

平成 30 年 4 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15289

研究課題名(和文)炎症性腸疾患の病態を修飾する腸内ウイルス叢を解明するメタゲノム解析

研究課題名(英文)Metagenome analysis of intestinal virome in inflammatory bowel disease patients

研究代表者

飯田 宗穂 (IIDA, Noriho)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40705604

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)：炎症性腸疾患であるクローン病と潰瘍性大腸炎においては、腸内細菌叢の変化に伴い、炎症の制御に異常を来している。健常者、潰瘍性大腸炎患者、クローン病患者の便細菌叢の解析ではクローン病や潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢は、健常者と比べ、有意に異なる細菌種やウイルスを含むことが判明した。これらの微生物叢を含む患者便または健常者便をIL10欠損マウスに移植した。結果、腸炎の病理学的スコア、腸管組織の炎症性サイトカインtnf、il6、il1bの発現は有意に炎症性腸疾患便移植群が高いことが判明した。以上のことから、炎症性腸疾患患者の変化した微生物叢は、腸炎を増悪させる働きがあると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory bowel diseases including Crohn disease (CD) and ulcerative colitis (UC) reveal dysbiosis of gut flora and dysregulation of inflammation in the colon. Gut microbiota of CD or UC patients contained significantly differential bacterial species and virus compared with healthy donors according to metagenome analysis. IL10-deficient mice transplanted with feces of UC, CD patients showed more severe inflammation in the colon and higher expression of inflammatory cytokine including tnf, il6 and il1b than the mice transplanted with feces of healthy donors. Taken together, it is suggested that the dysbiotic gut microbiota of inflammatory bowel disease patients exacerbates colitis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患

#### 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患であるクローン病と潰瘍性大腸炎においては、腸内細菌叢の変化に伴い、炎症の制御に異常を来している。抗菌薬投与が炎症を改善させることがあり、細菌叢と炎症の因果関係を支持する(1)。しかし、炎症性腸疾患患者便と健常者便を比較したときに、腸内細菌属の組成の変化は2%であったのに対し、細菌の遺伝子のパスウェイ解析による変化は12%であったと報告された(2)。つまり、炎症性腸疾患患者では、細菌の種類の変化のみを把握しても病態の理解には不十分であり、細菌が持つ遺伝子の内容の変化を把握し細菌の機能の異常を知る必要があると言える。ところが、抗菌薬耐性遺伝子や膜輸送、糖、脂質、アミノ酸代謝、さらにゲノムの複製や修復といった細菌の重要な遺伝子の一部は、バクテリオファージが運ぶ遺伝子であり、ファージの異常が腸内細菌叢の異常につながり、炎症の制御の破綻を招いている可能性があると思われる。

#### 2. 研究の目的

このことから、炎症性腸疾患の腸内細菌叢の機能異常を解明するためには、細菌由来の遺伝子解析のみでは全貌を明らかにすることはできず、ファージを含めたウイルス叢の解析が不可欠であると考えられる。本研究では、未だ解明されていない炎症性腸疾患患者の腸内ウイルス叢を解明することで、腸内微生物叢の機能異常を把握し、炎症性腸疾患の炎症の基盤にある病態に迫ることを目的とする。

#### 3. 研究の方法

健常者、潰瘍性大腸炎患者、クローン病患者から同意を得て便を採取した。細菌内部に存在するファージでウイルス粒子の出芽が頻回に行われないものを解析するには、便から直接にDNAを抽出しショットガンシーケンシングを行う必要がある。Illumina社の専用試薬を用いてDNAライブラリ作成を行い、Miseqにてシーケンシングを行った。

得られたリードからMetaVirを用いてアセンブリを行わないリードからウイルス種の推定を行う解析を行った。また存在する細菌種の同定を行うためにMetaphlan2を用いた細菌種の同定も行った。

さらに、特定の細菌やファージを含む便が腸炎を生じる原因となりうるかを検討するために、IL10-/-マウスに便を移植し腸炎を評価した。IL10-/-マウスは自然に腸炎を発症するモデルであり、ヒトの炎症性腸疾患感受性遺伝子1つと考えられるIL10を欠損したマウスである。便を移植したマウスは28日目に安楽死させ、大腸の病理を組織学的に評価し、また腸管から抽出したRNAを用いてサイトカイン発現を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 潰瘍性大腸炎・クローン病患者便の腸内細菌叢の解析

健常者13名、潰瘍性大腸炎患者17名、クローン病患者8名の便を採取しDNA抽出を行った。DNA抽出は0.7mmガーネットビーズでは品質レベルの低いDNAが採取された。そのため、0.1mmガラスビーズに代えて抽出を試みたところ品質レベルの高いDNAが採取できた。Illumina社のNexteraにてライブラリ作成を行った。品質の悪いDNAはNexteraの酵素反応に耐えられずライブラリが作成できなかったが、ガラスビーズにて抽出したDNAではライブラリ作成に成功した。

Illumina社のV3キット600bpを用いてシーケンシングをpair-endにて行った。得られたリードからquality control、ヒトゲノム配列リードの除去、PCR複製の除去を行った。各サンプル100万リード以上が得られた。潰瘍性大腸炎患者便にはヒトリードを50%以上含む検体が2つ存在した。腸炎の激しい症例では脱落した腸管粘膜を便中に多数含むと考えられ、そのような症例ではヒトDNAをリード中に多く含む可能性がある。これら2例は除外し解析を進めた。

まずは、便中に含まれている細菌種の理解のために、Metaphlan2を用いて細菌種の同定を行った。クローン病と健常者の細菌叢比較のために線形判別解析を行った。2群間で有意に異なる細菌種( $P < 0.05$ )を検討したところ、クローン病に多かったのが*E.coli*、*Bacteroides dorei*、*Bacteroides uniformis*、*Alistipes putredinis*であった。一方でクローン病に少なく健常者に多かったものとして*Collinsella aerofaciens*、*Ruminococcus obeum*、*Dorea longicatena*が挙げられた。さらに潰瘍性大腸炎患者と健常者の腸内細菌叢の比較も同様に行った。潰瘍性大腸炎患者腸内細菌で健常者に比し多く見られたのは*Bacteroides vulgatus*、*Streptococcus gordonii*、*Veillonella parvula*であった。さらに潰瘍性大腸炎患者に少なく健常者に多かった菌種は*Eubacterium rectale*、*Collinsella aerofaciens*、*Subdoligranulum*であった。クローン病や潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢は、健常者と比べ、有意に異なる細菌種を含むことが本研究の検体でも明らかになった。

##### (2) 腸内ウイルス叢の解析

引き続き、これらの便中の細菌叢の含まれるウイルス叢・ファージの情報を得るべく、前述の得られたリードをMetavir2で解析し含まれるウイルスについて検討した。

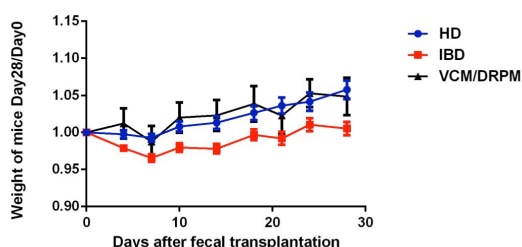
クローン病患者に多く含まれ健常者に少なかったウイルスとして、Podoviridae科のウイルスが挙げられた。PicovirinaeやEpsilon15like virusはクローン病患者で多く含まれる検体が見られた。潰瘍性大腸炎患者に置いてPodoviridae科のウイルスが健常者に比して多く含まれる検体が多かった。しかしながらクローン病群、潰瘍性大腸炎群、健常者群として群間比較を行ったときに明確なクラスタリングの傾向が見られなかった。一部特徴的に見られた上記のウイルスについては文献でも病理学的、生理学的な意味合いについて未だよく分かっていなかった。そこで、これら細菌種やウイルスを含む腸内微生物叢が、腸炎に因果関係を持つかどうかという観点で機能性を調べる実験に移行した。

### (3) 潰瘍性大腸炎・クローン病患者腸内微生物叢と腸炎の因果関係を調べるマウス実験

腸炎を自然発症するIL10欠損マウスを準備した。IL10はGWASによる炎症性腸疾患患者のSNP解析においても欧米では炎症性腸疾患の感受性遺伝子の1つとして挙げられる遺伝子であり、IL10欠損マウスはヒト炎症性腸疾患の良いモデルマウスである。IL10欠損マウスの腸内細菌叢を抗菌薬ドリペネムとバンコマイシンにて予め除菌を行った。菌量は1000分の1以下に減量され除菌は十分に行われたことを事前に確認した。その上で、潰瘍性大腸炎患者便、クローン病患者便、健常者便をそれぞれ、マウスに移植し腸炎の発症、増悪について観察を行った。

まず体重について観察を行ったところ、炎症性腸疾患便移植群 (IBD) は健常者便移植群 (HD) や、抗菌薬内服群 (VCM/DRPM) に比較し体重増加に乏しいことが判明した。

図 1



炎症性腸疾患便移植群が体重増加に乏しい原因として腸炎が増悪していることが予想され、確認のために便移植28日目に安楽死させ、大腸の病理について組織学的に評価を行った。腸炎の病理学的スコアは有意にIBD群が高く、腸炎の増悪に伴う体重増加の抑制であることが判明した。

腸炎と関連する炎症性サイトカインについて、同じ大腸から抽出したRNAを用いてリアルタイムPCRにて評価を行った。炎症性サイトカインであるtnf、il6、il1b、さらにil17a、il12bといったT細胞のTh17やTh1分化に関わるサイトカインも、健常者便移植マウスと比較し、炎症性腸疾患便移植マウスで発現が上昇していた。以上のことから、炎症性腸疾患患者の微生物叢は、マウスにおいて腸炎を増悪させる働きがあり、細菌叢とウイルス叢の変化を含む微生物叢の変化が腸炎に因果関係を持つことが判明した。

### (4) 腸炎に因果関係を持つ特定のウイルス・細菌種の同定

次に具体的に腸炎に因果関係を持つ特定のウイルスや細菌種を同定する段階に入った。これについて文献的考察も含めて検討を行ったが、本研究の被験者集団からは有意な特定の菌種やウイルスを推定できなかった。この解決手段として、被験者の症例数を増加させNを増やすことで特定の因果関係を持つ微生物の同定を行いたいと考えている。

### (5) 結語

潰瘍性大腸炎、クローン病という炎症性腸疾患の患者腸内微生物叢は、健常者と異なる細菌種、ウイルスを含む。この異なる腸内微生物叢はマウスにおいて腸炎を再現することができ、炎症との因果関係を持つ。この微生物叢の中で特に炎症と関連の深い特定の菌種やウイルスを同定することで治療法につながると思われた。

### <引用文献>

- (1). C. Manichanh, N. Borruel, et al. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**, 599 (Oct, 2012).
- (2). X. C. Morgan et al., *Genome Biol* **13**, R79 (2012).

### 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 1 件)

Jun Seishima, Noriho Iida, Shuichi Kaneko. 「Identification of colitis-associated bacteria in intestine of inflammatory bowel disease patients」 The 13th Congress of European Crohn's and Colitis Organization 平成 30 年 2 月、ウィーン、オーストリア

〔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

飯田 宗穂 (IIDA, Noriho)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40705604

##### (2) 研究分担者

北村 和哉 (KITAMURA, Kazuya)

金沢大学附属病院・助教

研究者番号：00579633

##### (3) 連携研究者

該当なし

##### (4) 研究協力者

該当なし