

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05272

研究課題名(和文) 感染症ゲノム遺伝子型迅速診断法の開発と臨床検体での評価

研究課題名(英文) Development of rapid diagnosis methods based on pathogen genome and their validation using clinical sample

研究代表者

山岸 潤也 (Yamagishi, Junya)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・准教授

研究者番号：80535328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、1) 小型迅速次世代シーケンサーMinIONを、核酸等温増幅系である2) Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法、あるいは3) 非特異的multiple displacement amplification (MDA)法と組み合わせることで、病原体ゲノム配列に基づいた感染症迅速診断系の開発を試みた。本系は、シーケンサーやサンプル処理に関わるシステム一式の持ち運びが容易であることを特徴とするため、研究室において基本的な系を確立した後、インドネシアをはじめとした種々の感染症の流行地に赴き、現場でも実施可能であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MinIONは小型迅速であるだけでなく省電力でもあり、ノートPCのUSBから電力の供給が可能である。そこで、今回開発した乾燥LAMP法あるいはMDA法を応用した非特異的検体処理法と組み合わせることで、遺伝子解析システム一式のポータビリティと汎用性が革新的に向上することが予想される("どこでも・なんでもシーケンス"の実現)。これら特徴を病原体の一次診断に用いることで、途上国において遺伝子型判定に基づく先進医療の提供が可能になるだけでなく、日本を含む先進国においても感染症の国境を越えた移動とそのアウトブレイクに対する対策を提供できる。

研究成果の概要(英文)：To develop novel system for rapid diagnosis of infectious diseases based on pathogen genome, we had attempted to integrate 1) MinION, a rapid real-time portable next generation sequencer available in the market recently, and isothermal amplification system such as 2) Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) method and 3) non- or semi-specific multiple displacement amplification (MDA) method in this study. The whole system including sequencing and library preparation is totally portable; therefore, it is executable in any place in standalone. We had proved the concept of the system at the lab then successfully demonstrated that it is feasible even at clinical site including Indonesia where various infectious are endemic.

研究分野：感染症ゲノム学

キーワード：感染症 ゲノム 次世代シーケンサー 網羅的診断

1. 研究開始当初の背景

[感染症対策における遺伝子型判定の重要性]

2014 年は本邦のみならず、世界的なデングウイルスの感染拡大が報告された。デングウイルスは初感染より 2 回目以降に異なる型のウイルスが感染した場合に重篤化することが知られており、遺伝子型の判定は重要である。チクングニアウイルスの感染による致死率は 0.1% と比較的低いですが、近年、ウイルスのエンベロープ遺伝子の変異により、従来のネッタイシマカだけでなく本邦にも生息するヒトスジシマカでも媒介が可能になることが報告されている。マラリアは未だ年間 100 万人近い人命を奪う重篤な感染症の 1 つである。現状、アルテメシニンが高い効果を保っているが、既にタイ・カンボジア国境等で耐性原虫の出現が報告されている。また、クロロキン耐性原虫が蔓延する地域で、当該原虫薬の使用を禁止することでクロロキン感受性原虫が増加することも知られており、遺伝子型に基づく迅速な耐性の判定は、治療方針の決定においても重要である。公衆衛生学的な視点からは、病原体の拡散過程を高精度にトレース・モニターし対策を講じる上で、病原体の遺伝子型情報は欠かすことができない。これは、デングウイルスの本邦への侵入の様に清浄国での感染拡大が起きた場合は特に重要である。

[ナノポアシーケンサー]

本年度より一部ユーザー限定ではあるが、オックスフォードナノポア社から使い捨て型の小型シーケンサー（以下ナノポア）が利用可能になった。ナノポアは、人工膜に埋め込まれたイオンチャンネルを核酸分子が通過する際に及ぼすイオン透過性の変化を検出、各塩基に固有な攪乱パターンを解読することで塩基配列を読み取ることができる。また、当該シーケンサーは世界的にも事前評価が始まったばかりの段階であり、MHC 領域の phasing 等、主に長鎖が読めることに注目した研究計画が進められているが、申請者らは、ポータビリティとライブラリー調整の簡便さに注目し、病原体の診断という独自の視点から試験運用を進めている。

[LAMP 法]

LAMP 法は、PCR と同じ遺伝子増幅方法であるが、一定温度での増幅が可能であることから、PCR と異なり特定の機器を必要としない。これは途上国での活動において大きな優位点である。さらに近年、乾燥により試薬の安定性を向上させた Dry-LAMP 法も確立されている。

[ナノポア + LAMP 法]

シーケンサーによる迅速診断を行うためには、そのライブラリー構築も同様に迅速・簡便化することが望まれる。この点、我々は Reverse transcription-coupled LAMP (RT-LAMP) 法を用いたウイルスゲノム DNA/RNA を増幅する簡便な検出系を構築している。本法をインドネシア人デングウイルス感染患者血清に用いてウイルスゲノムを増幅、さらに、増幅産物の塩基配列をナノポアで決定することにより D1 ~ D4 のデングウイルスセロタイプをほぼ 100% の確度で決定することが可能であった。

[実施フィールド：インドネシア共和国マナド市]

フィールドとなるマナド市はスラウェシ島東北部に位置する人口約 40 万人の都市で、市内には総合大学であるサムラトランギ大学が所在する。近年、近代化が急速に進むものの、未だマラリア、デング、チクングニア等、熱帯感染症の流行地域である。

これら感染症を対象としたゲノム疫学研究について、我々のグループはサムラトランギ大学と連携して種々の共同研究を進めている。具体的には、「大規模ゲノム解析による熱帯感染症制圧」（JST：アジア・アフリカ科学技術協力の戦略的推進プログラム：2008-2011）、および「マラリア原虫および媒介蚊野外株のゲノム疫学研究に向けた研究交流体制の確立」（JSPS：研究拠点形成事業：2012-2015）のサポートを得、代表的な成果として、熱帯熱マラリア患者約 100 名より末梢血の採取を行い、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析についての論文を発表している。

2. 研究の目的

各々の病原体に対して感染の有無を迅速に評価する系は存在するが、遺伝子型のタイピングまで行い得る迅速検査方法は現状では存在しない。一方で我々は RT-LAMP によりライブラリーを調整しナノポアで塩基配列を迅速に解析する実験系を既に確立している。そこで、1) デングウイルスで確立した系を、チクングニアウイルス、熱帯熱マラリアおよび、その薬剤耐性遺伝子にも展開し、インドネシア等で取得する臨床検体に適応し評価を行う。加えて、上記の系を軸に、2) 試薬を乾燥させることで試薬管理が難しい途上国においても安定した結果を出すことができる Dry-LAMP の適応による系の改良、および、3) 特定の病原性微生物を対象としない網羅的な multiple displacement amplification (MDA) 法によるライブラリー調整系の確立と臨床検体への応用を試みる。以上により、等温核酸増幅系と最新のナノポアシーケンシングテクノロジーの組み合わせによる病原性微生物の迅速スクリーニング系について、フィールドでの実証試験と有効性の評価を行う。

3. 研究の方法

熱帯感染症の流行地であるインドネシア共和国マナド市、あるいは、タイ、ベトナム、バンラディシュ、ブラジルで臨床検体（血清）を入手する（ Dengue熱、チクングニア熱、マラリア、不明熱）。それぞれの病原体に対し、LAMP 法による遺伝子増幅系をラボで確立した後、臨床検体に適応する。不明熱については、非特異的な等温核酸増幅を可能にする multiple displacement amplification (MDA)法をライブラリー構築に用いた MDA-ナノポア法を開発し、いかなる病原体でも特定できる網羅的迅速診断システムの確立を試みる。LAMP 法は、インデックス付与によるマルチプレックス化、および、試薬の乾燥化による長期安定化(Dry-LAMP)等、系のアップグレードを図る。等温核酸増幅系による増幅産物はナノポアで迅速に解析し、遺伝子型を決定する。同時に、MiSeq 次世代シーケンサーにより結果の確認を行う

4. 研究成果

1) Dengueウイルス、チクングニアウイルス、マラリア原虫を対象とした LAMP-MinION 系の確立と臨床検体を用いた評価

Dengueウイルスを LAMP により増幅し、その増幅産物を MinION で配列解析することで血清型を特定する系の開発に成功した(論文)。本系にはインドネシア、ベトナム、タイ由来の患者血清 141, 80, 12 検体を利用した。続いて、チクングニアウイルスを LAMP により増幅し、その増幅産物を MinION で配列解析することで遺伝型を特定する系の開発に成功した(投稿中)。本系にはブラジル由来の患者血清を利用した。インドネシア由来の患者血液からマラリア原虫 18S-rRNA 配列を LAMP により増幅し、その増幅産物を MinION で配列解析することで種を特定する系の開発に成功した(論文)。さらに、熱帯熱マラリア原虫のアルテミシニン耐性に関与する K13 遺伝子を LAMP により増幅し MinION で配列解析することで、耐性に関与する多型(C580Y)を判別する系の確立に成功した(論文)。PCR により K13 の他 9 遺伝子を増幅、プールしたのち MinION で配列解析することで、これら薬剤耐性に関わるの遺伝子型を一挙に特定する系の確立にも成功した(論文)。同時に、熱帯熱マラリア原虫のクロロキン耐性に関わる pfprt 遺伝子を index 配列を付与する形で PCR により増幅しイルミナシーケンサーで解析することで、安価に遺伝子型を特定する系の確立にも成功した(論文)。

2) LAMP 試薬の乾燥化 (Dry-LAMP)

主に指示薬、プライマー、DNA polymerase からなる LAMP 反応系は乾燥化により常温保存が可能になることが知られている。我々は、指示薬およびガラス化を促進する化合物の最適化を図った(投稿中)。さらに、特異性および感度を向上させるため、これまで手作業で行っていた反応液の反応チューブへの分注をマテリアルインクジェットプリンターの導入により自動化した。また、乾燥条件の最適化も行った。これらの改良により、室温で半年以上、有意差のない特異性および感度を維持できることを実証した(投稿準備中)。

3) 網羅的検出法の確立

Dengueウイルスから精製した RNA を oligodT で逆転写し illustra GenomiPhi DNA Amplification Kit (GE ヘルスケア) で非特異的に増幅したのち、MinION で配列解析することで、非特異的な系を用いても Dengueウイルスゲノムの検出が可能であるか評価した。実験室において牛胎児血清と精製ウイルスを混合することで作成した人工患者血清を材料に上記の実験を実施し、Dengueウイルスゲノムの検出が可能であることを証明した。次に、バンラディシュ由来の患者血清から、実際に Dengueウイルスゲノムの検出を行い、当該系が臨床検体をもちいても実施可能なことを証明した。さらに、ブラジル由来の患者血清を当該系で解析し、チクングニアウイルスおよび黄熱ウイルスの検出も可能であることを実証した。

4) 研究の継続および今後の発展

上記の成果に基づき JSPS 拠点形成事業 (Core-to-Core program) へ応募した課題「網羅的核酸分析に基づく新規感染症診断方法の社会実装に向けた研究交流体制の確立」が採択された。当該事業のサポートを受け、本件で確立した系の社会実装を図る。



(途上国・病院・空港 etc.)
 遺伝子型の迅速判定・どこでもシーケンス系の確立に成功

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

- Salim B et al., Development and validation of direct dry loop mediated isothermal amplification for diagnosis of *Trypanosoma evansi*., *Vet Parasitol.* 2018 Aug 30;260:53-57. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.08.009. [査読あり]
- Sivakumar T et al., Genetic Analysis of *Babesia* Isolates from Cattle with Clinical Babesiosis in Sri Lanka., *J Clin Microbiol.* 2018 Oct 25;56(11). pii: e00895-18. doi: 10.1128/JCM.00895-18. [査読あり]
- Runtuwene LR et al., Nanopore sequencing of drug-resistance-associated genes in malaria parasites, *Plasmodium falciparum*., *Sci Rep.* 2018 May 29;8(1):8286. doi: 10.1038/s41598-018-26334-3. [査読あり]
- Imai K et al., An innovative diagnostic technology for the codon mutation C580Y in kelch13 of *Plasmodium falciparum* with MinION nanopore sequencer., *Malar J.* 2018 May 29;17(1):217. doi: 10.1186/s12936-018-2362-x. [査読あり]
- Imai K et al., A novel diagnostic method for malaria using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and MinION nanopore sequencer., *BMC Infect Dis.* 2017 Sep 13;17(1):621. doi: 10.1186/s12879-017-2718-9. [査読あり]
- Yamagishi J et al., Serotyping dengue virus with isothermal amplification and a portable sequencer., *Sci Rep.* 2017 Jun 14;7(1):3510. doi: 10.1038/s41598-017-03734-5. [査読あり]
- Tarumoto N et al., Use of the Oxford Nanopore MinION sequencer for MLST genotyping of vancomycin-resistant enterococci., *J Hosp Infect.* 2017 Jul;96(3):296-298. doi: 10.1016/j.jhin.2017.02.020. [査読あり]
- Reteng P et al., Genetic polymorphisms in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance genes, *pfprt* and *pfmdr1*, in North Sulawesi, Indonesia., *BMC Res Notes.* 2017 Apr 4;10(1):147. doi: 10.1186/s13104-017-2468-1. [査読あり]
- Yamagishi J et al., Comparison of Boiling and Robotics Automation Method in DNA Extraction for Metagenomic Sequencing of Human Oral Microbes., *PLoS One.* 2016 Apr 22;11(4):e0154389. doi: 10.1371/journal.pone.0154389. [査読あり]
- Sato Y et al., Inter-Individual Differences in the Oral Bacteriome Are Greater than Intra-Day Fluctuations in Individuals., *PLoS One.* 2015 Jun 29;10(6):e0131607. doi: 10.1371/journal.pone.0131607. [査読あり]
- Jakalski M et al., DB-AT: a 2015 update to the Full-parasites database brings a multitude of new transcriptomic data for apicomplexan parasites., *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan;43(Database issue):D631-6. doi: 10.1093/nar/gku1240. [査読あり]

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計1件)

山岸潤也他, どこでも 誰でも より長く ナノポアシーケンサーが研究の常識を変える!、*実験医学* 2018年1月号 Vol.36 No.1 p27-p31 羊土社 査読無

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特記事項無し

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 鈴木 穰

ローマ字氏名: Suzuki Yutaka

所属研究機関名: 東京大学

部局名: 新領域創成科学研究科

職名: 教授

研究者番号(8桁): 40323646

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。