

## 周産期の病態解析にも導入されはじめたマイクロバイーム

秦 健一郎 部長 ((独) 国立成育医療研究センター研究所 周産期病態研究部)

漆山 大知 研究員 ((独) 国立成育医療研究センター研究所 周産期病態研究部 / 福岡大学医学部 産婦人科)

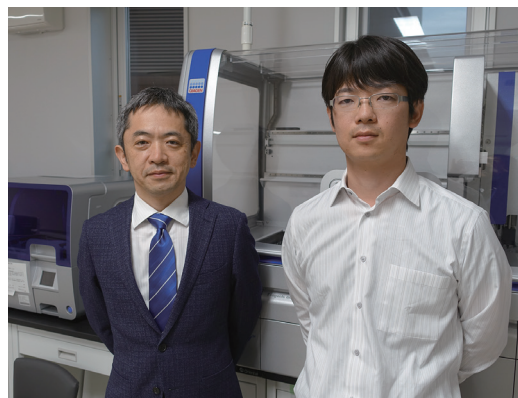
早産、先天性疾患、妊娠糖尿病など、周産期にみられる病態の解析にも、エクソーム解析、DNA メチル化解析、16S リボソーム RNA 遺伝子解析、メタゲノム解析などが導入されつつある。周産期特有の疾患を対象に網羅的な解析を進めるお二人に話を伺った。

周産期病態研究部ではどのような研究をされているのでしょうか。

秦：多くの妊娠は正常に完了しますが、わずかに不幸な転帰をたどる例もあります。後者について、胎児側の問題や、子宮内環境を含めた母体側の問題について解明しようというのが、私たちの目的です。具体的には、実際の異常妊娠症例（早産や胎児発育異常、先天奇形、妊娠糖尿病、遺伝性疾患など）を対象とし、様々な手法で正常と異常を比較解析しています。その後、これらから得られた知見の詳細を、培養細胞やモデル動物を用いた検証も行なっています。これらの研究を進めるには、解析手法の開発と日本人の標準データの蓄積が重要と考えています。例えば、日本人の正常妊婦 411 人を対象に、末梢血による一塩基多型情報を基にした染色体構造解析を行ないました。その結果、海外データとはかなり異なっていることがわかり、周産期の研究に適した日本人標準データが必要であることを示せました (1)。

漆山：私自身は、先天的に頭蓋骨や脳が欠損している無脳症を対象に、エクソーム解析や網羅的 DNA メチル化解析を行ない、興味深い結果を得つつあります。全国の共同研究者経由で臍帯血、胎盤、母体の末梢血、父親の唾液などを集め、6 家系を対象にエクソーム解析を行ない、新生突然変異や稀な頻度のホモ・ヘミ接合体変異などを数十箇所に絞り込みました。これらの中には無脳症発症に関連する可能性をもつ遺伝子がいくつか含まれていると思われ、さらなるゲノムやエピゲノムの解析を進める予定です。

秦：また、IHEC（国際ヒトエピゲノムコンソーシアム）に参加してエピゲノミクス解析も進めています。さらに、当センターは「ナショナルセンター・バイオバンク・ネットワークプロジェクト」の一員として、正常・異常にかかわらず臨床情報と検体をセットにしたデータの蓄積を進めています。これらは、用途を特定せず、必要に応じて、広く国内外に情報を提供するのが目的です。



秦 健一郎 部長 (左)、漆山 大知 研究員 (右)



漆山先生の日々の実験は、マイクロバイームが中心ということになりますね。

漆山：はい、その通りです。共同研究者から頂いた羊水、膣スワブ、血液などの検体について、DNAの抽出からシーケンスまでを行なっています。解析においては、東京大学大学院 新領域創成科学研究科の服部正平教授らとの共同研究として進めています。

この4月以降は、前期破水や早産の症例を対象に、羊水や膣スワブをもとにしたメタゲノム解析（環境中の全ての微生物ゲノムを解析する）と16SリボソームRNA遺伝子解析（以下、16S解析：細菌のリボソームRNA遺伝子の一部を増幅して解析する）を始めています。日本の早産率は諸外国よりも少ないのですが、それでも全妊娠の6～7%に上っており、特に近年は早い週数の早産が増加傾向にあります。多くは発熱もなく羊水の一般培養検査でも陰性なのですが、早産例の羊水中ではIL-6やIL-8などの炎症性タンパクが有意に多いといった報告が多数あります。こうしたことから、早産の多くは潜在的な感染が原因だろうと考えられてきた訳ですが、いまだにその実態をつかめずにいるのです。そこで必要になってくるのが、次世代シーケンサーを活用し、メタゲノム解析や16S解析などのヒトマイクロバイーム研究です。

基礎検討として、早産と正常各2例ずつ、計4症例のメタゲノム解析を行ない、興味深い結果を得つつあります。まず、早産例の一例では、一般培養検査で検出不可能なウレアプラズマという病原体由来の配列が顕著に見出されました。もう一例でも、人畜共通感染症の病原体として報告のある細菌など、特定の4種由来の配列が非常に多く認められました。ウレアプラズマの方は、すでに大阪府立母子保健総合医療センター研究所の柳原格先生や富山大学産婦人科の齋藤滋先生らによって早産やその予後との因果関係が示されており、今回のようなメタゲノム解析が、これまで検出が難しかった未知の病原体特定を可能にすると期待されます。

次に正常例についてですが、興味深いことに、存在量は少ないものの、かなり多くの種類の細菌が検出されました。コンタミネーションの可能性もあり、現在追加実験中ですが、これまで無菌状態と考えられてきた正常羊水中にも、数は少なくとも常在微生物が存在するのかもしれない。

一方16S解析は、PCR特有のバイアスを考慮する必要があるものの、メタゲノム解析で邪魔になる「ホスト（妊婦）由来のDNA」が問題にならず、比較的容易に菌叢解析ができます（3）。我々も最近、MiSeq®（Illumina®社）で96サンプルの16Sシーケンスを行ないました。現在、詳細な解析と検討を行なっていますが、後述するいずれのDNA抽出法でも16S解析が可能なが確認できました。メタゲノム解析と比較し、コストが低い点も大きなメリットといえます。

病原体の種類や早産に結びつく原因はわかったのでしょうか。

漆山：ただ最近、従来は無菌的と考えられていた胎盤組織においても「独立したマイクロバイーム」が観察され、一部で注目を集めています（2）。妊娠前から子宮内にいたのか、胎盤を介して口腔内や消化管などから移動したのか、膣からの上行感染なのかなど、いろいろ考えられると思います。

まずは解析手法を確立し、国内における周産期ヒトマイクロバイーム研究の基盤となる研究を進めるとともに、疾患群特異的な微生物群を特定したいと考えています。その上で、臨床研究で診断・治療・予防につなげ、基礎研究でホストとの相互関係についても解析を進めたいと思います。

ごくわずかな「微生物由来の DNA」を解析する必要がありますね。

漆山：はい、そこが今後のヒトマイクロバイオーム研究の難しいところだと思います。膣スワブや羊水検体には、宿主由来の DNA が非常に多く含まれています。現状では次世代シーケンサー解析のコストが高いため、メタゲノム解析においては、宿主由来の DNA を効率よく除く手法が必要になります。また、コンタミネーションが解析に影響する可能性も考慮しなければなりません。そこで、私たちは、QIAGEN のパッケージ (QIAamp<sup>®</sup> DNA Microbiome Kit と QIAamp UCP Pathogen Mini Kit) を利用しています。

この2つのキットに共通した主なメリットは、「試薬や容器が超清浄環境で製造されており、コンタミネーションリスクが最小限であること」と、「同時に多数のサンプルを、機械破砕から DNA 抽出に至るまで、簡便なプロトコールにより1日で行えること」だと思います。

羊水や膣から抽出できる DNA は比較的少量なのですが、DNA 収量の増加を期待し、服部教授らが用いている複合酵素法 (複数の酵素を用い、網羅的に溶菌した後に DNA 抽出する方法) (3) をご教授いただいた上で比較実験を行なってみました (図 1)。その結果は、DNA の抽出量と 16S ライブラリー濃度のいずれにおいても、QIAamp UCP Pathogen Mini Kit と複合酵素法の有意差はみられないというものでした。複合酵素法では結果がばらついたことから、実験中にロスした可能性も考えられますが、逆に言えば、QIAamp UCP Pathogen Mini Kit では「簡便に安定した結果を得られた」といえます。

このとき、QIAamp DNA Microbiome Kit では有意に少ない量の DNA しか抽出できませんでした。その理由は、このキットには「ヒト細胞を特異的に溶解し、遊離核酸を分解する工程」が含まれているため、主に宿主由来の DNA が減少したためと考えられます。その後は、全例で問題なく 16S ライブラリーが作製できています。メタゲノム解析も、微量 DNA からのライブラリー作製キットを利用することで実現可能だと思われ、今後の解析結果に期待しているところです。 ▶

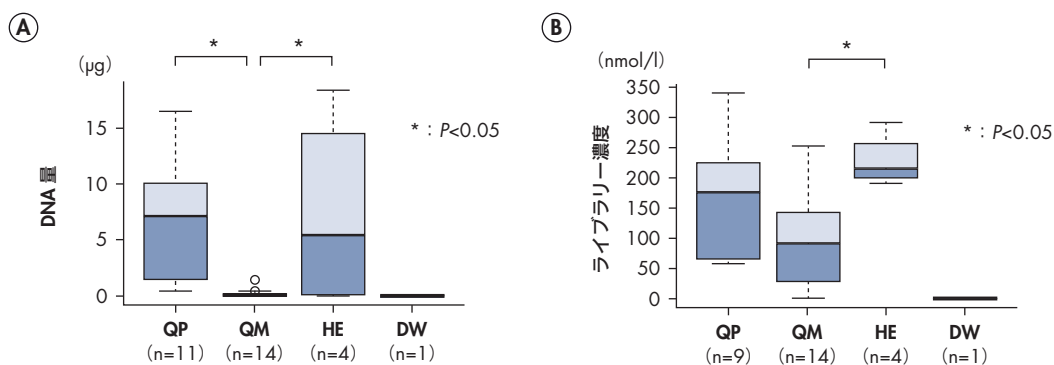


図 1. 妊婦の膣スワブ検体の DNA 抽出量と 16S ライブラリー濃度

① DNA 抽出量: QIAamp UCP Pathogen Mini Kit (QP) では、十分かつ安定した量の DNA を採取できた。QIAamp DNA Microbiome Kit (QM) では、比較的少ない量だった。既報告の通り、膣分泌物中にはヒト由来の DNA が多量に混入していることを示唆する結果である。② 16S ライブラリー濃度: 16S rRNA 遺伝子解析の MiSeq シークエンスライブラリー作製は、Illumina 社のプロトコール (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation) に従った。全例でシーケンシング可能な濃度 (4 nmol/l 以上) のライブラリーを作製できた。[QP: QIAamp UCP Pathogen Mini Kit, QM: QIAamp DNA Microbiome Kit, HE: 複合酵素法, DW: Distilled Water. 有意差検定法: Man-Whitney 検定]

今後の展開が楽しみです。最後に抱負を一言お願いできますか。

漆山：マイクロバイオーム研究に関しては、まずは日本人の膣や羊水中のマイクロバイオームを明らかにし、今後の研究基盤を確立するとともに、早産や前期破水などで特異的な微生物群を特定したいと考えています。将来的には、低侵襲で採取できる検体で解析できるシステム開発を目指し、効率よく早産や前期破水を予測できる診療体制の確立を目指します。実現すれば、症例ごとに抗生物質の投与などにおいて適切に治療介入できるかもしれません。オーダーメイド医療や医療イノベーションへの発展の可能性も視野に入れ、研究を進めたいと考えています。

秦：周産期の異常は、多くが多因子疾患である、淘汰されてしまい大家系がほとんど存在しない、といった理由から、遺伝学的解析が困難でした (4)。今後は少しずつゲノム解析の基盤が整い、加えてエピゲノム解析、マイクロバイオーム、さらには環境との関連や出生児への長期的影響 (例えば DOHaD 仮説: Developmental Origins of Health and Disease など) の概念を取り込み、周産期の疾患解析へ応用していきたいと考えています。

#### 参考文献

1. J Hum Genet. 2014 Jun; **59**(6): 326-31. doi: 10.1038/jhg.2014.27. Epub 2014 May 1.  
Compilation of copy number variants identified in phenotypically normal and parous Japanese women.  
Migita O1, Maehara K1, Kamura H1, Miyakoshi K2, Tanaka M3, Morokuma S4, Fukushima K4, Shimamoto T5, Saito S6, Sago H7, Nishihama K8, Abe K1, Nakabayashi K1, Umezawa A9, Okamura K10, Hata K1.
2. Sci Transl Med. 2014 May 21; **6**(237): 237ra65. doi: 10.1126/scitranslmed.3008599.  
The placenta harbors a unique microbiome.  
Aagaard K1, Ma J2, Antony KM3, Ganu R3, Petrosino J4, Versalovic J5.
3. DNA Res. Jun 2013; **20**(3): 241-253.  
Published online Apr 9, 2013. doi: 10.1093/dnares/dst006  
PMCID: PMC3686430  
Robustness of Gut Microbiota of Healthy Adults in Response to Probiotic Intervention Revealed by High-Throughput Pyrosequencing  
Seok-Won Kim, I Wataru Suda, I Sangwan Kim, I Kenshiro Oshima, I Shinji Fukuda, 2,3,4 Hiroshi Ohno, 3,4 Hidetoshi Morita, 5 and Masahira Hattori I, \*
4. 漆山大知、秦健一郎、エビジェネティクスの産業応用 第11章 周産期疾患のエビジェネティクス、2014年4月30日発行、シーエムシー出版

記載の QIAGEN 製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。最新のライセンス情報および製品ごとの否認声明に関しては [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) の "Trademarks and Disclaimers" をご覧ください。QIAGEN キットの Handbook および User Manual は [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) から入手可能です。

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp® (QIAGEN Group); Illumina®, MiSeq® (Illumina, Inc.).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

製品情報、仕様、カタログ番号 (Cat. no.)、価格等は予告なく変更する場合がございます。予めご了承ください。© 2016 QIAGEN, all rights reserved.

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

株式会社 キアゲン | 〒104-0054 | 東京都中央区勝どき3-13-1 | Forefront Tower II  
Tel: 03-6890-7300 | Fax: 03-5547-0818 | E-mail: techservice-jp@qiagen.com