

課題番号 : 26指103

研究課題名 : 次世代シーケンサを活用した結核菌等の薬剤耐性菌の高度・迅速検査法の開発と臨床応用

主任研究者名 : 秋山 徹

分担研究者名 : 切替 照雄

キーワード : 結核菌、全ゲノム配列、次世代シーケンサ、オンライン解析システム、分子疫学、ゲノム疫学、ネットワーク構築

研究成果 :

研究目的: 結核菌は世界最大規模の感染症であり、さらに抗菌剤がほとんど奏功しない多剤耐性菌の出現が問題となっている。結核菌の疫学的検査や薬剤耐性検査は PCR や培養などの労力を要する手法で実施されている。これらの検査の基盤はすべて結核菌の持つ遺伝子情報であり、結核菌全ゲノム情報取得により、理論的にはそれらを網羅的に解析可能である。次世代シーケンサの出現は結核菌全ゲノム情報の短時間で安価な入手を可能とした。筆者等は国内随一の次世代シーケンサによる病原体ゲノム解析の実績を有しており、既に数百に及ぶ結核菌などの臨床分離株の全ゲノム解析を実施している。これらの実績を元に、これまで個別実施されていた結核菌の薬剤耐性・疫学検査を、次世代シーケンサによる解析に包括的に置き換える基盤を開発する。結核の専門家はもとより、それ以外の研究者なども、次世代シーケンサのデータのみで、結核菌の薬剤耐性情報と疫学情報を取得可能とし、さらに従来では事実上不可能だった SNP レベルでの比較を行う高精細な結核菌型別を可能とする Web サービスを構築し、一般公開する。本研究では、一般公開されたサービスの有用性を検証するため、地方衛研と協力して、地方衛研に保有される結核菌株の詳細な疫学解析を行う。

必要性: 結核菌治療の根幹である抗結核薬投与には、標的株の薬剤耐性情報獲得が必須である。これらの情報は従来、培養や PCR などの労力や時間を要する手法で個別実施されてきた。次世代シーケンサのデータによりこれらの情報を統合的に扱える基盤が構築可能である。次世代シーケンサにより、従来の疫学解析では検討不可能だった、接触感染事例など類似性の高い菌株同士の関係を解析することも可能となる。そのため、本計画で構築される結核解析基盤は、高精度でより迅速な結核菌治療開始に極めて有用であり必須の基盤となる。これらの基盤を誰でも利用可能とするため、結核菌が収集されている地方衛研と協力して、保有株の詳細な疫学解析を行うことは、結核の全体像を把握するために極めて重要である。

期待される成果: 本計画で構築される基盤は、結核菌臨床分離株のゲノム解析による薬剤耐性検出と疫学的情報を包括的に取得するための、検体採取からデータ出力までの徹底的に最適化されたワークフローを提供する。バイオインフォマティクスなどの高度な知識なしで利用可能な結核用 Web サーバーは、これまで存在しないため、結核菌の臨床と研究の両面に大きく貢献する。本研究では結核菌が収集されている地方衛研のネットワークを構築することで日本の結核の基本的な疫学情報が高精細に解明される。結核治療では薬剤耐性状況の把握が必須であり、その判定は従来、培養法または PCR 法で実施されてきた。両者は時間や労力を要し、また個別薬剤や項目ごとに実施する必要があった。従来の結核の疫学解析は、大まかな菌の系統は把握可能であるが、集団感染事例など、元来、菌株同士が密接な関係にある事例を解析するのに足る解像力を持った系統解析法は、近年ようやく現実のものとなった全ゲノム配列解析を利用した SNP レベルの解析のみである。近年では、薬剤耐性になりやすい結核菌系統が報告されており、結核菌全体の疫学的動向を常に監視し、多剤耐性結核の出現などをモニターする必要がある。結核菌の薬剤耐性、疫学情報はすべて固有の遺伝子情報に基づいているため、対象菌株の全ゲノム解析により、理論的にはこれらの情報を取得可能である。本研究では、自動

化解析サーバーにより、これまで煩雑な手段で実施されてきた結核菌の薬剤耐性情報や疫学情報を誰でも簡単に解析可能とする。

研究成果：結核菌の疫学的検査や薬剤耐性検査は PCR や培養などの労力を要する手法で実施されている。これらの検査の基盤はすべて結核菌の持つ遺伝子情報であり、結核菌全ゲノム情報取得により、理論的にはそれらを網羅的に解析可能である。次世代シーケンサの出現は結核菌全ゲノム情報の短時間で安価な入手を可能とした。筆者等は国内随一の次世代シーケンサによる病原体ゲノム解析の実績を有しており、既に数百に及ぶ結核菌などの臨床分離株の全ゲノム解析を実施している。本研究では、構築される結核菌の自動解析 Web サービスについて、地方衛生研究所などと協力して、結核菌全ゲノム配列の次世代シーケンサによる解析を、ノウハウを有する当センターで実施し、臨床分離株を中心に解析支援を行うスキームを構築することで、構築されたサーバーの効率的運用を促進し、新規の高度感染症診断技術の均てん化を図った。地方衛研との共同研究で、過去数年間の分離菌株すべてについて、全ゲノム配列を解析し、各菌株の疫学的背景を明らかにすることで、当該地域における、結核菌の伝搬状況を分子レベルで初めて明らかにすることができた。加えて、当該地域で発生した、集団感染疑い事例について、全ゲノム解析により、実際にそれらの症例が集団感染であることを分子レベルで確認した。

これまで個別実施されていた結核菌の薬剤耐性・疫学検査を、次世代シーケンサによる解析に包括的に置き換える基盤を開発した。結核の専門家はもとより、それ以外の研究者なども、次世代シーケンサのデータのみで、結核菌の薬剤耐性情報と疫学情報（一般的に知られるものとしてスポリゴタイピング、VNTR、Beijing 型別など）を取得可能とし、さらに従来では事実上不可能だった SNP レベルでの比較を行う高精細な結核菌型別を可能とする Web サービスを構築し、一般公開した。当該ホームページは国立国際医療研究センターホームページから直接アクセス可能である (<http://castb.ri.ncgm.go.jp/CASTB/>)。これらの基盤となった基礎的研究情報について、以下の論文（査読有り）を発表した。

Construction of a virtual *Mycobacterium tuberculosis* consensus genome and its application to data from a next generation sequencer. Okumura K, Kato M, Kirikae T, Kayano M, Miyoshi-Akiyama T. BMC Genomics. 2015 Mar 20;16:218. doi: 10.1186/s12864-015-1368-9.

Subject No. : 26A103

Title : Development and translational research for precise and rapid analyses for drug resistance pathogens including Mycobacterium tuberculosis complex based on next generation sequencing.

Researchers : Tohru Miyoshi-Akiyama and Teruo Kirikae

Key word : Mycobacterium tuberculosis, whole genome sequence, next generation sequencer, online analysis, molecular epidemiology, genome epidemiology, network establishment

Abstract :

BACKGROUND: Although Mycobacterium tuberculosis isolates are consisted of several different lineages and the epidemiology analyses are usually assessed relative to a particular reference genome, M. tuberculosis H37Rv, which might introduce some biased results. Those analyses are essentially based genome sequence information of M. tuberculosis and could be performed in silico in theory, with whole genome sequence (WGS) data available in the databases and obtained by next generation sequencers (NGSs). As an approach to establish higher resolution methods for such analyses, whole genome sequences of the M. tuberculosis complexes (MTBCs) strains available on databases were aligned to construct virtual reference genome sequences called the consensus sequence (CS), and evaluated its feasibility in in silico epidemiological analyses.

RESULTS: The consensus sequence (CS) was successfully constructed and utilized to perform phylogenetic analysis, evaluation of read mapping efficacy, which is crucial for detecting single nucleotide polymorphisms (SNPs), and various MTBC typing methods virtually including spoligotyping, VNTR, Long sequence polymorphism and Beijing typing. SNPs detected based on CS, in comparison with H37Rv, were utilized in concatemer-based phylogenetic analysis to determine their reliability relative to a phylogenetic tree based on whole genome alignment as the gold standard. Statistical comparison of phylogenic trees based on CS with that of H37Rv indicated the former showed always better results than that of later. SNP detection and concatenation with CS was advantageous because the frequency of crucial SNPs distinguishing among strain lineages was higher than those of H37Rv. The number of SNPs detected was lower with the consensus than with the H37Rv sequence, resulting in a significant reduction in

Researchers には、分担研究者を記載する。

computational time. Performance of each virtual typing was satisfactory and accorded with those published when those are available.

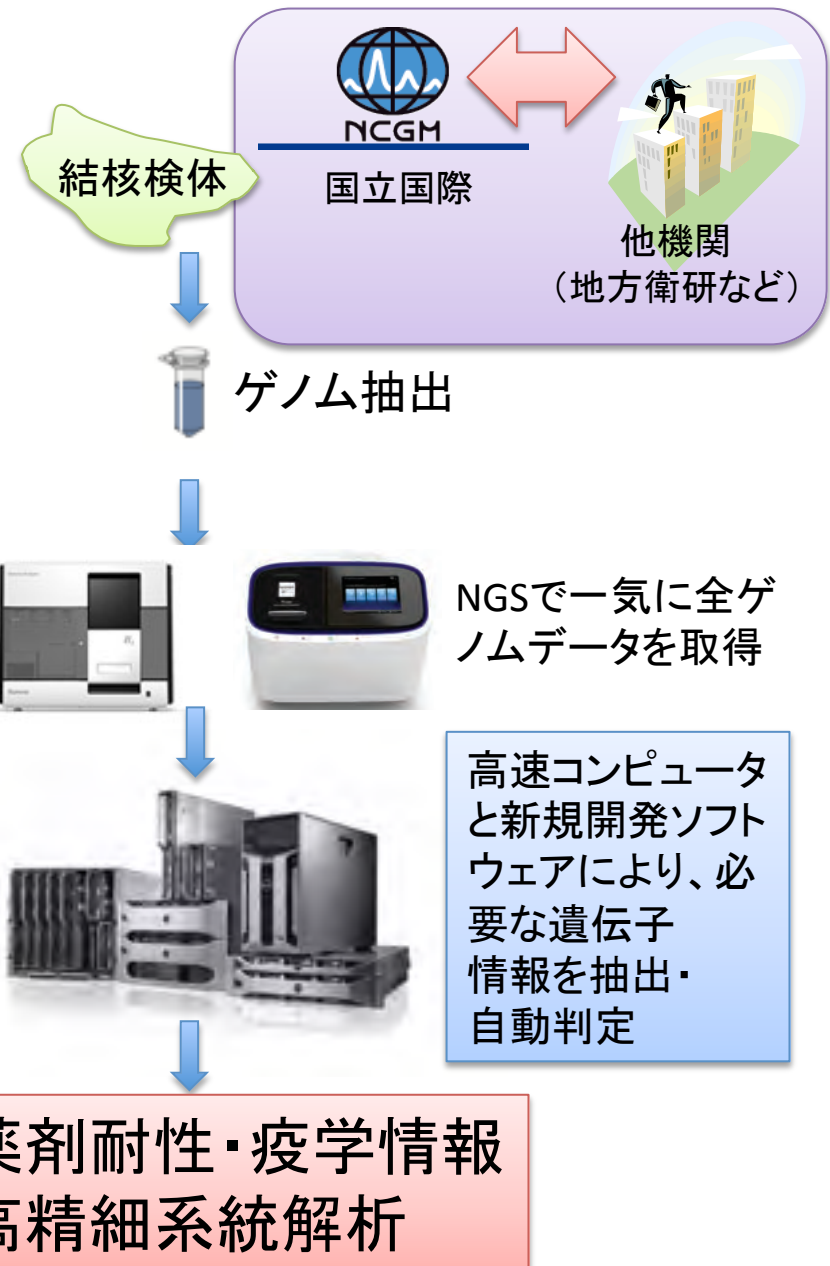
CONCLUSIONS: These results indicated that virtual CS constructed from genome sequence data is an ideal approach as a reference for MTBC studies.

結核菌等の病原体の全ゲノム情報解析サーバー

・結核菌の薬剤耐性・疫学情報を、次世代シーケンサ(NGS)による全ゲノム解析に基づき、自動判定するソフトウェアとコンピュータを構築し、対外的な解析サービスを提供する。

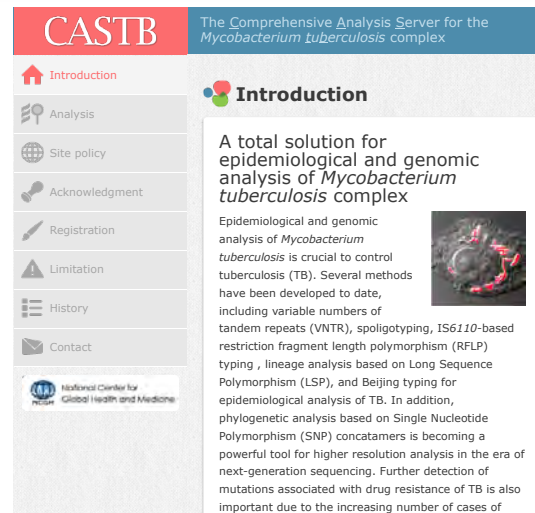
特徴

- ・NGSデータに基づく結核菌の薬剤耐性・疫学情報解析の自動化サービスを提供
- ・NGSデータさえあれば、**専門家でなくとも**詳細な結核菌解析が可能。
- ・現時点で類似サービスは存在しない
- ・NGSデータ取得のためのNCGMを中心とした地方衛研などの**機関ネットワーク**を構築



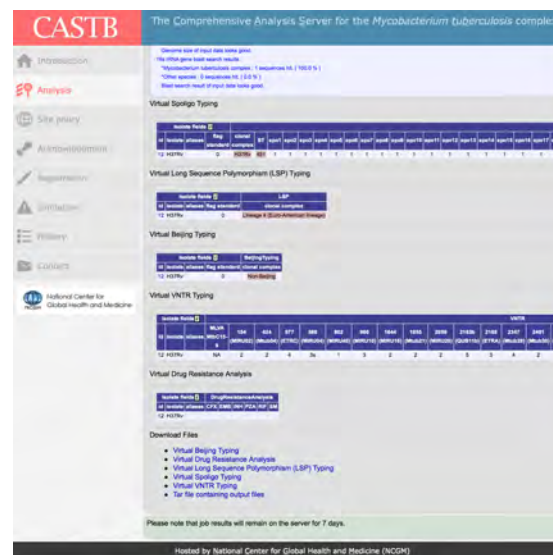
薬剤耐性・疫学情報
高精細系統解析

結核菌ゲノムオンライン包括解析システム「CASTB」



次世代シーケンサーのデータをもとに、誰でも簡単に結核菌の**包括的な分子疫学解析・薬剤耐性予測**・(従来では不可能だった)**精細な系統解析**が可能なオンライン解析システムを構築した。すでに本年1月に公開済みであり、センター病院や地方衛研の菌株データを**中心に登録された結核菌株は300株以上**である。

本システムは毎日新聞の記事でも取り上げられた。



CASTBの公開済みホームページと解析画面
(公開済みホームページはNCGMトップページからリンクされていて簡単にアクセスできます)

課題番号 : 26指103

研究課題名 : 次世代シーケンサを活用した結核菌等の薬剤耐性菌の高度・迅速検査法の Web サービス開発

主任研究者名 : 秋山 徹

分担研究者名 : 秋山 徹

キーワード : 結核菌、全ゲノム配列、次世代シーケンサ、オンライン解析システム

研究成果 :

研究目的: 結核菌は世界最大規模の感染症であり、さらに抗菌剤がほとんど奏功しない多剤耐性菌の出現が問題となっている。結核菌の疫学的検査や薬剤耐性検査は PCR や培養などの労力を要する手法で実施されている。これらの検査の基盤はすべて結核菌の持つ遺伝子情報であり、結核菌全ゲノム情報取得により、理論的にはそれらを網羅的に解析可能である。次世代シーケンサの出現は結核菌全ゲノム情報の短時間で安価な入手を可能とした。筆者等は国内随一の次世代シーケンサによる病原体ゲノム解析の実績を有しており、既に数百に及ぶ結核菌などの臨床分離株の全ゲノム解析を実施している。これらの実績を元に、これまで個別実施されていた結核菌の薬剤耐性・疫学検査を、次世代シーケンサによる解析に包括的に置き換える基盤を開発する。結核の専門家はもとより、それ以外の研究者なども、次世代シーケンサのデータのみで、結核菌の薬剤耐性情報と疫学情報を取得可能とし、さらに従来では事実上不可能だった SNP レベルでの比較を行う高精細な結核菌型別を可能とする Web サービスを構築し、一般公開する。

研究結果: 結核菌の疫学的検査や薬剤耐性検査は PCR や培養などの労力を要する手法で実施されている。これらの検査の基盤はすべて結核菌の持つ遺伝子情報であり、結核菌全ゲノム情報取得により、理論的にはそれらを網羅的に解析可能である。次世代シーケンサの出現は結核菌全ゲノム情報の短時間で安価な入手を可能とした。筆者等は国内随一の次世代シーケンサによる病原体ゲノム解析の実績を有しており、既に数百に及ぶ結核菌などの臨床分離株の全ゲノム解析を実施している。これらの実績を元に、これまで個別実施されていた結核菌の薬剤耐性・疫学検査を、次世代シーケンサによる解析に包括的に置き換える基盤を開発した。結核の専門家はもとより、それ以外の研究者なども、次世代シーケンサのデータのみで、結核菌の薬剤耐性情報と疫学情報（一般的に知られるものとしてスポリゴタイピング、VNTR、Beijing 型別など）を取得可能とし、さらに従来では事実上不可能だった SNP レベルでの比較を行う高精細な結核菌型別を可能とする Web サービスを構築し、一般公開した。当該ホームページは国立国際医療研究センターホームページから直接アクセス可能である (<http://castb.ri.ncgm.go.jp/CASTB/>)。これらの基盤となった基礎的研究情報について、以下の論文（査読有り）を発表した。

Construction of a virtual *Mycobacterium tuberculosis* consensus genome and its application to data from a next generation sequencer. Okumura K, Kato M, Kirikae T, Kayano M, Miyoshi-Akiyama T. BMC Genomics. 2015 Mar 20;16:218. doi: 10.1186/s12864-015-1368-9.

課題番号 : 26指103

研究課題名 : 次世代シーケンサを活用した結核菌等の薬剤耐性菌の高度・迅速検査法のネットワーク構築

主任研究者名 : 秋山 徹

分担研究者名 : 切替 照雄

キーワード : 結核菌、分子疫学、ゲノム疫学、ネットワーク構築

研究成果 :

研究目的: 結核菌は世界最大規模の感染症であり、さらに抗菌剤がほとんど奏功しない多剤耐性菌の出現が問題となっている。結核菌の疫学的検査や薬剤耐性検査は PCR や培養などの労力を要する手法で実施されている。これらの検査の基盤はすべて結核菌の持つ遺伝子情報であり、結核菌全ゲノム情報取得により、理論的にはそれらを網羅的に解析可能である。次世代シーケンサの出現は結核菌全ゲノム情報の短時間で安価な入手を可能とした。筆者等は国内随一の次世代シーケンサによる病原体ゲノム解析の実績を有しており、既に数百に及ぶ結核菌などの臨床分離株の全ゲノム解析を実施している。これらの実績を元に、これまで個別実施されていた結核菌の薬剤耐性・疫学検査を、次世代シーケンサによる解析に包括的に置き換える基盤を開発する。結核の専門家はもとより、それ以外の研究者なども、次世代シーケンサのデータのみで、結核菌の薬剤耐性情報と疫学情報を取得可能とし、さらに従来では事実上不可能だった SNP レベルでの比較を行う高精細な結核菌型別を可能とする Web サービスを構築し、一般公開する。本研究では、一般公開されたサービスの有用性を検証するため、地方衛研と協力して、地方衛研に保有される結核菌株の詳細な疫学解析を行う。

必要性: 結核菌治療の根幹である抗結核薬投与には、標的株の薬剤耐性情報獲得が必須である。これらの情報は従来、培養や PCR などの労力や時間を要する手法で個別実施されてきた。次世代シーケンサのデータによりこれらの情報を統合的に扱える基盤が構築可能である。次世代シーケンサにより、従来の疫学解析では検討不可能だった、接触感染事例など類似性の高い菌株同士の関係を解析することも可能となる。そのため、本計画で構築される結核解析基盤は、高精度でより迅速な結核菌治療開始に極めて有用であり必須の基盤となる。これらの基盤を誰でも利用可能とするため、結核菌が収集されている地方衛研と協力して、保有株の詳細な疫学解析を行うことは、結核の全体像を把握するために極めて重要である。

期待される成果: 本計画で構築される基盤は、結核菌臨床分離株のゲノム解析による薬剤耐性検出と疫学的情報を包括的に取得するための、検体採取からデータ出力までの徹底的に最適化されたワークフローを提供する。バイオインフォマティクスなどの高度な知識なしで利用可能な結核用 Web サーバーは、これまで存在しないため、結核菌の臨床と研究の両面に大きく貢献する。本研究では結核菌が収集されている地方衛研のネットワークを構築することで日本の結核の基本的な疫学情報が高精細に解明される。結核治療では薬剤耐性状況の把握が必須であり、その判定は従来、培養法または PCR 法で実施されてきた。両者は時間や労力を要し、また個別薬剤や項目ごとに実施する必要があった。従来の結核の疫学解析は、大まかな菌の系統は把握可能であるが、集団感染事例など、元来、菌株同士が密接な関係にある事例を解析するのに足る解像力を持った系統解析法は、近年ようやく現実のものとなった全ゲノム配列解析を利用した SNP レベルの解析のみである。近年では、薬剤耐性になりやすい結核菌系統が報告されており、結核菌全体の疫学的動向を常に監視し、多剤耐性結核の出現などをモニターする必要がある。結核菌の薬剤耐性、疫学情報はすべて固有の遺伝子情報に基づいているた

め、対象菌株の全ゲノム解析により、理論的にはこれらの情報を取得可能である。本研究では、自動化解析サーバーにより、これまで煩雑な手段で実施されてきた結核菌の薬剤耐性情報や疫学情報を誰でも簡単に解析可能とする。

研究成果：結核菌の疫学的検査や薬剤耐性検査は PCR や培養などの労力を要する手法で実施されている。これらの検査の基盤はすべて結核菌の持つ遺伝子情報であり、結核菌全ゲノム情報取得により、理論的にはそれらを網羅的に解析可能である。次世代シーケンサの出現は結核菌全ゲノム情報の短時間で安価な入手を可能とした。筆者等は国内随一の次世代シーケンサによる病原体ゲノム解析の実績を有しており、既に数百に及ぶ結核菌などの臨床分離株の全ゲノム解析を実施している。本研究では、構築される結核菌の自動解析 Web サービスについて、地方衛生研究所などと協力して、結核菌全ゲノム配列の次世代シーケンサによる解析を、ノウハウを有する当センターで実施し、臨床分離株を中心に解析支援を行うスキームを構築することで、構築されたサーバーの効率的運用を促進し、新規の高度感染症診断技術の均てん化を図った。地方衛研との共同研究で、過去数年間の分離菌株すべてについて、全ゲノム配列を解析し、各菌株の疫学的背景を明らかにすることで、当該地域における、結核菌の伝搬状況を分子レベルで初めて明らかにすることができた。加えて、当該地域で発生した、集団感染疑い事例について、全ゲノム解析により、実際にそれらの症例が集団感染であることを分子レベルで確認した。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：26指103

研究課題名：次世代シーケンサを活用した結核菌等の薬剤耐性菌の高度・迅速検査法の開発と臨床応用

主任研究者名：秋山 徹

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Construction of a virtual Mycobacterium tuberculosis consensus genome and its application to data from a next generation sequencer.	Okumura K, Kato M, Kirikae T, Kayano M, Miyoshi-Akiyama T.	BMC Genomics.	20;16:218.	2015
MicroRNA-155 knockout mice are susceptible to Mycobacterium tuberculosis infection.	Iwai H, Funatogawa K, Matsumura K, Kato-Miyazawa M, Kirikae F, Kiga K, Sasakawa C, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T.	Tuberculosis	95(3):246-50.	2015
Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates from foreign-born and Japan-born residents in Tokyo.	Kato-Miyazawa M, Miyoshi-Akiyama T, Kanno Y, Takasaki J, Kirikae T, Kobayashi N.	Clin Microbiol Infect.	21(3):248. e1-8	2015
Complete annotated genome sequence of Mycobacterium tuberculosis (Zopf) Lehmann and Neumann (ATCC35812) (Kurono).	Miyoshi-Akiyama T, Satou K, Kato M, Shiroma A, Matsumura K, Tamotsu H, Iwai H, Teruya K, Funatogawa K, Hirano T, Kirikae T.	Tuberculosis	95(1):37-9.	2014

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Construction Of A Virtual Mycobacterium Tuberculosis Consensus Genome And Its Application To Data From A Next Generation Sequencer	Okumura K, Kato M, Kirikae T, Kayano M, Miyoshi-Akiyama T.	American society of microbiology, 114th General meeting,	Boston, USA	May, 2014

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
結核菌：120種類のゲノム網羅 データベース運用開始		毎日新聞		2015年3月7日

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
結核菌の菌株の同定方法及び遺伝子変異の検出方法	特願2013-012546	株式会社ニプロ、 国立国際医療研究センター、 帯広畜産大学	2014. 1. 25	日本・米国

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。