

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08431

研究課題名（和文）クリニカルメタゲノミクスと病原体ゲノミクスの高感度化

研究課題名（英文）improvement of the sensitivities of clinical metagenomics and microbial genomics

研究代表者

元岡 大祐（Motooka, Daisuke）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：10636830

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、メタゲノム解析法により原因不明疾患の患者の臨床検体から網羅的かつ迅速な病原体の検出・同定を行い、感染症の原因を解明することを目的とする。しかし、臨床検体中に含まれる病原体由来の核酸は、極微量であり、検出感度向上、低コスト化や解析の高速化が課題である。そのため本研究では、臨床検体中における病原体の濃縮法、微量核酸に対応したライブラリ調製法、データ解析手法の開発に取り組み、感度向上を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新興・再興感染症は、いつどこで発生するか予想することは難しく、発生した場合に早期に診断、治療を行う体制をいかに構築するかが重要である。その対策として、網羅的に病原体を探索できるメタゲノム解析法（クリニカルメタゲノミクス）は病原体に関する前情報が不要であり有用である。本研究では、ウイルス検出の効率化に取り組み1000倍以上の検出感度向上に成功し、網羅的な病原体探索法の臨床応用にとって有用な成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to comprehensively and rapidly identify pathogens in clinical specimens obtained from patients with diseases of unknown etiology using metagenomic analysis. We also investigated the etiology of infectious diseases. However, the amount of pathogen-derived nucleic acids in clinical specimens is extremely low, and it is difficult to improve detection sensitivity, reduce costs, and shorten the time required for analysis. In this study, we developed novel techniques, such as a library preparation method for trace nucleic acids and a data analysis method to improve sensitivity for pathogen enrichment in clinical samples.

研究分野：感染症診断

キーワード：メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

感染症は高い死因の1つであり、マラリア、下痢症、HIV/AIDSや肺感染症などが主な原因となっている。特に発展途上国における全死亡の1/3が15歳未満の子供であり、その大部分は感染症が死亡要因である。また近年、格安航空会社の参入により海外旅行者が急増しており、本国でも2014年にエボラ出血熱疑いが発生、69年ぶりに流行したデング熱や2015-2016年に流行したジカ熱、2018年の台湾からの「輸入はしか」が日本全国に蔓延したことなどは記憶に新しい。特に2019年末からの新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の世界的パンデミックはその最たるものであり、すでに世界における感染者数は1.5億人に達し死者数が300万人以上である。感染症流行による死者数の増加のみならず、経済的損失も計り知れないものである。しかし新興・再興感染症は、いつどこで発生するかを予想することは難しく、発生した場合に早期に診断、治療を行う体制をいかに構築するかが重要である。それゆえ迅速診断は急務の課題である。我々が取り組むメタゲノム解析による病原体検出方法は、既存の培養法やPCR法などでは対応が難しい、未知病原体や新興・再興感染症の病原体の検出・同定法として期待が寄せられている。未だに感染症が疑われる不明疾患による死亡例は多いため、病原体検出法の開発は早急に取り組むべき課題である。本研究の目的は、感染症が疑われる臨床検体から、感染症の病原体(細菌、ウイルス、真菌や原虫など)を迅速に検出・同定する手法の構築である。

病原体同定法としては主に、分離・培養、形態観察やPCR法などが行われているが、近年用いられるようになった次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析法(クリニカルメタゲノミクス)は、病原体ごとに異なる処理は必要とせず、臨床検体中の遺伝情報を網羅的に探索することで、すべての既知の病原体はもちろん、未知の病原体をも検出・同定し得るものである。さらに全核酸の配列をシークエンスしているため、病原体の検出と同時に病原体ゲノムの遺伝子型のタイピングも実施可能である。従来法により病原体が確定している場合においても、多くの原因微生物が難培養性であり、その遺伝子型の同定にもメタゲノム解析法は有用である。しかし、臨床検体であるが故、得られるメタゲノムデータのほぼすべての配列が宿主由来の核酸によるデータで占められているために病原体の検出感度が低下してしまっていることや配列情報が得られにくいこと、また大量に取得される塩基配列に対応した解析手法がないことが課題となっている。

2. 研究の目的

本研究は、原因不明疾患の患者の臨床検体から網羅的かつ迅速な病原体の検出・同定を行い、感染症の原因を解明することを目的とする。しかし、本手法では、臨床検体中の核酸配列を網羅的に解読するため、得られるデータ量は、検体中に存在する生物のゲノムサイズとそのコピー数の積に比例する。そのため、例えばゲノムサイズ10kbのウイルスが 10^5 コピー存在したとしても、その総塩基長は1Gbであり、ヒトゲノム1細胞分(3Gb)の1/3のデータ量しかない。また、臨床検体からヒト細胞を効率的に取り除いたとしても、発現しているmRNAはなお大量に存在する。たとえば感染性心内膜炎患者の血液検体に対する解析から得られた起因菌である*E. faecalis*由来の配列は、わずか0.07%であり、Coronavirusによる呼吸器感染由来の配列は、わずか0.005%であった。それ故に効率的な病原体検出には至っていない。

本手法の病原体の検出感度の向上、低コスト化とデータ解析の高速化に向けては、主に臨床検体中における病原体の濃縮法の開発が課題である。ゲノムサイズとデータ量の関係から、ヒト由来核酸の混入量を僅かに減らすだけでも大幅な感度向上へと繋がるため、本課題の解決は、メタゲノム解析による病原体同定の低コスト化・臨床応用に向けた必須事項である。そこで本研究では、特に臨床検体中における微生物のより簡便で効率的な濃縮法の開発、微量核酸溶液からの最適なライブラリ調製方法の検討、効率的なデータ解析手法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

本手法の病原体の検出感度向上と低コスト化、解析の高速化に向けて、主に臨床検体中における病原体の濃縮法について開発を行った。具体的には、主に下記の3項目について取り組んだ。まず、これまでに取り組んできたウイルス濃縮を発展させた。次に、臨床検体から抽出された微量の核酸(DNA/RNA)を出発材料としたNGSライブラリ調製方法の最適化を行った。さらに、データ解析手法の最適化・高速化を目指したデータベース構築や解析パイプライン構築を行った。

(1) ハイドロキシアパタイトカラムを用いた精製条件の検討

先行研究では、下痢糞便中に含まれるノロウイルスを256倍濃縮することに成功したものの、ウイルス種によりカラムへの吸着具合が異なること、溶出バッファの濃度の細かい制御が難しいことから、対象とするウイルスが不明な場合、ウイルスのカラムからの溶出のタイミングがわからないという問題があった。そこで、濃縮率を高める意味合いで、スピンカラムからHPLCへと方法を変更し、またウイルスが球状粒子であることを利用して、カラムからのウイルス溶出の光散乱法による検出を試みた。

(2) 微量核酸からの病原体探索用ライブラリ調製方法の検討

ウイルスの濃縮に関しては、上述(1)のハイドロキシアパタイトによる濃縮に加え、ヌクレアーゼ処理法によるウイルスの濃縮法が効率的であり、10倍以上の検出感度向上と従来法では捉えられなかったウイルスの検出に成功することを示してきた。しかし、ヌクレアーゼ処理後の核酸量は少なく、また髄膜炎の髄液や呼吸器感染症のBALといった臨床検体中の微生物量も非

常に少ないことから、良質なライブラリ化ができないでいた。そこで、できる限りバイアスを減らして微生物ゲノムの増幅ができる方法について検討した。

(3) 病原体探索用解析パイプラインの最適化

データ解析では、ヒトのサテライト遺伝子やアセンブリ時のアーティファクトな配列が微生物ゲノムとして登録されているが故、しばしば偽陽性として病原体候補配列が見つかる。これらを除くするとともに高速化した解析パイプラインを構築した。

4. 研究成果

ハイドロキシアパタイトを担体に用いたカラムによるウイルス濃縮・精製法において、HPLC および検出器として低角光散乱を用いて、インフルエンザウイルスの濃縮を行った。H1N1 および H3N2 を用いて検討したところ、両者は明確に溶出時間が異なっており、同じ種のウイルスであっても表面蛋白をうまく認識して分離できることがわかった。また吸光測定ではウイルス溶出が検出できないものの光散乱によりウイルス粒子を明確に捉え、ウイルスの溶出のタイミングを把握できた。しかしウイルス量が少ない場合はウイルスの溶出を吸光度計、低角光散乱検出器のいずれでも検出することができず、各溶出フラクションの qPCR による確認が必要であった。今後、カラムの理論段数を上げてより特異的に溶出させることでさらなる濃縮と溶出検出性能を向上させたい。

またライブラリ調製方法の検討によるウイルスゲノムの検出感度向上に取り組んだ。また病原性について理解するうえでは、病原体の検出のみならず、種・亜種レベルでの同定が必要である。そのため感度向上のみならず、病原性微生物について、ゲノムワイドな遺伝情報が得られる必要もある。髄液、BAL や血清など無細胞系の臨床検体から抽出される核酸量は少ないために、効率よく NGS のライブラリ化ができないでいた。そこで 1 細胞由来の RNA-Seq で用いられている技術を用いたような無細胞系の臨床検体由来の核酸を対象としたメタゲノム解析にも利用できないか検討した。1 細胞由来 RNA からのライブラリ調製方法としては、SMART-Seq や RamDA-Seq があるが、これらは pg オーダーの RNA しかない場合でも、より効率的にまたバイアスを減らして RNA から cDNA を増幅することができる。そこで、SARS2 陽性患者由来の BAL を検体に用い、SuperScriptIV による逆転写、二本鎖 DNA 化、そして NGS ライブラリ化という従来から取り組んできた方法と SMART-Seq と RamDA-Seq によるライブラリ調製方法の検討に取り組み、メタゲノムデータの比較解析を行った。その結果、RamDA-Seq を使用した場合に 1000 倍以上の感度向上に成功した。また、ゲノムワイドに配列情報を取得することもできており、遺伝子型のタイピングについても従来法より感度良く実施できるようになった。

またメタゲノム解析の高速化に向けたデータベースと解析パイプラインの最適化に取り組んだ。メタゲノム解析の一般的な解析ワークフローとしては、得られた配列のトリミング、マッピングなどによる宿主由来核酸の除去、残る配列に対するデータベースとの相同性検索などであるが、最初の工程におけるトリミングの最適化を実施した。具体的には、NGS のライブラリ調製時に付加したアダプター配列がゲノムアセンブリの際にミスアセンブリにより組み込まれ、データベース上に誤登録されているものを検出したり、特定の試薬を用いた場合によく検出される病原体由来の配列断片を検出したりした。また、ゲノムとの類似性ゆえ誤検出されやすい(偽陽性となりやすい)配列もまとめあげ、それらをデータベース化することで、解析の最適化を実施した。また不要な配列の除去方法としては、シーケンスによって得られた配列との相同性が高いため、bwa を用いたマッピングにより実施することとし、高速に処理ができるように整えた。病原体検出専用のデータベースを用いたマッピング解析と組み合わせることで、計算時間のかかる相同性検索 (BLAST 検索) に要する時間を減らすことに成功した。また各病原体候補のカウント数を正規化し、検体ごとに特徴的に現れる病原体候補を抽出するようにデザインした(図 1)。

本研究課題にて行った実験より、ある程度ウイルス量が存在している検体中のウイルス粒子濃縮にはハイドロキシアパタイトカラムと HPLC を用いた精製方法が有効であることが明らかとなった。また、微量 RNA を材料とした NGS ライブラリ調製方法として、RamDA-Seq 法は効率がよく、おそらく宿主 mRNA より

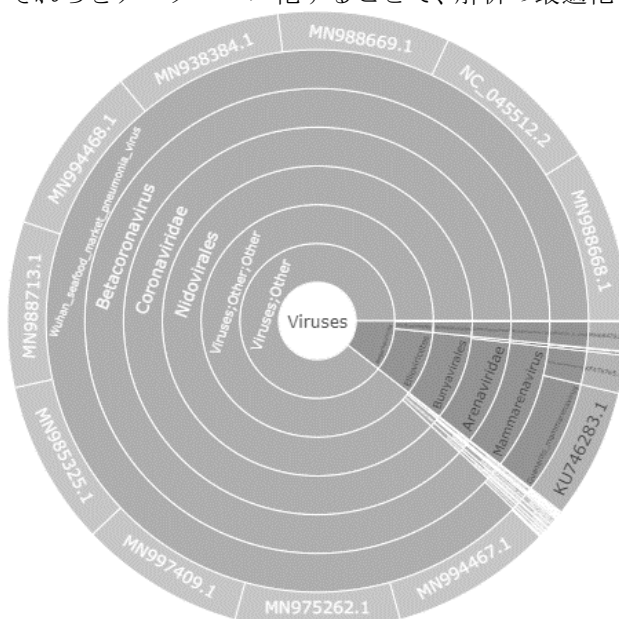


図 1. 解析パイプラインの出力結果の例

も長鎖 RNA がウイルスの場合は存在しているためであると考えられた。従来の方法では、SARS2 由来の配列が全リードの 0.01%以下であったものが、数%を超えている。病原体検出という目的では、より少ないリード数でも解析ができることから、従来よりもハイスループットにかつ、コストを抑えることができるようになった。カラムによるウイルス精製は、カラム径を細くするなど、感度向上を目指して検討できることがあるため、さらなる濃縮効率の改善を今後の課題としたい。未だに感染症が疑われる不明疾患が多く、これらについて病原体を検出し、病態との関連性を明らかにすることは、感染症対策を行う上で重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Cai Yingyun, Iwasaki Masaharu, Motooka Daisuke, Liu David X., Yu Shuiqing, Cooper Kurt, Hart Randy, Adams Ricky, Burdette Tracey, Postnikova Elena N., Kurtz Jonathan, St. Claire Marisa, Ye Chengjin, Kuhn Jens H., Martinez-Sobrido Luis, de la Torre Juan Carlos	4. 巻 11
2. 論文標題 A Lassa Virus Live-Attenuated Vaccine Candidate Based on Rearrangement of the Intergenic Region	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mBio	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) 10.1128/mBio.00186-20	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 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 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 -
1. 著者名 Le-Ha Tam-Duong, Le Lien, Le-Vo Hong-Ngoc, Anda Mizue, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Tran Linh Khanh, Tran Phuong Thi-Bich, Iida Tetsuya, Cao Van	4. 巻 Volume 12
2. 論文標題 Characterization of a carbapenem- and colistin-resistant Enterobacter cloacae carrying Tn 6901 in bla NDM-1 genomic context	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infection and Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 733 ~ 739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/IDR.S194495	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 Izumi Takuma, Sakata Kazuhito, Okuzaki Daisuke, Inokuchi Shoichi, Tamura Tomokazu, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Ono Chikako, Shimokawa Masahiro, Matsuura Yoshiharu, Mori Masaki, Fukuhara Takasuke, Yoshizumi Tomoharu	4. 巻 91
2. 論文標題 Characterization of human pegivirus infection in liver transplantation recipients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 2093 ~ 2100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmv.25555	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 -

1. 著者名 Tao Chiaki, Kinoshita Noriko, Shoji Kensuke, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Eura Rumiko, Ueoka Katsuhiko, Kubota Mitsuru, Ishiguro Akira, Miyairi Isao	4. 巻 25
2. 論文標題 Urinary tract infection due to anaerobic bacteria in a two-month-old infant	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 368 ~ 370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2018.11.016	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 -

1. 著者名 Uda Kazuhiro, Koyama-Wakai Chitose, Shoji Kensuke, Iwase Noriyasu, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Miyairi Isao	4. 巻 107
2. 論文標題 WU polyomavirus detected in children with severe respiratory failure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Virology	6. 最初と最後の頁 25 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcv.2018.08.003	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 -

1. 著者名 Vandepitte, W. P. ; Sukharam, R. ; Wichukchinda, N. ; Kaihatsu, K. ; Motooka, D. ; Nakamura, S.	4. 巻 2
2. 論文標題 Metagenomic profiling of potential pathogens isolated from blood samples and tracheal aspirates of critically ill children with persistent fever unresponsive to broad-spectrum antibiotics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health	6. 最初と最後の頁 236 ~ 250
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 該当する

1. 著者名 Yasugi Mayo, Hatoya Shingo, Motooka Daisuke, Matsumoto Yuki, Shimamura Shunsuke, Tani Hiroyuki, Furuya Masaru, Mie Keiichiro, Miyake Masami, Nakamura Shota, Shimada Terumasa	4. 巻 16
2. 論文標題 Whole-genome analyses of extended-spectrum or AmpC β -lactamase-producing Escherichia coli isolates from companion dogs in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0246482	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 Kishikawa Toshihiro, Ogawa Kotaro, Motooka Daisuke, Hosokawa Akiko, Kinoshita Makoto, Suzuki Ken, Yamamoto Kenichi, Masuda Tatsuo, Matsumoto Yuki, Nii Takuro, Maeda Yuichi, Nakamura Shota, Inohara Hidenori, Mochizuki Hideki, Okuno Tatsusada, Okada Yukinori	4. 巻 10
2. 論文標題 A Metagenome-Wide Association Study of Gut Microbiome in Patients With Multiple Sclerosis Revealed Novel Disease Pathology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 585973
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.585973	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 -

1. 著者名 Shimizu Kentaro, Takahashi Ayumi, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Tomono Kazunori, Ogura Hiroshi, Shimazu Takeshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Fecal Gram staining of phagocytosed bacteria to differentiate methicillin-resistant Staphylococcus aureus: A case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1078 ~ 1081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2020.05.021	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 -

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
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 Abe Yuko, Fukushima Kiyoharu, Hosono Yuki, Matsumoto Yuki, Motooka Daisuke, Ose Naoko, Nakamura Shota, Kitada Seigo, Kida Hiroshi, Kumanogoh 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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 元岡大祐
2. 発表標題 高分解能解析が明らかにする細菌叢のダイナミックな変化の観測と常在腸内真菌叢の解析
3. 学会等名 第42回分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

遺伝情報実験センター http://ngs-service.biken.osaka-u.ac.jp/

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	NIH		