

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670468

研究課題名(和文) 診断困難な感染症のための次世代シーケンサを用いた新規診断法の開発

研究課題名(英文) Novel diagnostic method for infectious disease using next generation sequencing

## 研究代表者

後藤 恭宏 (GOTOH, Yasuhiro)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20558358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：感染症の診断および治療において、病原体の同定に要する時間は、適切な治療の開始時期の問題に直結し、患者予後に著しく影響する。そこで、分離培養を介さずに、直接、次世代シーケンサを用いて解析する網羅的な診断法の開発を目的とした。血液のような検体の場合、現在のDNA調整法では宿主由来DNAが大量に混入するため、目的とする病原体の配列情報を十分に取得できない。そこで、病原体の情報を効率良く取得するためのDNA精製の方法および同定の方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：In the diagnosis and treatment of infectious diseases, the time that required for identification of the pathogen from patients, directly faces to the problem of the starting point for appropriate treatment and affects on patient prognosis. The exhaustive detection method for pathogens using the next generation sequencers without cultivation for isolation was developed. In the case of analyses such as blood, the current DNA purification method contaminates the large amount of host-derived DNA. It interferes to get enough of the sequence information of the pathogen of interest. Therefore, we developed a DNA purification method and identification method for efficiently acquiring information of the pathogen.

研究分野：細菌ゲノム

キーワード：メタゲノム 感染症 未培養

## 1. 研究開始当初の背景

病原体の分離同定が困難あるいは分離に時間や特別な技術等を要する感染症では、臨床所見から想定される全ての病原体に対して、それぞれ個別の検出方法を試みる必要がある。このような従来の診断法に必要とされる「時間や経験、技術の習熟」を必要としない新規診断法の開発は盛んに進められている。しかし、いずれも PCR や抗原検出などの個別検出法であり、複数の検査を行う必要がある。これに対して、次世代シーケンサを用いた網羅的な診断法の導入も検討されている。ところが、血液のような検体の場合、現在の DNA 調整法では宿主由来 DNA が大量に混入するため、目的とする病原体由来の配列情報を十分に得ることができず、実用化には大きな壁が存在する。本研究では、この問題の解決策として、血液検体などからヒトと細菌の間での DNA メチル化システムの違いを利用して細菌 DNA を選択的に調整する手法を確立し、次世代シーケンサと組み合わせることにより、分離培養を必要としない新しい細菌感染症診断法の開発に挑戦する。本手法が確立できれば、従来法での病原菌同定が困難であった症例に対しては、これまでの診断法の限界を打破する新しい診断法となる。従来法で同定が可能である感染症に対しては、補助的な診断法となるが、シーケンスコストがさらに下がれば、重複感染などを見落とすリスクが低い手法として、将来的にはメインの診断法となる可能性を秘めている。また、本手法では、菌種同定だけでなく、付随的に得られるゲノム配列から薬剤耐性や病原性にかかわる情報など、治療方針の決定等に役立つ情報を取得することが可能である。さらに、新たな病原菌の発見にもつながると期待される。

## 2. 研究の目的

感染症の診断および治療において、病原体の同定に要する時間は、適切な治療の開始時期の問題に直結し、患者予後に著しく影響する。特に、分離培養が困難あるいは分離に時間や特別な技術などを要する病原体に対する新規診断法の開発は、患者にとっても医療現場にとっても有益である。近年、次世代シーケンサを用いて血液などの患者由来検体を直接解析する手法の導入が議論されているものの、ヒト DNA の大量混入が病原体に由来する配列情報の取得を妨げ、実用化の大きな障害となっている。そこで、本研究では、対象を病原細菌に絞り、ヒトと細菌の間での DNA メチル化システムの違いに基づいた細菌 DNA 濃縮調整法を確立し、これと次世代シーケンサを組み合わせることにより、分離培養を必要としない新しい細菌感染症診断法の開発を目指す。

血液のような検体からの病原体検出に次世代シーケンサを利用するためには、様々な課題が存在する。本研究で最も重要なポイントは、血液検体を材料として細菌 DNA を選択

的に濃縮する DNA 調整法を確立し、次世代シーケンサを組み合わせることにより、これらの課題の克服に挑戦する点である。例えば、血液検体から DNA 試料を調整しても、大量のヒト DNA の混入(全 DNA の 99.9%以上)は避けられず、大型の次世代シーケンサを用いても病原体由来配列の取得は容易ではない。申請者も、これまでに核画分を除くことによる細菌 DNA 濃縮法を開発したが、時間と労力を要し、効率的にも実用レベルに達していない。申請者は、この研究の過程で、試料調整にヒトと細菌の間でのメチル化 DNA パターンの違いを利用できないかと考えた。ヒトと細菌の DNA が混ざった状態から、ヒトにのみ見られるメチル化 DNA パターンを利用してヒト DNA の除去すること(細菌由来 DNA の濃縮)が理論的には可能である。この手法を確立すれば、ベンチトップ型の次世代シーケンサでも、効率のかつ網羅的な DNA 解析と診断が可能となる。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト DNA 除去法の検討

メチル化 CpG(mCpG)結合タンパク質を用いたヒト DNA の除去

DNA 試料(1 µg)に、Protein A 融合メチル化 DNA 結合タンパク質溶液(NEBNext Microbiome DNA Enrichment Kit, New England Biolabs 社)を添加する。十分に DNA と結合させたのち、Protein A 認識磁気ビーズを添加し、メチル化 DNA/タンパク質複合体と結合させる。次に、磁気ビーズ(メチル化 DNA/タンパク質複合体が結合している)を磁石で固定し、その上澄みを回収する。回収した画分には、mCpG を含まない DNA 断片が濃縮される。mCpG は細菌 DNA に見られないので、この画分は細菌 DNA 濃縮試料となる。

メチル化 CpG(mCpG)認識性 DNA 制限酵素を用いたヒト DNA の除去

DNA の認識配列が異なる 4 種類のメチル化 CpG 認識性 DNA 制限酵素 MspJI や FspEI, LpnPI, McrBC (New England BioLabs 社)で、DNA 試料(1 µg)を数時間(3-6 時間)処理したのち、熱処理し反応を停止させ、断片化のパターンの違いはアガロース電気泳動により確認した。mCpG が点在するヒト DNA は断片化され(10 Kb 以下を想定)、例えば、HeLa 細胞由来 DNA を MspJI 単独で一晩処理した場合、約 80%が 10 Kb 以下に切断されることが報告されている。mCpG をもたない細菌 DNA でも非特異的な切断が生じる可能性はあるが、その頻度は極めて低いと予想される。処理した DNA 試料を、ゲル電気泳動によって DNA のサイズで分画し、20 Kb 以上の断片をゲルから抽出し、細菌 DNA 濃縮画分とする。

### (2) イルミナ MiSeq による配列解析と解析パイプラインの確立

細菌 DNA 濃縮試料から、イルミナ Nextera DNA Sample Prep Kit を用いてイルミナ MiSeq 解析用のライブラリを調製し、配列解析を行

う。取得した DNA 配列情報から、病原菌 DNA 含有率を算出し、(1)のいずれの方法が有効かを決定する。具体的には、取得した DNA 配列に含まれる病原菌由来 DNA の含有率は、病原菌のゲノム配列に対してマッピングされた配列数から算出する。具体的には、取得した DNA 配列に含まれる病原菌由来 DNA の含有率は、病原菌のゲノム配列に対してマッピングされた配列数から算出する。同時に宿主ゲノム配列に対してもマッピングを行い、宿主由来 DNA の割合も推定できる。また、総リード数に対して、含まれる由来不明リードがどの程度含まれるかも確認できる。DNA 配列情報量は、1 試料あたり 200 万リード（それぞれ 300bp）を取得した。さらに、添加菌数と病原菌由来 DNA 含有率から、本手法の検出感度を算出した。次に、宿主ゲノム配列をマッピングにより除去した後に残った配列群を由来が分からないものと仮定し（臨床検体を解析する場合を想定した解析）DNA 配列データベースに対して、これらの配列の相同性検索を行って菌種を同定するための解析パイプラインを構築する。

#### (3) 臨床検体への応用

確立した手法を用いて、血液や血液以外の臨床検体を解析し、有効性を評価する。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト DNA 除去法の検討

DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen 社)を用いて精製した DNA を使用して、原理の異なる 2 つの宿主 DNA の除去法を検討した。

##### メチル化結合タンパク質を用いたヒト DNA 除去

この全 DNA を用いて、MBD2F 結合磁気ビーズと混合した。このとき宿主由来 DNA は磁気ビーズと結合し、それを除去することで病原体由来 DNA 濃縮画分を回収した。3 条件の供試 DNA 量（62.5、250、1000 ng）から、細菌 DNA 濃縮画分とそれ以外の画分に分画し、Nextera XT（イルミナ社）を用いて次世代シーケンサ用ライブラリを調製した（計 6 ライブラリ）。また、濃縮操作を行っていない全 DNA から、同様のライブラリを調製した。次世代シーケンサ MiSeq を用いて、各ライブラリが 200 万リード以上になるように配列を取得した。得られた配列は、マッピングプログラム Bowtie2 により、マップリードと非マップリードに分けた。このときマップされたリードは宿主由来であると考えられ、非マップリードは病原菌由来の配列と考えられる。それぞれの配列の本数を用いて濃縮率を算出した。その結果、3 倍程度濃縮することに成功した。

##### メチル化認識性制限酵素を用いたヒト DNA 除去

菌血症を想定して、サルモネラと大腸菌、セラチア、緑膿菌を用いた。それらにマウス DNA を加えた計 6 つの DNA サンプルとメチル化認識性制限酵素を、それぞれ 37°C で 6 時

間反応させた後、熱処理（65°C で 20 分間）し反応を停止させた。実験には、DNA 認識配列が異なるメチル化認識性制限酵素 MspJI や FspEI、LpnPI、McrBC を用いた。DNA バンドパターンの違いはアガロース電気泳動により確認した。その結果、McrBC はマウス DNA のみ断片化し、細菌 5 菌種由来の DNA を断片化しなかった。一方で、MspJI や FspEI、LpnPI は、マウス DNA だけでなく幾つかの細菌由来 DNA を断片化することが確認された。このことから、臨床検体から、メチル化認識性制限酵素を用いて細菌 DNA を濃縮するためには、メチル化認識性制限酵素 McrBC が有効である可能性が示された。

#### (2) イルミナ MiSeq による配列解析と解析パイプラインの確立

次世代シーケンサを用いることで分培養を必要としない新しい細菌感染症診断法を実現するために、迅速化と簡便化を計った原因菌の同定を可能とする解析パイプラインの構築についても検討した。次世代シーケンサ MiSeq を用いて取得した DNA 配列情報（リード）のうち、配列クオリティの低い箇所を丁寧にトリムした。原因菌の高感度な検出のためには、検体の由来元であるヒトゲノムを除外する必要がある。NCBI Reference Sequence Database (RefSeq)に登録されているヒトゲノムに対して、リードのマッピングを行い、マップされたリードはヒト由来であると判断し除外した。マップされなかったリードは、RefSeqに登録されている細菌や nt のデータベースを対象にして blastn 検索を行った。この結果、有意なヒットが見られた細菌種の情報をもとにして、原因菌の推定を行うことができる解析パイプラインを構築した。

#### (3) 臨床検体への応用

感染症が疑われるホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を用いて病原体の検出を試みた。FFPE 組織から全 DNA を精製した。組織あたりの全 DNA 精製効率が低いため、Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた Multiple strand displacement amplification 法による全ゲノム増幅も検討した。その増幅した DNA を用いて、イルミナライブラリを調整し、配列取得を行った。構築したパイプラインに従い、原因菌の同定を試みた。しかしながら、ライブラリ調整はできたものの、シーケンスの結果、長期にわたるホルマリン固定による DNA の激しい損傷のため、得られた配列が解析に適さないことが判明した。ほかには、原因菌由来だと想定されるリード群から原因菌のゲノムを再構築するためのメタゲノム用アセンブラや、院内感染のような集団感染時の病原菌の伝播経路の推定を可能とする解析パイプライン等の開発を進めている。

### 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)

Katahira K, Ogura Y, Gotoh Y, Hayashi T. Draft Genome Sequences of Five Rapidly Growing Mycobacterium Species, *M. thermoresistibile*, *M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum*, *M. canariense*, *M. brisbanense*, and *M. novocastrense*. *Genome Announc.* 査読有, 2016, 4(3): e00322-16.  
doi: 10.1128/genomeA.00322-16.

Garcia BG, Ooka T, Gotoh Y, Vieira MA, Yamamoto D, Ogura Y, Girao DM, Sampaio SC, Melo AB, Irino K, Hayashi T, Gomes TA. Genetic relatedness and virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli* strains of serotype O119:H6 expressing localized adherence or localized and aggregative adherence-like patterns on HeLa cells. *Int J Med Microbiol.* 査読有, 2016, 306(3):152-64.  
doi: 10.1016/j.ijmm.2016.02.008.

Kusumoto M, Hikoda Y, Fujii Y, Murata M, Miyoshi H, Ogura Y, Gotoh Y, Iwata T, Hayashi T, Akiba M. Emergence of a Multidrug-Resistant Shiga Toxin-Producing Enterotoxigenic *Escherichia coli* Lineage in Diseased Swine in Japan. *J Clin Microbiol.* 査読有, 2016, 54(4):1074-81.  
doi: 10.1128/JCM.03141-15.

Ooka T, Ogura Y, Katsura K, Seto K, Kobayashi H, Kawano K, Tokuoka E, Furukawa M, Harada S, Yoshino S, Seto J, Ikeda T, Yamaguchi K, Murase K, Gotoh Y, Imuta N, Nishi J, Gomes TA, Beutin L, Hayashi T. Defining the Genome Features of *Escherichia albertii*, an Emerging Enteropathogen Closely Related to *Escherichia coli*. *Genome Biol Evol.* 査読有, 2015, 7(12):3170-9.  
doi: 10.1093/gbe/evv211.

Ogura Y, Mondal SI, Islam MR, Mako T, Arisawa K, Katsura K, Ooka T, Gotoh Y, Murase K, Ohnishi M, Hayashi T. The Shiga toxin 2 production level in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is correlated with the subtypes of toxin-encoding phage. *Sci Rep.* 査読有, 2015, 5:16663.  
doi: 10.1038/srep16663.

〔学会発表〕(計 7件)

吉村大, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也, 伊藤武彦: 全ゲノム配列情報を用いた近縁菌株の迅速高精度系統解析手法の開発: 病原菌感染経路推測への応用. 第89回日本細菌学会総会, 2016年03月23-25日, 大阪府・天王寺区.

吉村大, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也, 伊藤武彦: 次世代シーケンサを用いた菌株間 SNP 検出における問題点と検出プロトコルの構築. 第10回日本ゲノム微生物学会年会, 2016年3月4-5日, 東京都・目黒区.

後藤恭宏, 林哲也 (ワークショップ・招待演者): 難培養菌群による polymicrobial disease へのゲノムからのアプローチ. 第87回日本細菌学会総会, 2014年3月26-28日, 東京都・江戸川区.

後藤恭宏, 吉村大, 小椋義俊, 佐伯裕二, 谷口喬子, 桂啓介, 梅木一美, 大岡唯祐, 三澤尚明, 伊藤武彦, 岡山昭彦, 林哲也 (若手シンポジウム): Whole genome sequencingにより実現した高精度分子疫学解析を用いた *Helicobacter cinaedi* 院内感染事例の同定. 第67回日本細菌学会九州支部総会, 2014年9月5-6日, 鹿児島県・鹿児島市.

後藤恭宏, 林哲也 (ワークショップ・招待演者): 高精度分子疫学解析による集団感染疑い事例の検討. 第88回日本細菌学会総会, 3月26-28日, 2015年, 岐阜県・岐阜市.

後藤恭宏, 大岡唯祐, 小椋義俊, 林哲也, 岡山昭彦, 佐伯裕二, 梅木一美, 谷口喬子, 三澤尚明: Whole genome sequencingを用いた分子疫学と、その臨床応用. 第32回宮崎感染症研究会, 2014年2月2日, 宮崎県・宮崎市.

吉村大, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也, 伊藤武彦: Whole Genome Shotgunを用いた病原菌に関する疫学研究のための解析手法の開発. 第8回日本ゲノム微生物学会, 2014年3月7-9日, 東京都・八王子市.

〔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

後藤 恭宏 (GOTOH, Yasuhiro)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号： 20558358

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

林 哲也 (HAYASHI, Tetsuya)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号： 10173014

岡山 昭彦 (OKAYAMA, Akihiko)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号： 70204047