

令和元年6月12日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19472

研究課題名(和文)特発性肺線維症における肺内細菌叢とエピジェネティクス制御

研究課題名(英文) Microbial profile and epigenetic regulation in patient with idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

小田 桂士(Keishi, Oda)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：00625527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：特発性肺線維症(IPF)患者の気管支肺胞洗浄液(BALF)から16SrRNAを精製し、次世代シーケンシング技術を用いて肺内細菌叢を解析した。また、IPF安定期と急性増悪期の血清を用いてmiRNA網羅的解析を行い、急性増悪期に発現量が増減しているmiRNAと関連遺伝子を検索した。その結果、BALF中にはFirmicutesとProteobacteriaの割合が高いことを示した。また、急性増悪期に複数のmiRNAの増減を認めることを確認した。特にmiR-122-5pとmiR-151bは、A549細胞に遺伝子導入し発現量を調整したところ、細胞外基質に関連する遺伝子発現を調整していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難病指定を受けている特発性肺線維症の病態は未だ不明な点が多い。我々は今回、肺内細菌叢とエピジェネティクス解析を行い、さらに急性増悪時に増減するmiRNAの特定および機能解析を行うことでバイオマーカーおよび治療ターゲットになる可能性について検討した。本研究成果によって特発性肺線維症の病態全てを紐解くことは困難であるが、本疾患に関する理解を深めるために重要な役割を果たしたと考える。

研究成果の概要(英文)：The 16S rRNA was purified from BALF obtained in patients with IPF and analyzed using next-generation sequencing techniques to characterize the bacterial communities. In addition, we investigated to identify miRNAs, which changed the expression levels during acute exacerbation (AE) of IPF, and the associated genes regulated by the miRNAs through the comprehensive analysis of paired serum miRNA expressions at stable and AE periods. The most prevalent lung phyla were Firmicutes and Proteobacteria. We extensively analyzed serum miRNA expression levels and identified several miRNAs, which expression levels were significantly changed during the AE period compared to the stable period. Among them, we respectively introduced miR-122-5p and miR-151b, which we could confirm the changes in expression levels using real-time PCR, into A549 cells. Intracellular overexpression or suppression of these miRNAs revealed that they appeared to regulate gene expressions associated with extracellular matrix.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：特発性肺線維症 細菌叢解析 miRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

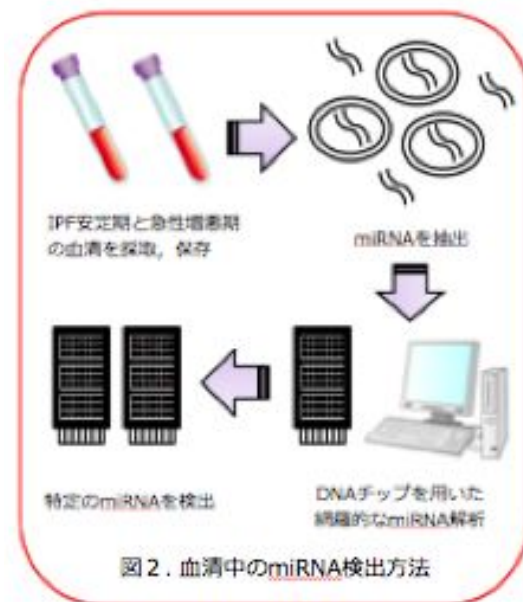
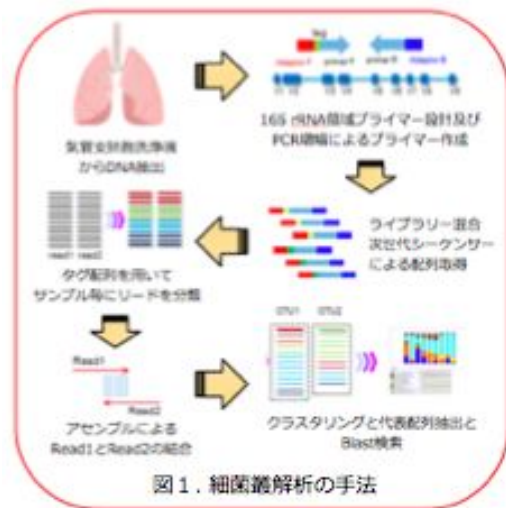
特発性肺線維症(IPF)は、特定疾患治療研究事業の対象疾患であり、平均生存期間3-5年の予後不良疾患である。病態の中心は肺胞上皮細胞における上皮傷害に伴う修復異常と遺伝子異常によって説明されるが、近年エピジェネティクス制御との関連が注目されている(Fernandez IE, et al. *Lancet*. 2012)。近年、遺伝子工学的手法の開発に伴い、気管支肺胞洗浄液(BALF)などの下気道検体から細菌遺伝子が検出されるようになり、肺内細菌叢の多様性が難治性肺疾患における病態への影響について、さらなる解明が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究では、IPF患者における肺内細菌叢の多様性とエピジェネティクス制御との関連、急性増悪時における血清内miRNAの発現と病態への関与について検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は、(1)IPF患者から採取したBALFにおける肺内細菌叢の多様性解析、(2)急性増悪時に関連するmiRNAの同定と機能解析の2つに分けて実施した。(1)については核酸抽出作業、核酸定量、ライブラリー作成(16S rRNA領域の増幅)、シーケンスライブラリーの作成、シーケンス解析を行い、(2)についてはIPF急性増悪時に特異的に増加・減少しているmiRNAを特定し、気管支肺胞上皮細胞を用いてRNA-seq解析を行った。(1)における細菌叢解析の解析手法については図1に示す。なお、核酸抽出作業はNucleoSpinMicrobialDNA(MACHERN-NAGEL社)を使用し、核酸定量は精製作業と2本鎖DNA定量を行い、精製作業ではAMPureXPを使用した精製処理を実施した。ライブラリー作成は16S rRNA領域の増幅、シーケンスライブラリーの作成を行った(シーケンスライブラリー品質検定も同時に行った)。シーケンス解析はイルミナ社シーケンサーを用いた。(2)における血清中のmiRNA検出方法については図2に示す。IPF患者の血清を用いてマイクロアレイを実施し、急性増悪時に特異的に増減するmiRNAの特定を行った上で、特定のmiRNAをレンチウイルスを用いて肺胞上皮細胞内に過剰発現、抑制するように遺伝子導入を行い、それらが調整している遺伝子について解析を行った。



### 4. 研究成果

研究の方法で示した(1)の研究成果について示す。IPF患者におけるBALF中に検出された主

な菌種は、図3に示すようにフィルミクテス門、プロテオバクテリア門、バクテロイデス門などの嫌気性菌が大多数を占めていた。一方で、肺内細菌叢の多様性について患者背景や疾患進行などの観点から複数の検討を行ったが、肺内細菌叢に影響を及ぼす背景因子は認めなかった。

現在、エピジェネティクス解析として、

(i)肺内細菌叢の変化に伴うヒストンアセチル化、DNAメチル化とHDACを用いた抑制実験、(ii)線維化に関わるタンパク質の検証を継続している。

次に研究の方法で示した(2)の研究成果について示す。IPF安定期と比較してIPF急性増悪時に増減する血清内miRNAを網羅的に解析した結果、複数のmiRNA発現に増減を認めた(図4)。このうちreal-time PCRで追加検証が可能であったmiR-122-5pおよびmiR-151bについて、各々レンチウイルスを用いてA549細胞と不死化肺胞上皮細胞に導入し、細胞内で過剰発現あるいは抑制させ、トランスクリプトーム解析を行い、さらに標的遺伝子の生物学的機能をThe Database for Annotation, Visualization and

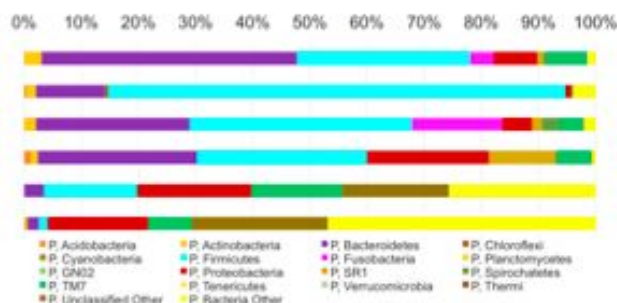


図3. 気管支肺胞洗浄液中の細菌叢

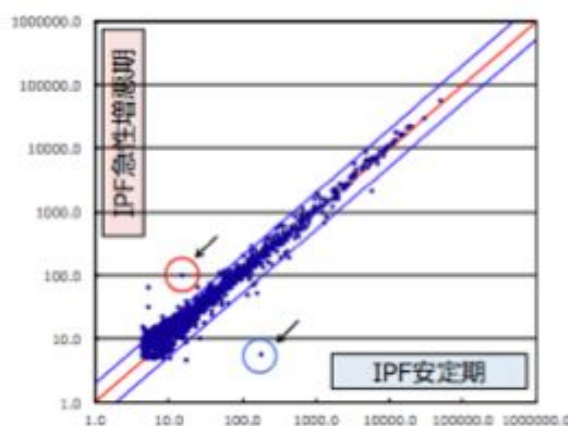


図4. マイクロアレイの結果

Integrated Discovery (DAVID ; <https://david-d.ncicrf.gov/>)の Gene Ontology (GO)を用いて解析を行ったところ、細胞外マトリックス沈着に影響する複数の遺伝子発現の調節に関与していることが示唆された。

近年、血中miRNAの解析は微量血液からmiRNAを効率的に抽出し、さらに高い再現性を有するため、多くの疾病においてバイオマーカーや治療ターゲットとして研究が盛んに行われている。今回の研究では、IPF急性増悪期にmiRNAの増減に伴い発現量が変動する遺伝子を特定した。特定したmiRNAは、これまで他疾患において病態への関与をうかがわせる既報はあるが、IPFに関する既報は存在しない。そのため本研究結果は、未だに十分に解明されていないIPF急性増悪期の病態解明の手がかりとなるだけでなく、バイオマーカーや治療ターゲットとしての創薬の可能性も秘めており、現在、他の細胞株での再現実験やマウスモデルを用いた追加実験を検討し、機能解析に関する研究を継続している。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計5件)

小田桂士, 田原正浩, 矢寺和博, 和泉弘人, 迎 寛 特発性肺線維症急性増悪期における血清内miRNAの発現と病態への関与 第59回日本呼吸器学会学術講演会 2019年

Keishi Oda, Masahiro Tahara, Kazuhiro Yatera, Hiroshi Mukae Expression analysis of serum microRNAs in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis American Thoracic Society 2019年

小田桂士, 田原正浩, 矢寺和博 職業性肺気腫、じん肺に合併した肺線維症における肺内

細菌叢とエピジェネティクス制御 第36回産業医科大学学会 2018年

小田桂士, 城戸貴志, 田原正浩, 矢寺和博 Nintedanib から Pirfenidone へ切り替えによる治療効果と忍容性に関する検討 第58回日本呼吸器学会学術講演会 2018年

小田桂士, 花香哲也, 城戸貴志, 矢寺和博 本邦における特発性間質性肺炎診断の実態 第57回日本呼吸器学会学術講演会 2017年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。