

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15411

研究課題名(和文)ファージウイルス群集改造理論に基づいた乾癬患者のVirome解析による病態解明

研究課題名(英文)Virome analysis of psoriasis based on the community shuffling model

研究代表者

松岡 悠美 (MATSUOKA, YUMI)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：10402067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は乾癬の患者検体を用いて細菌16SrRNA遺伝子のメタゲノム解析に加えファージウイルスをターゲットとしたVirome解析を包括的に行う事で乾癬の病因解明に繋がると期待するものである。本研究を推進するために、大学規定の生命倫理審査受理の後、実際に患者検体を採取・保管を行った。現時点までに、健常者および乾癬患者、約15名ずつのエントリーを行った。また、採取検体から効率よくViromeを解析するため、スピンカラムキットを用いたウイルス由来核酸抽出法の至適な条件を検討した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to characterize the virome of healthy skin and psoriasis skin in addition to microbiome analysis. To address this, we first got the approval of bioethics in our university. Until now, we have recruited around 15 of each psoriasis patient- and healthy control-samples. We also performed spin column method of viral DNA/RNA purification from human samples to find out the best condition.

研究分野：皮膚免疫学

キーワード：皮膚免疫・炎症学 乾癬

1. 研究開始当初の背景

尋常性乾癬は、Th1+Th17 型の慢性炎症性角化症である。Fits らは乾癬患者にイミキモドを外用すると皮疹が悪化することをヒントに、イミキモド外用による乾癬モデルマウスを確立した(Fits, *J Immunol* 2009)。その後 IL-17 や IL-23p19、IL-22 などの免疫機序がこのモデルを用いて解明され、実際に臨床で使用されている生物学的製剤の作用点が明らかとなってきた(Cai, *Immunity* 2011; Riol-Blanco, *Nature* 2014)。合成核酸イミキモドを認識する Toll-like receptor 7(TLR7)は自然界でウイルス由来の single-strand RNA (ssRNA) を生理的リガンドとして認識する。TLR7 は小胞体に発現し、免疫細胞の活性化に伴いエンドソームに移行し ssRNA を認識する。一般に、自己の核酸は TLR7 に認識されないとされているが、SLE などの自己免疫疾患では自己抗体などの修飾を受けた特殊な自己核酸が TLR7 を活性化できる事が報告されている。乾癬皮膚においても抗菌ペプチド LL37 に修飾された細胞外 RNA が健常人に対して高発現し、*in vitro* で RNA-LL37 複合体が樹状細胞を活性化し IFN- α の産生を起こす事が報告された(Ganguly, *J Exp Med* 2009)。しかし、乾癬では自己抗体が通常検出されない事など自己免疫疾患との病態の違いを考えると、Ganguly らが乾癬検体で見いだした RNA が、ウイルスなどの非自己由来であっても何ら不思議ではない。

2013 年 Mills らは、「バクテリオファージが環境ストレスにより優良な常在細菌内でより溶菌サイクルを引き起こし、病原性偏利共生菌が有利になるという Dysbiosis サイクル」をバクテリオファージによる “Community Shuffling (群集改造)” という概念として提唱した (Mills, *Gut Microbes* 2013)。すなわち体内環境が常在細菌に対してストレスとなるとバクテリオファージが宿主のいわゆる善玉菌を溶菌し、病原性偏利共生菌が増加する事で、宿主に炎症が惹起されるという理論である。

そこで申請者は、「乾癬患者においてもバクテリオファージによる “Community Shuffling” が腸管や皮膚で Dysbiosis を引き起こし、溶菌によって放出されたファージ由来の ssRNA が皮疹発症に関与している」という仮説を立てた。申請者はこれまで自然免疫と感染に主眼を置き研究を行ってきた (Nakamura, *Immunity* 2012; Nakamura, *Nature* 2013)。このような背景を生かし、乾癬患者において細菌 16SrRNA のメタゲノム解析に加えファージをターゲットとした Virome 解析を行う事で今まで解析できていなかった病因の解明に繋がると考えた。

2. 研究の目的

尋常性乾癬は、好中球の角層内浸潤を認めるものの、病原細菌および真菌は病変部から同定されない。マウスの乾癬モデルとして広く頻用されているイミキモド外用モデルは好中球表皮内遊走や表皮突起の棍棒状の延長を含め非常に良くヒトの病態を模した表現系を再現できる。申請者らの実験でも、ウイルス ssRNA をリガンドする TLR7-MyD88 がイミキモド外用マウスモデルで活性化していることは明らかである。一方、共生細菌の側では、細菌叢の維持・変化にはバクテリオファージが深く関与している。共生細菌は CRISPER-Cas9 をファージウイルスに対する優れた獲得免疫機構として持つ一方で、対宿主病原因子をファージウイルスを介し獲得するなど、バクテリオファージは細菌叢の成り立ちに密接に関与すると考えられる。2013 年 Mills らは、「バクテリオファージが環境ストレスにより優良な常在細菌内でより溶菌サイクルを引き起こし、病原性偏利共生菌が有利になるという Dysbiosis サイクル」を “Community Shuffling (群集改造)” という概念として提唱した。この概念に基づき、「通常状態では大量に放出されることのないファージがこのような過程で宿主内に過剰に放出され、ファゴソーム内に取り込まれることで宿主エンドソーム内の TLR7 を活性化し乾癬の皮疹が誘発されるのではないか」と着想した。申請者は、米国ミシガン大学において好中球遊走に深く関与しているとされている NLRP3、IL-1 を中心に自己炎症性疾患や、感染症による慢性炎症について研究に携わり成果をあげてきた (Nakamura, *Immunity* 2012; Nakamura, *Nature* 2013)。2013 年より千葉大学皮膚科に帰任しミシガン大学と共同研究を行うと共に、千葉大学真菌医学研究センターのグループと真菌感染症を含め、皮膚の微生物と宿主免疫についてより広く研究を進展させている。この環境はまさに新しい概念に基づき、微生物に焦点を当て乾癬の病態解明を行う、まさに好機であると考えた。

3. 研究の方法

(1) 動物実験および臨床検体の取り扱い:

動物実験を行う際には、実験計画の申請を千葉大学に対して行い承認を受けた後、規定を守り研究計画を遂行する。ヒトのサンプルは千葉大学皮膚科にて同意の得られた患者検体を用いて解析を行う。千葉大学の倫理審査委員会の審査の承認をうけたのち、実施する。

(2) 皮膚サンプルからの全ウイルス DNA・RNA サンプルの調整法の確立:

申請者は、マウス皮膚での細菌 16SrRNA メタゲノム解析用のサンプル調整の経験があり、マウス皮膚より、まず全ウイルス DNA・RNA 抽出法を確立し、その後ヒト皮膚検体より抽出を試みる。

ヒト皮膚でのウイルス核酸抽出法は過去報告されているが(Foulongne, *PLoS ONE* 2012)、最近この抽出法では、Virome 中の大部分を占めるバクテリオファージが上手く抽出されていない可能性が報告されている(Paepé, *Front Cell Infect Microbiol* 2014)。そこで、最新の報告、販売されているキットの抽出法をマウス皮膚・糞便を用いて検討する。

マウスサンプルの糞便・皮膚を用いてウイルス粒子を抽出する。方法は Minot らの DNA ウイルス抽出の報告に基づいて行う(Minot, *Genom Res* 2011)。サンプルを SM buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 0.1M NaCl, 7 mM MgSO₄, 0.01% Gelatin)内でホモジネート、遠心分離し上清を得る。得られた上清を 0.02 μm フィルターし、CsCl 比重分離法を行う。

抽出したウイルス粒子からの DNA ウィルスライブラリー、RNA ウィルスライブラリーを作製する。クロロホルム処理したのち Dnase 引き続き QIAGEN DNeasy Bood and Tissue Kit にて DNA ウィルスサンプルを抽出する。得られたウィルス由来 DNA は、Phi29 ポリメラーゼにて増幅を行う。RNA ウィルス粒子は、RNase H 処理し、QIAGEN DNeasy Bood and Tissue Kit で RNA を抽出した後、High Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (ABI 社)をもちいて cDNA として、DNA ウィルスと同様、Phi29 ポリメラーゼを用いて増幅する。

のステップは、SpinStar™ Viral Nucleic Acid Kit 1.0 (altona Diagnostics 社)で代用し抽出する事が出来る。細菌叢メタゲノム解析では、使用するキットによる結果の異差が報告されているので、Virome 解析にもそのような危険性があると考ええる。この時点での抽出法による結果に差がないかどうか、次世代シーケンサーを用いて検討する。

(3) 健常者および乾癬患者の皮膚・便・咽頭ぬぐい液からのウイルス DNA・RNA の抽出と解析

同意が得られた健常者と乾癬患者の皮膚生検検体(もしくはスワブぬぐい液)、便、咽頭ぬぐい液を採取する。採取したサンプルは速やかに凍結の後-80 で抽出を行うまで保存する。日本人乾癬の患者 10-20 名、

年齢のあった健常人コントロールを 10 名程度予定する。

次に(2)で確立した全ウイルス DNA・RNA 抽出、および細菌 DNA を抽出する。抽出したサンプルは 16SrRNA、18SrRNA 遺伝子で qPCR 法を行いサンプルのクオリティーチェックを施行する。抽出したサンプルは-80 で保存する。

抽出した細菌 DNA サンプルはミシガン大学病理学教室の Gabriel Nunez 教授のもとに送付し、細菌 DNA メタゲノム解析を行う。Gabriel Nunez 教授とはこれまでも共同研究を行っており、細菌 DNA メタゲノム解析に関しては技術面で精通するのみならず、\$4/サンプルというコストの面でも優れた解析を実現している。全ウイルス Virome 解析は、新たに行う必要があるため、研究協力者であるかずさ DNA 研究所小原 収研究部長、Gabriel Nunez 教授と相談し、解析系を確立する。かずさ DNA 研究所と千葉大学皮膚科はこれまでも自己炎症性疾患の DNA 解析などを通じて研究協力の実績があり(Tanaka, *Arthritis Rheum* 2011)、スムーズに研究協力を行える。Virome 解析法はすでに確立されており(Minot, *Genom Res* 2011; Ryes, *Nat Rev Microbiol* 2012)、この方法を参考にウイルス DNA・RNA サンプルを次世代シーケンサーを用いて解析する。

(4) 乾癬患者で特異的に同定されたウィルス-細菌の相互関係についての解析を行う。

解析により乾癬患者と健常者における Virome に特定の差が認められた場合、細菌-ウィルスの相互作用について、該当の細菌、ウィルスの全ゲノム解析を行うことでさらに詳細な“尋常性乾癬患者における Community Shuffling による Dysbiosis のメカニズム”に迫る予定である。

4. 研究成果

本研究を推進するために、大学規定の生命倫理審査受理の後、実際に患者検体を採取・保管を行った。現時点までに、健常者および乾癬患者、約 15 名ずつのエントリーを行った。また、採取検体から効率よく Virome を解析するため、スピнкаラムキットを用いたウィルス由来核酸抽出法の至適な条件を検討した。本研究で得られた結果をもとに今後引き続き、継続研究の研究費申請を行い、継続する。得られた研究結果を国内外に向けて発信するよう学会報告・論文投稿を今後積極的に行う。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松岡 悠美 (MATSUOKA, Yumi)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：10402067

(2)研究分担者

松江 弘之 (MATSUE, Hiroyuki)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：10250424