

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590536

研究課題名(和文) 原発性肝硬変等慢性炎症性疾患に關与するレンサ球菌のゲノムと病原因子解析

研究課題名(英文) Genome and virulence factor analysis of streptococci affected to chronic inflammatory diseases including primary biliary cirrhosis

研究代表者

菊池 賢 (KIKUCHI, KEN)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：60214748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では中年以降の女性に好発する原発性胆汁性肝硬変の発症・進展に *Streptococcus intermedius* (SI) の慢性炎症(歯周病)が關与しており、局所で産生された histone-like protein の持続的供給が病態に寄与していることを明らかにした。*S. anginosus* group (SAG) の中で SI は他の菌種に比べて均一な遺伝的背景を持っており、ニッチな環境に特化して宿主であるヒトと共進化してきた結果であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation like periodontitis caused by *Streptococcus intermedius* (SI) contributed to the etiology and progression of primary biliary cirrhosis (PBC), which occurred in menopausal females mainly. The continuous and localized production of histone-like protein was one of the mechanism of the pathogenesis of PBC. SI, one of the members of *S. anginosus* group, had uniform genetic backgrounds compared as other species, and the result was due to co-evolution with human in specialized niche environments.

研究分野：医歯薬学

キーワード：原発性胆汁性肝硬変 *S. intermedius* histone-like protein *S. anginosus* group competence

1. 研究開始当初の背景

S. anginosus group (SAG)はヒト口腔の常在菌叢を形成するが、嫌気好性を示し、歯周病などの慢性炎症部位から特に高率に分離される。我々はSAGのうちの *S. intermedius* (SI)が原発性胆汁性肝硬変 (PBC)の発症・進展に関与することを患者病理組織の免疫染色所見、患者血清のSI抗体価上昇、SI投与によるマウスPBCモデルの確立(Autoimmunity 39:129,2006, Clin Immunol 127:245,2008, Lab Invest 90:577,2010, J Clin Immunol 32:1026,2012)で証明してきた。SIの histone-like protein (HLP)はPBC進展に関与する抗gp210抗体のエピトープ配列を含んでおり、molecular mimicの1つと想定される。PBC進展に関わるHLPの継続的抗原曝露にはSIの急性感染よりはむしろ持続性慢性感染が望ましいと考えられ、SIの安定した持続感染部位としては歯周病が考えられる。PBC患者に特有のSIクローンが存在すれば、その遺伝的背景を調べることでPBCを惹起するメカニズムが更に明らかになる。しかし、PBC患者の歯周病から得られたSI株の遺伝的背景は急性化膿性病変や健常者由来株と相違は得られなかった。菌側の因子というよりは、HLPなどの原因物質の産生能や宿主との関係がPBC発症には関与しているものと推察される。一方、SAGは嚥下性肺炎や深部膿瘍の起原菌として知られているが、咽頭、食道癌などとの関連が指摘されており、SAG各菌種による慢性炎症はPBC以外の様々な全身疾患に関与している可能性がある。SAGはヒト以外から分離されず、ヒトと共進化を遂げてきたと考えられるが、SAGに属するSI, *S. constellatus* (SC), *S. anginosus* (SA)各菌種のヒト環境における分布や病原性は微妙に異なっている。SAGが遂げて来た分子進化的過程を明らかにすることが、常在菌、全身疾患に関与する慢性感染菌、急性感染菌へと変貌するメカニズムを解き明かす良い一例になると期待されていた。

2. 研究の目的

本研究ではPBC進展に関与するSIのHLPの役割を解明すると同時に、他の自己免疫疾患、癌などとの関連が指摘されているSAGについて、その分子進化的位置づけを明らかにする。

3. 研究の方法

PBC患者5名、健常者22名、自己免疫膵炎(AIP)11名、他の自己免疫疾患4名の計42名の歯周ポケットからSIを含むSAG各菌種の分離を行い、分布状況、内訳、遺伝的背景(house keeping geneによる multi-locus sequence analysis)を比較した。各患者から得られたSI株と深部膿瘍などの急性感染症SI株について、BHI brothで24時間培養した時の培養上清に産生されたHLPをELISAで測定した。また、由来の様々なSAG 234株

また、それぞれの由来株について、分子進化に大きく影響する遺伝子の水平伝播を規定する competence について、*comCDE* の構成要素と分布を調べた。

4. 研究成果

PBC患者5名からはSAGのいずれかの菌種、1人平均2.6株を同時に保有していた。一方、AIPでは0.9株、健常者では1.1株であり、PBCでは複数の遺伝的に異なる菌株を同時に保有する傾向が強かった。SAGの各菌種のHLPは遺伝子レベルでそれぞれの3菌種にクリアに分別されたが、SC, SIのHLPのアミノ酸配列は100%一致しており、gp210と交差するmolecular mimicの対象にはSCも関与していることが示唆された。In vitroでのHLP産生は健常者、PBC、他の自己免疫疾患の歯周由来株はいずれも産生量が高かったのに対し、急性感染症由来株では産生が有意に低く、ほとんどの株では検出限界以下であった。このことはHLPは急性感染症における病原因子というより、持続炎症を維持する因子として働いており、PBC進展に寄与するこれまでの我々の成績を裏付けるものであった。今回得られたそれぞれの患者背景毎のSAG各菌の遺伝背景に特定の傾向はみられず、それぞれの疾患に特有のクローンはSA, SCにおいても認められなかった。一方、今回得られた株に様々な感染部位から得られたSAG 500株のMLSAからは、SIは比較的単一の遺伝的背景を有していたが、SCには少なくとも4つの、SAには少なくとも7つの遺伝的背景の異なるクラスターがあり、従来報告されているSA 2亜種、SC 3亜種以外の亜種の存在が示唆された。SAでは特にSC, SI由来の断片との様々なモザイク構造を示す16S rDNA, *rpoB*, *groEL*が多く認められることから、水平伝播によるSC, SI SAへのhouse keeping geneの組み替えが頻繁に起こっていることが示された。SA, SC, SIのそれぞれの標準株の全ゲノム解析の結果、各菌種のゲノム上にはフェージ由来遺伝子の痕跡は非常に限定されることから、この遺伝子組み替えは主に competence による形質転換と考えられた。各ゲノム情報からSAGの competence の主役遺伝子 *comCDE* はいずれも arg-tRNA, glu-tRNA に挟まれて存在していた。ComCがスプライシングを受けて、competence factor として機能する competence stimulation peptide (CSP) は6タイプ (CSP1-1, 1-2, 1-3, 2-1, 2-2, 2-3) 存在し、このうちCSP1-1がSA, SI, SCの70~95%を占めており、SAGの中では大半が同じ competence システムを共有していることが示された。一方でSAではCSP2-1が、SCではCSP2-3がそれぞれの菌種に特有のCSPとして分布しており、それぞれの菌種の系統維持に寄与していると考えられた。SAGのうち、SIがほぼ単一の competence システムを維持していることは、SIの遺伝的背景が均一なことを裏付けており、よりニッチな環境に特化

した進化過程を経ていると思われた。今回の結果は PBC 進展に SI の慢性炎症持続による HLP の継続的な供給が寄与していることを示唆しており、歯周病の治療自体が PBC の進行を阻止することにつながるものと期待される。また、SI とその近縁菌種から構成される SAG では共通の competence による水平伝播で遺伝子共有がもたらされている一方、独自の competence による各菌種の独自の系統維持も行われており、それぞれの環境への適応進化に反映していると考えられた。

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7件)

1. Tabata A, Nakano K, Ohkura K, Tomoyasu T, Kikuchi K, Wiley R, Nagamune H. Novel twin streptolysin S-like peptides in the sag operon homologue of \square -hemolytic *Streptococcus anginosus*. J. Bacteriol. 195: 1090-1099, 2013.
2. Ko T, Mahara K, Ota M, Kato Y, Takanashi S, Kikuchi K, Umemura J, Sumiyoshi T, Tomoike H. A case of prosthetic valve endocarditis caused by *Streptococcus constellatus*, as a rare agent of endocarditis. Heart Lung 42: 379-381, 2013.
3. Tomoyasu T, Imaki H, Masuda S, Okamoto A, Kim H, Waite R, Wiley R, Kikuchi K, Hiramatsu K, Tabata A, Nagamune H. LacR mutations are frequently observed in *Streptococcus intermedius* and are responsible for increased intermedilysin production and virulence. Infect. Immun. 81: 3276-3286, 2013.
4. Tabata A, Sato Y, Maya K, Nakano K, Kikuchi K, Wiley R.A., Ohkura K, Tomoyasu T, Nagamune H. A streptolysin S homologue is essential for \square β -haemolytic *Streptococcus constellatus* subsp. *constellatus* cytotoxicity. Microbiology 160: 980-991, 2014.
5. Mizutani T, Iguchi S, Hiramatsu K, Kikuchi K. A problem of species determination using housekeeping genes in the *Streptococcus anginosus* group. Juntendo Med J 61:608-616, 2015.
6. 菊池 賢: 口腔細菌と自己免疫疾患 Bioindustry 32: 20-24, 2015.
7. 菊池 賢: 感染症四方山話(10): 感染症研究との出会い(2). The Chemical Times 237: 2-7, 2015.

〔学会発表〕(計5件)

1. Kikuchi K. Implication of *Streptococcus intermedius* in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. (招請英語講演) Japan-Russia International Workshop 2013. (2013.10.26-31), Tokyo, Juntendo University, Japan, 2013.
2. 水谷友紀、菊池 賢、平松啓一. *S. anginosus* group における遺伝子同定上のも問題. 第22回 Lancefield レンサ球菌研究会・第45回レンサ球菌感染症研究会合同研究会 6.28-29, 東京 2013.
3. 菊池 賢、春田郁子、清水京子、橋本悦子、白鳥敬子、岡本俊宏、安藤智博、八木淳二、水谷友紀、平松啓一. 原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性膵炎、および類縁患者歯周病病変部における *S. anginosus* group の分布と分類. 第22回 Lancefield レンサ球菌研究会・第45回レンサ球菌感染症研究会合同研究会 6.28-29, 東京 2013.
4. 田端厚之、中野晃太、大倉一人、菊池 賢、友安俊文、長宗秀明. 溶血性 *Streptococcus anginosus* が保有するストレプトリジン S ホモログの特徴と細胞障害性への寄与. 第22回 Lancefield レンサ球菌研究会・第45回レンサ球菌感染症研究会合同研究会 6.28-29, 東京 2013.
5. 菊池 賢、松田まり、井口成一、水谷友紀、平松啓一. *Streptococcus anginosus* group (SAG) の competence factor: ComCDE の多様性と house keeping gene の horizontal gene transfer. 第46回レンサ球菌研究会 6.27-28, 2014.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 賢 (KIKUCHI KEN)
東京女子医科大学・感染症科・教授
研究者番号：60214748

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：