

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460961

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた潰瘍性大腸炎病原ウイルスの同定

研究課題名(英文) Identification of the pathogenic virus of ulcerative colitis using the next-generation sequencing technology

研究代表者

松岡 克善 (Matsuoka, Katsuyoshi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：40307393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎の原因は不明である。次世代シーケンサーは、既知の塩基配列情報を必要とせず塩基配列を決定可能なため、未知の病原ウイルスの同定に用いられている。本研究では潰瘍性大腸炎の病因として未知のウイルスを想定し、これを同定することを目的とした。

潰瘍性大腸炎患者より大腸粘膜組織を採取し、次世代シーケンサーで網羅的に塩基配列を決定した。ヒトや細菌などの塩基配列情報を除去し、相同性解析からウイルス配列を抽出した。1サンプルあたり300以上のウイルス配列が得られた。主なものは、Human endogenous retrovirus, Stealth virusに類似した配列であった。

研究成果の概要(英文)：The cause of ulcerative colitis is unclear. Because the next-generation sequencer can determine nucleotide sequence without needing known base sequence information, it is used for identification of unknown pathogenic viruses. In this study, an unknown virus is assumed as the etiology of ulcerative colitis and was intended to identify this.

Colonic mucosal samples were obtained from patients with ulcerative colitis. Nucleotide sequence was determined with a next-generation sequencer. Human and bacterial nucleotide sequence was removed and virus nucleotide sequence was extracted on homologous analysis. More than 300 virus sequences per 1 sample were identified. The most frequently identified sequences were those similar to Human endogenous retrovirus, and Stealth virus.

研究分野：医歯薬学

キーワード：潰瘍性大腸炎 次世代シーケンサー ウイルス

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎は慢性に経過する難治性大腸炎である。我が国の患者数は増加し続けており現在 13 万人を超えている。特に 20~30 歳代に患者発症のピークがあるため、就学や就労に支障をきたし社会的影響も極めて大きい。本疾患は原因が解明されていないが、病因として自己免疫・ウイルス・腸内細菌叢の異常などが考えられている。一方で、潰瘍性大腸炎という診断であっても、臨床経過、薬剤への反応、内視鏡像などは様々であり、単一の病因による疾患ではない可能性もあり、その中にはウイルス性慢性腸炎も存在していると考えられる。本研究では、潰瘍性大腸炎病原ウイルスを同定することを目的としている。

潰瘍性大腸炎が輸血やその他の経路により直接に感染したとの報告はないが、ウイルス感染症であることを臨床的に示唆する所見が数々認められる。例えば、1. 家族内発症例があること、2. 高 IgG 血症がしばしば見られること、3. 腸管局所で著しい IgG 型のプラズマ細胞浸潤が認められること、4. 各種のウイルス感染症の際に出現する異型リンパ球がしばしば末梢血中に出現すること、などである。ウイルス感染症として outbreak のような伝播形式を示さないのは、遺伝的に感受性のある宿主しか病気を引き起こさないと考えれば説明可能である。実際、潰瘍性大腸炎には様々な疾患感受性遺伝子が報告されている。

潰瘍性大腸炎の病因を考える上で手がかりとなる事実として、1. 潰瘍性大腸炎は必ず直腸から病変が口側に進展、2. 病変部と非病変部の境界が明瞭、の 2 点が挙げられる。潰瘍性大腸炎は病変範囲により直腸炎型(炎症が直腸に限局)、左側大腸炎型(炎症が直腸から下行結腸までに限局)、全大腸炎型(大腸全てに炎症が起こる)に分類される。いずれの場合であっても、直腸から連続性に口側に病変が拡がることが知られており、病変部と非病変部の境界は非常に明瞭である。このことは、直腸親和性のウイルスが直腸に炎症を起こし、徐々に口側に進展していくと考えると理解可能である。また、疫学的には、潰瘍性大腸炎の患者数は食事の西洋化に伴って増加することが知られており、有病率は現在白人で最も高く、アジアでは日本でまず患者数が急増してきており、最近では韓国・中国で患者数が増えてきている。特に牛肉の摂取量と患者数の増加が比例する。このことも、牛肉や牛乳中に未知のウイルスが存在し、そのウイルスに対する感受性を持つ宿主において潰瘍性大腸炎が発症するという説で説明することができる。

次世代シーケンサーは、近年急速に進歩したシーケンス技術であり、サンガー法によるシーケンサーとは異なり、既知の DNA 配列に対する primer を設定することなく、大量の DNA 配列が一度に決定可能である。この特徴

を活かして、近年では次世代シーケンサーは未知ウイルスの同定法として最も強力な方法となっている。

2. 研究の目的

本研究では、潰瘍性大腸炎の病因として未知の腸炎ウイルスを想定し、潰瘍性大腸炎患者検体より次世代シーケンサーを用いて、潰瘍性大腸炎病原ウイルスを同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 対象症例: 厚生労働省炎症性腸管障害に関する調査研究班による潰瘍性大腸炎診断基準によって診断された潰瘍性大腸炎患者を対象とした。下部消化管内視鏡検査を実施時に、炎症部位から大腸粘膜組織 1 片を生検鉗子で採取した。採取した組織は RN later に入れ、-30℃ で保存した。

(2) DNA/RNA 抽出: Dry Bead Tube で組織を破碎し、Qiagen Allprep DNA/RNA mini kit を用いて DNA/RNA を抽出した。

(3) 次世代シーケンサーによる塩基配列決定: 抽出した RNA は cDNA に変換した。cDNA および DNA を断片化し、アダプターライゲーションを行い、アダプターをプライマーとした PCR によってライブラリー化した。得られたライブラリーを MiSeq (Illumina 社) によってシーケンスを行った。

(4) ウイルス塩基配列の抽出: 次世代シーケンサーで解析した塩基配列をヒトのリファレンス配列に配置し、マッチした塩基配列を除去する。続いて微生物のリファレンス配列を用いて、同様に微生物の塩基配列を除去する。残った塩基配列をさらに Mega BLAST および BLASTN を用いて配置し、マッチした塩基配列を除去した。残った塩基配列を、BLASTN と BLASTX のウイルス塩基配列に配置し、塩基配列の再構成を行った。

(5) 倫理的考慮: 本研究は慶應義塾大学医学部および東京医科歯科大学医学部倫理委員会にて承認を得た。患者からは文書による同意を得た。

4. 研究成果

(1) 対象症例: 同意を得た 8 名から大腸粘膜組織を採取した (表 1)。炎症部位より組織を採取した。8 名のうち、男性 5 名、女性 3 名で、平均年齢は 34 歳、平均罹病期間は 5.4 年であった。Mayo endoscopic sub-score は、3 が 5 例、2 が 3 例であり、全例中等症以上の重症度を有していた。臨床的重症度は、partial Mayo score で 4~8 点であった。血液中の CRP 値は平均 1.8 mg/dl (0.02~5.9)、ヘモグロビン値は平均 13.1 g/dl (8.1~15.4) であった。治療としては、プレドニン 5 例、インフリキシマブ 2 例、タクロリムス 1 例であった。

	年齢	性別	罹病年数	罹患範囲
1	31	男	1	遠位
2	73	男	4	左側
3	25	男	2	全
4	33	女	6	全
5	25	女	7	全
6	20	女	1	全
7	40	男	12	全
8	24	男	10	全

(2) 検出されたウイルス：次世代シーケンサーによって、1 サンプルあたり約30万リードの塩基配列を得た。検出された主なウイルス塩基配列を表2に示す。

ウイルス塩基配列	陽性率 (%)	平均リード数
Human endogenous retrovirus H HERV-H/env60 proviral copy	100.0%	223
Human endogenous retrovirus HERV-K(I) DNA, complete sequence	100.0%	146
Epstein-Barr virus/human cellular DNA left junction from	100.0%	124
Human endogenous retrovirus HML6 proviral clone HML6p	100.0%	112
Human endogenous retrovirus clone ERV FTD putative	100.0%	122
Stealth virus 1 clone C16128 T3	100.0%	115
Monkeypox virus strain	100.0%	153

USA_2003_039, complete genome		
Human immunodeficiency virus 2 proviral DNA, complete	62.5%	21
Human endogenous retrovirus HERV-K(II) DNA, complete sequence	87.5%	77
SV40 variant genome ev-2102 DNA/African green	100.0%	43
Human papillomavirus type 16 DNA for integration	100.0%	40
HIV-1 isolate PCM039 from Colombia genomic sequence	100.0%	32
Human endogenous retrovirus strain XA38 pol polyprotein	100.0%	37
Human papillomavirus type 16 genes for E6	100.0%	30
Human endogenous retrovirus strain XA34 pol gene	100.0%	34
Lymphocystis disease virus - isolate China, complete	100.0%	21
Stealth virus 1 clone C16128 T7	100.0%	27
Stealth virus 1 clone C16121 T7	75.0%	26
Stealth virus 1	87.5%	64

clone C16121 T3		
-----------------	--	--

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Saigusa K, Matsuoka K, Sugimoto S, Arai M, Kiyohara H, Takeshita K, Mizuno S, Mori K, Nanki K, Takeshita T, Nakazato Y, Yajima T, Naganuma M, Hisamatsu T, Ogata H, Iwao Y, Kanai T. Ulcerative colitis endoscopic index of severity is associated with long-term prognosis in ulcerative colitis patients treated with infliximab. *Dig Endosc*; 査読有, 2016 [in press]

DOI: 10.1111/den.12655.

Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin Immunopathol*. 査読有, 37:47-55, 2015.

DOI:

Matsuoka K, Saito E, Fujii T, Takenaka K, Kimura M, Nagahori M, Ohtsuka K, Watanabe M. Tacrolimus for the Treatment of Ulcerative Colitis. *Intest Res*. 査読有, 13:219-26, 2015.

DOI: 10.1007/s00281-014-0454-4.

Miyoshi J, Hisamatsu T, Matsuoka K, Naganuma M, Maruyama Y, Yoneno K, Mori K, Kiyohara H, Nanki K, Okamoto S, Yajima T, Iwao Y, Ogata H, Hibi T, Kanai T. Early intervention with adalimumab may contribute to favorable clinical efficacy in patients with Crohn's disease. *Digestion*. 査読有, 90:130-6, 2014.

DOI: 10.1016/j.crohns.2013.04.018.

Saigusa K, Hisamatsu T, Handa T, Sujino T, Mikami Y, Hayashi A, Mizuno S, Takeshita K, Sato T, Matsuoka K, Kanai T. Classical Th1 cells obtain colitogenicity by co-existence of ROR t-expressing T cells in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 査読有, 20:1820-7, 2014.

DOI: 10.1097/MIB.000000000000149.

Matsuoka K, Mizuno S, Hayashi A, Hisamatsu T, Naganuma M, Kanai T. Fecal microbiota transplantation for gastrointestinal diseases. *Keio J Med*. 査読有, 63:6-71, 2014.

DOI: 10.2302/kjm.2014-0006-RE.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

松岡 克善 (MATSUOKA, Katsuyoshi)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・講師
研究者番号: 40307393