属の配列を検出し、患者ごとに異なる特徴的な様相を呈していることが示唆された。患儿の急性期便からレンサ球菌を分離をし、全ゲノム配列の結果、患儿の半数で共通した特有の菌株を保有していた。免疫逃避に関わる遺伝子と細胞侵入因子に類似性を有する遺伝子が検出された。様々な仮説が提唱されている中、現在のシークエンス技術により明確な実像を明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：Kawasaki disease (KD) is an acute febrile illness of early childhood. Previous reports have suggested that genetic factors associated with disease susceptibility, together with an infectious agent as a trigger, could be involved in KD; however, the precise etiology of KD remains unknown. Additionally, previous studies based on culture experiments have suggested a possible role for intestinal microbiota in KD pathogenesis. In this study, we used metagenomics to comprehensively analyze the longitudinal variation within the intestinal microbiota of twenty-eight KD patients. Bacterial species classification suggested that the sequencing reads assigned as similar to six *Streptococcus* spp. were apparently increased in the acute phase. Our findings suggest that dysbiosis was present in the intestinal microbiota of acute-phase KD patients and that a marked increase in *Streptococcus* spp. could be associated with KD pathogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：川崎病 レンサ球菌

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(2g/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

感染症が病態増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、次世代シーケ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。

2. 研究の目的

川崎病は、小児の急性発熱性疾患のひとつで、病因が未だ明らかになっていない。申請者らが行った次世代シーケンサーによる網羅配列解読により、腸内細菌フローラの血流侵入が病態増悪に関わっている事が示唆された。特にマイコバクテリウム属の検出が特徴的であり、その難培養性の特性がこれまで起因病原体の検出を困難にしてきた可能性が出てきた。長年に渡って様々な仮説が提唱されている中、最新技術(ゲノミクス、プロテオミクス)を活用し、細菌学の見地から患児が有する細菌叢を明らかにする。治療前後における経時的な変動解析の結果、患者に生じている実像を多角的に明らかにし、川崎病に關する病原細菌の検索を試みる。

3. 研究の方法

川崎病に対する通常の診療を以下に簡単に述べる。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年後の外來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。

さいたま市民医療センター(研究協力者: 絹巻暁子)は平成21年3月1日に開院した新病院であるが、前身となる大宮医師会市民病院では小児科入院患者数が年間約800人(うち川崎病は年間平均34人)であり、本研究の対象収集は見込めるものと考えられる。

平成23および24年度

解析対象とする患者検体の採取(研究協力者: 絹巻暁子(東京大・医・小児科))

- ・ 川崎病患者群 ... 川崎病を疑われてさいたま市民医療センターに入院し、その後診断が確定(検査基準5項目以上)し治療を受けた0~6歳の小児の血液・咽頭ぬぐい液・便・尿。

1. 入院時の血液検査の際に、最大で5ml余分に採取する。
2. 治療終了時の血液検査の際に、最大で2ml余分に採取する。
3. 同時に咽頭ぬぐい液・自然排泄便・尿(中間尿を採取できる児のみ)を追加採取する。
4. 退院時の血液検査の際に、最大で2ml余分に採取する。
5. 同時に咽頭ぬぐい液・自然排泄便・尿(中間尿を採取できる児のみ)を追加採取する。
6. 退院後、6ヵ月・1年後の外來での血液検査の際に、最大で2ml余分に採取する。

また、この外來受診の際に、咽頭ぬぐい液・尿(中間尿を採取できる児のみ)・自然排泄便を追加採取する。

- ・ 対照群 ... 同時期に同センターに入院し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歳の小児の血液・咽頭ぬぐい液・便・尿。入院時の血液検査の際に、最大で5ml余分に採取する。また、入院時に咽頭ぬぐい液・尿(カテーテル尿あるいは中間尿)・自然排泄あるいは浣腸による排泄便の追加採取を行う。

平成25年度 採取検体の解析（遺伝子検査）

1. 次世代シーケンサーによる網羅配列解読

患者全血液と便から DNA/RNA を調整し、次世代シーケンサー illumina Genome Analyzer II にて網羅的に配列解読を行う。解読量の平均90%程度がヒトゲノム配列に相当するため解析対象から除外し、ウイルス・細菌に相同・類似性を示す配列を検索する。

2. 16S-rRNA を用いた網羅細菌フローラ解析

上記の網羅配列解読のデータを補完する意味合いとして、血清・咽頭ぬぐい液・便・尿より DNA を抽出し、細菌の 16S-rRNA 配列を指標にした T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法により、各細菌叢の菌種別の菌数分布について解析する。

4. 研究成果

川崎病患儿の腸内や咽頭に内在するあらゆる病原体を網羅的に把握するため、H25年度に20名のデータを加え、計28名の川崎病患儿の微生物フローラ・メタゲノム解析を行った。川崎病急性期の腸内には Bifidobacterium 属が少なく特徴的な口腔のレンサ球菌属 (Streptococcus) の配列を検出し、患者ごとに異なる特徴的な様相を呈していることが示唆された。健常児の健全な腸内フローラとは明らかに異なる細菌フローラ組成であった。患児 P7 の急性期便からレンサ球菌の分離培養を試みたところ、通常分離培養で使用される「PEA 血液寒天培地と好気培養」の組み合わせでは増殖が見られず、より栄養価の高い「チョコレート寒天培地と嫌気培養」の組み合わせで異なる7株のレンサ球菌を分離することができた。7株のゲノム解読を行い分子系統分類を行ったところ、患児 P7 のレンサ球菌は、肺炎球菌 *S. pneumoniae*、心内膜炎・化膿性疾患に関わる *S. sanguinis* に近い系統群に分類されることが分かった。個々菌株の全ゲノム配列を解読した結果、特徴的なスーパー抗原は同定できなかったが、患児の半数で共通した特有の菌株 (choco_25) が顕著に検出された。Choco_25 株のゲノム情報を精査した結果、IgA プロテアーゼ、C5a プロテアーゼに類する免疫逃避に関わる遺伝子と、食中毒菌 *Listeria monocytogenes* の細胞侵入因子 Internalin A と類似性を有する遺伝子が検出された。長年に渡って様々な仮説が提唱されている中、現在のシーケンス技術により明確な実像を明らかにできた。最有力候補である患者由来のレンサ球菌株のゲノム解析を進展させ、動物モデルによる病原性評価によって川崎病の病態解明を目指したい。

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 1件)

- (1) Katano H, Sato S, Sekizuka T, Kinumaki A, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Morikawa S, Saijo M, Mizutani T, Kuroda M. (2012) Pathogenic characterization of a cervical lymph node derived from a patient with Kawasaki disease. *Int J Clin Exp Pathol.* 5(8):814-23. PMID:23071864, ISSN:1936-2625/IJCEP1208021

〔学会発表〕(計 7件)

- (1) 阿部淳、黒田誠、中林一彦、高橋啓。川崎病患者の FFPE 肺組織を用いたメタゲノム解析。第33回日本川崎病学会（2013年9月 富山市）
- (2) 黒田誠。メタゲノム解析の臨床応用と病原体候補の推定。第86回日本細菌学会総会（2013年3月 幕張）
- (3) 絹巻 暁子、高見沢 勝、五十嵐 隆、黒田 誠。川崎病患儿におけるフローラの経時的変動解析。第32回日本川崎病学会（2012年10月 品川）
- (4) Akiko Kinumaki, Tsuyoshi Sekizuka, Masaru Takamizawa, Takashi Igarashi, Makoto Kuroda. Longitudinal analysis of gut flora in Kawasaki disease patients using a next-generation DNA sequencing. Scientific conference: Exploring Human Host-Microbiome Interactions in Health and Disease (2012年5月 Sanger centre, Cambridge, UK)
- (5) 絹巻 暁子、高見沢 勝、五十嵐 隆、黒田 誠。川崎病患儿における細菌叢の経時的変動解析。第31回日本川崎病学会・学術集会（2011年10月 横浜市）
- (6) 黒田誠、関塚剛史、片野晴隆、絹巻暁子、佐藤誠一、大場邦弘、浜田洋通、寺井勝、緒方昌平、森雅亮、水谷哲也。次世代シーケンサーによる川崎病の病原体候補の探索。第31回日本川崎病学会・学術集会（2011年10月 横浜市）
- (7) 大場邦弘、絹巻暁子、水谷哲也、黒田誠、上村茂。川崎病診断時における血清免疫グロブリンの検討。第31回日本川崎病学会・学術集会（2011年10月 横浜市）

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況（計 0件）

〔その他〕

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

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・主任研究官
研究者番号： 40462775