

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870568

研究課題名（和文）7価肺炎球菌結合型ワクチン普及に伴う莢膜型転換と薬剤耐性化加速機構の解明

研究課題名（英文）Evolution of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* of serotype 3 by capsular switching after introductions of 7-valent pneumococcal vaccine in children, in Japan

研究代表者

千葉 菜穂子（CHIBA, NAOKO）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：50420815

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、アジアで普及しているTaiwan23F-15クローンに由来するgenotypic penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* (gPRSP；遺伝学的なペニシリン耐性菌)が相同組換えによって病原性の高い莢膜型3型をコードするcps遺伝子座領域を獲得し、結果として表現型が血清型3型のgPRSPとなった株の最初の報告である。またこの株の出現は、KK0981の組換え領域における遺伝子配列が、近年分離された血清型3型のKK0381の遺伝子配列と完全に一致していたため、近年起こったとが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The present study is the first report of a genotypic penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* (gPRSP) derived from a Taiwan23F-15 clone prevalent in Asia that acquired a cps-locus region encoding a type 3 capsule by homologous recombination, resulting in emergence of gPRSP of serotype 3. Additionally, this recombinant event most likely occurred in recent years because the nucleotide sequence in recombination region of KK0981 were completely consistent with these of KK0381 of serotype 3.

研究分野：Molecular epidemiology of the pathogens

キーワード：Streptococcus pneumoniae capsular switchingne ゲノム解析 莢膜型3型 PRSP MLST cps homologous recombination

1. 研究開始当初の背景

わが国でも、小児の侵襲性肺炎球菌感染症 (invasive pneumococcal diseases: IPD) の発症予防を目的として、2010 年末「ワクチン接種緊急促進事業」がスタート、7 価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV7) の接種が開始された。2012 年の接種率は 90% に達したと推定され、本年 4 月には定期接種化されるに至った。私達の全国規模の疫学研究では、PCV7 の普及で乳幼児の IPD は半減し、明らかなワクチン効果が得られたことが報告されている (Chiba N et al., Microb Drug Resist 2013)。

しかし、IPD 例中の PCV7 に含まれる荚膜型 (vaccine type: VT) 菌による発症割合は、2010 年 (78%)、2011 年 (53%)、2012 年 (15%) へと急速に低下し、替わってワクチンで予防できない荚膜型 (non-vaccine type: NVT) 菌による IPD が急速に増加してきている (Chiba N et al., Emerg Infect Dis 2014)。この急速な変化は荚膜型の replacement と呼ばれる。PCV7 が既に定期接種化された欧米でも同様の問題が生じ、13 種の荚膜を抗原とする PCV13 へと切り替わりつつある。わが国でも PCV13 への変更が決定されたが、その予防効果は限定的であろうことが危惧されている。

このような現象は、ワクチン抗原の荚膜型が 97 種と多数存在することが原因であるが、増加しつつある NVT を欧米のそれと比較すると、わが国とは必ずしも同一ではない (Richter SS et al., Emerg Infect Dis 2013)。

このような多様化は、本菌がワクチンや抗菌薬の選択圧によって荚膜をコードする遺伝子を巧みに組み換え (capsular switching)、ワクチン効果を回避することが原因と推定されている (Brueggemann AB et al., PLoS Pathog 2007)。

2. 研究の目的

小児への 7 価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV7) の普及に伴い、ワクチン抗原として用いられている菌体表層物質の荚膜をコードする遺伝子の組換え (capsular switching と呼ばれる) が生じ、その近位に存在する β -ラクタム系薬耐性化に関わる細胞壁合成酵素 (penicillin-binding protein: PBP) の遺伝子組み換えも同時に生じていることが世界的に注目され始めている。日本で分離された IPD 由来肺炎球菌株を用い、荚膜と薬剤耐性遺伝子の組み換えメカニズムを明らかにし、次世代ワクチン開発と新規抗菌薬開発に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

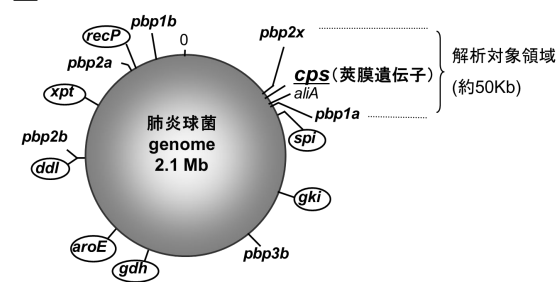
(1) MLST 解析

2010 年 4 月～2013 年までの 3 年間に全国収集された IPD 由来株 ($n=1,317$) の中から無作為に 500 株を抽出し、図-1 に示す 7 つの housekeeping 遺伝子の multilocus sequence typing (MLST) 解析を行い、それぞれの菌株の sequence type (ST) を明らかにした。さらに、

以前解析した 343 株のデータを加え、全 843 株についてすでに決定されている荚膜型と耐性遺伝子型とともにデータベース化した。

次にデータベースを用い ST を基準に荚膜型、耐性遺伝子型の順でソーティングを行い、その中で ST が同一で荚膜型や耐性遺伝子の異なる株を見出した。

図-1 肺炎球菌ゲノム上における荚膜遺伝子、*pbp* 遺伝子、および housekeeping 遺伝子の位置



(2) ゲノム解析

(1) でみいだされた株の中から 病原性の高いとされる荚膜型 3 型菌へ capsular switching を生じたと推測された KK0981 株 [荚膜型 3 型, gPRSP(*pbp1a*+2x+2b 変異), ST242]、組換え体の元となったと推定される KK1157 株 [荚膜型 23 型, gPRSP, ST242] および 一般的な 3 型菌の KK0381 [gPISP(*pbp2x* 変異), ST180] の比較ゲノム解析を実施し、その組換え位置を特定した。

Whole genome sequence は、PacBio SMRT sequencing technology を用いた。sequencing データをアセンブルした後、MiGAP pipeline (<http://www.migap.org/index.php/en>) で解析した。*cps* 遺伝子座とその周辺は、参照株の OXC141 および ATCC700669 を用いてマニュアルでアノテーションを行った。KK0981 の locus tag 名は、OXC141 を参照した。これらの株のゲノム間の相同性、および Single Nucleotide Variants (SNVs) の比較は、それぞれ BLAST Ring Image Generator (BRIG) software、ならびに MUMmer program により実施した。

4. 研究成果

(1) MLST 解析

全 843 株の ST の近似集団を表す clonal complex (CC) は 49 種、singleton が 7 種、ST が 168 種であった。最も多い ST は ST3111 ($n=50$)、次いで ST236 ($n=49$)、ST433 ($n=47$) であった。由来は順に US、Taiwan、Poland、いずれも海外であった。

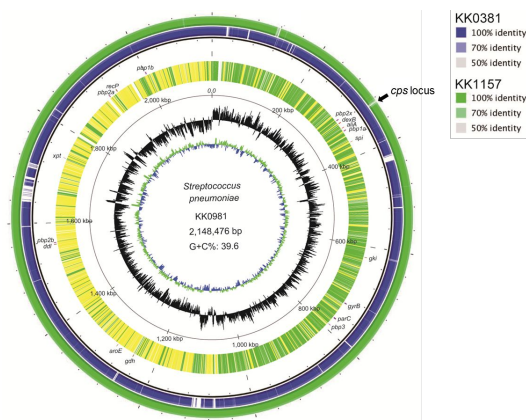
また全菌株の中から、capsular switching が生じたと推定される 1 株を病原性の高いムコイド型を呈する荚膜型 3 型菌において見出した。3 型菌は一般的に gPISP(*pbp2x* 変異)、ST180 (CC180) であるが、その株は KK0981 株 [gPRSP(*pbp1a*+2x+2b 変異); ST242 (CC242)] で

あった。KK0981 株と同様の ST 株が有する一般的な莢膜型は 23F 型であり、Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN) クローンに登録された Taiwan^{23F}-15 clone は ST242 に属する。

(2) ゲノム解析

gPRSP となった莢膜型 3 型株である KK0981 株、莢膜型は 23F 型であるが同じ ST と耐性遺伝子型を有する KK1157 株、一般的な莢膜型 3 型株の耐性遺伝子と ST を有する KK0381 の 3 株について比較ゲノム解析を実施した。その結果、KK0981 株ゲノムは、ゲノム全体として KK0381 株よりも KK1157 株と高い相同性を保持し(図-2)、3 つの *pbp* 遺伝子の配列も一致したことから KK0981 と KK1157 は同じ背景を持つ菌株であることが証明された。

図-2 . KK0981 ゲノムと KK1157 および KK0381 ゲノムとの比較



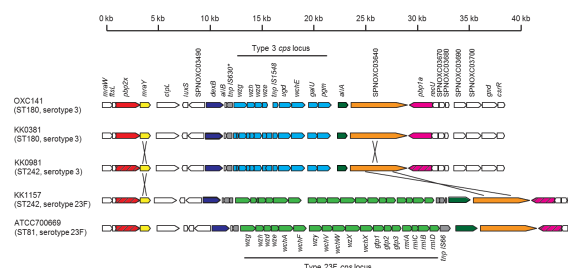
しかし KK0981 株は KK1157 株とは異なり、血清型 3 型を示すため *pbp2x* と *pbp1a* に挟まれた *cps* 遺伝子領域を含む領域が組換わったと推察された。*cps* 遺伝子座とその隣接領域(*pbp2x-cps locus-pbp1a*)を比較した結果は、KK0981 株は *pbp2x* 遺伝子隣りの *mraY* 遺伝子中の 312,701bp から *pbp1a* 遺伝子隣りの SPNOXC03640 遺伝子 (endo- α -N-acetylgalactosaminidase をコードする)中の 332,991 bp までの 20,291 bp が KK0381 と完全に一致した。また KK0981 株と KK0381 株は莢膜型 3 型をコードする *cps* 遺伝子、KK1157 株は莢膜型 23F 型をコードする *cps* 遺伝子を保持していた。

一方、*pbp2x* と *pbp1a* およびその外側は KK1157 株と同一であった。またファージや IS の痕跡は、組換えが起こった近接領域において明確には同定されなかった。

以上より、病原性の高い莢膜型 3 型の genotype (g)PRSP である KK0981 株の出現は、アジアで流行している Taiwan^{23F}-15 clone の gPRSP 株と近似の株が、*pbp2x* と *pbp1a* 遺伝子に挟まれた莢膜遺伝子領域(*cps* 領域)を含

む 20.3 kb 領域において相同組換えを起こし、penicillin 軽度耐性(non-susceptible)かつ病原性の強い莢膜 3 型のムコイド株へ形質転換したことが示された(図-3)。しかし、このような耐性菌がどこで出現したかは不明である。

図-3. *cps* 遺伝子座とその隣接領域(*pbp2x-cps locus-pbp1a*)の比較



(3) Accession number

3 株の whole genome sequence は以下の受託番号で DDBJ に登録されている。KK0981(AP017971) , KK0381(AP018043) , および KK1157(AP018044)。

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)

Ubukata K, Chiba N, Hanada S, Morozumi M, Wajima T, Shouji M, Iwata S; Invasive Pneumococcal Diseases Surveillance Study Group. 2015. Serotype changes and drug resistance in invasive pneumococcal diseases in adults after vaccinations in children, Japan, 2010-2013. Emerg Infect Dis, 査読有, 21:1956-1965. DOI: 10.3201/eid2111.142029.

〔学会発表〕(計 3 件)

千葉菜穂子, 高田美佐子, 諸角美由紀, 花田 豪郎, 輪島 文明, 岩田 敏, 生方公子: 肺炎球菌 23 価ワクチン (PPV23) に含まれない莢膜型にみいだされた gPRSP の分子疫学解析. 第 89 回日本感染症学会総会・学術講演会, 国立京都国際会館 (京都府京都市) 2015.04.17.

N. Chiba, M. Morozumi, T. Wajima, S. Iwata, K. Ota, K. Ubukata. Genetic Analysis of *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Pneumococcal Infections Showing High Resistance to β -Lactam Agents. 54th ICAAC, Washington, D.C. USA, Sep/05-09/2014

千葉菜穂子, 荘司 路, 諸角美由紀, 生方公子, 岩田 敏: 小児への PCV7 導入による成人侵襲性感染症由来肺炎球菌(IPD)由来株の変化. 第 88 回 日本感染症学会総会・学術講演会, ヒルトン福岡シーホーク (福岡県福岡市) 2014. 06.19.

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

千葉 菜穂子 (CHIBA, NAOKO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号: 50420815