

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08845

研究課題名(和文) バクテリオファージが引き起こす腸内細菌叢破綻メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) Study on dysbiosis of intestinal flora caused by bacteriophage

研究代表者

関塚 剛史 (Sekizuka, Tsuyoshi)

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・室長

研究者番号：40462775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腸管内バクテリオファージを効率的且つ簡便に回収する方法を考案し、新規バクテリオファージのゲノム配列を確定した。抗菌薬多剤併用療法を実施した潰瘍性大腸炎患者の治療前後の腸内細菌叢解析をメタゲノム解析により行い、抗菌薬多剤併用療法開始前の活動期に多く存在する細菌種、及び、治療後の寛解期で多く存在する細菌種が確認された。更に、phageome解析を行ったが、各患者で多様なパターンを示し、治療前後での共通性は認められなかった。しかし、個人の治療前後でのファージ組成は大きく変化していた。回収したファージを用いた細菌叢への感染実験を行ったが、供与したファージの増加は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎(UC)患者の腸内細菌叢では、活動期と寛解期において共通して増減する細菌種が存在する一方、ファージの組成には共通項は認められず、その組成は個人ごとにおいても治療前後で大きく異なっていた。UCでは細菌叢の破綻が関与し、健常な細菌叢に戻すことで寛解に向かうことが本研究でも明らかとなったが、ファージの組成も大きく変化することが強く示唆された。腸管内の細菌およびファージ組成の変化を共に注視することで、寛解維持の状態を把握できる可能性が予想され、侵襲性の少ない、メタゲノム解析手法を用いた経過観察を行うための基盤が作成できたものと思われる。

研究成果の概要(英文)：An efficient and convenient method of recovering phage from feces was devised in this study, and the genomic sequence of the novel bacteriophage was determined. Gut microbiota and phageome of patients with ulcerative colitis (UC) given antibiotic combination therapy were compared between both before and after treatment using metagenomic analysis. Comparison of the metagenomic data suggested that major population of several bacteria showed a negative correlation between before treatment in the active stage and remission after treatment. In addition, it is suggested that the composition of the phageome between active and remission stages in each patient was drastically changed and there was no similarity between active and remission stages of all patients. Liquid phage infection assay was performed against feces of a healthy person with extracted phage from feces of patients with UC in active stages, however, proliferation of phage extracted from feces of UC patients was not confirmed.

研究分野：細菌学、ゲノム生物学

キーワード：ファージ 腸内細菌 多様性 細菌叢破綻

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含めた動物の腸内細菌叢の研究は、次世代シーケンサー(NGS)の登場により大きく変化した。ヒト腸内細菌は、*Bacteroides* 属、*Prevotella* 属および *Ruminococcus* 属がそれぞれ多い、3つのエンテロタイプに分かれること (Arumugam *et. al.*, Nature. 473:174-180. 2011)、更に、それらエンテロタイプは長期間の食事に依存すること (Wu *et. al.*, Science. 334:105-108. 2011)が明らかとなってきた。これまで、細菌叢解析では、1) 16S rRNA 遺伝子を大量に解読する方法、2) 全 DNA を解読する網羅的解析法 (メタゲノム解析法) の2手法で行われているが、それぞれに利点・欠点が存在する (表1)。特に、メタゲノム解析法においては、完全な腸内細菌叢を解明するための情報量が不足していることが要因である。NIH Human Microbiome project の一環で、各細菌種のゲノム配列解読はされているが、数株の解読で終わっているものが大部分である。従って、現状では、細菌叢解析において株レベルでのクローンの存在比率を解析することは非常に困難である。

表1 NGSを用いた細菌叢解析手法の比較

	1) 16S rRNA 遺伝子解析	2) 全DNA網羅的解析法 (メタゲノム解析法)
利点	<ul style="list-style-type: none"> 解析が比較的容易 ゲノムが解読されていない細菌種の組成も把握可能 	<ul style="list-style-type: none"> 多種多様な遺伝子配列を検出可能 種レベルの解析を行うことが可能[3][4]
欠点	<ul style="list-style-type: none"> プライマーがアニールしない細菌種の同定は不可 16S rRNA 遺伝子以外の配列情報は取得不可 種レベルでの解析は困難 	<ul style="list-style-type: none"> データベースに対して相同性を持たない配列が多数存在 登録されている参照ゲノム配列の情報量不足

健康者と炎症性腸疾患(IBD)患者の腸内細菌叢比較により、IBD、特に潰瘍性大腸炎(UC)では、*Rhodococcus* 属や *Escherichia* 属細菌の存在比率の上昇および *Bacteroides* 属細菌の減少が報告されている (Sasaki and Klapproth, J Signal Transduct. 704953. 2012)。Norman らは、16S rRNA 遺伝子による細菌叢解析と、糞便検体からファージ粒子を回収し、全ファージ(phageome)もしくは virome)解析を行った。その結果、IBD では細菌叢の多様性が減少し、ファージの種類が上昇している傾向が高いことを示した(図1)(Norman *et. al.*, Cell. 160(3):447-60. 2015)。これは、ファージの存在と IBD との関係が示された最初の報告である。これまでは、細菌叢主体で考えられており、16S rRNA 遺伝子を主体とした解析が大部分であり、ファージの解析を行うことは不可能であった。また、全メタゲノム解析による IBD の細菌叢解析も報告はあるが、相同性検索でヒットした配列が細菌ゲノム由来か、ファージ領域かを特定することが困難であった。

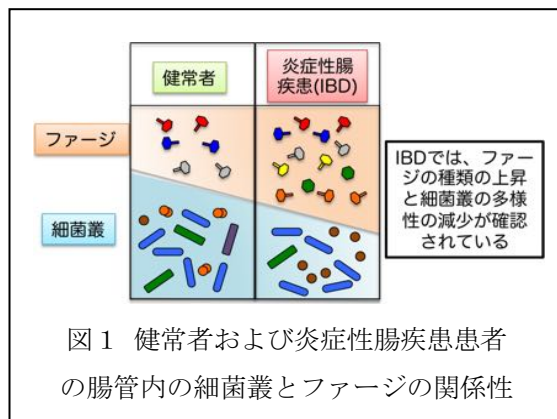


図1 健康者および炎症性腸疾患患者の腸管内の細菌叢とファージの関係性

2. 研究の目的

炎症性腸疾患(IBD)の発症機序の1つとして、腸管内でのバクテリオファージによる腸内細菌の溶菌、それに続く菌体内からの抗原の露出により、炎症が惹起されることが想定される。IBD を含む dysbiosis が生じる腸管疾患を理解する上で、ファージと細菌叢との関係性を明確にする必要が有る。本研究は、ファージが引き起こす腸内細菌叢破綻メカニズムに関する研究である。本研究では、簡便にファージを回収する手法を確立し、健康者および潰瘍性大腸炎 (UC) 患者の治療前後の腸内の全バクテリオファージ解析(phageome 解析)と細菌叢の多様性解析を行い、ファージにより溶菌される細菌叢中の主要細菌とそのファージを特定し、ファージによる腸内細菌叢破綻メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

糞便中のバクテリオファージは、糞便を SM buffer 及び SM-plus buffer に懸濁後、20%糞便乳剤を作成し、0.22 μ m のフィルターにて濾過した。得られた濾液の半量は MetaPolyzme 及びククロホルム処理を行ない、その後 DNase I (TAKARA)にて処理後、ポリエチレングリコール沈殿を行なった (図2)。回収したサンプルは ZR Fecal DNA Prep Kit (ZYMO RESEARCH)を用いて DNA を精製した。QIAseq FX にて DNA ライブラリーを作成後、Illumina NextSeq2000 にて配列解読を行なった。解読配列は、アダプター配

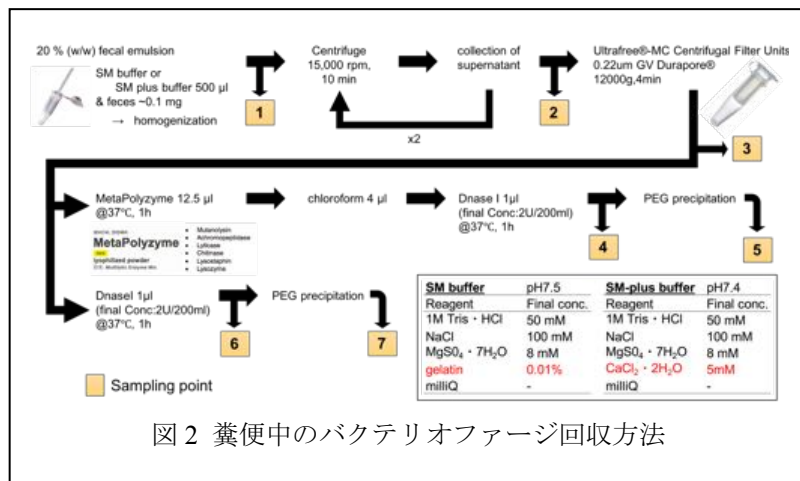


図2 糞便中のバクテリオファージ回収方法

列及びクオリティが低い領域をトリミング後、A5-miseq (Coli *et. al.*, Bioinformatics. 31(4):587-9. 2015)を用いた *de novo assemble* を行なった。メタゲノム解析には、塩基配列レベルの解析では MePIC2 (Takeuchi *et. al.*, Jpn J Infect Dis. 67(1):62-5. 2014)、アミノ酸配列レベルでは rapsearch v2.16 (Ye *et. al.*, BMC Bioinformatics. 12:159. 2011)を用いて行った。メタゲノム解析のデータベースは、nt, nr および、phagome 解析のため、NCBI Virus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/>)および PHAST (<http://phast.wishartlab.com/>) (Zhou *et. al.*, Nucleic Acids Res. 39:W347-52. 2011)を統合したカスタムデータベースを作成し、使用した。メタゲノムの比較解析では、LEfSe (Segata *et. al.*, Genome Biol. 12(6):R60. 2011)、R パッケージの *vegan* を用いて行った。統計解析は、ウィルコクソン順位和検定にて行った。ファージ感染実験は、嫌気条件下で糞便乳剤を作成し、回収したファージを添加し、嫌気条件下で 37°C インキュベーションを行なった。また、*Bacteroides* 属細菌を糞便よりバクテロイデス培地(ニッスイ)にて培養し、変法 GAM ブイヨン(ニッスイ)に懸濁後、上記と同様に行なった。インキュベーション後、DNA を精製し、メタゲノム解析にて比較を行なった。

4. 研究成果

1) 糞便中のファージ回収法の確立

図2で示した手法にて健常人の糞便よりファージ画分を回収し、メタゲノム解析を行い、*de novo assemble* にて contig 配列を作成した。得られた contig を長さ と read depth でプロットを行い、各 contig をファージゲノムデータベースに対して塩基配列による相同性検索を行った (図3)。糞便乳剤では、長い contig 配列は得られず、細菌ゲノム由来の contig を多く含んでいた。一方、糞便乳剤を遠心し、上清を回収しただけでも、長い contig 配列が作成され、塩基配列レベルでの相同性解析の結果、ファージ様配列であることが明らかとなった。0.22 μ m フィルターにて濾過したサンプルでは、細菌ゲノム由来の配列がさらに減少し、ファージ様配列が濃縮される傾向を示した。酵素およびクロロホルム処理を実施したが、細菌ゲノム由来の配列の顕著な現象は認められず、また、ポリエチレングリコール沈殿を行なった際、ファージ用配列の回収量が減っていた。更に、乳剤を作成する際に使用したバッファーは、ゼラチンが含まれる SM buffer (Cold Spring Harb Protoc 2006.)ではゼラチンを含まない SM-plus buffer (Kleiner *et. al.*, BMC Genomics. 16(1): 7. 2015)よりもファージの回収量が低くなる傾向を示した。両 buffer は、一般的なファージ実験で使用されるものだが、糞便からのファージ回収には、SM-plus buffer が至適であることが示唆された。以上の結果より、phageome 解析には、SM-plus buffer にて糞便乳剤を作成し、遠心後の上清を 0.22 μ m フィルターにて濾過することとした。

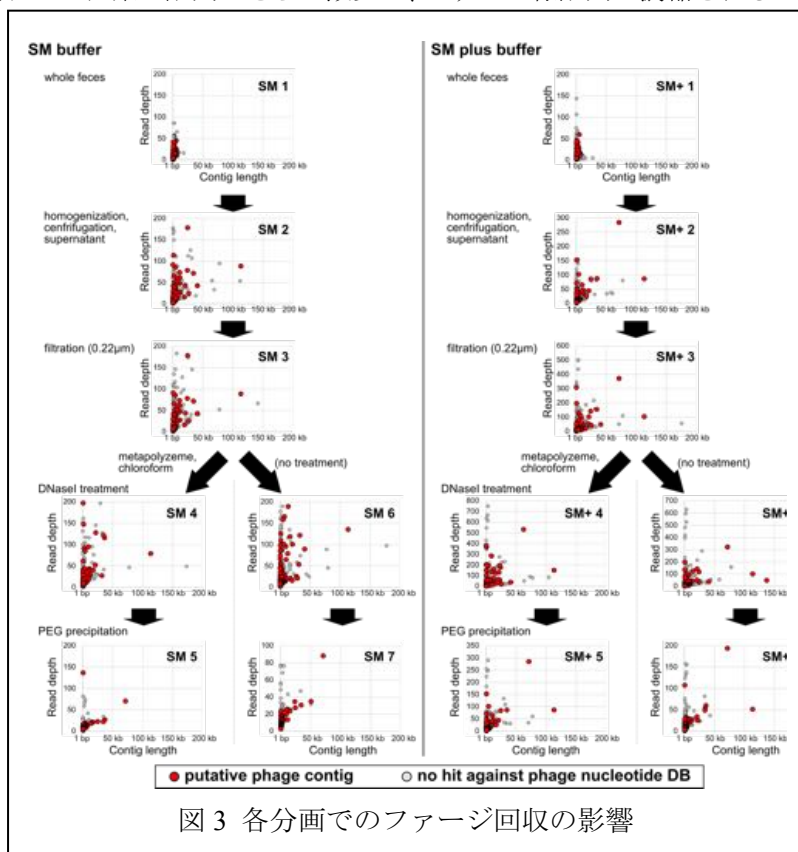


図3 各分画でのファージ回収の影響

2) 健常人糞便中のファージゲノム解析および phageome 解析

上記で得られた結果より、ファージゲノム解析を行った。最長 contig から上位 6 配列の ORF 抽出を行い、ファージデータベースに対してアミノ酸配列での相同性検索を行った。塩基配列レベルではヒットが認められなかった contig においても、ファージで認められるアミノ酸配列に対して相同性を示すものが確認された (図4)。この結果から、少なくとも解析に用いたこれら配列は、ファージゲノム配列である可能性が強く示唆された。また、細菌ゲノムのデータベースに対して検索をかけたところ、*Bacteroides* 属細菌および Firmicutes のアミノ酸配列に高い相同性を示す ORF が認められ、Contig 2 および 5 は、*Bacteroides* 属細菌に、Contig 6 は Firmicutes の細菌に感染するファージであることが強く示唆された。Contig 1, 3 および 4 においては、新規ファージゲノムであることが予想された。

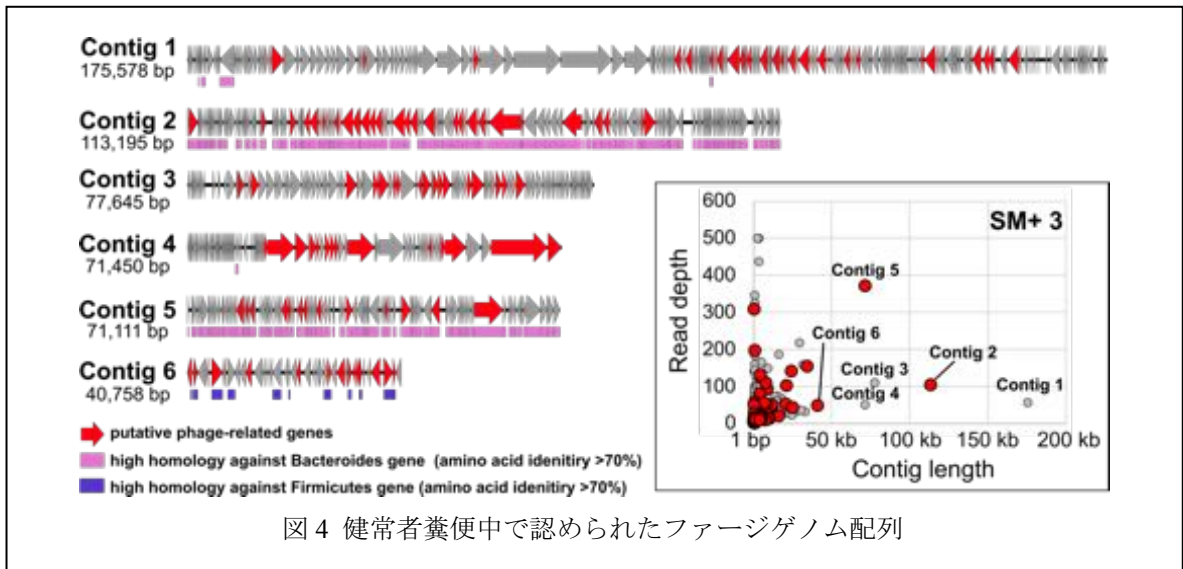


図4 健康者糞便中で認められたファージゲノム配列

phageome 解析では塩基配列による相同性解析よりもアミノ酸配列による検索が至適であることが認められたため、rapsearch v2.16にて解析を行った(図5)。糞便乳剤では *Siphoviridae* に属するファージが多く検出され、細菌ゲノム中のプロファージが多く含まれていたことが示唆される。一方、ファージ粒子を回収した場合には、unclassified Viruses に属するファージが多くを占めていた。これらは、上記のファージゲノム配列では Contig 5 に該当しており、未だ分類学的に不明なファージではあるものの、健康者糞便中には *Bacteroides* 属細菌に感染するファージが多く存在することが示唆された。

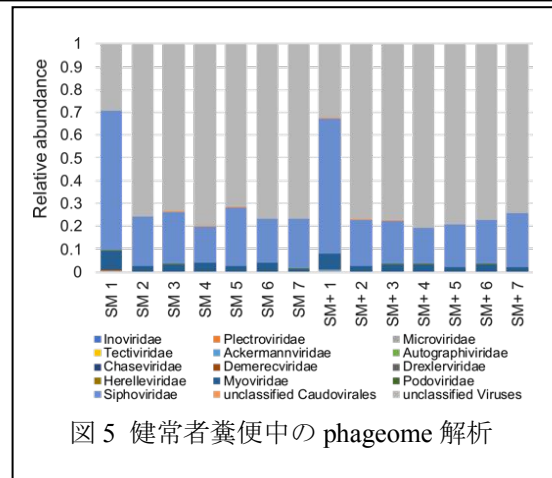


図5 健康者糞便中の phageome 解析

3) 健康者糞便中のメタゲノム解析および phageome 解析

UC 患者(n=32)の抗菌薬多剤併用療法(ATM/AFM 療法)前後のメタゲノム解析を行った(図6)。32名中、17及び8名が3ヶ月後に寛解及び有効となり、7名は有効性を示さなかった。抗菌剤投与前、治療中2週間以内および治療後2週間以上では、細菌叢が異なる組成を示すことが明らかとなり、腸管内の炎症状態を示す Mayo score とも相関を示した。治療前後で変動が認められた細菌種を比較したところ、治療前の活動期では、*Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Rickenella*, *Clostridium* 属細菌の比率が増加しており、治療後の寛解期では、*Bifidobacterium* 及び *Lactobacillus* 属細菌の比率が顕著に増加していることが明らかとなった(図7)。

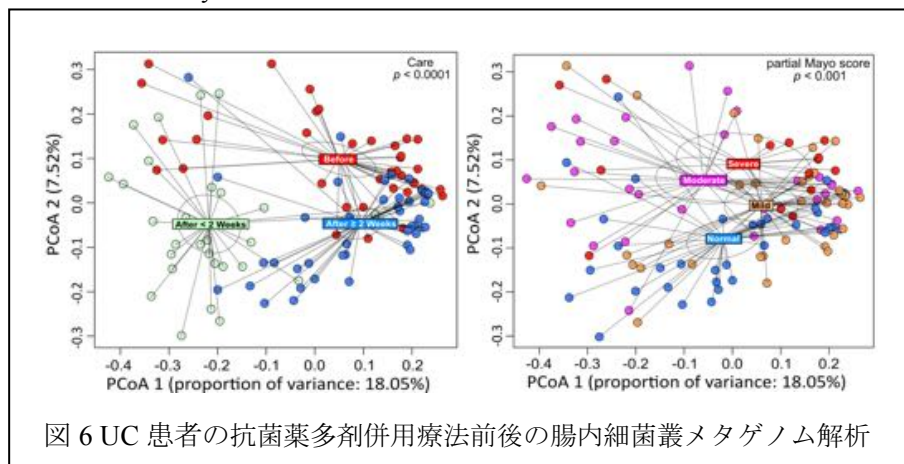
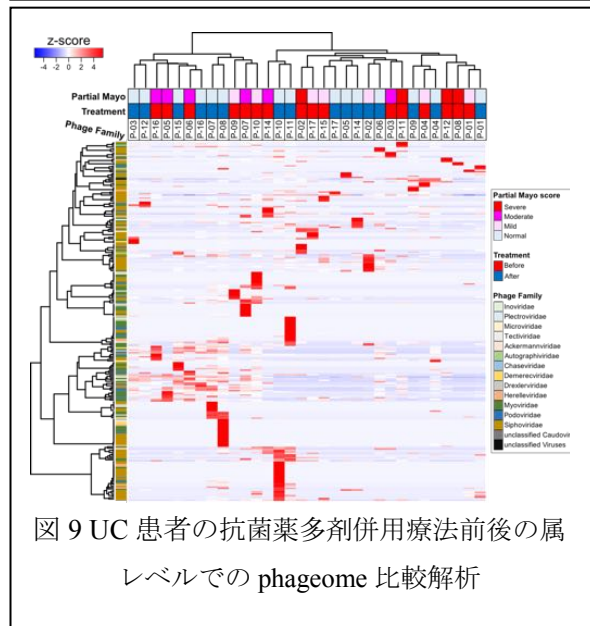
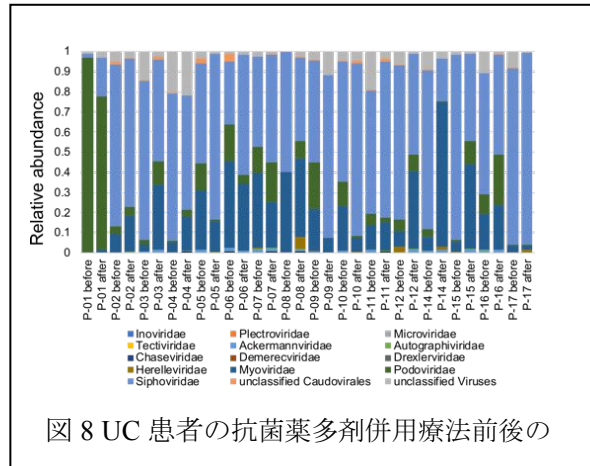
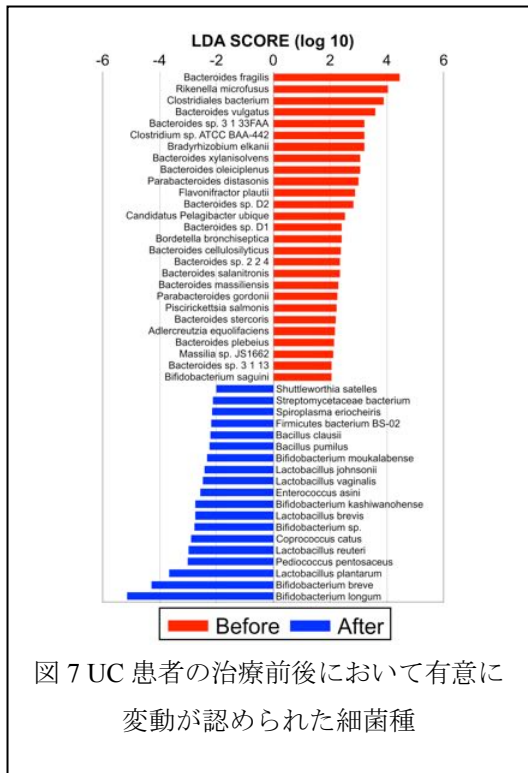


図6 UC 患者の抗菌薬多剤併用療法前後の腸内細菌叢メタゲノム解析



phageome 解析は、16 名の抗菌薬多剤併用療法により寛解となった患者の治療前後の試料を用いて実施した。各患者で、治療前後でファージの組成に変化が認められることが明らかとなった (図 8)。しかしながら、共通して治療前後で増減するファージの存在は、科レベルにおいて、統計的に有意なものは認められなかったが、unclassified Viruses に属するファージは治療前で多く存在する傾向を示した。更に、属レベルでの phageome 比較解析を行ったところ、ファージの組成は大きく 2 系統に分類されたものの、治療前後および臨床所見には相関が認められなかった (図 9)。しかしながら、各患者において、治療前後でファージの組成が大きく変動していることが明らかとなった。ファージ組成としては、細菌叢と同様な治療前後での共通項は認められないものの、活動期に存在していたファージが治療により大きく変動することで、細菌叢の破綻が生じにくくなり、寛解に向かった可能性と、治療により細菌叢が変化することで、存在するファージも同時に変動した可能性が示唆される。

4) 糞便中ファージの腸内細菌叢および Bacteroides 属細菌への感染実験

UC 患者の治療前糞便検体より回収したファージを混合し、カクテルとして、健常者糞便乳剤に添加し、UC 患者に存在していたファージの増殖を試みた。また、Bacteroides 属細菌を健常者糞便より培養後、ファージカクテルを接種し、感染実験を試みた。メタゲノム解析の結果、UC 患者に存在していたと示唆される有意なファージの増加は、どちらの条件でも認められなかった。これは、UC 患者より回収したバクテリオファージは、感染性が失われていたか、今回供試した糞便中の細菌にはバクテリオファージが感染を成立させるための宿主が存在していなかったことが示唆された。大部分のファージは、宿主域が非常に狭いことも報告されており、本研究でも同様な傾向を示していたことが予測される。

内視鏡による IDB の診断は的確なものではあるが、侵襲性が完全には言い切れない。本研究により、糞便中の細菌およびファージ組成の変化をメタゲノム解析することで、UC 患者の寛解維持の状態を把握できる可能性が予想され、より侵襲性の少ない、メタゲノム解析手法を用いた経過観察を行うための基盤的研究となったと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関塚剛史, 加藤公敏, 杉山敏郎, 大草敏史, 黒田誠
2. 発表標題 抗菌薬多剤併用療法後の潰瘍性大腸炎寛解時における腸管内細菌叢の特徴
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関塚剛史, 加藤公敏, 黒田誠, 大草敏史
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎患者由来Fusobacterium varium Fv113-g1株のゲノム・トランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第22回腸内細菌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関塚 剛史, 大草 敏史, 黒田 誠
2. 発表標題 完全長ゲノム配列解析による潰瘍性大腸炎患者より分離されたFusobacterium varium Fv113-g1株の特徴
3. 学会等名 第91回日本細菌学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	黒田 誠 (Kuroda Makoto)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	大草 敏史 (Ohkusa Toshifumi)		
研究協力者	加藤 公敏 (Kato Kimitoshi)		