

炎症性腸疾患における消化管ウイルス叢の解析

飯田 宗穂

金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学 助教（テニュアトラック）

緒言

炎症性腸疾患の病態には腸内細菌叢の構成かつ機能の異常が関与しているが、細菌の遺伝子の一部はファージが運ぶ遺伝子である。そのため炎症性腸疾患における腸内微生物叢の異常を解明するために、ファージを含めた腸内ウイルス叢の解析を次世代シーケンサを用いて行う。得られたファージの情報は将来的にファージ操作により新たなプロバイオティクス製剤を生み出す重要な基盤知識になると考えられる。

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構成が変化していることが知られている。基礎研究において、腸内の一部の細菌が制御性T細胞の誘導や抗炎症性サイトカインIL-10の分泌に関与し、炎症の制御という面から炎症性腸疾患の病態に関与していることが示されている¹⁾。このような腸内細菌叢が持つ炎症性腸疾患における重要性から、腸内に存在する数百種類を超える細菌を次世代シーケンサの技術により網羅的に把握しコミュニティとしての腸内細菌叢を理解し、炎症性腸疾患の病態を把握することが試みられるようになった。

米国の炎症性腸疾患患者の便中細菌のメタゲノム解析においては細菌属の種類の変化は健常者に比し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%であったことが報告されている。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、細菌の運ぶ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。実際に炎症性腸疾患患者の腸内細菌ゲノムで差異が見られたのは、酸化ストレス、炭水化物代謝、アミノ酸生合成、栄養素の輸送といった遺伝子群であった²⁾。

一方、腸内細菌の遺伝子のうち、抗菌薬耐性遺伝子や膜輸送、炭水化物、脂質、アミノ酸、核酸代謝、さらにゲノムの複製や修復といった遺伝子の一部は、バクテリオファージが運ぶ遺伝子であることがマウスモデルから実証された³⁾。

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、日本人を対象として、いま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のメタゲノムを解析することで、腸内微生物叢の機能異常を把握し、炎症性腸疾患の病態に迫ることを目的とする。

実験方法

クローン病患者、健常者の便を採取し、小さいサイズの粒子であるvirus-like particle (VLP) を抽出する。VLPから抽出したDNAを用いて次世代シーケンサを用いてショットガンシーケンシングを行い、ファージデータベースを基にリードを対応させる。得られたシーケンシングデータと炎症性腸疾患患者や健常者の臨床所見の相関を解析する。

対象者として金沢大学附属病院炎症性腸疾患センター・消化器内科を受診したクローン病患者から説明と同意を得て便を採取する。便を用いた観察研究はすでに金沢大学医薬保健研究域倫理審査委員会に承認済みであり、それを基に炎症性腸疾患患者便の採取も開始されている。コントロールとしての健常者の便も同意を得て採取を行う。便は嫌氣的、低温にて運送し、処理するまでは-80度に保存する。

得られた便から過去の報告に従い塩化セシウムの勾配を利用し大きな食物や細菌の粒子を除去し、小さな粒子であるvirus-like particle (VLP) を採取する⁴⁾。VLPからDNAを抽出する。次世代シーケンサは平成25年度末に金沢大学医薬保健研究域に納入が決まっているIllumina社のMiSeqを使用する。VLPから抽出したDNAを増幅した後に、Illumina社の専用試薬を用いてDNAライブラリ作成を行い、シーケンシングを行う。VLPサンプルから得られたリードは、まずエラーのフィルタリングやホストのゲノム配列の除去を行う。その後にはパ

ブリックに利用できるファージのデータベース Phage SEEDや解析のパイプライン Virome を用いて類似の配列の探索を行う。またKEGGデータベースから遺伝子の機能のアノテーションを行いパスウェイ解析を行う⁵⁾。

サンプルごとに得られたファージの種類と、炎症性腸疾患患者または健常者の臨床所見との相関を解析する。

結 果

本研究では、炎症性腸疾患の便ウイルス叢の組成や遺伝子が、健常者と異なることを仮説としている。これを証明するためにクローン病患者4名の便と健常者7名の便からDNAを抽出し、イルミナ社のNextera DNA kitを用いてライブラリの作成を行った。その後、イルミナ

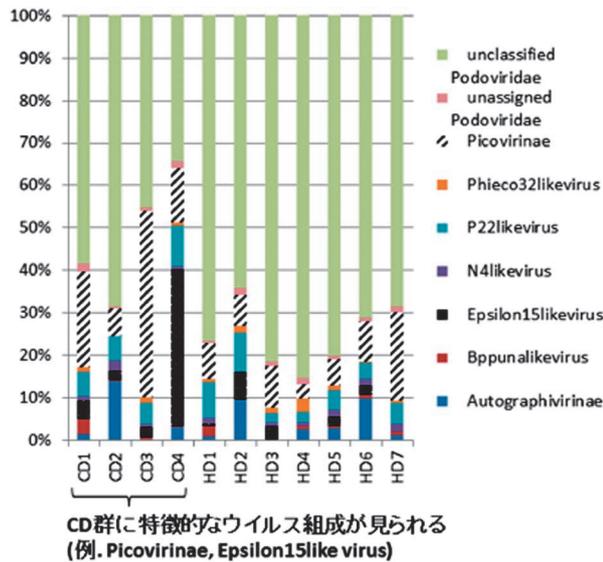


図1 便中DNAのシーケンシングから Podoviridae 科ウイルスの組成を明らかにした

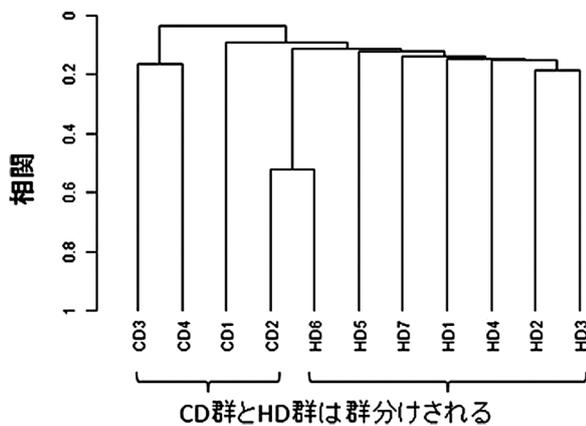


図2 便中ウイルス叢組成からクラスタリングを行った

社の Miseq を用いてシーケンシングを行いペアエンドリードを得た。Quality controlとして qualityの低い塩基を末端から除去し、その後でも qualityの低い塩基がリード中に効率に残ったリードはフィルタリングして除去した。ヒトゲノムのコンタミネーションを除去し、ライブラリ作成時のPCR反応にて生じた duplication read を除去した。このような基本的なリードの前処理を行った後に解析を行った。パイプライン Metavir を用いてそれぞれの検体に存在するウイルスゲノムの存在を同定した。クローン病 (CD) 4例、健常者 (HD) 7例の便中メタゲノムシーケンシングデータを解析した結果を図1、2に示す。図1は便中に豊富な Podoviridae 科の組成を示した図である。クローン病症例では健常者症例に見られないようなウイルス属、種の増加が見られ、たとえば Picovirinae Epsilon15like virus がクローン病に多いウイルスであった。ウイルス叢の組成を用いてクラスタリングを行うと図2のようにクローン病群は健常者群とクラスターが分けられる。このようにクローン群は健常者群と異なるウイルス叢を有すると考えられ、クローン病のマーカーとなる可能性を示唆した。

考 察

炎症性腸疾患患者に対するプロバイオティクスや抗菌薬投与の臨床試験は、持続的な炎症軽快が得られず成功していない。このことから、細菌の種類のみならず細菌の遺伝子を操作するような革新的な治療法が求められている。ファージ療法は発展中の治療法であるが、細菌の遺伝子操作を可能にする治療法である。炎症性腸疾患で減少がみられたファージ遺伝子を持ったファージを細菌に導入し、プロバイオティクスとして治療に用いることが将来的な治療として考えられる。プロバイオティクスは炎症性腸疾患における有用性が試験されてきた歴史がある。マウスあるいはヒト健常者における結果に基づき、炎症性腸疾患患者における Lactobacillus や Bifidobacterium の有効性を検討する臨床試験も行われてきた。しかし、大規模なデザインランダム化対照研究が存在しないため、メタアナリシスではプロバイオティクスの潰瘍性大腸炎やクローン病に対する利益は証明されていない。従来のプロバイオティクスでは炎症性腸疾患の病態を制御するには限界があると考えられる。

本研究では、炎症性腸疾患の消化管内バクテリオファージの持つ遺伝子が、健常者と異なることが証明された。ファージの運ぶ遺伝子は、腸内細菌の働きを担う重要な

遺伝子であることが多い。そのため、ファージの遺伝子の変化を把握することは、腸内細菌叢の機能異常の一端を把握することであり、炎症性腸疾患の病態解明に役立つと考えられる。また、適切な遺伝子を持つファージを細菌に感染させ新たなプロバイオティクスを作成する可能性にもつながり、治療応用にもつながる可能性を持っている。本研究は炎症性腸疾患患者の腸内ウイルス叢プロファイルの同定を通じて、新たなプロバイオティクスの可能性を探索するという点で先進的な治療の基盤となる結果を得た。

要 約

炎症性腸疾患の病態には腸内細菌叢の構成かつ機能の異常が関与しているが、細菌の遺伝子の一部はファージが運ぶ遺伝子である。そのため炎症性腸疾患における腸内微生物叢の異常を解明するために、ファージを含めた

腸内ウイルス叢の解析を行うことが重要となってくる。本研究では健常者便中のウイルス組成とクローン病患者便中のウイルス組成は異なっていることがわかった。クローン病特徴的なウイルスファージが病態とどのように関連しているか、疾患マーカーとして成立するか、さらなる検討が必要と考えられた。

謝 辞

本研究は公益財団法人三島海雲記念財団により助成を頂きました。御礼申し上げます。

文 献

- 1) C. Manichanh, et al.: *Nat. Rev. Gastroenterol Hepatol*, **9**, 599–608, 2012.
- 2) X. C. Morgan, et al.: *Genome. Biol.*, **13**, R79, 2012.
- 3) S. R. Modi, et al.: *Nature*, **499**, 219–222, 2013.
- 4) R. V. Thurber, et al.: *Nat. Protoc.*, **4**, 470–483, 2009.
- 5) A. Reyes, et al.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 607–617, 2012.