

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23406033

研究課題名(和文)ハイスループット遺伝子解読システムを用いたタイ国における病原ウイルスの網羅的探索

研究課題名(英文) Metagenomic research of virus infections in human clinical specimens by high-throughput DNA sequencing in Thailand

研究代表者

中屋 隆明 (NAKAYA, Takaaki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80271633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：近年実用化された次世代シーケンサーは、半日で数百メガ塩基対(約百万クローン)以上のDNA配列を解読するハイスループット性能を有する。我々はこの次世代シーケンサーを用いて、未だ原因不明の感染症が多く存在することが想定されるタイ国の、病原体未同定の臨床検体を対象とした網羅的解析(=メタゲノム研究)の共同研究を行った。)タイ国旅行者に発生した原因不明心筋炎のメタゲノム解析を行い、ピコルナウイルス科のウイルスを検出した。さらに病原体が同定されていない36検体を解析した結果、23検体において種々のヒト病原ウイルスゲノムが検出され、得られた情報をタイ国保健省と共有することができた。

研究成果の概要(英文)：Newly developed next-generation sequencing (NGS) technologies can be used to generate large amounts of unbiased data (gigabases) in a single round of operation. So far, we have conducted a direct metagenomic diagnosis of virus infections in human clinical specimens using NGS in Japan. In this study, we collaborated with Osaka University and the Ministry of Public Health, Thailand, to conduct metagenomic research in order to identify causative agents of 36 clinical infectious cases caused by unknown pathogens in Thailand. Several rounds of high-throughput sequencing identified human pathogenic viruses, such as Picornaviridae, Paramyxoviridae, Coronaviridae, Herpesviridae, and Parvoviridae, in 23 specimens.

研究分野：感染症内科学

科研費の分科・細目：基盤研究(B)

キーワード：ウイルス メタゲノム 次世代シーケンサー タイ

1. 研究開始当初の背景

これまでに実用化されている病原体遺伝子の診断法 (PCR、マイクロアレイ等) は遺伝子情報が明らかにされた病原体に対してのみ有効である。感染症遺伝子診断の更なる高性能化を図る上で、未知の病原体をも検出できる技術が求められている。一方、近年の DNA 配列決定技術の進歩は著しく、「次世代シーケンサー」は、半日で数百メガ塩基対 (約百万クローン) 以上の DNA 配列を解読するハイスループット性能を有する。さらに平成 22 年夏にベンチトップ型のシーケンサーが発売され、低コスト化が実現された。その結果、1 検体を 1 万円以下で解析することが可能となり、研究予算をより効果的に使えるようになった。

我々はこの次世代シーケンサーを用いて、ヒト臨床検体からの病原ウイルスゲノムの網羅的な迅速診断システムの開発に取り組んできた。その応用研究として、未だ原因不明の感染症が多く存在することが想定されるタイ国の、病原体未同定の臨床検体を対象とした網羅的解析 (=メタゲノミック研究) の共同研究を行うことを計画した。

2. 研究の目的

タイ国首都バンコク近郊にある保健省・医科学局(DMSc)衛生研究所(NIH)にはタイ国全土に設置された地域メディカルセンター(図 2 参照)より感染症診断のための臨床検体が送られてくる。DMSc の検査において、病原体同定に至らなかった(重症)感染症患者由来の検体からの抽出核酸を用いてメタゲノミック研究を行うことを目的とする。

本研究では、メタゲノム研究を遂行するに当たり、必要となる国内外の異分野の専門家が結集し、解析対象(臨床検体)および解析方法・手段という、研究目標の達成に必要な

ソフト及びハードをシステム化したことが特色である。さらに研究代表者が(平成 23 年 11 月まで)所属していた大阪大学・微生物病研究所・感染症国際研究センターおよび DMSc 内に設置された本研究所タイ感染症共同研究センターという研究施設を活かし、海外研究機関と連携したフィールド(疫学)研究を遂行することにより、グローバルな課題である感染症を理解し、克服するための最先端システムを構築することが、本研究の意義であると考えられる。

3. 研究の方法

京都府立医科大学、タイ国国立衛生研究所(National Institute of Health, DMSc, MOPH)、および大阪大学・微生物病研究所との共同研究である。タイ国において、通常の遺伝子診断、抗体検査では病原体同定に至らなかった臨床検体を本研究の対象とする。特にウイルス感染症に焦点を絞り、集団発生例および重症例(死亡例)を優先的に検討する。試験に用いる検体の選抜は Wichukchinda 博士と申請者を中心に、関係者の協議において決定した。

4. 研究成果

(1) タイ国旅行者に発生した原因不明心筋炎のメタゲノム解析

本研究を開始する直前の 2011 年 1 月にタイ国チェンマイ市で連続して発生した外国人旅行者 3 名の心筋炎(死亡例有)について、その原因特定のための一助としてメタゲノミック解析を行った。

同年 3 月より研究代表者がタイ国へ赴き、患者由来糞便、血清、鼻咽頭スワブより核酸を抽出した。3 月から 5 月にかけて、非死亡例の #2 および #3 患者由来の試料を用いて、次世代シーケンサー(454 GS-Junior/Roche 社)

によるハイスルーブット・シーケンスを行った。試料核酸 (DNA/RNA) を基にランダムプライマーを用いて DNA あるいは cDNA を非特異的に増幅し、200 から 400 塩基長の遺伝子を主たる標的としてショットガンシーケンスを行った。1 検体につき、数十万クローン以上のシーケンス (計 7 ラン) を行い、得られた塩基配列情報について BLAST サーチにて相同検索を行った結果、ヒトパレコウイルス (human parechovirus 1) と一致する遺伝子断片を #2 患者の糞便検体より検出した。しかしながら、パレコウイルスに対する特異的なプライマーを用いた RT-PCR 解析では、特異的なバンドを検出することができなかった。

次に、死亡例である患者 #1 の血清および鼻咽頭スワブ由来の抽出核酸をテンプレートとしたハイスルーブット・シーケンスを行った。その結果、鼻咽頭スワブよりライノウイルスのゲノムが検出された。最も相同性の高い (99%) ウイルスが Human rhinovirus 72 であり、同ウイルスゲノムは、(特異的プライマーを用いた) RT-PCR を用いても検出された。また、臨床検体と共培養した細胞上清からは上記以外の候補となるウイルス (ゲノム) は検出されなかった (計 5 ラン)。

これらのピコルナウイルス科に属するウイルスは健常者にも広く感染していることが報告されており、今回の心筋炎の原因病原体と判断するにはデータが不十分であった。また、上記 3 症例以降の同様な心筋炎の発生は報告されなかった。以上のデータは DMSc を通して、タイ国保健省へ報告した (2011 年 5 月)。

(2) タイ医科学局における原因不明臨床検体のメタゲノム解析

タイ国保健省 DMSc において従来のウイルス検査では検出できなかった臨床検体について、メタゲノム解析を行い、病原体 (ウイ

ルス) の同定を試みた。検体は 2 群あり、遺伝子検査 (リアルタイム RT-PCR) でインフルエンザウイルス (A/B)、RSV、アデノウイルス、ヒトメタニューモウイルス等の呼吸器ウイルスが検出された 6 検体
病原体不明な肺炎検体 (36 検体) である。

予備試験として設定した 群についてメタゲノム解析を行った結果、6 検体中 3 検体で一致するウイルスが検出された、一方残りの 3 検体についてはメタゲノム解析では検出限界以下となり、検出感度の低さ、もしくはテンプレートに用いた核酸の品質 (の低下) が問題であることが示唆された。

上記の予備試験を基に、群の不明検体についてハイスルーブット・シーケンシングと Blast 解析を行った。その結果、36 検体中 23 検体でヒト (病原) ウイルスゲノムが同定された。検出されたウイルスは以下の通りである。

- Human rhinovirus A/C/68
- Human herpesvirus 4 (EBV)
- Human coronavirus NL63
- Human respiratory syncytial virus
- Human bocavirus
- Human herpesvirus 1 (HSV1)
- Human enterovirus A/C

これらのウイルスは健常者からも検出されるものであり、実際に肺炎の原因となったものがどの程度存在するかは不明である。しかしながら、上記のウイルスが DMSc (もしくは関連病院における) ウイルス遺伝子検査では陰性であったことから、今後はタイにおけるウイルスの遺伝子型 (塩基配列) に基づいたプライマーの設計による遺伝子診断を進めていくことが重要であると考えられた。

また、近い将来、より感度の高いメタゲノム解析が行えることが予想されることから、今回の試験でウイルスが検出されなかった

検体についても、抽出核酸およびシーケンスに用いたテンプレートを保存しておくことにした。

本研究期間をを通して、Wichukchinda 博士から DMSc-NIH に所属する研究者とは活発な交流を続けてきた。日本からタイ国へ出張するだけでなく、日本に来てもらってメタゲノム解析方法を彼らに見てもらい、また実際に彼らに解析してもらうことも積極的に行った。また、平成 23 年 12 月に、研究代表者が大阪大学から京都府立医科大学へ異動したことにより、以後の交流は 3 つの研究機関（大学）で遂行することになった。これらの研究交流により、我々が確立したメタゲノム研究の方法が、タイ側に伝えることができたと考えている。最終年度（平成 25 年度）も、平成 25 年 7 月および平成 26 年 3 月に、京都府立医科大学および大阪大学・微生物病研究所を訪問してもらい、研究データに対する意見交換等を行った。さらに、平成 26 年 3 月には、タイ国で分離したアルボウイルス等のウイルスゲノム全長 cDNA の遺伝子増幅と遺伝子クローニング/シーケンシングについて技術指導を行った。

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）

（査読有）

1. M. Yasugi, R. Kubota-Koketsu, A. Yamashita, N. Kawashita, A. Du, T. Sasaki, M. Nishimura, R. Misaki, M. Kuhara, N. Boonsathorn, K. Fujiyama, Y. Okuno, T. Nakaya, *K. Ikuta, “Human Monoclonal Antibodies Broadly Neutralizing against Influenza B Virus”, *PLoS Pathog.*, Vol.9(2), e1003150 (2013) doi: 10.1371/journal.ppat.1003150.
2. R. Ramadhany, M. Yasugi, S. Nakamura, T. Daidoji, Y. Watanabe, K. Takahashi, K. Ikuta, *T. Nakaya, “Tropism of Pandemic 2009 H1N1 Influenza A Virus”, *Front Microbiol.*

Vol.3, Article 128 (2012) doi: 10.3389/fmicb.2012.00128.

3. M. Yasugi, S. Nakamura, T. Daidoji, N. Kawashita, R. Ramadhany, C.S. Yang, T. Yasunaga, T. Iida, T. Horii, K. Ikuta, *T. Nakaya, “Frequency of D222G and Q223R hemagglutinin mutants of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in Japan between 2009 and 2010”, *PLoS ONE*, Vol.7(2), e30946 (2012) doi: 10.1371/journal.pone.0030946.

（査読無）

4. 中屋隆明「次世代シーケンサーのウイルス性疾患同定への適用」臨床とウイルス 40(4), 177-183, (2012)
5. 中村昇太, 中屋隆明, 飯田哲也「メタゲノム解析を応用した網羅的病原体検出法」最新医学 67(No.9):131-133, (2012)

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 中屋隆明「血液感染症の治療戦略」京滋血液感染症研究会 2013、2013 年 9 月 13 日、京都市（特別講演）
2. 中屋隆明「新興・再興ウイルス感染症のダイナミクス」びわ湖国際医療フォーラム、2012 年 7 月 14 日、大津市（特別講演）
3. 中屋隆明、他「次世代シーケンサーが切り拓く感染症のメタゲノム学」第 11 回京都産業大学・総合生命科学部・バイオフォーラム、2012 年 1 月 16 日、京都市（招待講演）

〔図書〕（計 1 件）

1. *T. Nakaya, S. Nakamura, Y. Okamoto, Y. Nagai, J. Kawai, Y. Hayashizaki, T. Iida, T. Horii, “Direct metagenomic detection of viral pathogens in human specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach”, *Handbook of Molecular Microbial Ecology II*, pp.73-82. Metagenomics in Different Habitats. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, USA. (2011)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
ホームページ URL

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/did/>

<http://www.kpu-m.ac.jp/doc/classes/basicmedicine/221.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中屋 隆明 (NAKAYA, Takaaki)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80271633

(2)研究分担者

大道寺 智 (DAIDOJI, Tomo)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80432433

中村 昇太 (NAKAMURA, Shota)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：90432434

(3)連携研究者

()

研究者番号：