

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15041

研究課題名（和文）ヒトゲノムと結核菌ゲノムの統合的解析による集団間で共通する結核発症遺伝要因の探索

研究課題名（英文）Integrative application of human and Mycobacterium tuberculosis genomic information to identify genetic risk factors for tuberculosis onset shared among different populations

研究代表者

大前 陽輔 (Omae, Yosuke)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・特任研究員

研究者番号：70722552

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、感染結核菌ゲノム中の遺伝的マーカーで結核患者を層別化してヒトゲノム多型の関連解析を行うという新しい解析法を、新たにリクルートしたタイ人結核患者群および日本人結核患者群でのゲノムワイド関連解析（GWAS）に対しても適用し、ヒトゲノム変異と結核菌ゲノム変異の相互作用を日本人集団とタイ人集団という異なる集団間で解析・比較した。その結果、タイ人結核患者群においても日本人結核患者群においても、HLAアリルのリスクを上昇させる結核菌ゲノム多型が存在した。これらの結核菌ゲノム多型がタイ人集団と日本人集団という異なる集団間で共通した結核発症において重要な発症関連遺伝要因であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症は、宿主である患者側ヒトゲノムの多様性と同時に、病原体の感染という環境要因が重要である。結核患者のゲノム情報とその感染結核菌のゲノム情報を両面から解析することにより、異なる集団間で共通する結核発症において重要な宿主の遺伝要因および結核菌のゲノム変異を同定した。本研究で用いた宿主ゲノム情報と病原体ゲノム情報の両方に基づく解析アプローチは、結核以外の感染症にも応用可能であり、感染症研究のブレークスルーになる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：We have conducted stratified analyses in tuberculosis (TB), which is one of the three major global infectious diseases caused by pathogenic bacterium, Mycobacterium tuberculosis (MTB), and have already reported specific association of pathogen lineage group and host genetic risk factors with TB onset and disease outcome. In this research project, we first collected both human genome-wide SNP data and MTB whole genome sequencing (WGS) data from newly recruited Thai TB patients. We also collected the human and MTB data from Japanese TB patients and combined the Thai and Japanese datasets to further identify specific association of human and pathogen genome variations with patient disease onset and clinical characteristics in our genome-wide association study (GWAS) approach. Our approaches identified shared genetic risk factors among different populations and can become a breakthrough for research strategy in infectious diseases based on patient genomic and pathogen genomic information.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：ゲノムワイド関連解析 ヒトゲノム 病原体ゲノム 結核 感染症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

結核は、エイズ、マラリアと並び世界三大感染症の1つとされる結核菌による感染症である。2016年のWHO世界結核対策報告書では、年間発症者数約1040万人、年間死亡者数約180万人と述べられている。日本においても、現在でも年間2万人以上が新規に発症しており、効果的な結核対策が求められている。結核においては、結核菌保菌者は世界人口の3分の1におよぶと推定されているが、実際に発症するのは10人に1人である。一卵性双生児における研究では一方が発症した際に両方が発症する確率は7~8割という報告もあり、感染症の中でも特にその発症に対する遺伝率の寄与が高いとされている。しかしながら、これまでに世界中の様々な研究機関によりゲノムワイド関連解析(GWAS)による結核発症遺伝要因の探索が行われたが、現在のところ異なる集団間での結果の再現性が得られず、統一的な結核発症遺伝要因の同定にはつながっていない。つまり、「なぜ結核の発症において宿主の遺伝要因が重要であるのか」は不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「結核患者のゲノム情報とその感染結核菌のゲノム情報を両面から解析することにより、異なる集団間で共通する結核発症において重要な宿主の遺伝要因および結核菌のゲノム変異を同定する」ことである。

3. 研究の方法

結核菌のサブタイプには世界各地で多様性があることが報告されている[Gagneux S et al., *Lancet Infect Dis.* 2007]。研究代表者は先行研究において、感染した結核菌の遺伝的背景の違いに応じて宿主側の発症に関する遺伝的なリスク要因も異なると予想し、まず結核菌を大きく2つのサブタイプ(Lineage)に分類後、それぞれのサブタイプに感染したタイ人の患者集団についてゲノム全域の一塩基多型(SNP)の関連を評価するGWASを実施した。その結果、非北京型とよばれる特定の結核菌サブタイプの感染下において結核の発症リスクと関連するSNPを同定した[Omae Y et al., *J Hum Genet* 2017] (図1)。これらの知見は、結核菌の遺伝的背景の違いを考慮することが、結核の発症メカニズムを明らかにする上で重要であることを示唆している。従って、本研究計画において結核患者のゲノム情報とその感染結核菌のゲノム情報の両面から解析するべきと考えに至った。ヒトゲノム情報と結核菌ゲノム情報の両面からのアプローチは、結核患者のヒトゲノムサンプルと感染結核菌のゲノムサンプルを長年にわたりセットで収集してきた申請者の研究グループだからこそ実現可能な独自性のあるアプローチである。

本研究では、感染結核菌の全ゲノム配列情報を解析後、その情報に基づいて結核患者をさらに層別化し宿主ゲノム解析を進めることで、結核の発症メカニズムを特定の宿主ゲノム変異と結核菌ゲノム変異の組み合わせとして明らかにすることを試みた。具体的

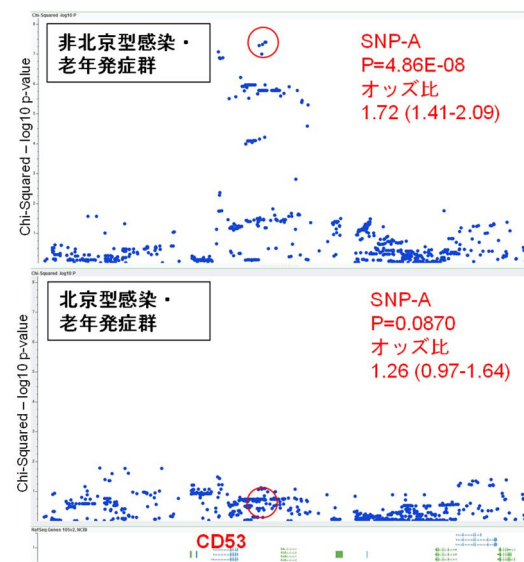


図1: 特定の結核菌サブタイプにおいて発症リスクと関連するSNPが存在する

本研究では、感染結核菌の全ゲノム配列情報を解析後、その情報に基づいて結核患者をさらに層別化し宿主ゲノム解析を進めることで、結核の発症メカニズムを特定の宿主ゲノム変異と結核菌ゲノム変異の組み合わせとして明らかにすることを試みた。具体的

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

には、以下の 3 段階で結核患者のヒトゲノム情報と結核菌ゲノム情報を相互に解析し、日本人集団とタイ人集団という異なる集団間で共通するヒトゲノム多型と結核菌ゲノム変異の組み合わせの探索を行った。

1. タイ人結核患者検体を用いて、結核発症にどのような結核菌のゲノム変異が関連するか? について、結核菌の全ゲノム配列情報を活用して解析する。特に、感染結核菌群において高頻度で見られる特徴的な多型を同定する。
2. 日本人結核患者検体においても、**CD53** 遺伝子のリスク多型を持つ一部の検体を対象として感染結核菌の全ゲノム配列解析を行い、タイ人集団でのゲノム変異と共通する多型が見出されるか? 検討する。
3. 結核発症に **CD53** の他に宿主側のどのような因子が関わるのか? について、ヒトの全ゲノム **SNP** 情報を活用して日本人検体とタイ人検体のメタ解析を実施し同定する。特に、2 までの検討で同定された結核菌ゲノム多型の有無により分類した患者群で頻度の違いが見られるヒトゲノム多型を網羅的に **GWAS** で探索する。

4. 研究成果

1. タイ人結核患者検体を用いて、結核発症にどのような結核菌のゲノム変異が関連するか? について、結核菌の全ゲノム配列情報を活用して解析する。特に、感染結核菌群において高頻度で見られる特徴的な多型を同定する。

結核菌の北京型と非北京型というサブタイプを分けるこれまでマーカーとしていたゲノム欠失領域には機能的な遺伝子の報告が無いことから、まずタイ人結核患者群において、結核発症に関連する結核菌のゲノム多型を探索した。具体的には、結核菌の全ゲノム配列情報から、これまでのゲノム欠失領域による分類時よりもさらにヒトゲノム多型のリスクを上昇させる変異が、結核発症に寄与する機能的な変異であると期待し探索した。その結果、32 個の結核菌ゲノム変異が北京型と非北京型による結核患者分類時よりも強い **CD53** 領域の関連を示した。また、259 のヒトゲノム領域と結核菌ゲノム多型の組み合わせがゲノムワイド関連解析における一般的な統計学的有意水準である **5E-08** 以下の **P** 値を示した(図 2)。しかしながら、多数の結核菌ゲノム多型の検討による多重検定補正を考慮すると有意な関連と判断するに至らず、追加のタイ人結核患者群や日本人結核患者群とのメタ解析の必要性が明らかとなった。

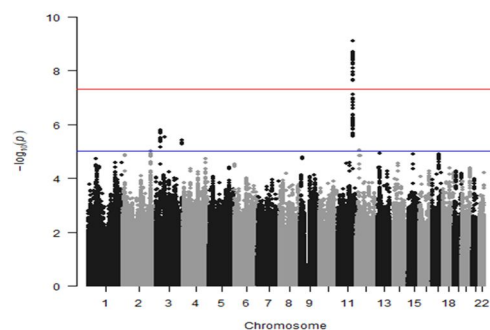


図 2: 特定の結核菌ゲノム変異において発症リスクと関連するヒトゲノム領域を検出

日本人結核患者群においても、結核研究所における倫理承認手続きを経て、**CD53** 遺伝子のリスク多型をホモに持つ結核患者検体の絞り込みを行い、64 症例について当該患者由来の結核菌の培養ならびにゲノム抽出を行い、日本人結核患者由来結核菌ゲノム

2. 日本人結核患者検体においても、**CD53** 遺伝子のリスク多型を持つ一部の検体を対象として感染結核菌の全ゲノム配列解析を行い、タイ人集団でのゲノム変異と共通する多型が見出されるか? 検討する。見出した結核菌のゲノム変異について残りの検体でも確認する。

日本人結核患者群においても、結核研究所における倫理承認手続きを経て、**CD53** 遺伝子のリスク多型をホモに持つ結核患者検体の絞り込みを行い、64 症例について当該患者由来の結核菌の培養ならびにゲノム抽出を行い、日本人結核患者由来結核菌ゲノム

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

の次世代シーケンシングによるデータ取得を行った。取得した結核菌 **NGS** データについて、日本人結核患者由来株ならびにタイ人結核患者由来株に対して共通の解析パイプラインを用いて、結核菌ゲノム多型データ取得を行った。

3. 結核発症に **CD53** の他に宿主側のどのような因子が関わるのか? について、ヒトの全ゲノム **SNP** 情報を利用して日本人検体とタイ人検体のメタ解析を実施し同定する。特に、2 までの検討で同定された結核菌ゲノム多型の有無により分類した患者群で頻度の違いが見られるヒトゲノム多型を網羅的に **GWAS** で探索する。

タイ保健省医科学局との共同研究の下、タイ人結核患者由来ヒトゲノムデータと結核菌ゲノムデータの取得を、新たにリクルートしたタイ人結核患者群 **605** 例と対照タイ人健常者群 **545** 例に対しても行い、見出した関連の再現性確認用データセットとした。

ヒトゲノム中の **HLA** 遺伝子アレルのリスクを上昇させる結核菌ゲノム多型を対象として解析したところ、新たにリクルートしたタイ人結核患者群においてもリスクを上昇させることが再現される結核菌ゲノム多型が見出された。さらに、日本人結核患者群においても、**HLA** アレルのリスクを上昇させる結核菌ゲノム多型が存在した。これらの結核菌ゲノム多型はタイ人集団と日本人集団という異なる集団間で共通した発症関連遺伝要因であることが示唆された。同定された結核菌ゲノム多型の有無に基づく **GWAS** を実施することで、新たに関連を示すヒトゲノム中の遺伝子領域も同定された。

また、データ解析のノウハウをタイ側共同研究者に技術移転し、抗結核薬投与による肝障害を解析対象表現型とすることで、肝障害の発症関連遺伝要因を論文報告した (**Suvichapanich S, et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2019**)。結核以外の抗酸菌感染症にも解析アプローチを広げ、非結核性抗酸菌感染症、中でも肺 **MAC** 症において発症リスクとなる遺伝要因を論文報告した (**Namkoong H, Omae Y, et al., Eur Respir J.2021**)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Namkoong H, Omae Y, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Genome-wide association study in patients with pulmonary Mycobacterium avium complex disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur Respir J.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1183/13993003.02269-2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 大前陽輔、徳永勝士	4. 巻 11(2)
2. 論文標題 感染症ゲノム解析の最前線 COVID-19のゲノムワイド関連解析を例としてー	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 遺伝子医学	6. 最初と最後の頁 48-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suvichapanich S, Wattanapokayakit S, Mushiroda T, Yanai H, Chuchottawon C, Kantima T, Nedsuwan S, Suwankesawong W, Sonsupap C, Pannarunothai R, Tumpattanakul S, Bamrungram W, Chaiwong A, Mahasirimongkol S, Mameechai S, Panthong W, Klungtes N, Munsoo A, Chauychana U, Maneerat M, Fukunaga K, Omae Y, Tokunaga K	4. 巻 63
2. 論文標題 Genomewide Association Study Confirming the Association of NAT2 with Susceptibility to Antituberculosis Drug-Induced Liver Injury in Thai Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e02692-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.02692-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Omae Y, Tokunaga K.	4. 巻 266(6)
2. 論文標題 Host genetic risk factors for infectious diseases identified through genome-wide analyses / ヒトゲノム全域の解析からみえてきた感染症の発症遺伝要因	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 466-472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Omae Y, Toyo-oka L, Mahasirimongkol S, Yanai H, Smittipat N, Palittapongarnpim P, Nedsuwan S, Wattanapokayakit S, Satproedprai N, Sawanpanyalert P, Inunchot W, Pasomsub E, Wichukchinda N, Mushiroda T, Kubo M, Tokunaga K
2. 発表標題 Mycobacterium tuberculosis identified from pathogen lineage based genome-wide association study in tuberculosis
3. 学会等名 American Society of Human Genetics (ASHG) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tokunaga K, Omae Y, Toyo-oka L, Yanai H, Wattanapokayakit S, Smittipat N, Palittapongarnpim P, Wichukchinda N, Mushiroda T, Mahasirimongkol S
2. 発表標題 A novel susceptibility locus CD53 in tuberculosis identified by pathogen lineage-based genome-wide association study
3. 学会等名 European Society of Human Genetics (ESHG) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Omae Y, Toyo-oka L, Mahasirimongkol S, Yanai H, Smittipat N, Palittapongarnpim P, Nedsuwan S, Wattanapokayakit S, Satproedprai N, Sawanpanyalert P, Inunchot W, Pasomsub E, Wichukchinda N, Mushiroda T, Kubo M, Tokunaga K
2. 発表標題 Pathogen lineage based genome-wide association study in tuberculosis revealed interplay among host and pathogen genomes
3. 学会等名 Japan Society of Human Genetics (JSHG)/日本人類遺伝学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Omae Y and Tokunaga K.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer, Singapore	5. 総ページ数 30
3. 書名 Genetics of Infectious Diseases. In: Tsunoda T., Tanaka T., Nakamura Y. (eds) Genome-Wide Association Studies.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

ゲノム医科学プロジェクト（戸山）ホームページ＞研究内容＞結核研究
<http://genome-toyama.ncgm.go.jp/researches/tuberculosis.html>

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		
タイ	タイ保健省医科学局	タイ国立マヒドン大学	