

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：84505

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590845

研究課題名(和文)結核菌全ゲノム情報の活用は新たな分子疫学像を提供しうるのか

研究課題名(英文)Can we get new insights into epidemiology of tuberculosis through whole genome sequencing analysis?

研究代表者

岩本 朋忠(Iwamoto, Tomotada)

神戸市環境保健研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：70416402

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文):結核感染のリスクを軽減するためには、患者間の伝搬経路を可能な限り高い精度で推定し、感染拡大の防止を図らなければならない。本研究課題では、結核菌の全ゲノム情報を用いた高精度な菌株異同判定による伝搬経路推定の有用性を検証した。現行の遺伝子型別解析では単一クローンによる感染拡大と考えられた30株に着目し、全ゲノム解析を行った。その結果、これら30株の伝搬経路追跡に有益な、35箇所の一塩基変異が特定できた。本結果は、全ゲノム解析により、従来の結核分子疫学調査結果を補完することで、より詳細な感染伝搬経路の解明が可能であることを示している。

研究成果の概要(英文):Detection and cutting of transmission routes of Mycobacterium tuberculosis is one of the most important public health actions to control the expansion of tuberculosis. Whole-genome sequencing (WGS) gives greater discrimination than widely used genotyping methods, which should improve the ability to trace a transmission of M. tuberculosis. In this study, we focused on one genotype strains (30 strains) to verify the effectiveness of WGS to unveil the transmission routes of the genotype strains. Our WGS analysis identified in total 35 single nucleotide variants (SNVs) which subdivided the 30 strains into highly probable transmission chains. This means that current molecular epidemiological study complement with WGS could be a practical approach to get deeper traceability of transmission of M. tuberculosis.

研究分野：分子疫学

キーワード：結核 感染症 ゲノム 分子疫学 公衆衛生 細菌 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

我が国の結核罹患率は10万対16.7(平成24年)であり、未だ、中蔓延状態にあるといわざるを得ないが、徐々に低蔓延すなわち10万対10以下の状況に近づきつつあり、現在はその移行期といえる。結核低蔓延化に伴い、集団社会防衛としての結核対策は、高蔓延時代の集団への対処(集団検診)から個への対処(菌検査・接触者検診)、そして、リスクへの対応へとその重心を移してゆく。そのような背景のもと、結核菌分子疫学が、結核の感染連鎖の特定、ならびに、感染リスクの解明のための強力なツールとして広く活用されている。本邦では、分子疫学のための遺伝子型別解析法として、結核菌ゲノム内に多数存在する縦列反復数多型(Variable Number of Tandem Repeat, VNTR)分析が標準化されている。

VNTR型別データが集積されるにつれて、特定の遺伝子型を示す株が地域由来や分離年度に関わらず一定の割合で検出されることが分かってきた。これらは、拡張型クラスター形成株として扱われており、新たな感染様式を探る糸口となり得るものである。しかしながら、多くの場合、都市部における拡張型クラスター形成株の疫学的関連性は十分に把握出来ておらず、有効な結核対策に結び付いていないのが現状である。その主な要因の一つは、VNTR型別解析による菌株異同判定の曖昧さ(菌株識別力の不十分さ)にあると考えられている。この問題を解決しうる新たな技術革新として、近年急速に発展してきた次世代シーケンサー(Next Generation Sequencer, NGS)を活用した解析への期待が高まっている。

2. 研究の目的

従来の遺伝子型別解析が、部分的な遺伝子領域の違いのみを対象としているのに対して、NGSを活用した全ゲノム解析では、結核菌の4.4 Mb全ての塩基を対象にして菌株の異同判定を行うことになる。公衆衛生の現場でこの技術を活用するためには、菌株異同判定のための基準が必要である。そこで、本研究では、まず、菌株異同判定の基準の評価を目的として、関連性が明らかな菌株間での塩基変異の出現について精査した。次に、従来の遺伝子型別解析法に対する全ゲノム解析による菌株異同判定の優位性を検証するために、拡張型クラスター形成株について全ゲノム解析を行い、その感染伝搬様式の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 全ゲノムマッピング解析

Illumina社製のGAIIx/Hiseq/Miseqを用いて、解析対象菌株のゲノム全域の配列データを取得した。得られた配列データを、既に完全ゲノム配列が明らかになっている結核菌H37Rv株の配列情報(AL123456.2)を参照配

列としてアラインメントマッピングし、一塩基バリエーション(Single Nucleotide Variant; SNV)を検出した。一連の解析は、CLC Genomics Workbench(QIAGEN社)を用いて実施した。

(2) ペア検体のマッピング解析比較

全ゲノム解析に基づく菌株異同判定の基礎データとなる結核菌の微小進化を知るために、関連性が明らかな菌株間でのSNVの検出を行い、1) ヒト生体内に潜在する時間に伴う変異の蓄積、2) 潜在性結核治療に伴う変異の蓄積、3) 感染伝搬に伴う変異の出現について検討した。具体的には、1) 再発事例による初発株と再発株の比較。全4事例。初発と再発の期間は2~7年、2) 潜在性結核治療対象となった患者由来株と初発患者由来株との比較。全3事例、3) 家族内感染事例での患者株間の比較。初発患者とほぼ同時期に家族が発症した2事例、4) 集団感染1事例での患者株間比較を行った。

(3) 地域内感染拡大株のゲノム疫学的検討

2002年から継続している神戸市結核菌分子疫学解析により、最も大きなクラスター(クラスターサイズ30株)を形成する遺伝子型株(KCT018株)に着目した。KCT018株の遺伝子型を示す30株は、VNTRパターンが完全に一致であり、従来の遺伝子型別解析では、これ以上の細分類化が不可能である。これら30株より8株を全ゲノム比較の対象として選択した。各菌株の全ゲノムマッピング解析結果を比較することで、各菌株固有のSNVを35カ所特定した。これらの全ての変異は、サンガーシーケンス法により、菌株固有の変異であることを確認した。次に、各菌株に固有の35箇所のSNVの有無を残る22株についてサンガーシーケンス法により確認し、グループ分けを行った。

4. 研究成果

(1) 信頼性高い系統分類マーカーの特定

結核菌北京型株は、他の遺伝系統群と比べて感染伝搬力や薬剤耐性化に優れており、より病原性の高い遺伝系統とされている。北京型株の解析においては、さらに詳細な亜系統に分けることで、その特徴がより明確になる。したがって、亜系統分類に用いる遺伝マーカーの信頼性が重要である。我々は、これまで標準的に利用されてきた亜系統分類のための遺伝マーカー(10領域のSNV)のうち、ゲノム位置909166のSNVはreversibleな挙動を示し、亜系統分類には適していないことを、全ゲノム解析情報から明らかにするとともに、その代替として、より信頼性の高いSNVを特定した。我々が特定したSNVはゲノムポジション1576481での変異であり、homoplasticな挙動を示さないことを1340株のサンプルセットを用いて確認した。

(2) 全ゲノム解析による同一クローン派生

株の解像度

結核菌は、ゲノム変異速度が大腸菌などと比べて遅く、これまでの研究により、菌株中に発生する塩基変異の頻度は、1年間に0.5 SNVと推定されている(0.5 SNV/genome/year)。実際、イギリスでの大規模解析(Waller et al., Lancet Infect Dis, 2013)により、結核菌の感染伝搬におけるSNVの蓄積は、3年間で5 SNVs以下、10年間では10 SNVs以下であると報告されている。すなわち、菌株の異同判定の疫学的マーカーとしてのSNVは、5~10 SNVs以下が妥当であると考えられている。本研究課題では、下記のような、異なる結核菌の生活環におけるSNVの蓄積を評価し、その背景の違いにかかわらず、同一クローン株の特定の基本情報として、0.5 SNV/genome/yearが活用できることを示し得た。

同一株による再発事例

初発時と再発時の菌株のVNTR遺伝子型別が一致した事例、4事例について、全ゲノム解析によるSNVを比較した(表1.再発事例1-4)。ヒト生体内に潜在する時間に伴う変異の蓄積を反映した事例といえる。各事例における塩基変異の数は、0~3 SNVsであり、ヒト体内においての潜伏状態が続いても、ゲノムは高い安定性を保つことが確認された。3年間で5 SNVs以下、10年間では10 SNVs以下の蓄積という基準は、再発時の菌株異同判定にも適応できるものと思われる。

潜在性結核治療によるSNVの誘導

集団感染などで、最近の感染が認められた場合に、その後の発病のリスクを軽減する目的で、イソニアジド(INH)を用いた、潜在性結核治療(LTBI)が行われる。そこで、我々は、LTBI完了後に発病した2事例(表1. LTBI-1, 2)とLTBI治療中に発病した1事例(LTBI-3)の菌株を用いて、休眠株がINHに曝露されることによる変異の誘導について調べた。いずれの事例においても、SNVはほぼ従来の基準に収まっており、LTBIでの薬剤の曝露によっても、特にSNV蓄積が促進されるという現象は認められなかった。しかしながら、発病時にINH耐性化した2事例(表1. LTBI-2, 3)では、いずれもINH耐性化に関与するkatG遺伝子の欠失が起こっていた。この欠失による耐性化の出現頻度は低いにもかかわらず、今回調べた2事例ともがLTBIが同じ機構によるINH耐性化であったことは興味深い。休眠状態での薬剤曝露による変異は、SNVよりも遺伝子の欠落という機構が優先するのかもしれない。これは、全く新しい概念であり、現在、この点についての詳細な検討を進めている。

家族内感染・集団感染事例でのSNV

家族内感染、集団感染でのSNVの出現を検討したところ(表1.家族内感染-1, 2, 集団感染-1)、感染後比較的短期間に発病した場合には、初発株と比べて変異はほとんど認め

られなかった。一方、90か月後の発病事例では、SNVが3か所あり、0.5 SNVs/genome/yearという変異速度をほぼ反映した結果となった。家族内感染の事例-2では、祖母と孫にのみ共通のSNVが検出されており、祖父->祖母->孫という感染伝搬の順序を特定し得た。これは、従来の遺伝子型別解析では追跡不能な感染伝搬経路であり、全ゲノム解析の有利性を示すものである。

表1. 本課題でゲノム比較した菌株セット

| 事例 | 菌株ID | 菌株 | 薬剤耐性 | SNV |
|-----------|-----------|------------------|------|----------------|
| 再発-1 | NK297 | 初発株 | 感受性 | No SNV |
| | FY20N063 | 7年後の再発 | | |
| 再発-2 | FY20N032 | 初発株 | 感受性 | 1 SNV |
| | FY23KH013 | 3年後の再発 | | |
| 再発-3 | FY18H129 | 初発株 | 感受性 | No SNV |
| | FY21N050 | 3年後の再発 | | |
| 再発-4 | FY20H003 | 初発株 | 感受性 | 3 SNVs |
| | FY23KH164 | 2年後の再発 | | |
| 潜在性結核治療-1 | FY21N002 | 初発株 | 感受性 | No SNV |
| | FY25KH033 | LTBI 9か月完了3年後の発病 | | |
| 潜在性結核治療-2 | IN_17 | 初発株 | 感受性 | 3 SNVs |
| | TR_20 | LTBI 6か月完了1年後の発病 | | |
| 潜在性結核治療-3 | 11-922 | 初発株 | 感受性 | 1 SNV |
| | 11-1066 | LTBI 開始3ヶ月後に発病 | | |
| 家族内感染-1 | FY25KH073 | 祖父 | 感受性 | No SNV |
| | FY25KH074 | 孫(初感染発病) | | |
| 家族内感染-2 | FY20N030 | 祖父 | 感受性 | 祖母、孫に共通した1 SNV |
| | FY20N031 | 祖母(初感染発病) | | |
| | FY20N052 | 孫(初感染発病) | | |
| 集団感染 | 11-922 | 初発株 | 感受性 | No SNV |
| | 11-992 | 2ヶ月後発病 | | |
| | 11-993 | 2ヶ月後発病 | | |
| | 18N053 | 90ヶ月後発病 | | |

(3) 地域内感染拡大株の感染経路の特定

神戸市において、従来の遺伝子型別解析により、感染拡大が認められるにもかかわらず、その疫学的関連付けが困難である地域内感染拡大株(KCT018株)について、ゲノム疫学的アプローチを試み、感染伝搬様式を解明した。これまでの分子疫学調査結果の利用価値を高めるアプローチを確立し得たといえる。

具体的な研究結果は次のとおりである。同一遺伝子型を示した30株から8株を選定して、全ゲノム解析を行ったところ、各菌株に固有の変異箇所が合計35か所検出され。一方、これら30株共通の分岐点(oldest coalescence)からのSNVは、最大11SNVsにとどまっていることから、これらの菌株は、単一クローン株から派生した遺伝的関連性の極めて高い株であることも確認された(図1)。次に、これら8株で特定された菌株固有SNV35か所、を残る22株について調べたところ、感染拡大株30株は、11株からなるグループ(G1)、10株からなるグループ(G2)、そして、その他散発的なものに大別された。G1の11株について、それぞれの疫学的関連性を精査したところ、これら11株は特定の職種・職場に勤める者とその家族で構成されることが分かり、これまで感染経路が不明としていた感染拡大株の感染様式の一つが解明された。さらに、G2については、神戸市以外の近隣地域で高頻度に分離される株が同じグループに分類されることが分かった。すなわち、G2については、地域を超えた広域での感染伝搬が起こっている株であり、感染経路の特定のためには、自治体間を超えたデータの共有、すなわち、広域データベースによるアプローチが必要であると結論付けられた。

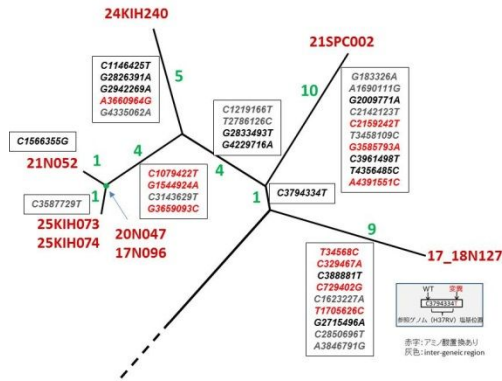


図1. 同一遺伝子型8株間のゲノム比較

(4) まとめ

以上の成果により、NGS によるゲノム解析データの活用は、従来の遺伝子型別解析を凌駕する信頼性の高い菌株異同判定を可能にすることが確認された。従来の結核分子疫学調査結果を基礎として、ゲノム疫学を組み合わせることで、より詳細な感染伝搬経路の解明を目指すことが出来る。NGS によるゲノム解析は、今後の結核対策における抜本的な分析法となりうるということが、確認された。

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 5 件)

Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, Nakanishi N, Caviedes L, Coronel J, Sheen P, Wada T, Taype CA, Shaw MA, Moore D.A.J, and Robert H. Gilman R.H. Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of Mycobacterium tuberculosis in Peru. PLoS ONE 7(11):e49651, 2012

Nakanishi N, Wada T, Arikawa K, Millet J, Rastogi N, and Iwamoto T. Evolutionary robust SNPs reveal the misclassification of Mycobacterium tuberculosis Beijing family strains into sublineages. Infection, Genetics and Evolution 16:174-177, 2013

Iwamoto T, Arikawa K, Nakajima C, Nakanishi N, Nichiuchi Y, Yoshida S, Tamaru A, Tamura Y, Hoshino H, Yoo H, Park YK, Saito H and Suzuki Y. Intra-subspecies sequence variability of the MACPPE12 gene in Mycobacterium avium subsp. hominissuis. Infect. Genet. Evol. 21:479-83, 2014

Barletta F, Otero L, de Jong B, Iwamoto T, Arikawa K, Van der Stuyft P, Niemann S, Merker M, Uwizye C, Seas C, and Rigouts L. Predominant Mycobacterium tuberculosis families and high rate of transmission among new cases are not

associated with primary multidrug resistance in Lima. J. Clin. Microbiol. 53:1854-1863, 2015

Grandjean L, Iwamoto T, Lithgow A, Gilman R.H., Arikawa K, Nakanishi N, Martin L, Castillo E, Alarcon V, Coronel J, Solano W, Aminian M, Guezala C, Rastogi N, Couvin D, Sheen P, Zimic M, Moore D. The association between Mycobacterium tuberculosis genotype and drug resistance in Peru. PLoS ONE 10(5): e0126271

[学会発表](計 13 件)

Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, Nakanishi N, Coronel J, Caviedes L, Sheen P, Wada T, Taype C, Shaw MA, Moore D.A.J, Gilman R.H. Genetic diversity of Beijing family strains of Mycobacterium tuberculosis in Peru compared with that of strains from East Asia, 11 th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, October 30 - November 2, 2012, New Orleans, USA

中西典子, 和田崇之, 有川健太郎, 岩本朋忠. 結核菌北京型 1,054 株を用いた遺伝的系統解析法の評価. 第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18-20 日, 幕張メッセ 千葉

岩本朋忠, 有川健太郎, 中西典子, 藤山理世, 松林恵介, 山下真理子, 水尻節子, 白井千香, 伊地智昭浩. 結核分子疫学への新技術「次世代シーケンサー」活用の基礎的検討, 第 111 回日本結核病学会近畿地方会, 2013 年 7 月 13 日, 大阪

有川健太郎, 中西典子, 岩本朋忠, 藤山理世, 松林恵介, 山下真理子, 水尻節子, 白井千香, 伊地智昭浩. 神戸市における外国人結核の分子疫学. 第 111 回日本結核病学会 近畿地方会, 2013 年 7 月 13 日, 大阪

岩本朋忠, 有川健太郎, 吉田志緒美, 露口一成, 鈴木克洋. BCG ワクチン接種副反応事例から得た BCG Tokyo 172-1 株に生じた遺伝子変異の検出. 第 44 回結核・非定型抗酸菌症治療研究会, 2013 年 12 月 8 日, 東京

岩本朋忠, 有川健太郎, 中西典子, 瀧井猛将. ワクチン接種副反応患者の生体内で起こった BCG Tokyo 172 株の微小進化. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26-28 日, 東京

有川健太郎, 中西典子, 岩本朋忠. 結核菌分子疫学による地域内蔓延株の網羅的解析ならびに外国人結核との比較. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26-28 日, 東京

岩本朋忠, 有川健太郎, 藤山理世, 松林

恵介,水尻節子,白井千香,伊地智昭浩.
BCG ワクチン接種副反応事例から得た
BCG Tokyo 172 株の遺伝子変異. 第 89
回 日本結核病学会総会, 2014 年 5 月
9-10 日, 岐阜

和田崇之, 岩本朋忠, 瀬戸順次, 田丸亜
貴, 長谷篤, 前田伸司, 阿彦忠之, 山本
太郎. M 株の広域的分離の原因究明 比
較ゲノム解析に基づく「結核ゲノム疫学」
の導入. 第 89 回 日本結核病学会総会,
2014 年 5 月 9-10 日, 岐阜

有川健太郎, 中西典子, 岩本朋忠, 藤山
理世, 松林恵介, 水尻節子, 白井千香,
伊地智昭浩. 結核菌分子疫学による神戸
市内蔓延株の網羅的解析ならびに外国
人結核との比較. 第 89 回 日本結核病学
会総会, 2014 年 5 月 9-10 日, 岐阜

岩本朋忠. 都市型結核分子疫学へのゲノ
ム解析の活用. 第 19 回 国際結核セミナ
ー, 2015 年 3 月 5 日, 東京

有川健太郎, 吉田志緒美, 岩本朋忠. 多
剤耐性結核菌の二次変異保有状況の解
析. 第 88 回 日本細菌学会総会, 2015
年 3 月 26-28 日, 岐阜

瀧井猛将, 吉田志緒美, 有川健太郎, 藤
山理世, 岩本朋忠. BCG 副反応事例株に
おける遺伝子変異と宿主細胞に対する
作用の解析. 第 90 回 日本結核病学会総
会, 2015 年 3 月 27-28 日, 長崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 朋忠 (IWAMOTO TOMOTADA)
神戸市環境保健研究所・副部長
研究者番号: 70416402

(2) 連携研究者

和田 崇之 (WADA TAKAYUKI)
長崎大学熱帯医学研究所・助教
研究者番号: 70332450