

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17933

研究課題名(和文)メタゲノム解析を用いた菌血症における病原菌の患者内多様性の解明

研究課題名(英文)Metagenomic approach for within-host genomic diversity in bacteremia

研究代表者

後藤 恭宏(Gotoh, Yasuhiro)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：20558358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：菌血症の診断は、血液培養による菌の分離と得られた単一コロニーを用いた菌種同定等によって行われている。しかし、患者内に存在する原因菌は必ずしも単一のクローンではなく、何らかの遺伝的多様性が存在し、治療や宿主免疫等によってさらに変化している可能性もある。菌血症例を対象として、集団遺伝学的視点とメタゲノム解析を組み合わせ、個別の患者内に存在する原因菌の遺伝的多様性とその変動を解析した結果、菌血症の発症・進展に係わる新たな知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

菌血症を発症した血液中の病原細菌を集団として捉えて、集団遺伝学的な視点から、その遺伝的多様性を解析するという新しい発想に基づく研究であり、特定の分離菌株のみを対象とする従来の解析では得られなかった菌血症の発症・進展に係わる新たな知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Diagnosis of bacteremia is performed by identification of bacterial pathogen using blood culture technique and single colony isolation. However, the causative bacteria present in the patient are not necessarily single clone. It is possible that some genetic diversity exists, and further changes will be occurred by treatment or host immunity. In this study, we performed population genetics and metagenomic analysis to reveal the genetic diversity of the causative bacteria present in individual patients and their variation in cases of bacteremia.

研究分野：細菌学

キーワード：遺伝的多様性 菌血症 メタゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

菌血症は、早期に適切な治療を行わないと細菌性髄膜炎や感染性心内膜炎などの重症感染症へと進行する。敗血症に進行すると依然として致死率は高く、原因病原菌の迅速で正確な把握が重要である。そのための一般的な検査は血液培養であり、診断と治療に必要な情報を提供する。菌血症では、極少量の病原細菌が侵入した後、増殖した菌が血液中に侵入して全身を循環する状態になると考えられている。多くの病原細菌で、体内や体液中での増殖に係わる因子についての研究は進んできているが、実際にどのようなクローン(単一のクローンあるいはクローン集団)が血液中に侵入し、どのようなクローンが選択されているのか、また、その過程でどのような遺伝的变化が生じるのかなど、菌血症の発症・進展過程における病原細菌の動態は解析されていない。

2. 研究の目的

菌血症の診断は、血液培養による菌の分離と得られた単一コロニーを用いた菌種同定等によって行われている。しかし、患者内に存在する原因菌は必ずしも単一クローンではなく、何らかの遺伝的多様性が存在し、治療や宿主免疫等によってさらに変化している可能性もある。本研究では、菌血症例を対象として、集団遺伝学的視点とメタゲノム解析を組み合わせ、個別の患者内に存在する原因菌の遺伝的多様性とその変動を解析する。これにより菌血症の発症や進展に係わる病原菌の動態や菌種の違い等による患者内での遺伝的多様化の差異を明らかにし、症例に応じた次世代治療・診断を実現するための情報基盤を構築する。さらに、ヒト生体内で強い選択を受ける遺伝子が同定できるため、ヒト生体内での生存に係わる新規病原遺伝子の発見も期待できる。

3. 研究の方法

九州大学病院で臨床検査部に提出される血液検体のうち、血液培養が陽性となった検体は全て、一定期間保存されている。そのうち、確実に感染症と診断、臨床検査で単一菌種が分離、コンタミネーションが否定された、この3条件を満たす症例を解析対象に選んだ。原因菌の配列情報を効率良く取得するため、ヒトDNAの混入を避け、細菌由来のDNAが多く含むようなDNAサンプルを調製した。具体的には、保存検体から低速遠心でヒト由来成分を取り除き、その上清を遠心して細菌を回収した。この試料からMolYsis Plus Kit (Molzyme社)を用いて細菌DNAを精製した。NGS用ライブラリ調製は、シーケンスバイアスが少なく、本研究の解析に最も適していたQIAseq FX DNA Library Kit (Qiagen社)を用いて行った。イルミナHiSeqシーケンサを用いて、検体毎にゲノム配列の約100倍分のデータ(151bpのペアエンドシーケンス)を取得した。シーケンスされたヒト由来配列を除去するために、公開されているヒトゲノム配列にBWAプログラムを用いてマッピングし、非マッピングペアのみを抽出した。さらに、哺乳類の配列データベースに対して相同性(blastNプログラム)が見られたリードペアは全て除外し、確実に細菌由来と考えられる配列だけを解析に使用した。一塩基多型(SNP)や塩基配列の挿入/欠失(InDel)等の遺伝的多様性を特定するには、参照ゲノム配列が必要である。ゲノム配列データが公開されている菌株は、実際の解析対象とする菌株と遠い遺伝的關係にあり、高精度な遺伝的变化の検出が望めない場合が多いと予想されるので、メタゲノム配列データをアセンブリ(Platanusプログラム)してドラフトゲノム(多型が存在する場合は多数決によるコンセンサス配列になる)を取得し、参照配列とした。これにメタゲノム配列をBWAを用いてマッピングし、信頼を下げる要素(マルチヒットやInDel周辺等のミスアライメント等)を丁寧に除外した後、確実に複数の塩基型が確認される多型部位(ヘテロサイト)を検出する。必要に応じてキャピラリーシーケンサで確認した。

複数のヘテロサイトが検出された場合、メタゲノム解析では、それらが同一ゲノム配列上に存在するか否かは分からないため、クローン集団を構成するクローン数や遺伝型、その比率は決定できない。そこで、保存検体を平板培地に塗抹して得られたコロニー(個別菌)の全ゲノムシーケンスを行った。シーケンスする個別菌の数は検出されたヘテロサイト数とその塩基比を参考に決定した。

細菌が生体内で新たに獲得した遺伝的变化は、生体内での生存に有利な形質に係る可能性がある。1塩基の変異がアミノ酸置換を生じ、薬剤感受性が大きく変わることも知られており、治療効果に大きな影響を与える。そこで、Prokkaプログラムを使用して参照配列に詳細な遺伝子情報を付加し、遺伝的变化を生じたサイトが遺伝子間/内領域であるか、遺伝子内であればアミノ酸変異を伴うかどうかを解析し、形質変化を伴う可能性のある変異を抽出した。有利に機能することが予想される遺伝的变化がみられた場合、個別菌を用いた解析によって変化した形質の確認・検証し、その表現型と生体内で受ける選択圧(抗菌剤や免疫系)との関連を検討した。

4. 研究成果

解析にもちいた陽性症例数は計350検体となった。検体から精製されたDNAは、その80-90%以上が細菌由来DNAであることを、細菌およびヒト特異的な定量的PCR法を用いて確認した。シーケン

スされた多くのサンプルで、メタゲノムシーケンス解析によりヘテロサイトが確認された。

その解析の1例として、*Helicobacter cinaedi*による再燃症例で確認された患者内多様性を挙げる。本菌は、高い再燃率が問題になっているが、感染源や感染経路は明らかにされていない。本症例は、発症期に51日間の時間的間隔があった。それぞれの血液検体を全ゲノムシーケンス解析した結果、複数の塩基型が確認される多型部位（ヘテロサイト）がゲノム上に6ヶ所確認された。そこで、同一染色体上に存在する遺伝型（ハプロタイプ）を明らかにするために、平板培地に塗抹して得られたコロニー（個別菌）の全ゲノムシーケンス解析をおこなった。個別菌の解析の結果、初発期に5つの宿主内多様性（遺伝型）、再燃期には2つの遺伝型が確認された。再燃期の遺伝型は、初発期に確認された遺伝型であった。初発期に存在した多様性は、複数クローンが体内に侵入した可能性だけでなく、発症するまでに生体内で本菌がコロナイゼーションしていた可能性が考えられた。また、初発期から再燃期までの優勢クローンの経時的な移り変わりは、患者生体内で有利なクローンが選択された可能性が考えられた。そこで、各ヘテロサイトについて詳細な解析を行ったが、本症例では宿主内の環境から受けた選択圧（たとえば、治療のために投与された抗菌薬）からエスケープした形跡の特定には至らなかった。

この検体のほかに、高頻度でヘテロサイトが確認された検体が多くあり、非常に複雑な解析作業になっている。多様なクローンが検出される頻度と、原因菌種の常在性/環境由来や侵入門戸、感染経路などの相関解析を行い、各菌種における多様化の様式・パターンを明らかにすることを目指して、現在詳細な解析を進めている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Sawada O, Gotoh Y, Taniguchi T, Furukawa S, Yoshimura D, Sasaki S, Shida H, Kusunoki Y, Yamamura T, Furuya K, Itoh T, Horita T, Hayashi T, Misawa N. Genome Sequencing Verifies Relapsed Infection of *Helicobacter cinaedi*. *Open Forum Infect Dis*. 2019, 25; 6: ofz200. doi: 10.1093/ofid/ofz200.
2. Yoshimura D, Kajitani R, Gotoh Y, Katahira K, Okuno M, Ogura Y, Hayashi T, Itoh T. Evaluation of SNP calling methods for closely related bacterial isolates and a novel high-accuracy pipeline: BactSNP. *Microb Genom*. 2019. doi: 10.1099/mgen.0.000261.
3. Gotoh Y, Taniguchi T, Yoshimura D, Katsura K, Saeki Y, Hirabara Y, Fukuda M, Takajo I, Tomida J, Kawamura Y, Ogura Y, Itoh T, Misawa N, Okayama A, Hayashi T. Multi-step genomic dissection of a suspected intra-hospital *Helicobacter cinaedi* outbreak. *Microb Genom*. 2018; 4. doi: 10.1099/mgen.0.000236.
4. Ogura Y, Seto K, Morimoto Y, Nakamura K, Sato MP, Gotoh Y, Itoh T, Toyoda A, Ohnishi M, Hayashi T. Genomic Characterization of β -Glucuronidase-Positive *Escherichia coli* O157:H7 Producing Stx2a. *Emerg Infect Dis*. 2018; 24: 2219-2227. doi: 10.3201/eid2412.180404.
5. Oogai Y, Gotoh Y, Ogura Y, Kawada-Matsuo M, Hayashi T, Komatsuzawa H. Small RNA repertoires and their intraspecies variation in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *DNA Res*. 2018; 25: 207-215. doi: 10.1093/dnares/dsx050.
6. Ogura Y, Gotoh Y, Itoh T, Sato MP, Seto K, Yoshino S, Isobe J, Etoh Y, Kurogi M, Kimata K, Maeda E, Piérard D, Kusumoto M, Akiba M, Tominaga K, Kirino Y, Kato Y, Shirahige K, Ooka T, Ishijima N, Lee KI, Iyoda S, Mainil JG, Hayashi T. Population structure of *Escherichia coli* O26:H11 with recent and repeated *stx2* acquisition in multiple lineages. *Microb Genom*. 2017; 3. doi: 10.1099/mgen.0.000141.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. サーベイランス・アウトブレイクの検出。後藤恭宏, 第 278 回 ICD 講習会, 福岡, 2018 年 3 月.
2. 院内感染疑い事例の全ゲノムシーケンスによる超高解像度分子疫学解析。後藤恭宏, 谷口 喬子, 吉村大, 桂啓介, 佐伯裕二, 平原康寿, 福田真弓, 高城一郎, 小椋義俊, 伊藤武彦, 三澤尚明, 岡山昭彦, 林哲也. 第 13 回ゲノム微生物学会年会, 東京, 2018 年 3 月.
3. 全ゲノム配列情報を用いた近縁菌株間高精度 SNP 検出パイプライン BactSNP の開発. 吉

村大、後藤恭宏、小椋義俊、林哲也、伊藤雄彦、第12回日本ゲノム微生物学会年会、京都、2018年3月。

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。