

令和元年6月18日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05496

研究課題名(和文)敗血症ショックの原因となる病原性微生物の全ゲノム配列決定

研究課題名(英文)Whole genome sequencing of pathogenic microorganisms causing septic shock

研究代表者

関根 章博 (Sekine, Akihiro)

千葉大学・予防医学センター・教授

研究者番号：30425631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症301症例の血液培養から得た病原性微生物のPacBioRS /Sequelによる全ゲノム配列決定を行った。菌種はE.coli(136症例)、K.pneumoniae(94)、P.aeruginosa(44)、K.oxytoca(11)、E.cloacae(7)、他に5種で、複数の菌種の同時検出(2)も観察された。全株とも全ゲノム配列が決定でき、全て新規配列であった。症例の多かったE.coli、K.pneumoniae群では、敗血症に関連する可能性のある構造変異が検出された。これらは救命救急医療従事者が閲覧できるデータベースを構築し、将来は外部医療従事者と共有する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症に発症に関わる多数の病原性微生物全ゲノム配列を取りまとめた情報はない。一方、本研究代表者・研究分担者は敗血症例のヒトGWASデータ約800人の情報も所持し、ヒト感受性一病原性微生物種・全ゲノム情報を備えたことは、ほぼ原因が不明である宿主・感染の相互作用を理解するための重要な基盤情報となる。すでに、千葉大学の救命救急医療従事者にはデータベースとして共有化を開始し、意見徴集を行った後、将来は、千葉大学外の当該領域関係者とも共有化を図り、敗血症解決への基盤に発展させる予定である。

研究成果の概要(英文)：The whole genome sequence was determined by PacBioRSII / Sequel from blood culture bacterial samples of 301 cases of sepsis. Bacterial species are E. coli (136 cases), K. pneumoniae (94), P. aeruginosa (44), K. oxytoca (11), E. cloacae (7), and rare cases, Aeromonas. Spp (3), E. aerogenes (2), R. ornitholytica (1), S. maltophilia (1), S. marcescens (1). The simultaneous detection of E. coli and K. pneumoniae (2) was also observed. All strains were able to determine the entire novel genome, and several structural mutations associated with sepsis were detected from the E. coli K. pneumoniae group. These were made into a database, and it was set as the situation which a critical care worker can read.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：敗血症 病原性微生物 全ゲノム PacBioRS /Sequel 変異 データベ ス

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

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症は、感染症に伴う制御不能な臓器障害(ショック、DIC、多臓器不全)を招く死亡率の高い疾患である。発症要因には宿主側と感染株の両者が深く関与している可能性が推察されるが、その成因は殆ど明らかになっていない。本研究では感染症に焦点を当て、敗血症を招く感染種および感染株の特徴を知るために全ゲノム配列を決定し、その配列特性から感染種や感染株の特性(病原性、感染性、薬剤耐性等)を解明するデータベースを構築することが本課題となる。一方、本申請時には、多数の感染症株を決定できる装置として short read 型次世代シーケンサ (NGS: Next Generation Sequencer)の MiSeq, NextSeq, HiSeq, IonProton が知られていたが、DNA 断片あたりのリード長が短く、しかも、配列決定にはリードした DNA 断片の配列を公開標準配列に annotation するため、刻々と変化する病原性微生物の正確なゲノム配列決定、特に、繰返し配列、相同領域、構造変異の決定には不向きで、全ゲノムからの病原性微生物の特徴を調査する基盤構築の実現には疑問が持たれていた。そこで、DNA 断片あたりのリード長が長い (~60kb) long read 型 NGS の PacBioRS /Sequel で DNA 断片の塩基配列決定し、それらを de novo assemble で繋いで病原性微生物の全ゲノム配列を決定する計画とした。当初、本技術は一部の限られた研究者のみが取得しており、数株の病原性微生物全ゲノム配列決定が限度であった。その中で、本研究は、病原性微生物の特性を見出すための基盤を構築するため、300 株の病原性微生物全ゲノム配列決定を行うことを課題とした。

### 2. 研究の目的

敗血症ショックを招く病原性微生物種および種の特徴(病原性、感染性、薬剤耐性等)を解明し、これらを迅速に診断できる技術を確立するため、敗血症ショックを罹患した多数の患者さんから採取した病原性微生物の全ゲノム配列を決定し、敗血症に関連する配列の特徴を明らかにして、死亡率の改善ができなかった敗血症ショックへの新たな医療対応への重要な基盤情報を提供することが本課題の目標となる。そこで、敗血症を招いた患者 300 例を目標に、敗血症患者の血液から病原性微生物を採取し、PacBioRS /Sequel により全ゲノム配列を決定する。当情報はデータベース化、救命救急医療従事者が閲覧でき、当該領域の医療従事者・研究者との協力体制を構築する計画とした。

### 3. 研究の方法

これまでに、敗血症患者さんの血液中の病原性微生物の全ゲノム配列を直接決定できるかを試みたが、DNA 量が少なく、高感度検出が困難であることが判明したので、当アプローチを中断した。そこで、敗血症患者から採血の後、血液培養を行い、さらに、菌種に最適な培養法にて培養した(DNA 量>10ug)。DNA 精製は、前処理に InnuPREP Bacteria Lysis Booster (analytik jena 社)、精製キットには smart DNA prep(a) (analytik jena 社)を用いて、InnuPure C16(analytik jena 社)にて実施した。得られた DNA は配列精度を確保するための高品質な DNA を得たことを確認するために、OD 値の A260/A280、A260/A230 が 1.6 以上、さらに、Qubit 値 / OD 値が 0.7 以上であること、電気泳動で 100kb サイズ以上の DNA が採取されたことを確認して、PacBioRS /Sequel シーケンスを実施する。一方、PacBioRS /Sequel によるシーケンスは、g-tube(Covaris 社)を用いて 3000xg (8~10kbDNA 断片) および 2000xg (15~20kbDNA 断

片)で切断し、Template Prep Kit(PacBio 社)で前処理を行い、PacBioRS /Sequelにてシーケンスを実施、h-gap と FALCON(PacBio 社)を用いて de novo assemble にて配列を決定する。解析上、配列が疑わしい領域は、独自 Script を作成の上、検証を行う。なお、de novo assemble に用いた平均 coverage は 100 以上とし、精度維持を行った。

#### 4 . 研究成果

敗血症 301 症例の血液から培養した病原性微生物の全ゲノム配列を PacBioRS /Sequel にて決定した。病原性微生物種は、E.coli (136 症例) K.pneumoniae (94 症例) P.aeruginosa (44 症例)、K.oxytoca(11 症例)、E.cloacae(7 症例)、稀なものとして、Aeromonas.spp(3 症例)、E.aerogenes(2 症例)、R.ornithinolytica(1 症例)、S.maltophilia(1 症例)、S.marcescens(1 症例)で、E.coli と K.pneumoniae の同時検出(2 症例)も観察された。全株とも全ゲノム配列が決定できたが、登録公開配列(NCBI:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)と同一配列を有する株は無く、敗血症の中でも、重症化のため ICU に搬送された群とそうでない群の比較から、症例の多い E.coli、K.pneumoniae から敗血症重症化に関連する可能性のある複数の構造変異が抽出されている。なお、現在普及型の short read 型次世代シーケンサ (MiSeq 等)では全ゲノム配列決定が困難であり、PacBioRS /Sequel で迅速に全ゲノム配列が決定出来たことも注目に値する。なお、当情報はデータベース化し、救命救急医療従事者が閲覧できる状況とした。現状、データベースの閲覧を通じて意見徴集、追加登録すべき情報の搭載などを検討するためにアクセス制限された関係者のみへの開示であるが、関係者での議論を経た後、当該領域関係者が共有できる体制構築を計画している。一方、敗血症では、病原性微生物の全身循環への侵入が引金であることは周知であるが、重症化にはさらにその病原性微生物の感染性や病原性などの特徴が大きく影響することは多くの研究者が予測するところであり、これらの特性を見出す重要な基盤になると考えている。重症化には病原性微生物のタイプのみならず、宿主の応答・体質も関わる可能性が高く、両者の相互作用も調査したい。研究分担者は、別プロジェクトの分担者として、約 800 症例の GWAS(Genome-Wide Association Study)用チップ(ゲノムワイドの genotyping データ:Omni2.5M+eoxn)の情報を既に取得済で、病原性微生物・宿主の相互作用も解析できる状況が整った。これらの情報は、死亡率の改善ができなかった敗血症ショックへの新たな医療対応への重要な知見を提供することに寄与できると確信している。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

- 1.Mitsunaga T, Hasegawa I, Uzura M, Okuno K, Otani Y, Ohtaki Y, **Sekine A**, Takeda S : Comparison of the National Early Warning Score (NEWS) and the Modified Early Warning Score (MEWS) for predicting admission and in-hospital mortality in elderly patients in the pre-hospital setting and in the emergency department. 2019 Peer J (in press) DOI : 10.7717/peerj.6947 査読あり
2. **Nakada TA**, Takahashi W, Nakada E, Shimada T, Russell JA, Walley KR. : Genetic Polymorphisms in Sepsis and Cardiovascular Disease: Do Similar Risk Genes Suggest Similar Drug Targets? Chest. 2019 Jan 17. pii: S0012-3692(19)30013-3. doi: 10.1016/j.chest.2019.01.003. 査読あり

3. Mano F, Ikeda K, Sato T, Nakayama T, Tanaka D, Joo E, Takahashi Y, Kosugi S, **Sekine A**, Tabara Y, Matsuda F, Inagaki N; Nagahama Study Group. : Reduction in Gastroesophageal Reflux Disease Symptoms Is Associated with Miso Soup Intake in a Population-Based Cross-Sectional Study: The Nagahama Study. ; J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2018;64(5):367-373. doi: 10.3177/jnsv.64.367. PMID:30381627 査読あり
4. Ikeda K, Sato T, Nakayama T, Tanaka D, Nagashima K, Mano F, Joo E, Fujimoto S, Takahashi Y, Kosugi S, **Sekine A**, Tabara Y, Matsuda F, Inagaki N; Nagahama Study Group. : Dietary habits associated with reduced insulin resistance: The Nagahama study. ; Diabetes Res Clin Pract. 2018 Jul;141:26-34. doi: 10.1016/j.diabres.2018.04.006. Epub 2018 Apr 19. PMID:29679632 査読あり
5. **Nakada TA**, Wacharasint P, Russell JA, Boyd JH, Nakada E, Thair SA, Shimada T, Walley KR. : The IL20 Genetic Polymorphism Is Associated with Altered Clinical Outcome in Septic Shock. J Innate Immun. 2018; 10: 181-8. 査読あり
6. Takeda H, Ueda Y, Inuzuka T, Yamashita Y, Osaki Y, Nasu A, Umeda M, Takemura R, Seno H, **Sekine A**, Marusawa H. : Evolution of multi-drug resistant HCV clones from pre-existing resistant-associated variants during direct-acting antiviral therapy determined by third-generation sequencing. ; Sci Rep. 2017 Mar 31;7:45605. PMID:28361915 doi: 10.1038/srep45605. 査読あり
7. Matsumoto T, Tabara Y, Murase K, Takahashi Y, Setoh K, Kawaguchi T, Muro S, Kadotani H, Kosugi S, **Sekine A**, Yamada R, Nakayama T, Mishima M, Matsuda F, Chin K. : Combined association of clinical and lifestyle factors with non-restorative sleep: The Nagahama Study. ; PLoS One. 2017 Mar 9;12(3):e0171849. PMID:28278155 doi: 10.1371/journal.pone.0171849. 査読あり
8. Matsumoto H, Izuhara Y, Niimi A, Tabara Y, Nagasaki T, Kanemitsu Y, Murase K, Oguma T, Ito I, Muro S, **Sekine A**, Matsuda F, Kosugi S, Nakayama T, Chin K, Mishima M; Nagahama Study Collaboration Group. : Risks and Cough-Aggravating Factors in Prolonged Cough: Epidemiological Observations from the Nagahama Cohort Study.. ; Ann Am Thorac Soc. 2017 Feb 10. PMID:28186843 doi:10.1513/AnnalsATS.201608-616BC. [Epub ahead of print] 査読あり
9. Kume S, Kondo M, Maeda S, Nishio Y, Yanagimachi T, Fujita Y, Haneda M, Kondo K, **Sekine A**, Araki SI, Araki H, Chin-Kanasaki M, Ugi S, Koya D, Kitahara S, Maeda K, Kashiwagi A, Uzu T, Maegawa H. : Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase Regulates Biphasic Insulin Secretion from Pancreatic  $\beta$  Cells during Fasting and in Type 2 Diabetes. ; EBioMedicine. 2016 Nov;13:168-180. PMID:28005533 doi: 10.1016/j.ebiom.2016.10.038. 査読あり
10. Muro S, Tabara Y, Matsumoto H, Setoh K, Kawaguchi T, Takahashi M, Ito I, Ito Y, Murase K, Terao C, Kosugi S, Yamada R, **Sekine A**, Nakayama T, Chin K, Mishima M, Matsuda F; Nagahama Study Group. : Relationship Among Chlamydia and Mycoplasma Pneumoniae Seropositivity, IKZF1 Genotype and Chronic Obstructive Pulmonary Disease in A General Japanese Population: The Nagahama Study. ; Medicine (Baltimore). 95(15):e3371. 2016 PMID:27082601 doi: 10.1097/MD.0000000000003371. 査読あり

〔学会発表〕(計7件)

1. **関根章博**、山下泰生、竹村亮、真下陽一、井上正宏：シンポジウム5 今こそ変化の時。 - 精密医療のための患者個別アッセイモデルとソーシャルネットワークク-

“ AI を想定した医療ビッグデータの収集解析 ”、第 30 回日本動物実験代替法学会  
2017 年 11 月 品川

2. **中田孝明**，織田成人：敗血症 Up to Date 2017 感染源のコントロール、第 30 回日本外科感染症学会・学術集会 2017 年 11 月 東京
3. Takeda H, Yoshihide Ueda Y, Inuzuka T, Ohtsuru S, Seno H, **Sekine A**, Hiroyuki M : Third-generation sequencing unveils the evolution of multi-drug resistant hepatitis C virus clones during direct-acting antiviral therapy. American Association for Study of Liver Diseases (AASLD) The Liver Meeting 2017.10 Washington DC, USA
4. **中田孝明**，織田成人：James Russell , Keith Walley : Interleukin-10 ファミリー遺伝子多型と重症救急患者の転帰との関連、第 45 回日本救急医学会総会・学術集会 2017 年 10 月 大阪
5. **関根章博**、山下泰生、北原輝栄、竹村亮、羽田明：シンポジウム 2 遺伝子診断体制の確立に向けた今後の課題 ”シーケンス・タイピングを用いた遺伝子診断における精度低下を招く問題点と改善策 ”、第 24 回遺伝子診療学会 2017 年 7 月 千葉
6. **中田孝明**：感染の診断にバイオマーカー有用である、第 44 回日本集中治療医学会学術集会 2017 年 3 月 横浜
7. **中田孝明**，松田直之，小倉裕司，藤島清太郎，西田 修，井上茂亮，射場敏明，今泉 均，江木盛時，垣花泰之，久志本成樹，小谷穰治，貞広智仁，志馬伸朗，中川聡，布宮 伸，林 淑朗，松嶋麻子，織田成人，田中 裕（日本版敗血症診療ガイドライン 2016 作成特別委員会）：敗血症の診断、第 44 回日本集中治療医学会学術集会 2017 年 3 月 横浜

〔図書〕(計 2 件)

1. **関根章博**，光永敏哉，真下陽一：正確なサンガ法を行うために、医学のあゆみ、医歯薬出版株式会社、2018、266：255-321
2. **関根章博**，竹田治彦，山下泰生，丸澤宏之：PacBioRS を用いたインターフェ論フリー療法無効症例の原因となった変異の検出法、医学のあゆみ、医歯薬出版株式会社、2018、266：189-254

〔産業財産権〕出願状況 (計 0 件)

〔その他〕予防医学センターホームページ：<http://cpms.chiba-u.jp/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：中田 孝明  
ローマ字氏名：Nakada Takaaki  
所属研究機関名：千葉大学  
部局名：大学院医学研究院  
職名：講師  
研究者番号：20375794

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：真下 陽一  
ローマ字氏名：Mashimo Yoichi

研究協力者氏名：光永 敏哉  
ローマ字氏名：Mitsunaga Toshiya

研究協力者氏名：山下 泰生  
ローマ字氏名：Yamashita Taiki

研究協力者氏名：高橋 希  
ローマ字氏名：Takahashi Nozomi

研究協力者氏名：高屋 明子  
ローマ字氏名：Takaya Akiko

研究協力者氏名：村田 正太  
ローマ字氏名：Murata Syota

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。