

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08298

研究課題名(和文) 次世代シーケンスによる包括的な重症感染症リキッドバイオプシー

研究課題名(英文) Next-generation sequencing

研究代表者

伊藤 嘉規 (ITO, Yoshinori)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：20373491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：病原微生物検出における次世代シーケンスの優位性を検討するため、ロングリード法とショットガン法を比較検討した。さらに、次世代シーケンスによるRNA解析により生体応答についての解析も試みる目的で、中枢神経感染症を疑われた1歳未満の小児28例について解析した。ロングリード法はより短時間でショットガン法と同等に病原微生物を検出した。生体応答の解析では、病原微生物検出群では未検出群と比較し、抗ウイルス遺伝子であるMX1、SG15、およびOAS1の発現上昇、自然免疫反応や脱ユビキチン化に関する遺伝子群の発現上昇を認めた。これらの結果は、病原微生物同定と生体応答を同時に解析できることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代シーケンス法は、臨床検体中の核酸断片を網羅的・定量的に解析できるため、特に重症感染症における病原微生物の同定が期待されている。一方、臨床応用するためには、比較的短時間で結果が得られるロングリード法に優位性があるが、臨床検体でのデータを蓄積することが必要である。さらに、臨床検体中のRNA解析から、生体応答が解析できれば、リキッドバイオプシーとしての臨床応用が期待できる。本研究はその実現可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to analyze metagenome for detection of pathogens, and transcriptome for host immune responses during infection using two different next-generation sequencing (NGS) platforms, the long-read method and the shot-gun method. Twenty-eight patients (<12 months) with central nervous system infections were enrolled. The findings obtained from the long-read method and the shot-gun method were consistent. Host transcriptomic analysis of the long-read method revealed highly expressed genes, including MX1, ISG15, and OAS1, related to the antiviral roles of innate immunity from pathogen-identified cases. Additionally, through enrichment analysis of host genes, we observed an upregulation in the transcriptional activity associated with deubiquitination. The use of the long-read method sequencing would help to understand both pathogens and host immune responses for basic infectious disease research.

研究分野：小児感染症

キーワード：次世代シーケンス ショートリード ナノポアシーケンス リキッドバイオプシー 重症感染症

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児期には急性脳炎・脳症、劇症肝炎・急性肝不全、心筋炎などの重篤な感染症が存在する。基礎疾患や免疫抑制剤の投与により易感染性を示す患者は、血流感染症などの重症感染症のリスクにさらされる。重症感染症では、早期診断と適切な抗微生物薬の選択が予後を左右する。次世代シーケンズ法(NGS)は、一度のアッセイで、1,000万～10億程度のリード(DNA・RNA断片のシーケンズ数)を得ることができ、臨床検体中の核酸断片を網羅的・定量的に解析できる。重症感染症における病原微生物診断の臨床応用は不十分であり、多くの症例で診断が可能となれば、抗微生物薬の効率的な使用が可能となる。

(2) 血液などの体液中には、細胞由来 RNA 分子が存在し、その分離・解析により、重症感染症患者の炎症反応、免疫応答や臓器障害に関する評価を行うことが可能である。

2. 研究の目的

(1) NGS を用いて重症感染症の病原微生物を早期に網羅的に診断できる方法を確立する目的で、NGS の手法の一つであるロングリード法による微生物検出を、最も頻用されているショットガン法の結果と比較検討する。

(2) リキッドバイオプシー（体液による病態解析・診断）の可能性を探索するため、ロングリード法およびショットガン法による RNA シーケンズを行い、生体応答の解析を試みた。ロングリード法とショットガン法の結果の比較検討も行った。

3. 研究の方法

(1) 中枢神経感染症を疑われた1歳未満の小児 28 例を対象とした。各症例の急性期髄液から RNA 抽出を行い、ナノポアシーケンサー (PromethION) によってロングリードシーケンズを行なった。比較として、従来型の次世代シーケンサー (HiSeq) で同一検体に対して RNA、DNA ショットガンシーケンズを行なった。2名の患児では、病原微生物は診断されていた (Proteus mirabilis が1例、Human parvovirus B19 が1例)。各症例の急性期髄液検体に対して PCR による単純ヘルペスウイルス・ヒトヘルペスウイルス 6 型のスクリーニングを行った。すべてのシーケンズデータは病原微生物解析パイプライン PATHDET により病原微生物検索を行った。

(2) 宿主由来と判別されたものは宿主遺伝子発現解析に利用し、病原微生物が検出された患者と検出されなかった患者で比較した。

4. 研究成果

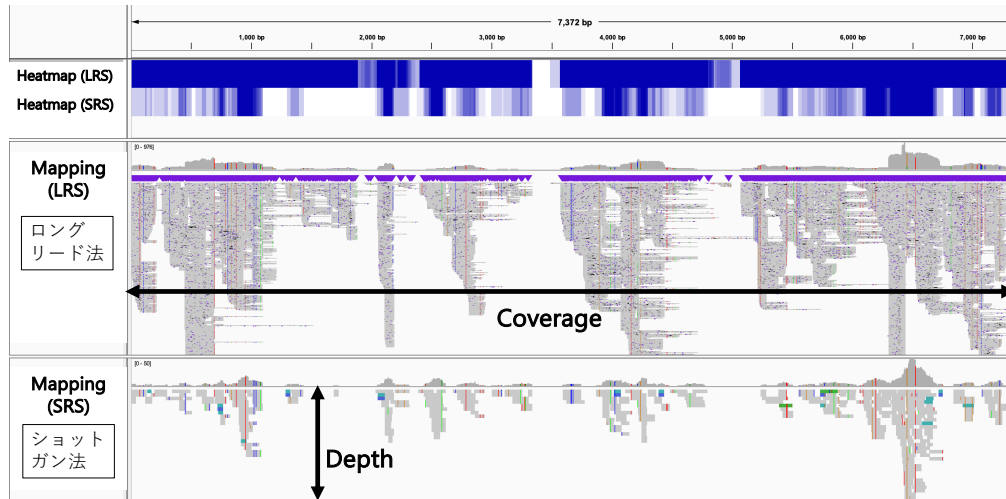
(1) 抽出した DNA および RNA の解析を行った結果、前述の 2 例では同一の微生物が検出され、さらに、Coxsackievirus B5 が 4 例、Coxsackievirus B4 が 3 例、Echovirus E7 が 1 例、Human parechovirus 3 が 1 例に検出された。全体で、原因不明であった患者 26 例中 10 例 (38%) の病原微生物を明らかにした (表 1)。

(表 1) 次世代シーケンズによる病原微生物検出結果

患者	ショットガン法	ロングリード法	推定されるゲノムデータ
N01	Echovirus E7	Echovirus E7	Echovirus E7 strain 40/Longyou/ZJ
N13	Coxsackievirus B4	Coxsackievirus B4	Coxsackievirus B4 isolate B406
N15	Coxsackievirus B4	Coxsackievirus B4	Coxsackievirus B4 isolate B408
N16	Coxsackievirus B5	Coxsackievirus B5	Coxsackievirus B5 isolate B512
N17	Human parechovirus 3	Human parechovirus 3	Human parechovirus 3
N18	Coxsackievirus B5	Coxsackievirus B5	Coxsackievirus B5 isolate B512
N19	Enterovirus B	Enterovirus B	Totivirus sp. isolate sequence_5835
N20	Coxsackievirus B5	Coxsackievirus B5	Coxsackievirus B5 isolate B512
N23	Coxsackievirus B5	Coxsackievirus B5	Coxsackievirus B5 isolate B512
N26	Coxsackievirus B4	Coxsackievirus B4	Coxsackievirus B4 strain 2019/FR/3996

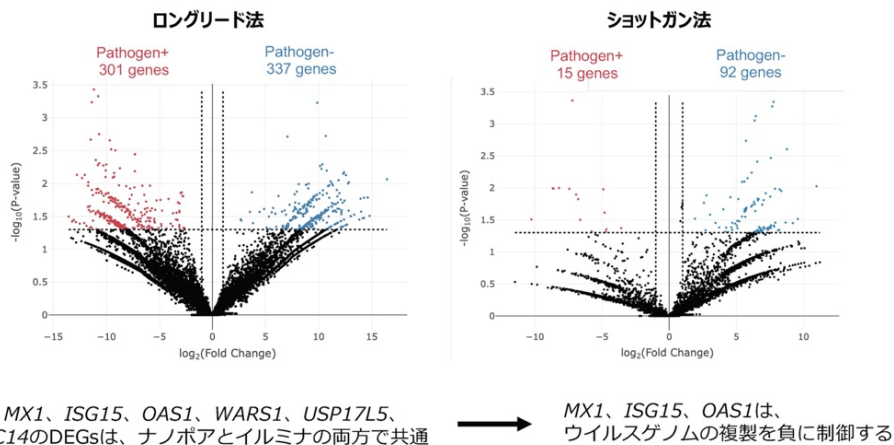
(2) 検出された病原微生物ゲノムに対するショートリード法の mapping coverage (ゲノム配列全体のどのくらいの領域のデータが得られたかを示す) および depth (ゲノムの特定の領域がどのくらいの情報量で解読されたかを示す) は、ショットガン法より有意に高かった。代表的な結果を図 1 に示す。

(図1) 病原微生物の参照配列へのマッピング (例: N15)



(3) 宿主遺伝子発現解析では、ショートリード法により 638 遺伝子、ショットガン法により 107 遺伝子の発現が検出された。これらのうちで、病原微生物の検出された患者群において、検出されなかった患者群に比べて有意に発現上昇した遺伝子は、ショートリード法で 301、ショットガン法で 15 であり、共通した遺伝子は 7 種類であった。7 遺伝子のうち、MX1、ISG15、OAS1 は抗ウイルス遺伝子であった (図2)。

(図2) 発現変動遺伝子群の検出



(4) 病原微生物検出群で発現上昇する遺伝子の機能を推定したところ、「自然免疫反応」、「脱ユビキチン化」に関する遺伝子が有意に多いと推定される結果となった。Protein-Protein interaction 解析では、「自然免疫反応」、「インターフェロニンシグナル伝達」、「ウイルスに対する防御反応」に関する遺伝子が有意に多いと推定される結果となった。

以上より、ロングリード法は汎用されるショットガン法に比べてより多くのシーケンス情報が得られる優位性があり、宿主免疫反応解析にも応用可能である。NGS による感染症リキッドバイオプシーの臨床応用が有用であることを示唆する結果となった。

(引用文献)

1. Horiba K, Torii Y, Aizawa Y, Yamaguchi M, Haruta K, Okumura T, Suzuki T, Kawano Y, Kawada JI, Hara S, Saitoh A, Giske CG, Ogi T, Ito Y. Performance of Nanopore and Illumina metagenomic sequencing for pathogen detection and transcriptome analysis in infantile central nervous system infections. *Open Forum Infect Dis* 9(10): ofac504, 2022.
2. 伊藤嘉規. 次世代シーケンスを活かした感染症診療. 小児科 63(8);904-912. 金原出版, 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okumura T, Horiba K, Kamei H, Takeuchi S, Suzuki T, Torii Y, Kawada J, Takahashi Y, Ogura Y, Ogi T, Ito Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 Temporal dynamics of the plasma microbiome in recipients at early post-liver transplantation: a retrospective study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Microbiol	6. 最初と最後の頁 104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12866-021-02154-w	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 Horiba K, Torii Y, Okumura T, Takeuchi S, Suzuki T, Kawada J, Muramatsu H, Takahashi Y, Ogi T, Ito Y	4. 巻 8
2. 論文標題 Next-Generation Sequencing to Detect Pathogens in Pediatric Febrile Neutropenia: A Single-Center Retrospective Study of 112 Cases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Open Forum Infect Dis	6. 最初と最後の頁 ofab223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ofid/ofab223	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀場千尋、原 雄一郎、遠山美穂、奥村俊彦、鈴木高子、鳥居ゆか、川田潤一、尾崎紀夫、荻朋男、伊藤嘉規.
2. 発表標題 次世代シーケンスデータ解析の効率を向上させる病原微生物予測パイプラインPATHDETの開発
3. 学会等名 第52回日本小児感染症学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤嘉規
2. 発表標題 Microbiological diagnosis
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀場千尋、鳥居ゆか、鈴木高子、武内俊、奥村俊彦、川田潤一、伊藤嘉規
2. 発表標題 次世代シーケンス解析による発熱性好中球減少症の網羅的病原微生物検出
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	川田 潤一 (KAWADA Junichi) (20532831)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	
研究分担者	荻 朋男 (OGI Tomoo) (80508317)	名古屋大学・環境医学研究所・教授 (13901)	

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