

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16643

研究課題名（和文）非結核性抗酸菌同定のためのメタゲノム解析法とゲノムデータベースの確立

研究課題名（英文）Comprehensive metagenomic analysis of nontuberculous mycobacteria

研究代表者

松本 悠希（Matsumoto, Yuki）

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員（常勤）

研究者番号：30749114

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではNTM同定のためのMLSTデータベースおよびそれを用いた同定ソフトウェアであるmlstverseを開発した。これにより同日中に菌種同定を行うとともに、クラリスロマイシンなどのNTM症治療のキードラッグに対する薬剤耐性予測が行えるようになった。また核酸抽出方法及び増幅手法の最適化を行うことで、喀痰検体の取得から数日でのNTMの網羅的同定を実現することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NTM症は難治性の呼吸器疾患の総称であり、NTMはおよそ200種が知られ、亜種の違いにより異なる薬剤耐性を示す。そのため治療方針決定のためには亜種レベルの正確な同定が要求され、これまでの手法では正確な同定を行うことは困難であった。本研究ではこの同定を、正確かつ短期間で行う手法を確立した。これによりNTM症診断にかかる期間は従来の4-8週間から数日に短縮されるため、より早期の確定診断・治療開始が可能となり、より良い治療方法の確立へ繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The prevalence of nontuberculous mycobacteria (NTM) pulmonary diseases has been increasing worldwide. NTM consist of approximately 200 species and distinguishing between them at the subspecies level is critical to treatment. We developed a novel multi-locus sequence typing (MLST) database based on 184 genes from 7547 assemblies and an identification software, mlstverse, which can also be used for detecting other bacteria given a suitable MLST database. This method demonstrated the capacity for rapid detection of NTM, 10 min of sequencing of the ONT MinION being sufficient. Application of this methodology could improve disease epidemiology and increase the cure rates of NTM diseases.

研究分野：ゲノミクス

キーワード：非結核性抗酸菌症 病原体検出 MLST 全ゲノムシーケンシング

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

NTM 症は難治性の呼吸器疾患の総称であり、NTM はおよそ 200 種が知られ、亜種の違いにより異なる薬剤耐性を示す。そのため治療方針決定のためには亜種レベルの正確な同定が要求され、これまでの手法では正確な同定を行うことは困難であった。それに加えて、当初ゲノム配列が既知であった NTM は限られており、ゲノム情報に基づいた種同定が行えない状況にあった。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題では NTM 同定のための MLST データベースを構築し、それをを用いた菌種同定および薬剤耐性予測を行うソフトウェアである mlstverse の開発を行う。

(2) 喀痰中に含まれるメタゲノム DNA から早期に NTM の菌種を行うために、核酸抽出手法およびゲノム増幅方法の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) GenBank および RefSeq (NCBI Reference Sequence Database) より 175 種からなる NTM ゲノム 7547 配列を取得し、そのうちの 184 遺伝子を抽出することで MLST データベースを構築した。シーケンスされたサンプルのゲノム配列をデータベース上にマップし、R 言語により記述されたカスタムスクリプトを用いて MLST 解析を行い菌種同定を行った。またデータベース中の 184 遺伝子には薬剤耐性に関与するとされる 12 遺伝子が含まれており、ResFinder に登録された薬剤耐性変異を探索することで薬剤耐性予測を行った。

(2) *Mycobacterium agri* の培養を行い、核酸抽出手法として、シリカビーズによる単純破碎、Chelex-100, GenCheck, LoopAmp, Lucigen, NucleoSpin Microbial DNA の 6 条件の比較を行った。またゲノム増幅手法として抽出した *M. agri* ゲノム DNA を用いて、TruePrime, PicoPlex, REPLI-g, DOPlify, Rapid PCR Barcoding Kit を用いた手法についてそれぞれ検討した。Rapid PCR Barcoding Kit 以外の増幅産物については Rapid Barcoding Kit を用いてライブラリ化を行いシーケンスし、配列の QC を行った。最も NTM のゲノム解読に適した手法を組み合わせることで喀痰や早期培養検体からの NTM 検出を行う。

4. 研究成果

(1) NTM 症患者由来の培養検体に対して確立した手法の評価を実施したところ、従来のゲノム配列をベースとした 16S rRNA や ANI を用いた評価に比べ、感度・精度ともに上回っており、従来手法ではいずれも達成できなかった亜種レベルでの同定を行うことができていた。またキードラッグであるクラリスロマイシン耐性についても予測結果の評価を行ったところ、薬剤感受性試験の結果と 96%(47/49 検体)一致した。

(2) ゲノム抽出手法としては、シリカビーズによる単純な破碎による方法が最も低菌量におけるゲノム回収量が最も多く、また菌量に対する DNA 抽出量が線形を示した。また全ゲノム増幅手法としては REPLI-g および PicoPlex がゲノム中の全領域を増幅できており、特に REPLI-g についてはリアルタイムに配列を出力可能な MinION 等に適した長鎖 DNA が増幅産物として取得できていた。

そこでビーズ破碎による方法と REPLI-g による手法を組み合わせ、喀痰からの直接同定および MGIT 培養産物からの早期同定を試みた。その結果喀痰からの直接同定率は 33% 程度に留まったのに対し、2-7 日程度の MGIT による培養を経た検体からの早期同定ではすべての検体において菌種同定を行うことができた。これにより NTM 症診断にかかる期間は従来の 4-8 週間から数日に短縮されるため、より早期の確定診断・治療開始が可能となり、より良い治療方法の確立へ繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Abe Yuko, Fukushima Kiyoharu, Hosono Yuki, Matsumoto Yuki, Motooka Daisuke, Ose Naoko, Nakamura Shota, Kitada Seigo, Kida Hiroshi, Kumagogoh Atsushi	4. 巻 21
2. 論文標題 Host Immune Response and Novel Diagnostic Approach to NTM Infections	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4351 ~ 4351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21124351	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 -
1. 著者名 Fukushima Kiyoharu, Miki Mari, Matsumoto Yuki, Uda Emi, Yamamoto Yuji, Kogita Yuya, Kagawa Yuko, Matsuki Takanori, Kagawa Hiroyuki, Oshitani Yohei, Motooka Daisuke, Tsujino Kazuyuki, Yoshimura Kenji, Miki Keisuke, Hayashi Akio, Nakamura Shota, Kitada Seigo, Takeuchi Yukiyasu, Kida Hiroshi	4. 巻 21
2. 論文標題 The impact of adjuvant surgical treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease on prognosis and outcome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 153-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-020-01420-1	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 -
1. 著者名 Kuge Tomoki, Fukushima Kiyoharu, Matsumoto Yuki, Abe Yuko, Akiba Eri, Haduki Kako, Saito Haruko, Nitta Tadayoshi, Kawano Akira, Kawasaki Takahiro, Matsuki Takanori, Kagawa Hiroyuki, Motooka Daisuke, Tsujino Kazuyuki, Miki Mari, Miki Keisuke, Kitada Seigo, Nakamura Shota, Iida Tetsuya, Kida Hiroshi	4. 巻 20
2. 論文標題 Pulmonary disease caused by a newly identified mycobacterium: Mycolicibacterium toneyamachuris: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 888-888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12879-020-05626-y	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 -
1. 著者名 Matsumoto Yuki, Kinjo Takeshi, Motooka Daisuke, Nabeya Daijiro, Jung Nicolas, Uechi Kohei, Horii Toshihiro, Iida Tetsuya, Fujita Jiro, Nakamura Shota	4. 巻 8
2. 論文標題 Comprehensive subspecies identification of 175 nontuberculous mycobacteria species based on 7547 genomic profiles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Emerging Microbes & Infections	6. 最初と最後の頁 1043 ~ 1053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/22221751.2019.1637702	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 Le-Vo Hong-Ngoc, Tran Phuong Thi-Bich, Le Lien, Matsumoto Yuki, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Jones James W., Iida Tetsuya, Cao Van	4. 巻 10
2. 論文標題 Complex Class 1 Integron in a Clinical Escherichia coli Strain From Vietnam Carrying Both mcr-1 and blaNDM?1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	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) 10.3389/fmicb.2019.02472	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 Hsu Ying-Feng, Ito Makiko, Maruyama Takumi, Matsuoka Morito, Jung Nicolas, Matsumoto Yuki, Motooka Daisuke, Nakamura Shota	4. 巻 -
2. 論文標題 Deep Learning Approach for Pathogen Detection Through Shotgun Metagenomics Sequence Classification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Artificial Intelligence in Medicine	6. 最初と最後の頁 24 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-21642-9_4	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 Kishikawa T., Maeda Y., Nii T., Motooka D., Matsumoto Y., Matsushita M., Matsuoka H., Yoshimura M., Kawada S., Teshigawara S., Oguro E., Okita Y., Kawamoto K., Higa S., Hirano T., Narazaki M., Ogata A., Saeki Y., Nakamura S., Inohara H., Kumanogoh A., Takeda K., Okada Y.	4. 巻 79
2. 論文標題 Metagenome-wide association study of gut microbiome revealed novel aetiology of rheumatoid arthritis in the Japanese population	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 103 ~ 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2019-215743	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 Niitsu Takayuki, Kuge Tomoki, Fukushima Kiyoharu, Matsumoto Yuki, Abe Yuko, Okamoto Masashi, Haduki Kako, Saito Haruko, Nitta Tadayoshi, Kawano Akira, Matsuki Takanori, Motooka Daisuke, Tsujino Kazuyuki, Miki Keisuke, Nakamura Shota, Kida Hiroshi, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 8
2. 論文標題 Pleural Effusion Caused by Mycolicibacterium mageritense in an Immunocompetent Host: A Case Report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	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) 10.3389/fmed.2021.797171	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 Fukushima Kiyoharu, Kitada Seigo, Matsumoto Yuki, Komukai Sho, Kuge Tomoki, Kawasaki Takahiro, Matsuki Takanori, Motooka Daisuke, Tsujino Kazuyuki, Miki Mari, Miki Keisuke, Nakamura Shota, Kida Hiroshi	4. 巻 187
2. 論文標題 Serum GPL core antibody levels are associated with disease activity and treatment outcomes in Mycobacterium avium complex lung disease following first line antibiotic treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respiratory Medicine	6. 最初と最後の頁 106585 ~ 106585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rmed.2021.106585	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 Umeda Kaoru, Nakamura Hiromi, Fukuda Akira, Matsumoto Yuki, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Yasui Yoshinori, Yoshida Hideki, Kawahara Ryuji	4. 巻 24
2. 論文標題 Genomic characterization of clinical Enterobacter roggenkampii co-harboring blaIMP-1- and blaGES-5-encoding IncP6 and mcr-9-encoding IncHI2 plasmids isolated in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Global Antimicrobial Resistance	6. 最初と最後の頁 220 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jgar.2020.11.028	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

プレスリリース http://www.biken.osaka-u.ac.jp/achievement/research/2019/130
--

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
---------	---------