

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293205

研究課題名(和文)次世代遺伝子解析による新型脳炎の原因究明及び神経感染症診断システムの構築

研究課題名(英文)A useful approach for genetic diagnosis of infectious agents using next generation sequencing

研究代表者

高嶋 博(Hiroshi, Takashima)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：80372803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、未知の感染症(慢性脳炎)の疾患概念の確立と病原菌の同定を試みた。40-70歳代の進行性認知症4例に特殊な慢性脳脊髄炎を認め、Grocott染色陽性の病原体を確認した。病原体を含む領域に絞り、レーザーマイクロダイセクターを用いて組織を取り出した。その菌を含む組織からDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて、2症例について遺伝子配列を決定した。DNAを種別に分類した結果をもとに検索した結果、検索した2例において全く同じ種の菌を同定し、古細菌に属するHalobacterium属であった。世界で初めての古細菌によるヒト疾患の存在が確認された。

研究成果の概要(英文)：Background During a 7-year period, we experienced four patients with slowly progressive encephalomyelitis in the same geographical area. Brain biopsy showed histological changes characteristic of non-viral encephalitis. We reported the clinical features of this encephalitis and the morphology of the microbe identified in brain biopsies with its molecular analysis.
Methods We extensively investigated four patients with unknown subacute/chronic dementia. Affected brain tissues were analyzed histopathologically, and DNA sequences of the responsible pathogen were detected using brain biopsy tissues.
Findings Histopathology of biopsied brain tissue revealed a microorganism was observed around the vessels in all patients. Ultrastructural analysis of this microorganism revealed the lack of a cell wall. Based on the morphology of the pathogen, we hypothesized that it belonged to Archaea. Next-generation sequencing (NGS) identified sequences were homologous to Halobacteriaceae.

研究分野：Neurology

キーワード：新規感染症 古細菌 感染症遺伝子診断 脳炎 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

原因不明の感染症の菌種を同定することは感染症治療の第一歩であるが、実際には原因がわからないことも多い。培養ができる場合はよいが、培養不可能な細菌や、ウイルス、または未知の生命体である可能性もある。そのような中で、次世代シーケンサーを用いて、大規模なゲノム解析から菌種を同定するシステムの開発を行い、そのシステムを用いて、はじめに南九州地域に発生した認知症の原因究明を行った。

我々は、南九州地域において中年期および老年期に発症した4例の慢性脳炎を診療したが、これらの患者の臨床的特徴は2ヶ月から2年をかけて緩徐に進行する脳炎で、高次機能障害を中心として進行し、より重くなると運動障害も認め、舌の不随意運動を呈する特徴がある。本症の特徴について臨床的に追求し、疾患概念を確立し、起因菌の同定を試みた。

2. 研究の目的

最新の次世代シーケンサーを用いた感染症のDNA診断システムを構築し、未知の感染症(慢性脳炎)の確立と病原菌の同定を行う。

3. 研究の方法

1) 新型脳炎の疾患概念の確立(平成25年度)

患者は、40 - 70歳代の進行性認知症4例に特殊な慢性脳脊髄炎を確認し、病理学的にこれまで経験のないGrocott染色陽性の病原体を確認した。その病原体は、2-5ミクロンの細胞壁の無い円形であり、これまで病原性が確認されているどの菌とも類似していない。患者4例とも同一地域に居住し、地域的な感染が疑われ、これまでの範疇を超えた新しい病原菌を推定している。これまでの既存の方法では菌が検出不可

であり、より高感度な手法を模索するため次世代シーケンサーを用いて病原菌の検出を行う。

2) 次世代シーケンサーによる起因菌同定システムの構築

本研究では、全く未知の病原体の原因を明らかにするため、直接的な方法として、DNA配列から起因菌の同定を試みる。病原体は一般的には16s, 18s rRNA(rDNA)の配列により分類されているため、共通領域のプライマーを設定し、PCR法で増幅し同定する方法が行われているが、感度が必ずしも高いとは言えない。実際我々は、新規の脳炎患者の脳、髄液、血液から取り出したDNAを用い、細菌、真菌、原虫、リケッチア、マイコプラズマなどそれぞれについて、既存のPCR法でrRNAを検出する。さらに我々は、次世代シーケンサーが1つ1つのDNA断片の配列を200から500塩基長で10万から6.6億リード読むことが出来ることを利用し、おのおのの検査検体に含まれるDNA配列を検出し、ヒトのDNA配列を除くことで、候補菌のDNAを決定する。公共のデータベースとの比較で起因菌をDNA配列から同定可能と考えられる。

上記の方法で南九州地域の新規の脳炎の起因菌の検出を行い、その後様々な感染症のDNA診断をするための解析パイプラインを構築する。その後、我々は、開発した方法で感染症の診断を実践し、実際にこれまでのPCR法をベースとした方法よりも高感度で、正確に、迅速に起因菌を同定出来るのか検討する。

4. 研究成果

症例提示

発端となった症例は47歳男性。受診の3ヶ月前から過食がみられ、翌月には時間や場所を認識できなくなった。さらに自発的な発言や行動も減少し仕事ができなくなり、

前医ではアルツハイマー型認知症と診断され塩酸ドネペジルを処方されたが効果なく、当科に入院した。特記すべき既往歴はなかった。長谷川式認知症スケールは9点で、おもに失見当識、記憶障害、失算が目立った。舌の不随意運動と四肢ミオクローヌスをみとめ、四肢腱反射は亢進、両側の把握反射、口尖らせ反射、Babinski 反射とChaddock 反射を両側にみとめたが、歩行は正常だった。異常感覚はなく、頻尿と残尿感をみとめた。髄液検査で蛋白上昇、細胞増多をみとめ、頭部 MRI の FLAIR 画像で、橋背側、両側島皮質、側頭葉内側の皮質下白質に異常高信号を確認したが、血清学的に既知の自己免疫疾患や感染症はすべて陰性であった。感染症や自己免疫性脳炎を想定してセフトリアキソン、ストレプトマイシン、メチルプレドニゾロン、免疫グロブリン大量療法 (IVIg) を実施して一時的に症状の改善を得たが、かえって頭部 MRI 上は病巣が拡大し、特に側頭葉病変が顕著となった。舌の不随意運動を伴う認知症から、当時は Whipple 病を鑑別にあげて十二指腸生検を行ったが異常なく、脳生検を実施することになった。脳病理所見の詳細は「病理学的検討」で後述するが、核や細胞壁をもたない原核生物による感染性脳炎ととらえ、ST 合剤 12g/日とプレドニゾロンの組み合わせによる治療を試みた。治療後には見当識、記憶、意欲、計算に改善がみられ、髄液所見は正常となり、MRI の異常高信号も軽減した。7 年後、内服薬の漸減中に記憶障害が増悪したが、ST 合剤を 8g/日に増量して改善した。

臨床的特徴

年齢は 47 歳から 70 歳。南九州のある地域、半径数 10km 圏内に居住し、4 例の患者はすべて免疫抑制状態ではなかった。全例に進行性の認知障害と舌の不随意運動が確認され、発症 1 年以内に錐体路症状、パーキンソニズム、小脳失調症状などの運動合併症を伴っていた。これらの症状経過は Whipple 病に類似しているが、Whipple 病の病初期にみられる体重減少、下痢、関節痛などは、本研究対象患者にはみとめていない。全例にリンパ球主体の髄液細胞増多があり、さらに髄液中の CXCL13 が著高していた。頭部 MRI は脳幹病変、基底核の散在性病変、びまん性の深部白質病変、脳表病変など症例ごとに多様な異常を示すなか、側頭葉内側病変は全例に共通していた。さらに症例 2 は脊髄にも散在性病変が確認された。

病理学的検討

4 症例すべてに脳の病理学的検討を行った。HE 染色では血管周囲に多数のリンパ球が存在し、CD8 陽性リンパ球が主体で、ほ

かに CD4 陽性リンパ球や CD68 陽性マクロファージも散在していた。MRI 所見と同じように病理上も皮質下に炎症が目立ち、症例 3 では一部に microabscess の形成をみとめ、さらにクモ膜下腔にも炎症細胞の浸潤が確認されたが、壊死、出血、脱髄、神経細胞侵食 (neuronophagia) はみとめなかった。Whipple 病を想定して実施した periodic acid-Schiff (PAS) 染色では、血管周囲の細胞外もしくはマクロファージ細胞質内に大小さまざまな球形の小体が確認され、Grocott 染色でも陽性を示した。グラム染色に異常なく、トキソプラズマ抗原に対する抗体反応も陰性だった。この円形の小体を電子顕微鏡で確認したところ、大きさは 2-7 μ m で球形もしくは卵形を呈し、細胞質内には膜構造をみとめるが、核膜や細胞壁を欠いていた。この小体はウイルスや細菌 (真正細菌) よりも明らかにサイズが大きく、核膜がみられない点で真核生物である真菌や原虫は否定され、既知のどの病原微生物とも形態学的に合致しないものだった。そこで「細胞壁のない菌」をキーワードに google による検索をしたところ、古細菌の一種であるサーモプラズマ属にその形態が酷似していたことから、血管周囲にみられた小体は古細菌に属する微生物であることが推定された。

遺伝子解析

病理学的検討でその存在が明らかになった謎の病原体の由来を遺伝子学的に証明することを試みた。まずは髄液や生検脳から DNA/RNA を抽出して、細菌、真菌、古細菌の 16S/18S rRNA 遺伝子の配列をターゲットにポリメラーゼ連鎖反応を試みたが検出に至らなかった。そこで症例 3 と症例 4 の生検脳から DNA/RNA を抽出し、次世代シーケンサーで解析したところ、それぞれ 1 本の古細菌である高度好塩菌に近似した配列を検出した。そこでより多くの遺伝子配列を検出するため、球形の小体が多く集簇している血管周囲領域をレーザーマイクロダイセクションで選択的に切り抜き、そこに含まれる微量の DNA を抽出して次世代シーケンサー (Miseq) を用いた網羅的な配列解読を行い、Blastn を利用して既存微生物の DNA 配列との相同性を調べた。その結果、各患者からそれぞれ 700 万または 30 万以上の DNA 断片配列を獲得し、このうちそれぞれ 130 と 126 の断片は高度好塩性古細菌に属するハロバクテリウム科の広い種にきわめて高い相同性を示した。対照として過去に脳生検が実施された乳頭状髄膜腫、血管内リンパ腫、および膠芽腫の脳組織からは、500 万以上もの DNA 断片を解読したにも関わらず、古細菌の配列はみられなかった。以上から、我々は病理学的検索でみられた

核や細胞壁のない病原体と思われる小体は高度好塩性古細菌の一種であり、ハロバクテリウム科に類縁の新しい種である可能性が高いと結論した。

治療と予後

治療はST合剤を最低でも1日6グラム以上の高容量、かつ中等量のコルチコステロイドの併用が最も効果的で、少なくとも年単位の投与期間が必要となる。アンピシリン、セフトリアキソン、ストレプトマイシン、ミノサイクリンは無効で、ST合剤も単独では十分な治療効果は得られず、コルチコステロイド単独投与はかえって症状やMRI画像を増悪させた。さらに、症例2と症例4はST合剤に伴う肝障害のために治療を一時中断、その後は1日2グラム以下の低用量で再開したものの、症例2は一部改善にとどまり症例4は病変の拡大を止められず不幸な転帰をたどった。この副作用の問題から今後はST合剤の代替薬も検討しなければならず、古細菌への有効性と髄液移行の点からメトロニダゾールが有用かもしれない。

今回発見した古細菌は、これまで直接ヒトの病気として認識されたことはないが、本研究によりそれが明らかになった。古細菌は、真核生物、細菌(真正細菌)と並んで全生物界を3分する生物グループのひとつで、その形態は真正細菌に近いものの、系統学的かつ生化学的には、真正細菌よりも真核生物に近い生物であることが知られている。通常、高塩濃度の環境、酸性の環境、温泉や海底熱水地帯、腐った沼地や動物の腸管内など特殊な環境に多く存在する。このような大きな生物分類の一つでありながら、古細菌を原因とする病気はこれまでに報告されていないことは、一つの不思議であったため、一つの新しい第一歩といえるであろう。本研究は進行性認知症の原因を明らかにし、いままで知られていない古細菌の病原性と、その治療の道を開いたが、4名の患者は互いに接触した形跡はなく独立に感染したものと考えているが、その後新しい患者の発生はなく、さらに半径数10km圏内にわずか4名の発症となると、比較的感染性の低いものと予想される。感染経路については証明に至っていないが、ヒトの口腔内や腸管上皮に好塩性古細菌がみられることが知られており、おそらくは経口感染と考えている。本当の病原性を証明するには培養するなど、さらなる検証が必要である。遺伝子解析から本研究の脳脊髄炎の病原菌が高度好塩性古細菌であると想定して、15%や20%の高度塩化ナトリウム培地を用いて凍結生検脳から菌の分離培養を試みたが未だに成功していない。その原因は、高度好塩性古細菌は強い細胞壁を持

っていないために外部からの物理的な傷害を受けやすく、凍結による氷の結晶により破壊されたものと推定される。培養以外にも、病原菌のゲノム配列の決定、診断を目的とした特異的プローブの作成、動物を用いた病原性の証明、患者血清中の抗体測定など課題は多い。今後の検証のために、病原菌の単離培養が必要であり、培養を成功させることが急務である。

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2件)

崎山佑介、神田直昭、出雲周二、高嶋 博 人類初の古細菌による感染症 認知症や運動障害を呈する新しい脳脊髄炎の発見 Neuroinfection 2016 (査読有)

Sakiyama Y, Kanda N, Higuchi Y, et al: New type of encephalomyelitis responsive to trimethoprim/sulfamethoxazole treatment in Japan. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2:e143, 2015 (査読有)

[学会発表](計4件)

発表者名: Yusuke Sakiyama, Naoaki Kanda, Junhui Yuan, Michiyoshi Yoshimura, Hitoshi Arata, Shuji Izumo, and Hiroshi Takashima First Archaeal Infection in Human Brain: a new type of chronic encephalomyelitis

学会等名 第57回日本神経学会総会

年月日 2016年5月18-21日

発表場所 神戸国債会議場(兵庫県神戸市)

発表者名: 高嶋 博、崎山佑介、出雲周二 人類初の古細菌による感染症 認知症や運動障害を呈する新しい脳脊髄炎の発見

学会等名 第20回日本神経感染症学会

年月日 2015年10月22-23日

発表場所 メルパルク長野(長野県長野市)

発表者名: Y. Sakiyama, Y. Higuchi, H. Tanabe, J. Yuan, S. Nozuma, A. Yoshimura, A. Hashiguchi, Y. Okamoto, R. Hirano, E. Matsuura, R. Okubo, T. Iwasaki, F. Matsuda, S. Izumo, H. Takashima.

A useful approach for genetic diagnosis of infectious agents using next generation sequencing 2013

学会等名 The 63th Annual meeting of the American society of human genetics Annual meeting 2013

発表場所 Boston, U.S.A.

年月日 20131022-20131026

発表者名：崎山佑介、神田直昭、樋口雄二郎、高田良治、渡邊修、袁軍輝、荒田仁、野妻智嗣、道園久美子、東桂子、橋口昭大、平野隆城、松浦英治、大窪隆一、樋口逸郎、岩崎琢也、出雲周二、高嶋 博
ST 合剤が奏功した新しい感染性脳炎の原因究明
学会等名第 54 回日本神経学会総会
発表場所東京国際フォーラム（東京都千代田区）
年月日 2013 年 5 月 29 日-6 月 1 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 3 件)

名称：抗菌剤を含む医薬組成物
発明者：高嶋 博、 出雲周二
権利者：国立大学法人 鹿児島大学
種類：
番号：2013-032631
出願年月日：2013/02/21
国内外の別： 国内

名称：抗菌剤を含む医薬組成物
発明者：高嶋 博、 出雲周二
権利者：国立大学法人 鹿児島大学
種類：PTC
番号：2015-501434
出願年月日：2014/02/14
国内外の別： 国外

名称：抗菌剤を含む医薬組成物
発明者：高嶋 博、 出雲周二
権利者：国立大学法人 鹿児島大学
種類：USA
番号：14/769220
出願年月日：2015/08/21
国内外の別： 国外

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高嶋 博(TAKASHIMA HIROSHI) 鹿児島大学,
医歯(薬)学総合研究科, 教授
研究者番号：(80372803)

(2) 研究分担者 松浦 英治(MATSUURA EIJI)

鹿児島大学, 医歯(薬)学総合研究科, 講師

研究者番号：(30598800)