

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 感染症研究国際展開戦略プログラム (J-GRID)
(英語) Japan Initiative for Global Research Network on Infectious Diseases

研究開発課題名： (日本語) 迅速・正確な感染症診断を可能にする病原微生物同定システムの開発
(英語) Development of the rapid and accurate diagnostic system for infectious diseases

研究開発担当者 (日本語) 今西 規
所属 役職 氏名： (英語) Professor Tadashi Imanishi
Dept. of Molecular Life Science
Tokai Univ. Schl. Medicine

実施期間： 平成 27 年 10 月 15 日 ～ 平成 30 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 定量的 16SrRNA 解析
開発課題名： (英語) Quantitative 16S rRNA analysis

研究開発分担者 (日本語) 井上 茂亮
所属 役職 氏名： (英語) Associate Professor Shigeaki Inoue
Dept. of Emergency and Critical Care Medicine,
Tokai Univ. Schl. Medicine

分担研究 (日本語) 高速ゲノム配列解析
開発課題名： (英語) Rapid genome sequencing

研究開発分担者 (日本語) 浅野 浩一郎
所属 役職 氏名： (英語) Professor Koichiro Asano
Division of Pulmonary Medicine, Dept. of Medicine,
Tokai Univ. Schl. Medicine

II. 成果の概要（総括研究報告）

本課題は「定量的 16S rRNA 解析」、「高速ゲノム配列解析」、「解析ソフト開発」の3つの研究開発項目を立て、並行して研究を進めた。平成 28 年度の実績としては、「定量的 16S rRNA 解析」についてはランダム DNA バーコードを用いた PCR および次世代シーケンサ解析を実施し、その結果を集計する計算機プログラムの開発も行った。その結果 DNA の定量に成功したが、さらに改良が必要な点も明らかになった。「高速ゲノム配列解析」については、次世代シーケンサを用いた感染微生物の検出に最適なサンプル調製プロトコルの作成と、臨床サンプルを対象とした実際のシーケンシングを多数実施した。その結果、膿胸の感染菌に関する新発見があった。「解析ソフト開発」については、ナノポア・シーケンサからの出力をリアルタイムに計算機解析するソフトウェアを整備し、精製後の DNA から 2 時間以内で感染菌を特定できる病原微生物同定システムを整備することに成功した。以下に、それぞれの研究開発項目の研究開発の実績をまとめる。

「定量的 16S rRNA 解析」

7 種の菌を等量ずつ混合した人工サンプルに対する定量的 16S rRNA 解析のため、試験的なシーケンシングと計算機解析のパイプライン構築を行った。28 塩基のランダム DNA バーコードを 16S rDNA 用 PCR プライマーに連結し、増幅した PCR 産物を MiSeq でシーケンシングした。得られた配列データの詳細な計算機解析によって DNA 分子のコピー数の推定に成功したが、菌種の正答率がやや低く、その比率も正解とはやや異なることから、改良すべき点も浮かび上がった。

「高速ゲノム配列解析」

敗血症に関しては、20 検体の血液由来 DNA から 16S rRNA 領域の PCR アンプリコン作成し、IonPGM で解析を行い血液培養の結果との相関を調べた。その結果、血液培養で検出された菌(種レベル)は、11 検体中 7 検体で全リード中 0.5% から最大 12% の範囲で検出された。一方、血液培養では陰性であった 3 検体からも *Corynebacterium callunae* などの敗血症の原因菌が突出して検出され、本法の感染菌検出の有効性が示唆された。また、重症肺炎に関しては、膿胸 8 症例より採取した胸水を低速遠心後、上清から DNA を抽出し、その全 DNA あるいは細菌 16S rRNA 遺伝子領域の PCR 増幅産物を用い、IonPGM で DNA 塩基配列を決定した。これにより、生化学的手法では従来同定不能であった *Campylobacter curvus* を膿胸の原因菌として初めて検出するなどの成果が得られた。以上より、この手法は真の原因菌同定に有用と考えられた。

「解析ソフト開発」

計算機解析における短時間での微生物種の判定を実現するため、独自の GenomeSync データベースから各生物分類群の代表的生物を抽出した代表配列データベースを新たに作成し、BLAST および Centrifuge で使用できるようにした。このデータベースと解析ソフトウェアの性能評価を実施した。また、2 台の高性能ラップトップ PC と MinION シーケンサで構成される病原微生物同定システムを作り、上記のソフトウェア群をインストールして、これを用いたシステムの運用試験を実施した。その結果、サンプルに含まれる微生物 DNA の種を 2 時間以内に同定できることを確認した。

This research project is composed of three research items: (1) Quantitative 16S rRNA analysis, (2) Rapid genome sequencing, and (3) Software development, which we conducted in parallel. In the Heisei 28th fiscal year, we conducted the following research. About "Quantitative 16S rRNA analysis", we made trials of quantitative 16S rRNA analysis using random DNA barcodes and next-generation sequencer. We also developed software required for counting the numbers of DNA molecules. As a result, we could successfully quantify DNAs from bacteria, but it appeared that there is room for further improvements. About "Rapid genome sequencing", we developed an optimum protocol for sample preparations for detecting infectious bacteria using next-generation sequencers. Using the protocol, we carried out bacterial identification for various clinical samples. As a result, we made a new discovery about causal bacteria of empyema from a severe pneumonia patient. About "Software development", we developed software for analyzing outputs from nanopore-based DNA sequencer in a real-time manner. Using the software, we could successfully set up an original bacterial identification system that can identify bacteria contained in a sample within two hours after DNA extraction. More details are below.

(1) Quantitative 16S rRNA analysis: To conduct quantitative 16S rRNA analysis with a mixture of DNA extracted from seven different bacteria, we made trials of DNA sequencing and developed a pipeline of computational analysis. We ligated random DNA barcodes of 28 bases to PCR primers for 16S rRNA genes, amplified the gene segments with these primers, and determined nucleotide sequences of PCR amplicons using MiSeq. By a detailed computational analysis of the sequence data, we could estimate the numbers of DNA molecules in the original sample. However, it appeared that there is room for further improvements, because the accuracy of bacterial species identified was low, and the estimated bacterial composition was not accurate enough.

(2) Rapid genome sequencing: Concerning sepsis, we collected blood samples from 20 patients, amplified the 16S rRNA gene region, and determined the DNA sequences by the IonPGM sequencer. Then, we examined the correlation between the sequencing results and the results of bacterial culture experiments. As a result, for 7 out of 11 samples, 0.5-12% of the total sequencing reads matched to bacteria identified by blood culture at the species level. On the other hand, for 3 other samples that showed negative results by bacterial culture, we could identify *Corynebacterium callunae* and other bacteria that are known causes of sepsis. These results indicate effectiveness of our method of bacterial identification. Concerning severe pneumonia, we collected empyema samples from 8 patients, extracted DNA from each of the samples, and determined DNA sequences of entire DNA or 16S rRNA genes by using IonPGM. As a result, we could identify *Campylobacter curvus* as a cause of empyema for the first time, which was not possible by conventional methods. From the above, we conclude that our method is applicable to identification of causal bacteria for these infectious diseases.

(3) Software development: To realize quick judgement of bacterial species by computers, we developed a new database of genome sequences of representative species by extracting representative data from our original GenomeSync database, and reformatted it to the BLAST and Centrifuge formats. Then, we evaluated the performance of the database and our analysis software. Furthermore, we developed a genome identification system that is composed of 2 high-spec laptop computers and a MinION sequencer, and installed the above software. Trials of the system successfully demonstrated its ability to identify bacteria contained in a sample within two hours after DNA extraction.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 5件、国際誌 11件）

1. Mitsuhashi S, Kryukov K, Nakagawa S, Takeuchi JS, Shiraiishi Y, Asano K and Imanishi T*. A portable system for metagenomic analyses using nanopore-based sequencer and laptop computers can realize rapid on-site determination of bacterial compositions. *BioRxiv*. 2017, 101865.
2. Kryukov K and Imanishi T*. Human contamination in public genome assemblies. *PLoS One*. 2016, 11(9): e0162424.
3. Shimada MK, Sanbonmatsu R, Yamaguchi-Kabata Y, Yamasaki C, Suzuki Y, Chakraborty R, Gojobori T and Imanishi T. Selection pressure on human STR loci and its relevance in repeat expansion disease. *Molecular Genetics and Genomics*. 2016, 291(5): 1851–69.
4. 浅野浩一郎. 喘息における吸入ステロイド薬治療 –ピットフォールと限界-. 臨床呼吸生理. 2016, 48:11-14.
5. 浅野浩一郎. 自然リンパ球 アレルギー-疾患のすべて. 日本医師会雑誌. 2016, 145:S36-S37.
6. 浅野浩一郎. 経皮感作と喘息. 日本小児アレルギー学会誌. 2016, 30:184-189.
7. 松坂雅子, 浅野浩一郎. 気管支喘息とバイオマーカー Annual Review 2016 呼吸器 永井厚志、巽浩一郎、桑野和善、高橋和久編集, 中外医学社. 2016, p92-97.
8. 浅野浩一郎. 気管支喘息 モノクローナル抗体 呼吸器疾患 –最新の薬物療法- 2. 感染症・免疫アレルギー・びまん性肺疾患ほか 川名明彦、江口研二編集. 克誠堂出版. 2017, p102-107.
9. Haraguchi M, Nakamura H, Sasaki M, Miyazaki M, Chubachi S, Takahashi S, Asano K, Jones P, Betsuyaku T, K-CCR Group. Determinants of chronic obstructive pulmonary disease severity in the late-elderly differ from those in younger patients. *BMC Res Notes*. 2016, 9:7.
10. Moro K, Kabata H, Tanabe M, Koga S, Takeno N, Mochizuki M, Fukunaga K, Asano K, Betsuyaku T, and Koyasu S. Interferon and IL-27 antagonize ILC2 function and type 2 innate immune responses. *Nat Immunol*. 2016, 17:76-86.
11. Chubachi S, Sato M, Kameyama N, Tsutsumi A, Sasaki M, Tateno H, Nakamura H, Asano K, Betsuyaku T, and the Keio COPD Comorbidity Research (K-CCR) Group. Identification of five clusters of comorbidities in Japanese COPD patients. *Respir Med*. 2016, 117:272-9.
12. Sato M, Chubachi S, Sasaki M, Haraguchi M, Kameyama N, Tsutsumi A, Takahashi S, Nakamura H, Asano K, Betsuyaku T, and the Keio COPD Comorbidity Research (K-CCR) Group. Impact of mild exacerbations on the symptom of COPD from a Japanese cohort. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016, 11:1269-78.
13. Nakajima T, Nakamura H, Owen C, Yoshida S, Tsuduki K, Chubachi S, Shirahata T, Mashimo S, Nakamura M, Takahashi S, Minematsu N, Tateno H, Fujishima S, Asano K, Celli B, Betsuyaku T. Plasma cathepsin S and cathepsin S/cystatin C ratios are potential biomarkers for COPD. *Dis Markers*. 2016, 2016:4093870.
14. Aoki T, Nagaoka T, Kobayashi N, Kurahashi M, Tsuji C, Takiguchi H, Tomomatsu K, Oguma T, Kobayashi N, Magatani K, Takeda S, Asano K, and Abe T. Prospective analyses of volatile organic compounds in obstructive sleep apnea patients. *Toxicol Sci*. 2017, 156: 362-374.
15. Takiguchi H, Hayama N, Oguma T, Harada K, Sato M, Horio Y, Tanaka J, Tomomatsu H, Tomomatsu K, Takihara T, Niimi K, Nakagawa T, Masuda R, Aoki T, Urano T, Iwazaki M, Asano K. Post-bronchoscopy pneumonia in patients suffering from lung cancer: Development and validation of a risk prediction score. *Respir Invest*. 2017, 55: 212-218.
16. Oguma T, Nagaoka T, Kurahashi M, Kobayashi N, Yamamori S, Tsuji C, Takiguchi H, Niimi K, Tomomatsu H, Tomomatsu K, Hayama N, Aoki T, Urano T, Magatani K, Takeda S, Abe T, Asano K.

Clinical contributions of exhaled volatile organic compounds in the diagnosis of lung cancer. *PLoS ONE*. 2017, 12(4): e0174802.

17. Oguma T, Taniguchi M, Shimoda T, Kamei K, Matsuse H, Hebisawa A, Takayanagi N, Konno S, Fukunaga K, Harada K, Tanaka J, Tomomatsu K, Asano K, Allergic bronchopulmonary aspergillosis in Japan: a nationwide survey, *Allergol. Int.* (in press),

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. A portable system for rapid resolution of bacterial composition using nanopore-based DNA sequencer. (第90回日本細菌学会総会), ポスター発表, 三橋里美, 今西規, 仙台国際センター, 2016/3/19-21, 国内.
2. Detecting human contamination in genome database. (Genome Evolution at Mishima), 口頭, Kirill Kryukov, 今西規, 国立遺伝学研究所, 2017/3/27-29, 国内.
3. Development of a next-generation sequencing-based method to detect bacterial DNA in human serum from sepsis and pneumonia patients. (The 8th congress of international federation of shock society), Poster presentation, Nobuo Watanabe, Meiko Takeshita, Junko Takeuchi, Yukiko Kirimura, So Nakagawa, Kirill Kryukov, Miho Sera, Satomi Mitsuhashi, Sadaki Inokuchi, Tadashi Imanishi, Shigeaki Inoue, 東京ドームホテル, 2016/10/5, 国内.
4. 教育講演 スキンケアと喘息 (第115回日本皮膚科学会総会), 口頭, 浅野浩一郎, 京都国際会館, 2016/6/4, 国内.
5. 重症喘息の最新治療 (日本内科学会関東支部第54回生涯教育講演会), 口頭, 浅野浩一郎, 日本都市センター, 2016/7/10, 国内.
6. 気道過敏性 (第55回臨床呼吸機能講習会 (日本呼吸器学会)), 口頭, 浅野浩一郎, 岡山コンベンションセンター, 2016/8/24-26, 国内.
7. COPDの治療と管理 (東京都健康づくり推進指導者育成研修会), 口頭, 浅野浩一郎, 東京都健康プラザハイジア, 2016/11, 国内.
8. シンポジウム「バリア機能とアレルギー」 経皮感作と喘息 (第3回日本アレルギー学会総合アレルギー講習会), 口頭, 浅野浩一郎, パシフィコ横浜, 2016/12/17-18, 国内.
9. Clinical phenotypes and molecular mechanisms of severe asthma. (121st Spring Congress of Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Diseases), Invited lecture, Koichiro Asano, Seoul, 2016/4/16, 国外.
10. Joint ATS/ERS/JRS symposium on severe asthma. Severe Asthma: Lessons Learned from Global Studies. (ATS2016 American Thoracic Society International Conference), Symposium, Koichiro Asano, Moscone Center San Francisco, 2016/5/15, 国外.
11. EAACI symposium: Key updates and emerging trends. Asthma-COPD overlap syndrome. (Joint congress of Asia Pacific Association of Allergy, Asthma, and Clinical Immunology (APAAACI) and Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiratory, and Immunology (APAPARI) 2016), Symposium, Koichiro Asano, Shangri-La Hotel Kuala Lumpur, 2016/10/18, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし