

腸内環境の恒常性維持および疾患の進行に
寄与する腸内微生物群集の特徴抽出

西山 拓輝

2020 年

概要

ヒトは腸内や皮膚などに常在している微生物との共生により生命機能を維持している生命体、すなわち「超生命体」であることが、Lederberg によって 2000 年に提唱された (Lederberg, 2000)。実際、この説が提唱されて 20 余年が経過した現在、人体の体細胞数をはるかに超える 100 兆個の多種多様な細菌が腸内にて群集を形成していることが判明している。さらに、これらの腸内細菌は、腸管粘膜の炎症を抑制したり、腸管粘膜の恒常性に有用な代謝産物を提供したりすることでヒトの健康に寄与することが近年の研究により明らかになりつつある。そこで、本研究では、近畿大学医学部附属病院消化器内科と共同研究を行い、塩基配列の大規模データを情報科学技術の活用により紐解くことで、腸内環境の恒常性維持および疾患の進行に寄与する腸内細菌群集の特徴抽出を実施した。さらに、炎症性腸疾患患者の腸内メタゲノムの大規模公開データベースを活用し、炎症性腸疾患患者の腸内微生物群集における溶原性ファージの役割について追究した。

パンクレリパーゼは、高力価のリパーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼを含む膵酵素補充剤であり、慢性膵炎などの患者に対し、膵機能の低下による膵外分泌機能不全の症状を緩和する目的で使用される。本薬剤は、消化吸收を補助することで、膵外分泌機能不全による消化不良に起因する下痢、脂肪便、腹痛などの症状を緩和するとされている。一方で、先行研究では、慢性膵炎患者の腸内における善玉菌が健常者より少ないことが報告されており本疾患の病態に腸内細菌群集が関与しているとされている。これらのことから、パンクレリパーゼは消化不良に加え、腸内細菌の群集構造に作用することで効果を発揮するのではと考えた。

そこで、本研究では、パンクレリパーゼを投与したマウスに対し、腸内細菌を対象とした 16S rRNA アンプリコン解析を実施した。その結果、パンクレリパーゼ投与群とコントロール群のマウスの間で腸内細菌の群集構造が異なることが分かった。また、頻度比較解析により、腸内バリア機能の修復に有用な善玉菌である *Akkermansia muciniphila* などがパンクレリパーゼ投与群にて顕著に多く検出された。これらの結果により、パンクレリパーゼは腸内細菌の正常な群集構造の保持に有益であることが示唆された。

ガンキリンは、7つのアンキリンリピートからなるがんタンパク質であり、大腸炎関連がん、膵臓がん、子宮頸がん、骨肉腫などを含む様々ながんの発生および進行に関与している。特に、大腸炎関連がんでは、炎症性腸疾患による慢性的な腸炎により、ガンキリンの遺伝子発現が亢進され、これにより炎症性サイトカインの発現が増加し、大腸炎関連がんが進行すると考えられている。一方で、共同研究者らが、腸粘膜におけるガンキリンの遺伝子発現を阻害したマウスに対し大腸炎を誘発させた結果、同じく大腸炎を誘発させたコントロール群のマウスより、さらに重度な大腸炎が生じた。本現象における、腸内細菌群集の役割を精査するため、16S rRNA アンプリコン解析を実施した結果、より重度の炎症を示した、ガンキリン遺伝子ノックアウト大腸炎モデルマウス群にて、腸炎の増悪を誘導することが知られている *Helicobacter japonicum* がより多く検出された。これらの結果により、小腸上部におけるガンキリンは、がんタンパク質としての側面を持つ一方で、その発現は健康な腸内細菌群集の組成の維持に必要であることが示唆された。

これまでの炎症性腸疾患の病態における腸内微生物群集の役割を追究してき

た多くの研究では、細菌にのみ焦点が当てられてきた。しかし腸内の細菌に加え、これらに感染するウイルス（ファージ）も、本疾患の病態に関係している可能性が近年の研究により報告されている。ヒト腸内のファージの多くは溶原性だと考えられており、それらの中でも特に *Caudovirales* 目が炎症性腸疾患と関係しているとされている。しかし、腸内の溶原性ファージの大多数は未知であるのに対し、これらの研究の多くでは、既知ウイルスに限定して解析が行われてきた。そこで本研究では、断片的な塩基配列の情報から微生物ゲノムを再構築することで、炎症性腸疾患患者の腸内の溶原性ファージ群集の生態学的構造を既知の微生物ゲノムとの比較に依存しない手法により特徴づけた。その結果、腸内では極めて多様な系統の細菌が活性を保持した溶原性ファージに感染していることが判明した。さらに、活動期の潰瘍性大腸炎患者では、非炎症性腸疾患患者と比較して、善玉菌である *Bacteroides uniformis* および *B. thetaiotaomicron* の頻度が有意に少なく検出されたのに対し、それらに感染する溶原性ファージの頻度は有意に多く検出された。

上記の研究を通じ、筆者は、情報科学技術の活用により塩基配列を読み解くことで腸内環境の恒常性維持および疾患の進行に寄与する腸内微生物群集の特徴を抽出した。腸内には多様な微生物が生息しており、個別の微生物がそれぞれどのような機序でヒトの健康に影響しているのかを調べるのには限界があるため、網羅的な微生物群集のゲノム配列の解析などにより、研究対象の現象に関わっている可能性のある微生物を数多くの候補から抽出する必要がある。本研究を通じて筆者が塩基配列のデータから抽出した腸内微生物群集の特徴が、上記の各現象の原因または結果として判断するにはより多くの検証を必要とする一方

で、これらの知見は、ヒトの健康に個別の腸内微生物が影響を与える仕組みの解明への糸口となると期待される。

目次

1章 序論.....	1
1.1 超生命体としてのヒトの存在	1
1.2 ヒトと微生物との共生は胎内から始まる	1
1.3 腸内微生物群集とそれらの健康における役割.....	2
1.4 腸内微生物群集に対する理解の進展と技術の発展	3
1.5 本研究の目的と概要.....	5
2章 膵酵素補充剤がマウス腸内細菌群集に及ぼす影響の評価.....	6
2.1 概要	6
2.2 序論	7
2.2.1 慢性膵炎.....	7
2.2.2 膵酵素補充療法とパンクレリパーゼ.....	7
2.2.3 パンクレリパーゼの作用機序.....	8
2.3 方法	9
2.3.1 マウス腸内細菌群集の採取とシーケンシング.....	9
2.3.2 配列データの前処理	10
2.3.3 OTU 解析	10
2.3.4 α 多様性の評価.....	11
2.3.5 β 多様性の評価.....	12
2.3.6 各群間における生物学的分類群の頻度の比較.....	12
2.4 結果	14
2.4.1 各サンプルにおける腸内細菌の同定.....	14
2.4.2 パンクレリパーゼ投与群とコントロール群は同程度の α 多様性を示す	14
2.4.3 パンクレリパーゼ投与群はコントロール群と異なる細菌組成を示す.....	14
2.4.4 パンクレリパーゼ投与群とコントロール群との間で頻度の異なる生物学的分類群の検出.....	17
2.5 考察	19
2.5.1 パンクレリパーゼは腸内細菌の群集構造の変化を誘導する	19
2.5.2 パンクレリパーゼは腸内環境の恒常性に寄与する善玉菌の増加を促す	19
2.5.3 パンクレリパーゼは Desulfovibrionaceae 科の悪玉菌の減少を促す.....	20
2.6 結論	22
3章 ガンキリンの発現抑制に起因する大腸炎の増悪における腸内細菌群集の役割	23
3.1 概要	23
3.2 序論	24
3.2.1 炎症性腸疾患と大腸炎関連がんの発症リスク	24

3.2.2	大腸炎関連がんの発症とガンキリン	24
3.2.3	小腸におけるガンキリン遺伝子の欠失による大腸炎の増悪	25
3.3	方法	28
3.3.1	マウス腸内細菌群集の採取とシーケンシング	28
3.3.2	配列データの前処理	28
3.3.3	OTU 解析	29
3.3.4	α と β 多様性の評価	30
3.3.5	各群間における OTU の頻度の比較	30
3.4	結果	32
3.4.1	各サンプルにおける腸内細菌の同定	32
3.4.2	大腸炎誘導群は大腸炎非誘導群と比べてより少ない α 多様性を示す	32
3.4.3	ガンキリン遺伝子の欠損は腸内細菌群集の細菌組成の変化を誘導する	34
3.4.4	ガンキリン遺伝子の欠損により異なる頻度を示す OTU の検出	36
3.5	考察	44
3.5.1	ガンキリンは腸内細菌群集の制御因子として重要な役割を果たす	44
3.5.2	ガンキリンの発現抑制により生じた大腸炎の増悪と腸内細菌の群集構造の変化との関係性	45
3.6	結論	47
4	炎症性腸疾患患者の腸内における溶原性ファージの細菌群集及び疾患への影響の調査	48
4.1	概要	48
4.2	序論	49
4.2.1	クローン病と潰瘍性大腸炎の病態	49
4.2.2	溶原性ファージの生活環	49
4.2.3	CD と UC における溶原性ファージの役割	50
4.3	方法	51
4.3.1	IBDMDB データデポジトリ	51
4.3.2	CD と UC 患者の重症度の定義づけ	51
4.3.3	コンティグ・アセンブリ	52
4.3.4	溶原性ファージの操作的分類群の作成	52
4.3.5	細菌ドラフトゲノム (MAG) の構築	53
4.3.6	細菌ドラフトゲノムに基づいた系統樹の作成	54
4.3.7	Viral OTU への宿主の割り当て	55
4.3.8	Viral OTU および MAG クラスタへのリード・マッピング	56
4.3.9	ファージ対宿主比の算出	56
4.3.10	α と β 多様性の評価	56

4.3.11 各群間における viral OTU および MAG クラスターの頻度比較.....	58
4.4 結果.....	60
4.4.1 ヒト腸内の溶原性ファージの大多数の生物学的分類は未知.....	60
4.4.2 ヒト腸内の溶原性ファージは幅広い系統の細菌に感染.....	62
4.4.3 CD および UC 群はそれぞれ非 IBD 群と同程度の α 多様性を示す.....	65
4.4.4 腸内微生物群集の組成は個人により大きく異なる.....	65
4.4.5 疾患状態により頻度の異なる溶原性ファージおよび細菌の検出.....	67
4.5 考察.....	71
4.5.1 溶原性ファージはヒト腸内における細菌群集の生態に関与している.....	71
4.5.2 IBD などの胃腸疾患患者の腸内における溶原性ファージの組成は個人により異なる.....	71
4.5.3 溶原性ファージは疾患状態に特異的な腸内微生物の群集構造の形成に関与している.....	72
4.6 結論.....	74
5章 総括.....	75
謝辞.....	77
参考文献.....	79

1章 序論

1.1 超生命体としてのヒトの存在

ヒトは微生物との共生により生命機能を維持している生命体、すなわち、超生命体である (Lederberg, 2000)。20 世紀の後半まで、人体における微生物の存在は、一部の例外を除いて、ごく限られていると考えられてきた。しかし、ゲノム配列の解読技術の誕生により、多種多様な微生物が人体のあらゆる部位にて群集を形成していることが発見され、現在では、微生物群集は人体の一部として広く認識されている (Evans, et al., 2013)。実際、Human Microbiome Project が、242 人の男女を対象に実施した研究では、口腔、咽頭、腸、生殖器、体表面などの、人体の 18 か所から多数の細菌が見つかった (Human Microbiome Project Consortium, 2012)。また、これらの細菌群集の菌組成や遺伝子組成は、人体の部位によって大きく異なることが報告されており、微生物群集は身体の部位に応じて適切な機能を発揮することで、ヒトの健康維持に貢献していると考えられている。

1.2 ヒトと微生物との共生は胎内から始まる

ヒトと微生物の共生は、出生前から始まり、生涯にわたり続く。この考えは、胎児は胎盤に守られて無菌であるとの考えから、長らく否定されてきた (Perez-Muñoz, et al., 2017)。しかし、新生児が出生後 48 時間以内に排出した胎便などから微生物が検出されたことから、近年では出生前から腸内微生物群集の形成

が始まっているとの考えが主流になりつつある (Hu, et al., 2013; Aagaard, et al., 2014; Perez-Muñoz, et al., 2017)。この仮説に対し、新生児の腸内微生物群集は、産道を通じた際に得られたものだと主張する仮説もあるが、151 人の新生児の胎便の細菌組成を調べた臨床研究では、産道を通せず帝王切開により生まれた新生児と、産道から生まれた新生児の、両方の胎便から、細菌が検出された (Nagpal, et al., 2016)。さらに、出生から 4 日以内に排出された新生児の便を調べた研究では、細菌に加え、これらに感染するウイルス (ファージ) も多数検出された (Lim, et al., 2015)。こうした発見から、微生物は人体の成長や健康維持に不可欠な要素であることが伺える。

1.3 腸内微生物群集とそれらの健康における役割

人体に常在している微生物の大多数は腸内に生息しており、人体は 37.2 兆個のヒト細胞によって構成されているのに対し、腸内にはそれらをはるかに上回る、100 兆個の微生物が存在している (Ursell, et al., 2012; Bianconi, et al., 2013)。これらの腸内微生物群集は、主に細菌とウイルスによって構成されていると考えられており、実際、22 人のヨーロッパ人の腸内微生物ゲノムの塩基配列を調べた研究では、90%以上の配列が細菌に、残りの配列の半数以上 (5.8%) がウイルスに、由来していた (Arumugam, et al., 2011)。一方で、古細菌と真核生物に由来していた配列は、それぞれ、わずか 0.8%と 0.5%であった (Arumugam, et al., 2011)。

腸内に生息する細菌の大多数は、Bacteroidetes 門と Firmicutes 門に属しており、他は、Actinobacteria 門、Proteobacteria 門、Synergistes 門、Verrucomicrobia

門、Fusobacteria 門などに属している (Arumugam, et al., 2011)。これらの細菌は、腸管粘膜の炎症を抑制したり、不飽和短鎖脂肪酸などの腸管粘膜の恒常性維持に有用な代謝産物を提供したりすることで、ヒトの健康に寄与していると考えられている (Cresci, et al., 2015)。しかし、慢性膵炎や炎症性腸疾患などでは、腸内の善玉菌の減少や悪玉菌の増加などが多数報告されており、こうした腸内微生物群集中の細菌のバランスの乱れは、様々な疾患の病態に関与していると考えられている (Qin, et al., 2010; Kostic, et al., 2014; Jandhyala, et al., 2017)。

腸内微生物群集中のウイルスの大部分は、ファージだと考えられている (Garmaeva, et al., 2019)。細菌とは対称的に、これらの多くのファージは単離の難しさから、ゲノム配列が決定されておらず、属や種などの詳細なレベルでの生物学的分類が割り当てられていない。実際、13 人の腸内から 8920 個のウイルスゲノムが解読された研究では、8759 個 (98.2%) のウイルスゲノムの詳細な生物学的分類は不明であった (Shkoporov, et al., 2018)。同じ傾向は他の研究でも報告されており、腸内のウイルスの多くは詳細な生物学的分類が不明なファージによって、構成されていると考えられている (Minot, et al., 2013; Norman, et al., 2015; Garmaeva, et al., 2019)。なお、これらは宿主の溶菌や形質導入などにより、腸内細菌の群集構造に影響を与えていると考えられており、腸内の悪玉菌の除去を目的としたファージセラピーなどの治療法の開発が進められている (Chehoud, et al. 2016; Duan, et al., 2019)。

1.4 腸内微生物群集に対する理解の進展と技術の発展

腸内微生物群集の研究は、1680 年代に Leeuwenhoek によって行われた、便中の細菌の顕微鏡観察に端を発している。この後、1866 年に Pasteur により滅菌法が、1881 年に Koch により純粋培養法が確立され、分離培養により単一菌種の特性を調べるのが可能になった。そして、これがきっかけとなり、*Escherichia coli* (Escherich 1886 年)、*Bifidobacterium bifidus* (Tissier 1899 年)、*Lactobacillus acidophilus* (Moro 1900 年) などの細菌が腸内から相次いで発見された。さらに、これらの発見から数十年後の 1917 年に、d'Herelle によって、ファージが腸内から発見された。

20 世紀初頭から現在にかけて、Koch による純粋培養法が発明された後も、培養技術の発展と改良により、それまで分離培養が難しかった様々な微生物が腸内から次々に発見された。しかし、現在の培養技術を以てしても、ヒトの腸内に生息している多種多様な微生物を全て分離培養することは難しい。そのため現在では、腸内微生物群集を対象とした多くの研究で、培養を経ない、環境中の微生物ゲノム（メタゲノム）の塩基配列の読み取り、すなわちシーケンシングが行われている。その最初の例として、2006 年に行われたサンガー法に基づいた第一世代シーケンサーによる、2 人の被験者の腸内微生物群集の解析が挙げられる (Gill, et al., 2006)。その後、ゲノム配列の読み取りをより高速に、かつ、より大量に実行可能な次世代シーケンサーが登場し、2010 年に、初めて 100 人を超える規模の被験者を対象とした腸内微生物群集の解析が実施された (Qin, et al., 2010)。

上記の技術革新に伴い、ここ 10 年の間で、腸内微生物群集に関する理解が飛躍的に向上し、近年では、腸内微生物群集と様々な疾患との関連について研究が

進められている。2021年現在、こうした研究の多くでは、細菌ゲノムの16S rRNA 遺伝子のPCR増幅産物（アンプリコン）または、断片化したゲノムを標的とした解析が成されている。前者の解析方法は、16S rRNA アンプリコン解析と呼ばれ、環境中の細菌組成を調べる際に使用されている。後者の解析は、whole metagenome shotgun sequencing (WMGS) 解析と呼ばれ、環境中の微生物組成や遺伝子組成を網羅的に調査する際に用いられている。

1.5 本研究の目的と概要

本研究では、筆者は、情報科学技術の活用により塩基配列の大規模データを紐解くことで、腸内に生息する微生物の群集構造を精査し、それらのヒトの健康への影響について検討した。2章と3章では、近畿大学医学部附属病院消化器内科と共同研究を行い、16S rRNA アンプリコン解析により、腸内環境の恒常性維持や疾患の改善・増悪に関係する腸内細菌群集の特徴を抽出した。具体的には、まず、2章では、パンクレリパーゼの腸内細菌の群集構造への影響を調べるため、パンクレリパーゼを投与したマウスに対し、腸内メタゲノム解析を実施した。そして、3章では、大腸炎にてがんタンパク質であるガンキリンは腸内細菌群集をどのように制御しているか調査した。さらに、4章では公開データベースを利用した単独研究を通じ、炎症性腸疾患患者のWMGS解析データから細菌・ウイルスゲノムを再構築し、炎症性腸疾患患者の腸内微生物群集における溶原性ファージの役割について追究した。最後に5章では本研究を通じて得られた結果の展望と課題について論じた。

2章 膵酵素補充剤がマウス腸内細菌群集に及ぼす影響の評価

2.1 概要

パンクレリパーゼは、高力価のリパーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼを含む膵酵素補充剤であり、慢性膵炎などの患者に対し、膵機能の低下により生じる膵外分泌機能不全の症状を緩和する目的で使用されている。本薬剤は、消化吸收を補助することで、膵外分泌機能不全による消化不良に起因する下痢、脂肪便、腹痛などの症状を緩和するとされている。同時に、慢性膵炎患者を対象とした先行研究では、慢性膵炎患者の腸内における善玉菌が健常者より少ないことが報告されている。そこで、パンクレリパーゼは消化不良に加え、腸内細菌の群集構造に作用することで効果を発揮するのではと考えた。したがって、本研究では、パンクレリパーゼの腸内細菌の群集構造への影響を調べるため、パンクレリパーゼを投与したマウスに対し、16S rRNA アンプリコン解析を実施した。その結果、パンクレリパーゼ投与群とコントロール群のマウスの間で腸内細菌の群集構造が異なることが分かった。また、頻度比較解析により、腸内バリア機能の修復に有用な善玉菌である *Akkermansia muciniphila* などがパンクレリパーゼ投与群にて顕著に多く検出された。これらの結果により、パンクレリパーゼは腸内細菌の正常な群集構造の維持に有益であることが示唆された。なお、本章の研究は、Nishiyama*, Nagai*, et al., 2018 に掲載された (*, 共同筆頭著者)。

2.2 序論

2.2.1 慢性膵炎

慢性膵炎は、生活習慣の乱れ（アルコールの過剰摂取など）や膵炎関連遺伝子の異常などにより膵臓の炎症が持続することで、膵機能が不可逆的に損なわれる疾患である（Braganza, et al. 2011）。慢性膵炎の初期では、激しい腹痛を伴う急性的な膵臓の炎症が繰り返され、膵組織が破壊されていく（Braganza, et al. 2011）。そして、病状の進行に伴い、後期では、膵臓の繊維化、免疫細胞の浸潤、膵実質の脱落などの組織学的な変化が現れ、膵臓の外分泌機能の消失に伴い、消化酵素が十分に分泌されなくなる（Braganza, et al. 2011）。この状態を膵外分泌機能不全と呼び、これにより消化不良による栄養失調、脂肪便、糖尿病などが誘発される（Braganza, et al. 2011）。

2.2.2 膵酵素補充療法とパンクレリパーゼ

膵酵素補充療法は、膵外分泌機能不全により不足している消化酵素の補充を行うことで、脂肪や蛋白質などの消化吸収を改善し、栄養失調や脂肪便などの症状を緩和する対症療法である（D'Haese, et al. 2014; Whitcomb, et al. 2016; de la Iglesia-García, et al., 2017）。パンクレリパーゼは、本治療法において使用される主な膵消化酵素補充剤の一つであり、高力価のリパーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼを含む（Lindkvist, 2013）。294人の慢性膵炎患者に本薬剤を投与し、その予後を観察したD'Haeseらの臨床研究では、本薬剤を使用することで膵外分泌機能不全に起因する症状（下痢、脂肪便、腹痛など）が緩和されたことが報告されている（D'Haese, et al. 2014）。

2.2.3 パンクレリパーゼの作用機序

パンクレリパーゼは、一般的に膵臓の消化活動を補助することで、慢性膵炎による膵外分泌機能不全に起因する症状を緩和すると考えられてきた。同時に、慢性膵炎患者において腸内環境を正常に保つ善玉菌の減少が慢性膵炎に寄与していることが報告されている (Jandhyala, et al. 2017)。そこで、パンクレリパーゼは、消化不良の改善に加え、腸内細菌の群集構造を変化させることで治療効果を発揮しているのではないかと考えた。本仮説を検討するため、パンクレリパーゼ投与群とコントロール群のマウスを用意し、それらの腸内細菌群集を対象とした 16S rRNA アンプリコン解析を行うことで、パンクレリパーゼが腸内細菌群集に及ぼす影響について調査した。なお、本研究は、近畿大学医学部附属病院消化器内科の櫻井俊治博士らのグループとの共同で実施した。

2.3 方法

2.3.1 マウス腸内細菌群集の採取とシーケンシング

サンプル採取、DNA 抽出、シーケンシングは近畿大学医学部附属病院消化器内科の櫻井俊治博士らのグループによって実施された。

サンプル採取に際して、8~9 週齢のマウス (C57BL/6J ; SLC JAPAN 株式会社) が用意され、パンクレリパーゼ投与群 (4 匹) とコントロール群 (4 匹) に分けられた。前者にはパンクレリパーゼ (LipaCreon ; EA Pharma) 1.2 mg が、後者には水道水 0.75 mL が、それぞれ 1 日 3 回に分けて 21 日間投与された。この際、両群のマウスは実験動物用飼料 CE-2 (日本クレア) を自由摂取した。なお、飼育中にケージ内のストレスにより一匹のコントロール群のマウスが死亡したため、このマウスは後の解析には含まれなかった。飼育期間終了後、残りのマウスは屠殺され、各個体から盲腸、横行結腸、便が採取された。これらのサンプルは -20 °C で冷凍保存された。

DNA 抽出は以下の手順で実施された。冷凍サンプルの解凍後、MagNALyzer (Roche Diagnostics) とジルコニア/シリカビーズ (Bio Spec Products) を用いてサンプルがホモジナイズ (均質化) された。そして、QIAamp DNA Stool Mini Kit と QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH) を用いてこれらのサンプルから DNA が抽出された。

シーケンシングでは、最初に、前段階で抽出された DNA の内、細菌の 16S rDNA の V3-V4 領域が、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により増幅された。次に、PCR 増幅産物を Nextera XT Index Kit (Illumina) で調製することで、シーケンシング用の DNA ライブラリが作成された。そして、次世代シーケンサ

ーMiSeq と MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina)を用いて DNA ライブラリのシーケンシング (301 bp ×2) が行われ、ペアエンド・リード (配列データ) が得られた。なお、使用されたプライマーの塩基配列は次の通りである。

- ・フォワードプライマー：5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-MID-GT-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'
- ・リバースプライマー：5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-MID-GT-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

2.3.2 配列データの前処理

次世代シーケンサーから得たペアエンド・リードに対し、後の解析に必要な前処理を実施した。具体的には、まず Trimmomatic (version 0.35) (SLIDINGWINDOW: 40:15, MINLEN:50) (Bolger, et al., 2014) を使用し、各ペアエンド・リードから低品質領域を切除した。次に、Cutadapt (version 1.11) (-e 0.06, -pair-filter = both) (Martin, 2011) を用いて、PCR 用プライマーの配列を各ペアエンド・リードから除去した。そして、FLASH (version 1.2.11) (-m 30, -M 271, -x 0.25) (Magoč and Salzberg, 2011) を使い、ペアエンド・リードをペア毎に結合し、マージド・リードを作成した。簡単のため、以下、マージド・リードをリードと呼ぶ。なお、未決定塩基を含むリードは後の解析から除外した。

2.3.3 OTU 解析

腸内細菌の同定のため、各サンプルから得たリードを配列類似度に基づいて操作的分類群(Operational Taxonomy Unit; OTU)に分類した。別段の記載がない限り、以降の解析では Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME version 1.9.1) (Caporaso, et al., 2010a) に含まれているツールを用いた。まず、parallel_pick_otus_uclust_ref.py を用いて、各リードを参照配列に対して 97%の配列同一性閾値でグループ化し、OTU を形成した。この際、Greengenes データベース (version 13_5) (McDonald, et al., 2012) が提供している、同データベースの 16S rDNA 配列を 97%の配列同一性閾値でグループ化した OTU の代表配列を、参照配列として使用した。そして、参照配列に付与されている分類情報に基づいて生物名 (生物学的分類群) を各 OTU に付与した。

2.3.4 α 多様性の評価

各サンプルの種多様性 (α 多様性) を測るため、希薄化曲線による解析および、Shannon 指数値の測定を実施した。Shannon 指数は種数と均等度を考慮して、対象の種多様性を評価する際に使用される指標である (Shannon, 1948)。希薄化曲線は、parallel_multiple_rarefactions.py を用いて、5000 リード間隔でサンプリングサイズを調整しながら、各サンプリングサイズにてリードを各サンプルから 10 回サブサンプリング繰り返し、得られた OTU の数を平均化したものをプロットした。Shannon 指数値の測定では、まず single_rarefaction.py を用いて各サンプルからリードを無作為に抽出した。この際、サンプリングサイズを最小サンプルのリード数 (57,762 本) に設定した。そして、各サンプルから無作為に抽出したものに対し、parallel_alpha_diversity.py を用いて Shannon 指数値を

算出した。そして、Welch の t 検定を用いて、異なる群間の Shannon 指数値の差の統計的有意性を検定した。また p 値の閾値は 0.05 とした。

2.3.5 β 多様性の評価

各サンプル間の腸内細菌の群集構造の類似度 (β 多様性) を求めるため、加重 UniFrac 距離を用いた (Lozupone, et al., 2005)。加重 UniFrac 距離は、系統発生距離を考慮した上で定量的に生物学的集団の群集構造の類似度を評価する際に使用される指標である。本解析では、まず align_seqs.py を用いて、各 OTU の代表配列を Greengenes データベースのテンプレートアラインメントに並置 (アラインメント) した (Caporaso, et al., 2010b; McDonald, et al., 2012)。次に、make_phylogeny.py に実装されている FastTree 2 (Price, et al., 2010) を用いて、得たアラインメントを基に系統樹を作成した。また、single_rarefaction.py を用いて、各サンプルからリードを無作為に抽出した。サンプリングサイズは最小サンプルのリード数 (57,762 本) に設定した。そして、parallel_beta_diversity.py を用いて、上記で作成した系統樹および各サンプルから無作為に抽出したリードを基に各サンプル間の加重 UniFrac 距離を計算した。さらに、各サンプル間の腸内細菌の群集構造の類似度を視覚化するため、得られた距離行列に対し、principal_coordinates.py を用いて主座標分析を実施した。

2.3.6 各群間における生物学的分類群の頻度の比較

各群間で頻度が統計的に有意に異なる生物学的分類群の検出のため、以下の比較解析を実施した。まず summarize_taxa.py を用いて、割り当てられた分類に

従い OTU を種レベルでまとめた。属あるいは、それ以上の階級までしか、分類が割り当てられていない OTU については、割り当てられた最下級の分類階級でまとめた。次に、上記の操作により得た生物学的分類群の内、`filter_otus_from_otu_table.py` を用いて、合計リード数が 10 未満のものを除外した。そして、各群間における各生物学的分類群の頻度の差の統計的有意性を `differential_abundance.py` (`--algorithm DESeq2_nbinom`) に実装されている DESeq2 (Love, et al., 2014) を用いて検定した。さらに、多重比較補正のため、Benjamini-Hochberg 法を用いて得られた p 値を FDR 値に変換し、0.1 未満の FDR 値を有意とした。また、偽陽性を避けるため、下記の条件に当てはまるものは、除外した：A. 対象 OTU がより多く検出された群において、未検出のサンプルが一つでも存在した場合、B. 対象 OTU がより多く検出された群の平均値が、他方の群の最大値を下回っている場合。

2.4 結果

2.4.1 各サンプルにおける腸内細菌の同定

腸内細菌を標的としたシーケンシングにより、各サンプルから合計で 5,167,710 リードが得られた。この内、3,572,866 リード (69.14%) が Greengenes データベースに登録されている既知の細菌の 16S rRNA 遺伝子と一致し、2692 個の OTU (31 目、54 科、62 属、19 種の細菌に対応) が形成された。これらの結果を OTU テーブルに整理し、これを基に後述の解析を実施した。

2.4.2 パンクレリパーゼ投与群とコントロール群は同程度の α 多様性を示す

パンクレリパーゼによる腸内細菌群集の α 多様性への大きな影響は見られなかった。具体的には、盲腸、横行結腸、便のいずれにおいても、パンクレリパーゼ投与群とコントロール群との間で細菌群集のリッチネス (OTU 数) に差は見られなかった。また、いずれの部位においても、両群の間で Shannon 指数値に統計的に有意な差は見られなかった (p 値 >0.05)。

2.4.3 パンクレリパーゼ投与群はコントロール群と異なる細菌組成を示す

パンクレリパーゼ投与群の腸内細菌群集の門組成はコントロール群とは明らかに異なっていた (図 2-1)。特に、Verrucomicrobia 門の相対頻度は、両群の間で大きく異なっていた。具体的には、コントロール群では Verrucomicrobia 門の平均相対頻度が 0.13% しかなかったのに対し、パンクレリパーゼ投与群では 7.58% あった。興味深いことに、Verrucomicrobia 門に割り当てられた OTU の生物学的分類をより細かく調べた結果、すべて善玉菌として知られている

Akkermansia muciniphila に分類されていた。また、統計的有意性は無かったが、横行結腸のサンプルでは、Firmicutes 門と Bacteroidetes 門の比が、コントロール群と比べてパンクレリパーゼ投与群で低く検出された (p 値=0.0623)。より微細なスケールで両群の細菌組成の異なりを調べるため、加重 UniFrac 距離を用いて、各サンプル間の OTU 組成の類似度を評価し、主座標分析を実施した (図 2-2)。その結果、いずれの部位においても、両群の間で細菌組成の違いによる分離が見られた。

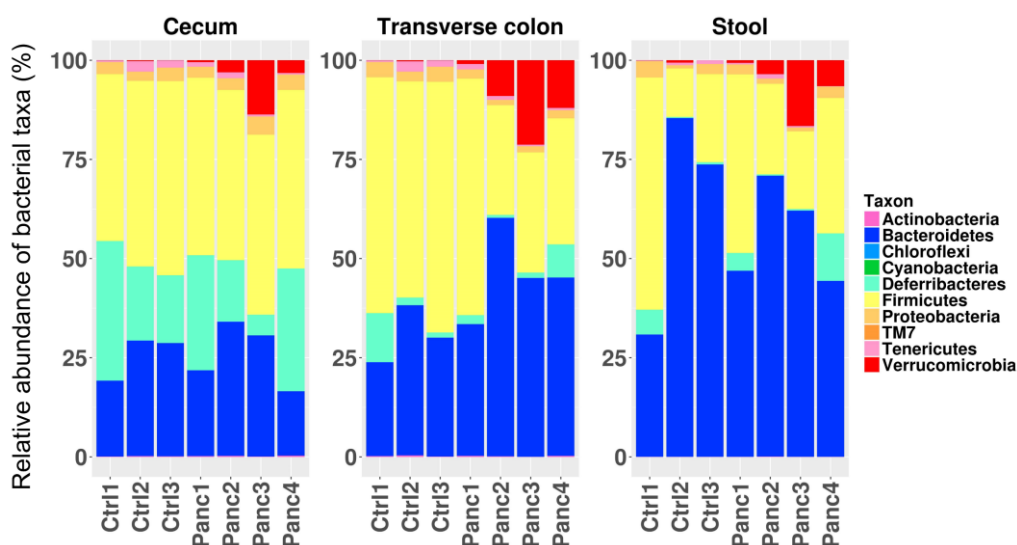


図 2-1 腸内細菌群集の門レベルでの組成

パンクレリパーゼ投与群 (Panc) とコントロール群 (Ctrl) のマウスの盲腸 (Cecum)、横行結腸 (Transverse colon)、便 (Stool) にて観察された腸内細菌群集の門レベルでの組成を算出した。本図は Nishiyama*, Nagai*, et al., 2018 (*, 共同筆頭著者) より改変[†]。

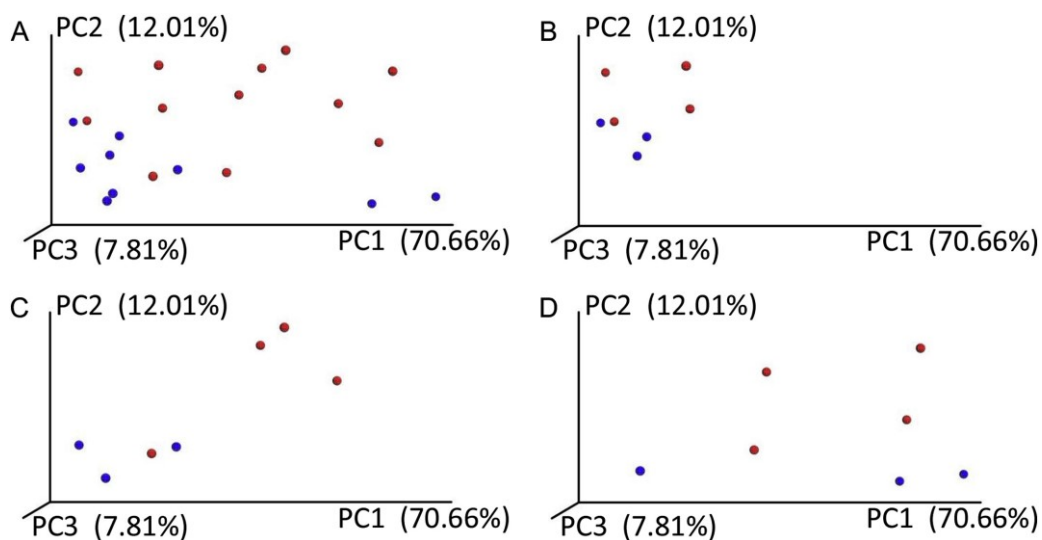


図 2-2 各サンプル間の腸内細菌群集の類似度

パンクレリパーゼ投与群 (赤) とコントロール群 (青) のサンプル間の類似度を加重 UniFrac 距離に基づいて評価し、それらの結果を主座標分析により三次元の空間に投影した。可視化のため、(A) 全体、(B) 盲腸、(C) 横行結腸、(D) 便に分けて表示した。本図は Nishiyama*, Nagai*, et al., 2018 (*, 共同筆頭著者) より転載[†]。

[†]DOI : <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.130>

2.4.4 パンクレリパーゼ投与群とコントロール群との間で頻度の異なる生物学的分類群の検出

上記により、パンクレリパーゼ投与群とコントロール群で、腸内細菌の群集構造が異なることが分かったため、頻度の比較により、これらの違いに寄与している生物学的分類群の同定を実施した。その結果、両群間で頻度が統計的に有意な差を示し（FDR 値<1.0）かつ、偽陽性のリスクを低減するために定められた基準（方法の「2.3.6」を参照）を満たす例が、17件検出された（図 2-3）。そのうち、8件では、パンクレリパーゼ投与群にて、該当する生物学的分類の頻度がより多く検出された。これらは、*Akkermansia muciniphila*（盲腸、横行結腸、便）、*Alcaligenaceae Sutterella*（横行結腸）、*Lactobacillus reuteri*（盲腸）、Clostridiaceae *Clostridium*（横行結腸）、および Erysipelotrichaceae *Coprobacillus*（盲腸、便）に対応していた。残りの9件では、パンクレリパーゼ投与群にて、該当する生物学的分類の頻度がより少なく検出された。これらは、Desulfovibrionales Desulfovibrionaceae（横行結腸）、Desulfovibrionaceae *Desulfovibrio*（横行結腸）、Desulfovibrionaceae *Bilophila*（横行結腸、便）、Clostridiales Lachnospiraceae（横行結腸、便）、Lachnospiraceae *Dorea*（横行結腸、便）、および Clostridiales Mogibacteriaceae（横行結腸）に対応していた。

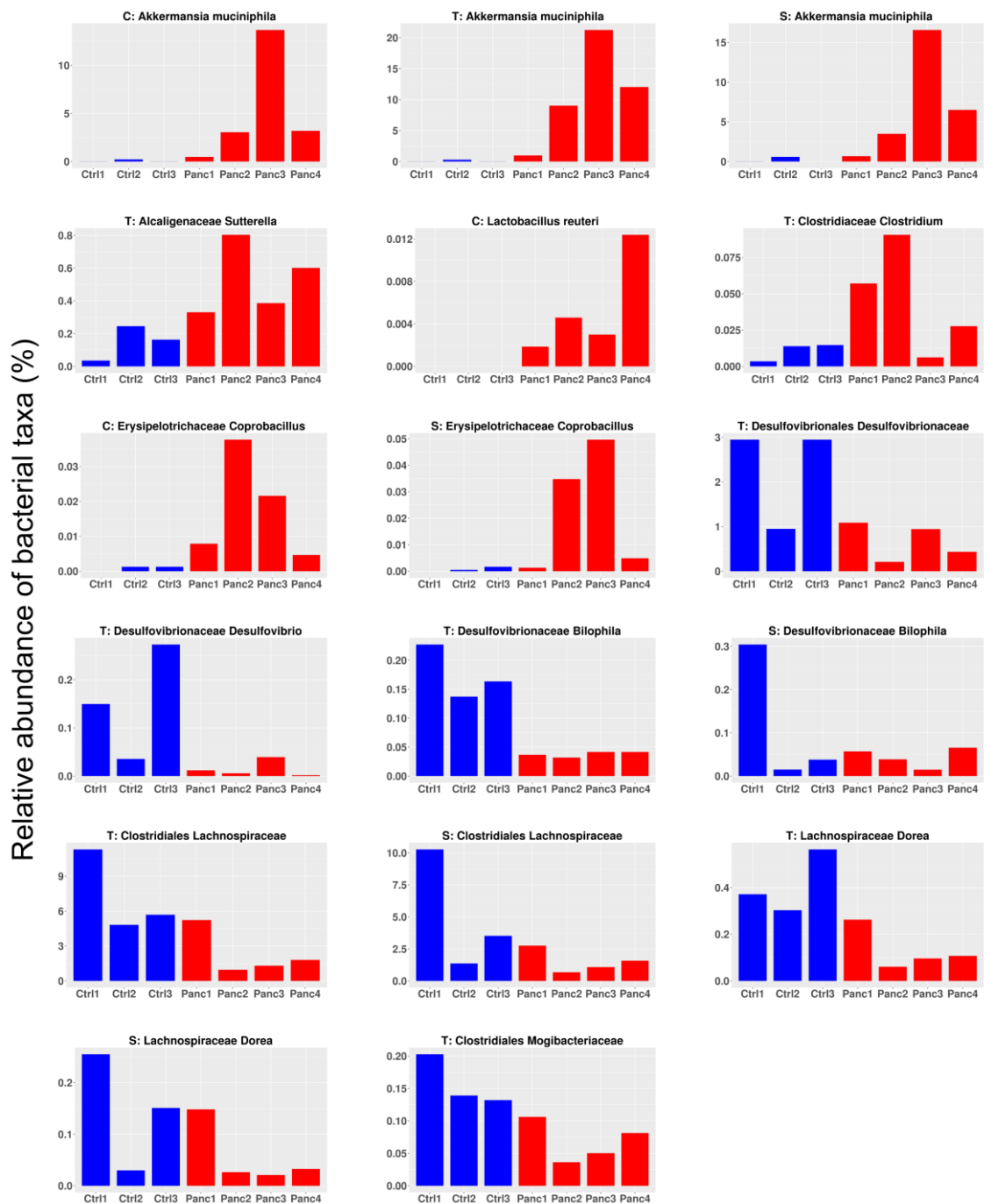


図 2-3 各サンプル間にて有意な頻度差を示した OTU

盲腸 (C)、横行結腸 (T)、糞便 (S) のそれぞれの部位にてパンクレリパーゼ投与群 (赤) とコントロール群 (青) の間で統計的に有意な頻度差 (FDR 値<1.0) を示した生物学的分類群の検出。本図は Nishiyama*, Nagai*, et al., 2018 (*, 共同筆頭著者) より改変[†]。

[†] DOI : <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.130>

2.5 考察

2.5.1 パンクレリパーゼは腸内細菌の群集構造の変化を誘導する

膵酵素補充療法は、慢性膵炎などによって生じた膵外分泌機能不全に起因する症状（下痢、脂肪便、腹痛など）の緩和に有効な治療方法である。一方で、どのようなメカニズムで、膵酵素補充療法に使用されるパンクレリパーゼなどの膵酵素補充剤が、膵外分泌機能不全により生じる症状を緩和するのかについては、十分に理解されていない。そこで、パンクレリパーゼは腸内における食物の消化を補助することで、宿主に有益な細菌の増加を特徴とした腸内細菌の群集構造の変化を誘導するとの考えの基、16S rRNA アンプリコン解析により、本薬剤を投与したマウス群とコントロール群との間で比較解析を実施した。その結果、パンクレリパーゼ投与群とコントロール群との間で腸内細菌の群集構造が異なることが判明した（図 2-1; 図 2-2）。

2.5.2 パンクレリパーゼは腸内環境の恒常性に寄与する善玉菌の増加を促す

パンクレリパーゼ投与群とコントロール群との間で統計的に有意な頻度の差を示した細菌の内、*Akkermansia muciniphila* は、パンクレリパーゼ投与群における頻度が平均でコントロール群の 58 倍もあり、最も顕著な差を示した（図 2-3）。慢性膵炎の発症に、過剰なアルコール摂取が関係しているケースが多いが、アルコールの過剰摂取は腸管バリア機能を破綻させることが知られている（Vonlaufen, et al. 2014）。これに関連して、アルコールを原因とする腸内バリア機能の破綻に *A. muciniphila* の顕著な減少が関連していることが報告されている（Grander, et al. 2017）。また、同発表にて、本細菌は、腸管粘膜の増強や

タイトジャンクション構成蛋白質の発現を促進することで腸管バリア機能の保持に寄与していることが明らかにされている (Grandner, et al. 2017)。これらのことから、パンクレリパーゼは、腸内の *A. muciniphila* の増加に寄与することで、腸管バリア機能を正常化し、膵外分泌機能不全に起因する症状を緩和していることが推測される。しかし、実際に本薬剤の投与が、慢性膵炎患者において、本細菌の増加を誘導し、治療に有益な効果をもたらすか否かは不明であり、更なる検証が必要であることに留意しなくてはならない。

A. muciniphila の他に、4つの生物学的分類群がパンクリパーゼ投与群にてより多く検出された (図 2-3)。これらの一つに含まれる、*Lactobacillus reuteri* は、健康維持に有益な影響をもたらすプロバイオティクスとして注目されている善玉菌である。実際、*L. reuteri* は、L-ヒスチジンのヒスタミンへの変換により、H2 受容体を活性化し、宿主免疫系を抑制することで、腸内の炎症を抑制することが報告されている (Gao, et al. 2015)。さらに、腸炎モデルマウスにおいて、*L. reuteri* の投与により、腸内の炎症を緩和されたことが報告されている (Mackos, et al. 2013、Mackos, et al. 2016)。これらのことから、パンクレリパーゼは、*L. reuteri* の増加を誘導することで、腸管免疫の恒常性維持に寄与している可能性があると考えられる。上記の他に、*Sutterella*、*Clostridium*、*Coprobacillus* の頻度がパンクレリパーゼ投与群においてコントロール群より多く検出されたが、これらの増加が宿主の腸内環境に及ぼす影響については明らかにされていない。

2.5.3 パンクレリパーゼは Desulfovibrionaceae 科の悪玉菌の減少を促す

コントロール群と比較してパンクレリパーゼ投与群において 6 つの生物学的分類群が減少していた (図 2-3)。 *Bilophila* や *Desulfovibrio* の細菌は、腸内の炎症を促す硫化水素を産生する (Warren, et al., 2005; Singh, et al., 2015; Beaumont, et al., 2016)。したがって、これらに関連する生物学的分類群の減少は、腸内環境の保護に有益だと考えられる。一方で、腸内環境の恒常性維持に有益な酪酸を産生する菌種を含む Lachnospiraceae が減少していた (Meehan, et al., 2014)。これらの他に、Clostridiales、Mogibacteriaceae に関連する生物学的分類群がパンクレリパーゼ投与群にてより少なく検出されたが、これらは先行研究による知見が乏しく、腸内環境の保護にどのように寄与するか解釈が難しい。

2.6 結論

本研究結果により、パンクレリパーゼの経口投与は、腸内細菌の群集構造の変化を誘導し得ることが示唆された。さらに、コントロール群と比較した際に、パンクレリパーゼ投与群において、腸管バリア機能の維持に有益な細菌として知られている *A. muciniphila* および *L. reuteri* がより多く検出された。一方で、慢性膵炎患者において、実際にパンクリパーゼの投与が腸内細菌群集を変えることで膵外分泌機能不全に起因する症状を改善するかについては、本薬剤を投与した慢性膵炎モデルマウスと無菌マウスとの比較などによる更なる検証が必要である。上記の点を留意した上で、本研究は、パンクレリパーゼは慢性膵炎患者の栄養状態を改善する効果に加え、腸内細菌群集を変化させることで効果を発揮する可能性を示唆したものである。

3章 ガンキリンの発現抑制に起因する大腸炎の増悪における腸内細菌群集の役割

3.1 概要

ガンキリンは、炎症性腸疾患（IBD）において腸管粘膜における炎症性サイトカインの発現の亢進などにより大腸炎関連がんの発症を促すがんタンパク質である。一方で、大腸炎モデルマウスにて、腸管粘膜でのガンキリンの発現を抑制した結果、より重度な炎症が誘発されることが共同研究者らの研究により判明した。そこで本研究では、本現象における腸内細菌群集の役割の解明のため、16S rRNA アンプリコン解析を実施した。その結果、より重度の炎症を示したガンキリン遺伝子ノックアウト大腸炎モデルマウス群にて、腸炎の悪化を引き起こす *Helicobacter japonicum* がコントロール群より多く存在していた。これらの結果により、がんタンパク質であるガンキリンの発現は、これまでの予想と異なり、健康な腸内細菌群集の維持に貢献している可能性が示唆された。なお、本章の研究は、Sakurai*, Nishiyama*, et al., 2020 に掲載された (*, 共同筆頭著者)。

3.2 序論

3.2.1 炎症性腸疾患と大腸炎関連がんの発症リスク

炎症性腸疾患（IBD）は、主に大腸などの腸管において、慢性的な炎症が持続する疾患の総称であり、クローン病（CD）や潰瘍性大腸炎（UC）などが含まれる。本疾患の具体的な原因は明らかにされていないが、近年の研究により、遺伝的背景や環境因子に加え、腸内細菌群集における偏った善玉菌と悪玉菌のバランスが IBD の病態に関与していることが示されている (Baumgart, et al., 2007、Lopetuso, et al., 2018)。また、IBD は治癒不能な疾患であり、病状の進行に伴い、大腸炎関連がんの発症リスクが増大することが知られている (Itzkowitz, et al., 2004, Ullman, et al., 2011)。

3.2.2 大腸炎関連がんの発症とガンキリン

共同研究者である近畿大学医学部附属病院の櫻井俊治博士らのグループによって、IBD による慢性的な腸炎によって誘導される大腸炎関連がんの発症に、ガンキリンが関与している可能性が示唆された (Sakurai, et al., 2014; Adachi, et al., 2015; Sakurai, et al., 2017a; Sakurai, et al., 2017b)。ガンキリンは、PSMD10、p28、Nas6p と呼ばれており、7つのアンキリンリピートモチーフによって構成されているがんタンパク質の一種である (Zamani, et al., 2018)。ガンキリンは、膵臓がん、子宮頸がん、骨肉腫などの様々ながんの発生と進行に関与しており、大腸炎関連がんとも関係していると考えられている (Sakurai, et al., 2017a; Zamani, et al., 2018)。具体的には、大腸炎関連がんでは、IBD 患者の腸粘膜におけるガンキリンの遺伝子発現量が、炎症性サイトカイン TNF- α と IL-17 の

遺伝子発現量と相関していたことから、本がんタンパク質は大腸炎の増悪を誘導することで、大腸炎関連がんの発症・進行を促していると考えられている (Sakurai, et al., 2017a)。

3.2.3 小腸におけるガンキリン遺伝子の欠失による大腸炎の増悪

ガンキリンの遺伝子発現は大腸炎の増悪に関与しているとの上記の仮説を検証するため、櫻井俊治博士らのグループにより、ガンキリン遺伝子ノックアウトマウスが二種類作成された。一種類目は、*Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}*マウス群であり、小腸から大腸にかけてガンキリン遺伝子がノックアウトされている。もう片方は、*Cdx2-Cre;Gankyrin^{fl/fl}*マウス群であり、小腸下部から大腸にかけてガンキリン遺伝子がノックアウトされている。そして、これらのマウスにコントロール群としてガンキリン遺伝子がノックアウトされていない *Gankyrin^{fl/fl}* マウス群を加え、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) の投与により大腸炎を誘導した結果、予想と反し、最も多くの腸管の部位においてガンキリン遺伝子が欠損している *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群で最も重度な大腸炎が生じた (図 3-1A) (Sakurai, Nishiyama, et al., 2020)。また、炎症性サイトカインの大腸内での発現を比較した結果、*Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群で IL-17、IL-23、IFN- γ の発現が有意に増加していた (図 3-1B) (Sakurai, Nishiyama, et al., 2020)。

本現象の解明のため、共同研究者が、抗菌ペプチドである α -defensin (Defa5 および Defa6) の発現量を測った結果、小腸上部における Defa5 および Defa6 の発現量が *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群において著しく低下していることが判明した (図 3-2) (Sakurai, Nishiyama, et al., 2020)。 α -defensin は、腸内細菌

群集を制御する宿主免疫の一部であることから (Salzman, 2010; Ostaff, et al., 2013)、本研究では腸管からのガンキリン遺伝子の発現抑制により増悪した大腸炎に腸内細菌群集が関与しているとの仮説を立て、検証のため上記のマウス群における腸内細菌群集を対象とした 16S rRNA アンプリコン解析を実施した。

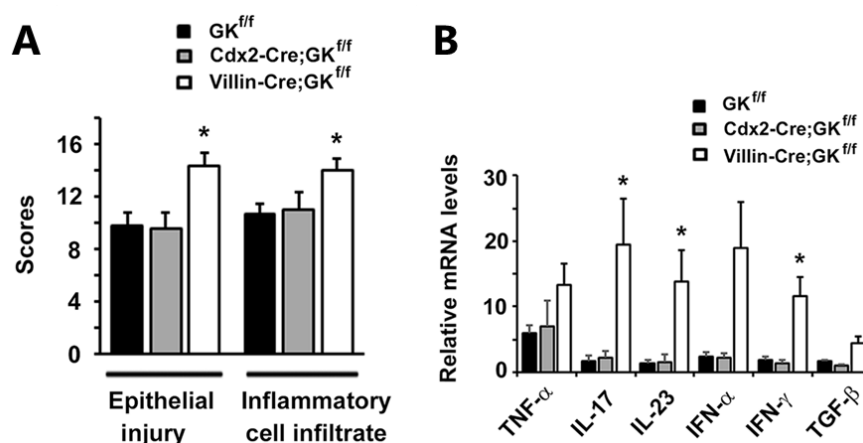


図 3-1 大腸炎誘導後の腸内上皮における炎症の重症度および炎症性サイトカインの発現量

(A) 大腸炎誘導後の *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群 (n=6)、*Cdx2-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群 (n=6)、*Gankyrin^{fl/fl}* マウス群 (n=6) の腸管上皮における炎症の重症度および、炎症性細胞浸潤度のスコアの計測値。(B) 大腸炎誘導後の *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群 (n=6)、*Cdx2-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群 (n=4)、*Gankyrin^{fl/fl}* マウス群 (n=5) の腸管上皮における各炎症性サイトカインの発現量。統計検定は両側 t 検定によって行われ、*は *p* 値<0.05 を意味する。本結果は近畿大学医学部消化器内科の櫻井博士らの研究チームによる成果である。本図は Sakurai, Nishiyama, et al., 2020 より改変[†]。

[†] 本図の使用は CC-BY ライセンスにより許諾されている。本ライセンスの内容は、<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> に掲示されている。

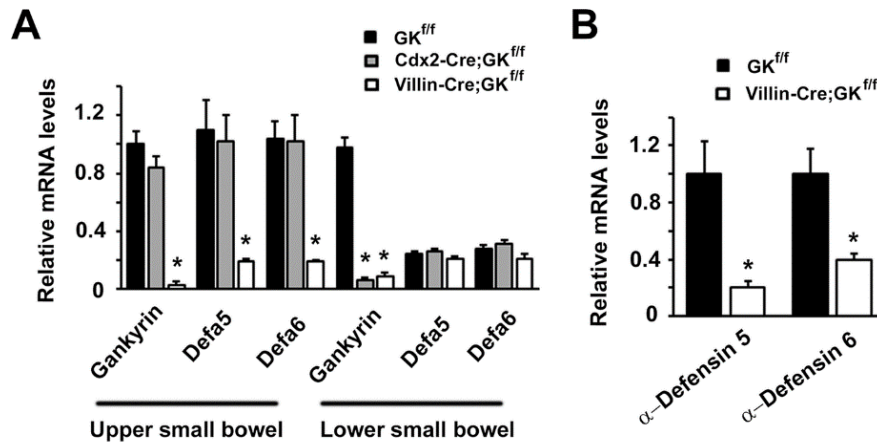


図 3-2 定量 PCR による各遺伝子の発現の測定

定量 PCR により、(A) 大腸炎非誘導群の小腸上部・下部におけるガンキリン、 α -defensin 5、 α -defensin 6 の遺伝子発現量および、(B) 大腸炎誘導群における α -defensin 5、 α -defensin 6 の遺伝子発現量の測定が実施された。各群のマウス数は 3 匹。統計検定は両側 t 検定によって行われ、*は p 値 <0.05 を意味する。本結果は近畿大学医学部消化器内科の櫻井俊治博士らの研究チームによる成果である。本図は Sakurai, Nishiyama, et al., 2020 より改変[†]。

[†] 本図の使用は CC-BY ライセンスにより許諾されている。本ライセンスの内容は、<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>に掲示されている。

3.3 方法

3.3.1 マウス腸内細菌群集の採取とシーケンシング

サンプル採取、DNA 抽出、シーケンシングは近畿大学医学部附属病院消化器内科の櫻井俊治博士らのグループによって実施された。

まず、小腸と大腸の上皮細胞で DNA 組み換え酵素 Cre を部位特異的に発現する *Villin-Cre* マウス (Jackson laboratory) と、ガンキリン遺伝子を DNA 組み換え酵素 Cre の標的配列 loxP で挟み込んだ *Gankyrin^{flox/flox}* マウス (Jackson laboratory) を交配することで、小腸と大腸の上皮細胞でガンキリン遺伝子を欠損している *Villin-Cre;Gankyrin^{ff}* マウスが作成された。そして、8-16 週齢の *Villin-Cre;Gankyrin^{ff}* マウス群と *Gankyrin^{ff}* マウス群からそれぞれ 6 匹を大腸炎誘導群に、3 匹を大腸炎非誘導群に分けられた。大腸炎誘導群には、分子量 36,000-50,000kDa のデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) (MP Biomedicals) を溶解した 2.5% DSS 水溶液が飲料水として 7 日間投与され、大腸炎非誘導群には通常の飲料水が投与された。この際、全てのマウスは、実験動物用飼料 CE-2 (日本クレア) を自由摂取した。その後、全てのマウスは屠殺され、各個体から盲腸および直腸が採取された。これらのサンプルは -20°C で保存された。そして、2 章の「2.3.1」に記した手法に基づいて、これらのサンプル中の腸内細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象とした DNA 抽出が行われ、次世代シーケンサーを用いてこれらの配列が決定された。

3.3.2 配列データの前処理

2 章の「2.3.2」に記した手法に基づいて、次世代シーケンサーから得た配列

データの処理を実施した。簡潔に述べると、得たペアエンド・リードから、低品質領域および PCR 用プライマー配列を除去した後、ペア毎に結合し、マージド・リード (以後、リード) を作成した。ただし、本解析では Cutadapt (version 1.11) (-e 0.06, -pair-filter = both) (Martin, 2011) を用いて PCR 用プライマーの配列除去を行い、未決定塩基を含むリードも解析の対象とした。また、十分量のリードが得られなかったため、大腸炎誘導群の *Gankyrin*^{ff} マウス群の盲腸サンプルの一つを後の解析から除外した。

3.3.3 OTU 解析

まず、2 章の「2.3.3」に記した手法に基づいて、各サンプルから得たリードを配列類似度に基づいて OTU に分類した。この際、より高い精度で解析するため、従来の 97%ではなく、99%の配列同一性閾値で OTU を形成した。それに伴い、配列との比較に用いる参照データベースとして、Greengenes データベース (version 13_8) (McDonald, et al., 2012) が提供している、同データベースの 16S rDNA 配列を従来の 97%ではなく、99%の配列同一性閾値でグループ化した OTU の代表配列を用いた。さらに、後述する手順により、参照データベースに含まれていない細菌を同定する目的で次の操作を行った。別段の記載がない限り、以降の解析では Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME version 1.9.1) (Caporaso, et al., 2010a) に含まれているツールを用いた。

まず、前述の参照データベースとの比較でマッチしなかった配列を集め、VSEARCH (version 2.10.4) (--uchime_denovo and --uchime_ref, --db 99_otus.fasta) (Rognes, et al., 2016) を用いて、PCR のエラーにより生じたキ

メラ配列を除去した。次に、pick_otus.py (--otu_picking_method usearch61, --similarity 0.99, --enable_rev_strand_match)を用いて、残されたリードの内での配列比較により、99%の配列同一性閾値で OTU を形成した。これらの内、すべてのサンプルにおいて、1つまたは2つしかリードが検出されなかった OTU (シングルトンおよびダブルトン) を解析から除いた。そして、parallel_assign_taxonomy_rdp.py (--confidence 0.8, --id_to_taxonomy_fp 99_otu_taxonomy.txt, --reference_seqs_fp 99_otus.fasta) を用いて、残された OTU の生物学的分類を割り当てた (Wang, et al., 2007)。

3.3.4 α と β 多様性の評価

2章の「2.3.4」および「2.3.5」に記した手法に基づいて、 α と β 多様性の解析を実施した。ただし、 α 多様性の比較検定には、compare_alpha_diversity.py のノンパラメトリック t 検定を用いた。 β 多様性解析では、非加重 UniFrac 距離を用いてサンプル間の腸内細菌の群集構造の類似度を評価した。また、これらの類似度の評価に使用する系統樹を作成する際に SSU-ALIGN (version 0.1.1) (Nawrocki, et al., 2009) を使用してアライメントを作成した。さらに、compare_categories.py の Adonis 検定を用いて群内と群間でサンプル間の類似度を比較することで、ある群間で類似度が統計的に有意に異なるか検定した (Anderson, 2001)。p 値の閾値は 0.05 とした。

3.3.5 各群間における OTU の頻度の比較

各群間で頻度が統計的に有意に異なる OTU の検出のため、以下の比較解析

を実施した。まず、`filter_otus_from_otu_table.py` を用いて、比較対象のサンプル群において、100 リード未満の OTU および、25%未満のサンプルでしか、観測されなかった OTU は解析から除外した。そして、各群間における各生物学的分類群の頻度の差の統計的有意性を `differential_abundance.py` (`--algorithm DESeq2_nbinom`) に実装されている DESeq2 (Love, et al., 2014) を用いて検定した。さらに、多重比較補正のため、Benjamini-Hochberg 法を用いて得られた p 値を FDR 値に変換し、0.05 未満の FDR 値を有意とした。また、偽陽性を避けるため、下記の条件に当てはまるものは、除外した：A. 対象 OTU がより多く検出された群において、いずれかのサンプルで未検出の場合、B. 対象 OTU がより多く検出された群の平均値が、他方の群の最大値を下回っている場合。

3.4 結果

3.4.1 各サンプルにおける腸内細菌の同定

腸内細菌を標的としたシーケンシングにより、各サンプルから合計で 4,507,372 リードが得られた。この内、2,593,734 リード (57.54%) が配列類似性に基づいたクラスタリングにより、13,442 個の OTU に分類された。これらの結果を OTU テーブルに整理し、後述の解析に使用した。

3.4.2 大腸炎誘導群は大腸炎非誘導群と比べてより少ない α 多様性を示す

遺伝的背景毎に、大腸炎誘導群と大腸炎非誘導群を比較した結果、いずれの比較においても、大腸炎誘導群においてリッチネス (OTU 数) がより少なく検出された (図 3-3)。また、ランダムサブサンプリングにより、サンプルサイズのばらつきによる影響を除いたうえで上記の差を精査した結果、いずれも統計的有意性が認められた (Holm 法による補正後 p 値 <0.05)。さらに、Shannon 指数値を用いて同一の解析を実施した結果、同じ傾向がみられたが、*Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウスの内、大腸炎誘導群と大腸炎非誘導群の直腸の間でのみ、統計的に有意な差が認められた (Holm 法による補正後 p 値 <0.05)。

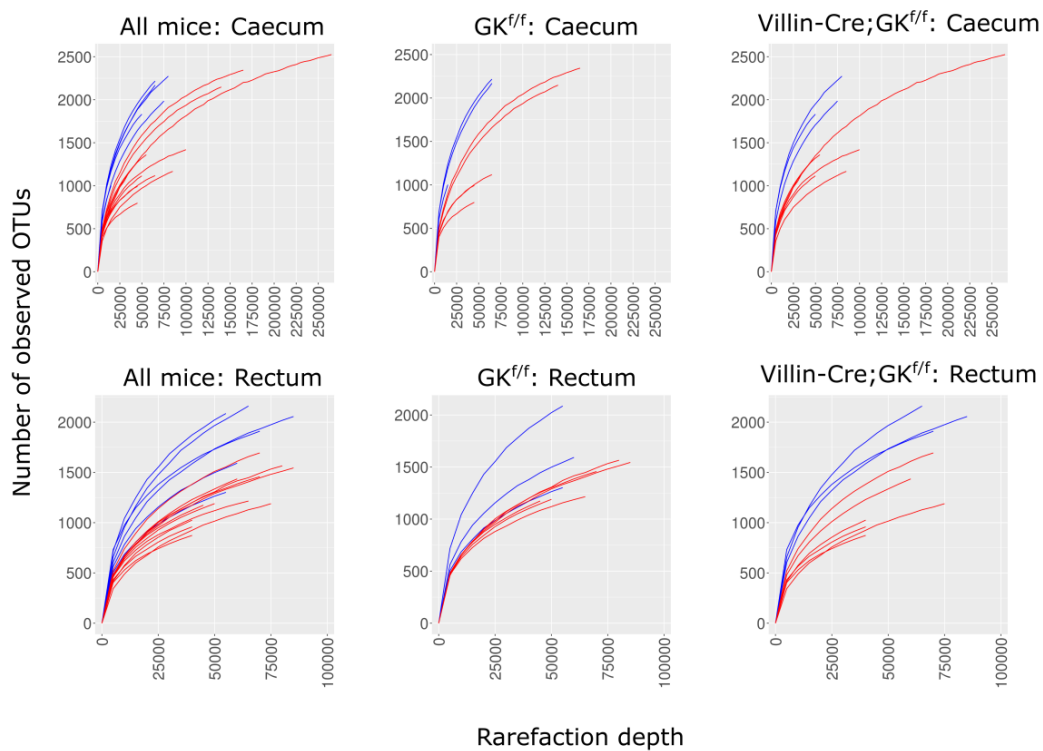


図 3-3 希薄化曲線による α 多様性の評価

各遺伝子背景の各部位にて観測された腸内細菌群集の OTU 数をサンプリングサイズ毎に表示。赤色は大腸炎誘導群、青色は大腸炎非誘導群を示す。本図は Sakurai, Nishiyama, et al., 2020 より転載[†]。

[†] 本図の使用は CC-BY ライセンスにより許諾されている。本ライセンスの内容は、<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>に掲示されている。

3.4.3 ガンキリン遺伝子の欠損は腸内細菌群集の細菌組成の変化を誘導する

各サンプル間の OTU 組成の類似度を非加重 UniFrac 距離で評価し、主座標分析を実施した結果、各遺伝的背景において、大腸炎誘導群と大腸炎非誘導群の間で大きな差が見られた (図 3-4)。さらに、Adonis 検定を用いた結果、上記の差は統計的に有意であった (Holm 法による補正後 p 値 <0.05)。効果量は、大腸炎誘導群と大腸炎非誘導群における *Villin-Cre;Gankyrin^{ff}* マウスの盲腸部位での比較で 0.30、直腸部位での比較で 0.29 であった。さらに、大腸炎誘導群と大腸炎非誘導群における *Gankyrin^{ff}* マウスの盲腸部位での比較では効果量はそれぞれ 0.36、直腸部位での比較で 0.30 であった。また、同検定を用いて、大腸炎を誘導した *Villin-Cre;Gankyrin^{ff}* マウス群と *Gankyrin^{ff}* マウス群の盲腸における腸内細菌群集の類似度を測った結果、これらは有意に異なることが分かった (Holm 法による補正後 p 値 <0.05)。この際の効果量は 0.15 であった。一方で、大腸炎を誘導していない *Villin-Cre;Gankyrin^{ff}* マウス群と *Gankyrin^{ff}* マウス群との差は有意では無かった (Holm 法による補正後 p 値 <0.05)。

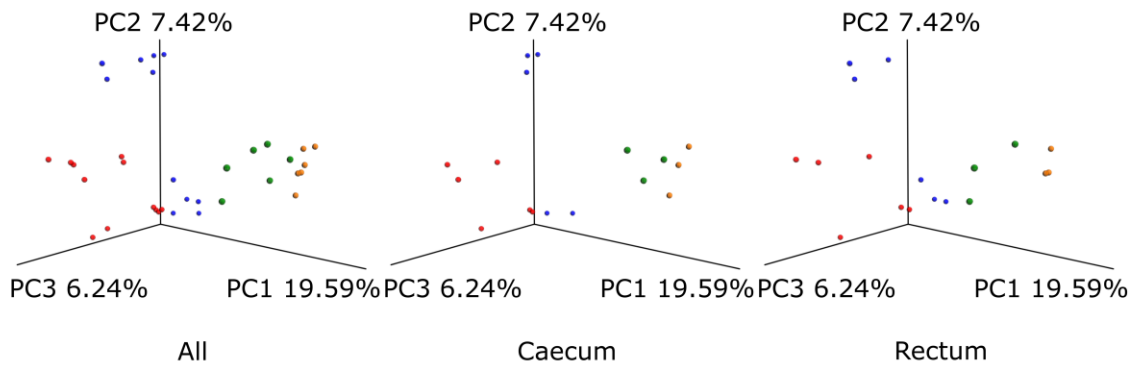


図 3-4 各サンプル間の腸内細菌群集の類似度

非加重 UniFrac 距離を用いて計算したサンプル間の類似度を、主座標分析により、三次元の空間に投影。可視化のため、全体 (All)、盲腸 (Caecum)、直腸 (Rectum) に分けて表示した。大腸炎非誘導の *Villin-Cre;Gankyrin^{f/f}* マウス群は橙色、大腸炎非誘導の *Gankyrin^{f/f}* マウス群は緑色、大腸炎誘導群の *Villin-Cre;Gankyrin^{f/f}* マウス群は赤色、大腸炎誘導群の *Gankyrin^{f/f}* マウス群は青色で示した。本図は Sakurai, Nishiyama, et al., 2020 より転載[†]。

[†] 本図の使用は CC-BY ライセンスにより許諾されている。本ライセンスの内容は、<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> に掲示されている。

3.4.4 ガンキリン遺伝子の欠損により異なる頻度を示す OTU の検出

上記で観測された腸内細菌の群集構造の違いに寄与している OTU の検出のため、下記の OTU 頻度の比較を実施した。この際、FDR 値<0.05 でかつ偽陽性のリスクを低減するために方法「3.3.5」で定めた基準を満たすものを有意とした。その結果、大腸炎を誘導した *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群と *Gankyrin^{fl/fl}* マウス群との比較において、盲腸で 39 個の OTU が、直腸で 25 個の OTU が有意に異なっていた (図 3-5; 図 3-6)。これらの内、大腸炎を誘導した *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群にて次の OTU がより多く検出された：*Bilophila* (1 個の OTU、盲腸と直腸)、*Helicobacteraceae* (3 個の OTU、直腸)、*Bacteroidales* S24-7 (10 個の OTU、盲腸と直腸)、*Clostridiales* (15 個の OTU、盲腸と直腸)、*Erysipelotrichaceae* (1 個の OTU、盲腸と直腸)。さらに、より詳細な生物学的分類を得るため、上記 OTU の代表 16S rDNA 配列をクエリとして NCBI の nucleotide collection (nr/nt) データベースに対し megablast ツール (Zhang, et al., 2000; Johnson, et al., 2008) を用いて検索した結果、*Helicobacteraceae* に分類されていた OTU-206538 は、*Helicobacter japonicum* の 16S rDNA 配列 (NR_149210.1、EF373968.1) と、OTU-675509 および OTU-2564049 は、*Helicobacter* sp. の 16S rDNA 配列 (GU902718.1、AB693139.1) と 100% の配列類似性で一致した。一方で、有意差を示した OTU の内、大腸炎を誘導した *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群にて次の OTU がより少なく検出された：*Adlercreutzia* (1 個の OTU、盲腸)、CW040 F16 (1 個の OTU、盲腸)、*Clostridiales* (23 個の OTU、盲腸と直腸)。

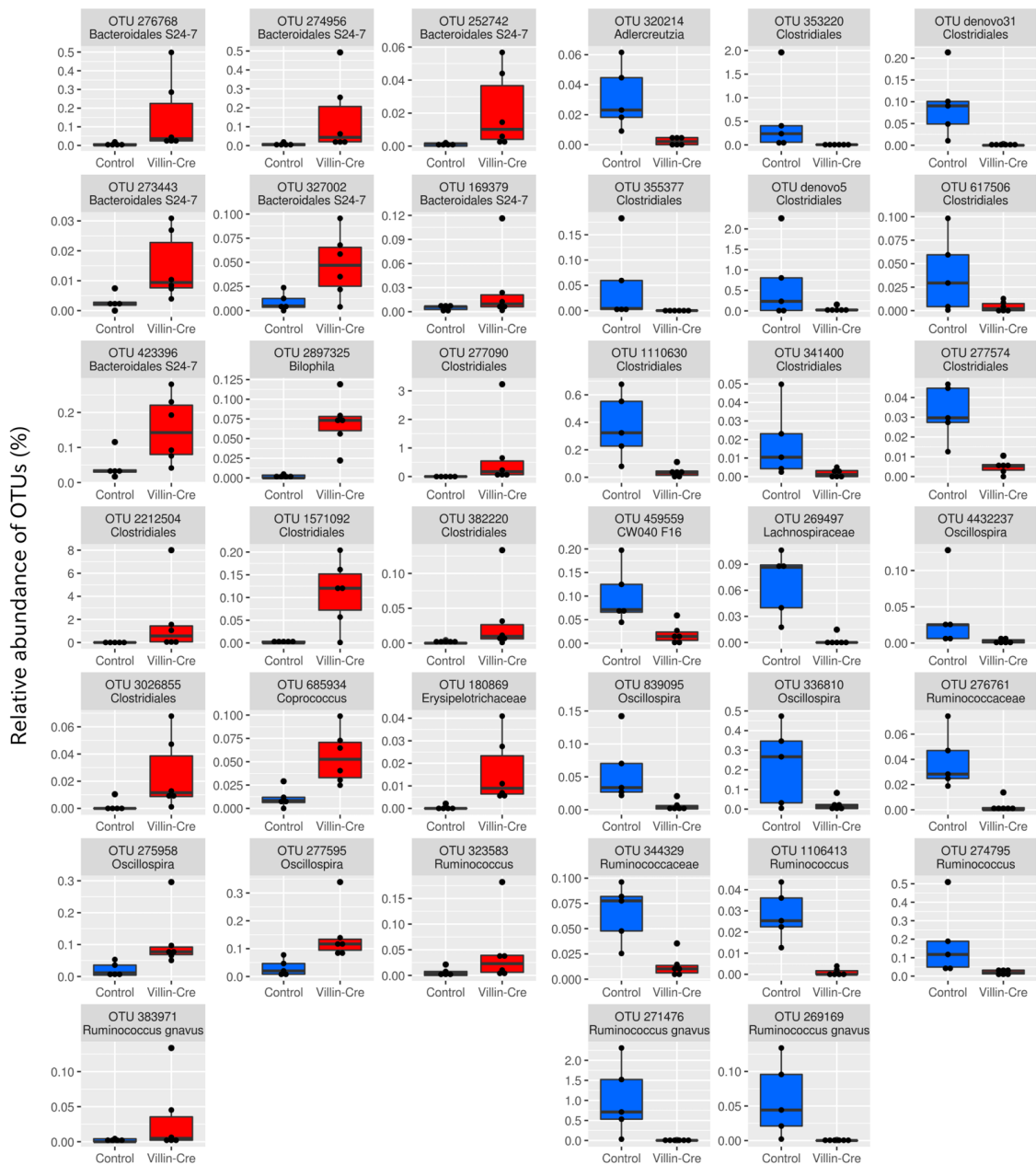


図 3-5 大腸炎を誘導した *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群(赤)と *Gankyrin^{fl/fl}* マウス群(青)のそれぞれの盲腸の間で有意な頻度差を示した OTU (FDR 値<0.05)

本図は Sakurai, Nishiyama, et al., 2020 より転載[†]。

[†] 本図の使用は CC-BY ライセンスにより許諾されている。本ライセンスの内容は、<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> に掲示されている。

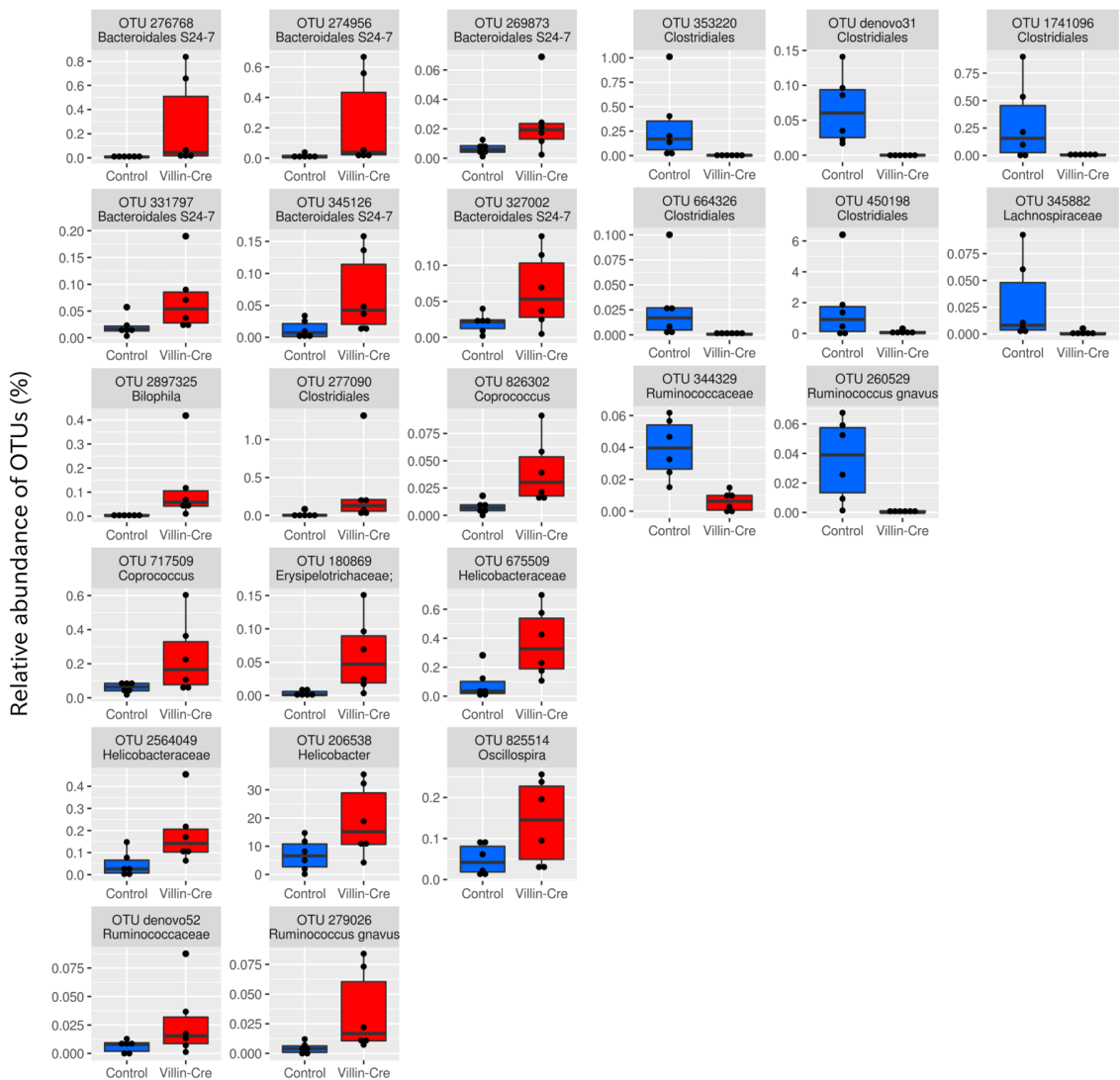


図 3-6 大腸炎を誘導した *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群(赤)と *Gankyrin^{fl/fl}* マウス群(青)のそれぞれの直腸の間で有意な頻度差を示した OTU (FDR 値<0.05)

本図は Sakurai, Nishiyama, et al., 2020 より転載[†]。

[†] 本図の使用は CC-BY ライセンスにより許諾されている。本ライセンスの内容は、<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> に掲示されている。

次に、大腸炎を誘導していない *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群と *Gankyrin^{fl/fl}* マウス群との比較を実施した。この際、FDR 値<0.05 でかつ偽陽性のリスクを低減するために方法「3.3.5」で定めた基準を満たすものを有意とした。その結果、盲腸で 91 個の OTU が、直腸で 86 個の OTU が有意に異なっていた (図 3-7; 図 3-8; 図 3-9; 図 3-10)。これらの内、*Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群にて、次の OTU がより多く検出された : Coriobacteriaceae (1 個の OTU、直腸)、Bacteroidales (32 個の OTU、盲腸と直腸)、*Lactobacillus reuteri* (1 個の OTU、直腸)、*Turicibacter* (1 個の OTU、盲腸と直腸)、Clostridiales (29 個の OTU、盲腸と直腸)、*Allobaculum* (1 個の OTU、盲腸と直腸)。一方で、有意差を示した OTU の内、*Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群にて次の OTU がより少なく検出された : Bacteroidales (3 個の OTU、盲腸と直腸)、*Mucispirillum schaedleri* (1 個の OTU、直腸)、Clostridiales (51 個の OTU、盲腸と直腸)、Alphaproteobacteria RF32 (1 個の OTU、盲腸)、Desulfovibrionaceae (2 個の OTU、直腸)。

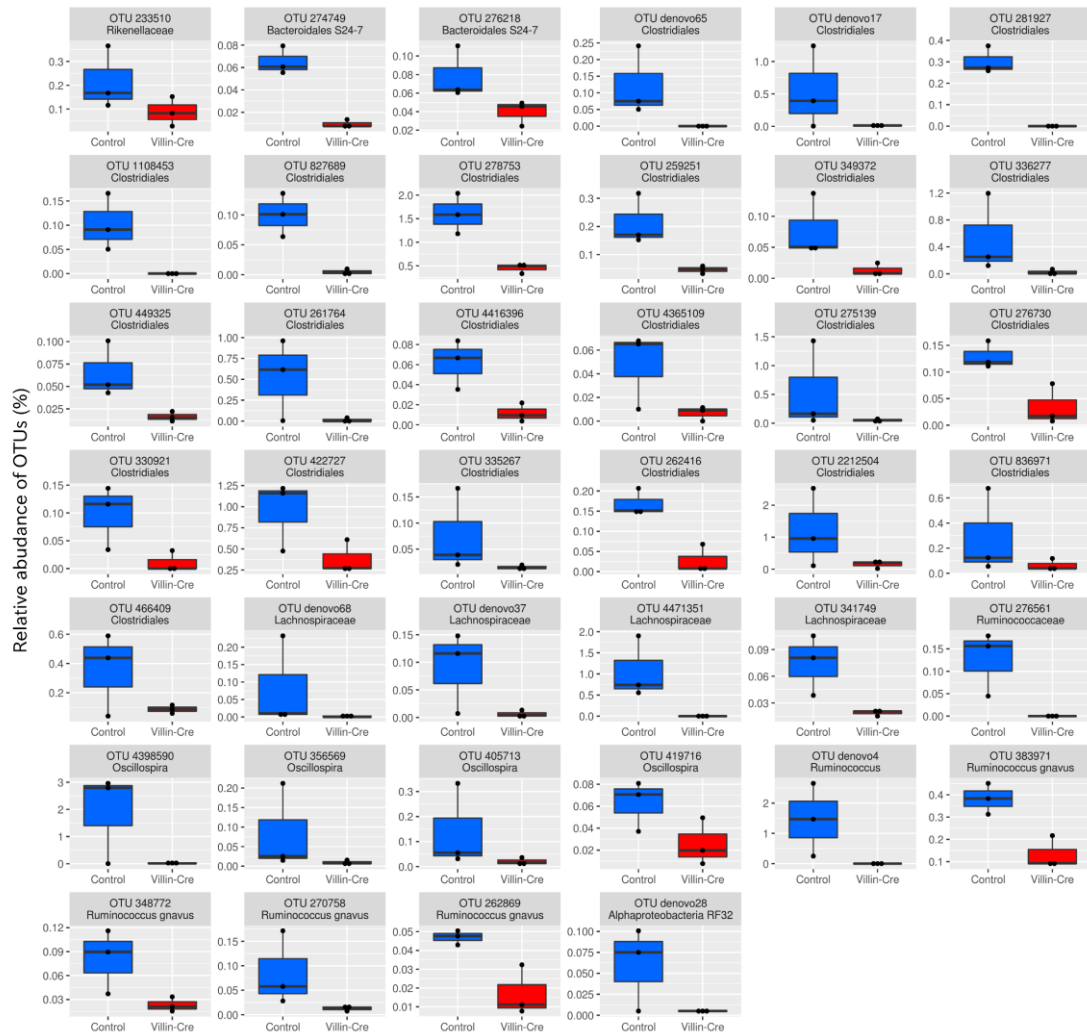


図 3-7 大腸炎を誘導していない *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群 (赤) と *Gankyrin^{fl/fl}* マウス群 (青) のそれぞれの盲腸の間で後者にてより有意に高い頻度を示した OTU (FDR 値 < 0.05)

本図は Sakurai, Nishiyama, et al., 2020 より転載[†]。

[†] 本図の使用は CC-BY ライセンスにより許諾されている。本ライセンスの内容は、<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> に掲示されている。

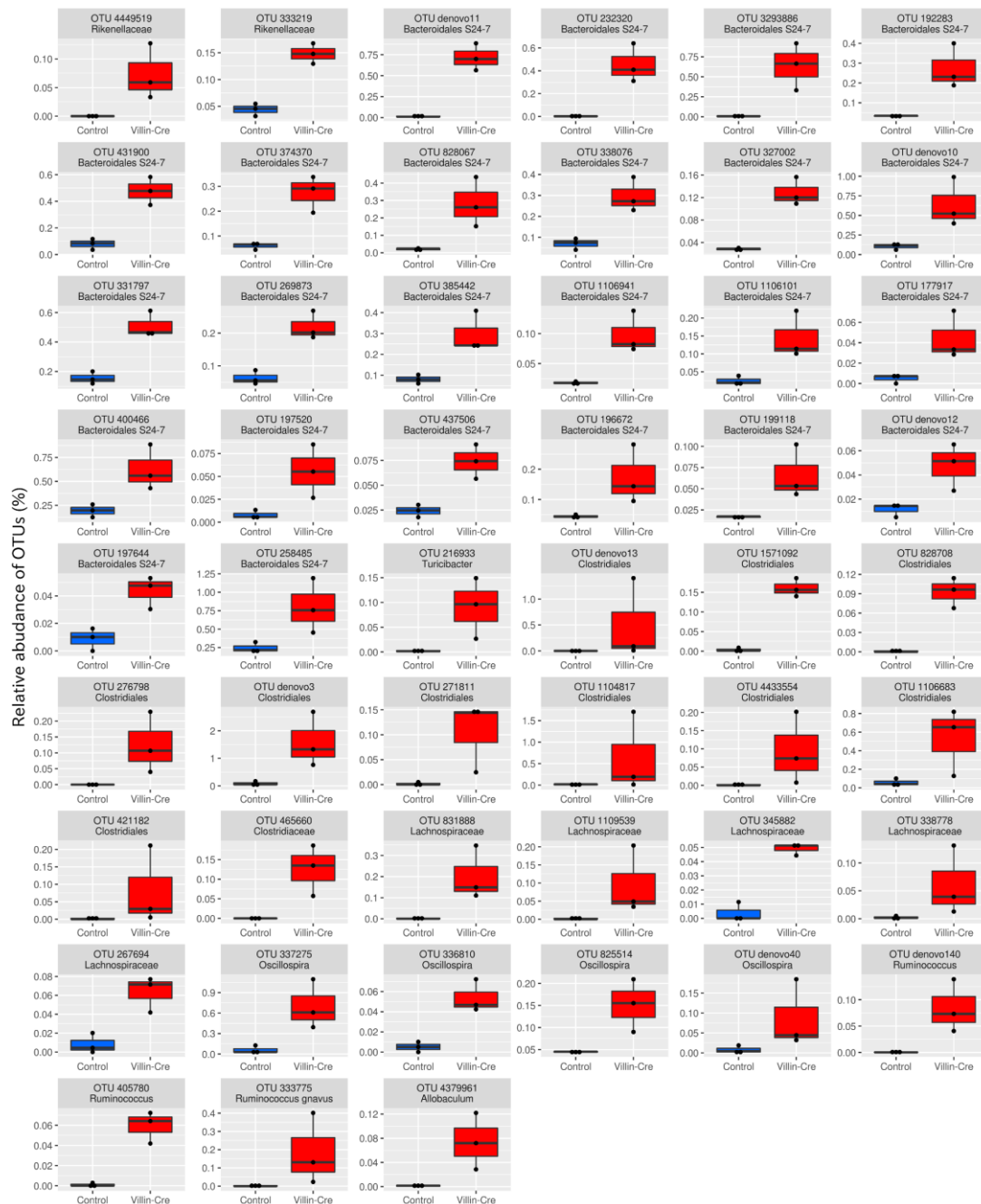


図 3-8 大腸炎を誘導していない *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群 (赤) と *Gankyrin^{fl/fl}* マウス群 (青) のそれぞれの盲腸の間で前者にてより有意に高い頻度を示した OTU (FDR 値 < 0.05)

本図は Sakurai, Nishiyama, et al., 2020 より転載[†]。

[†] 本図の使用は CC-BY ライセンスにより許諾されている。本ライセンスの内容は、<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> に掲示されている。

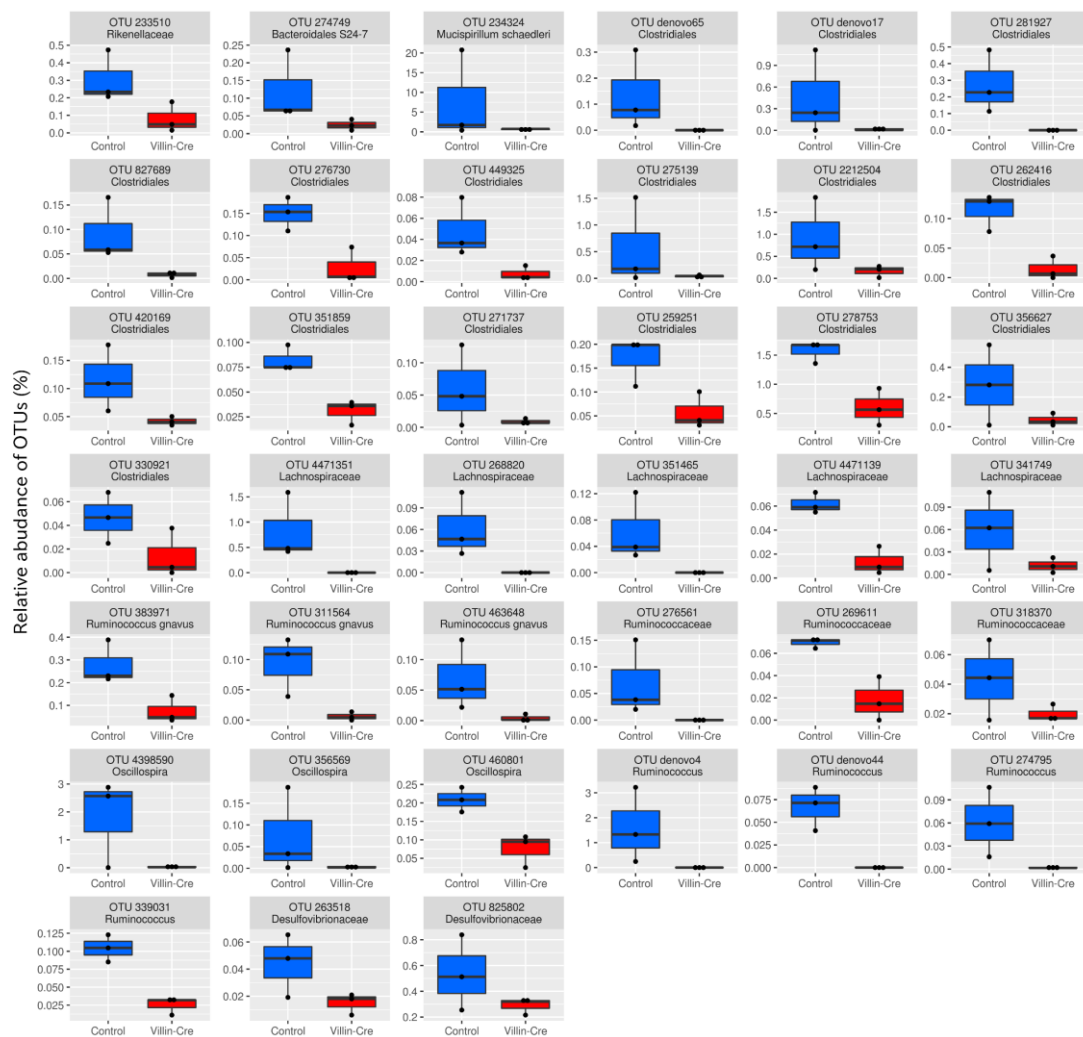


図 3-9 大腸炎を誘導していない *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群 (赤) と *Gankyrin^{fl/fl}* マウス群 (青) のそれぞれの直腸の間で後者にてより有意に高い頻度を示した OTU (FDR 値 < 0.05)

本図は Sakurai, Nishiyama, et al., 2020 より転載[†]。

[†] 本図の使用は CC-BY ライセンスにより許諾されている。本ライセンスの内容は、<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> に掲示されている。

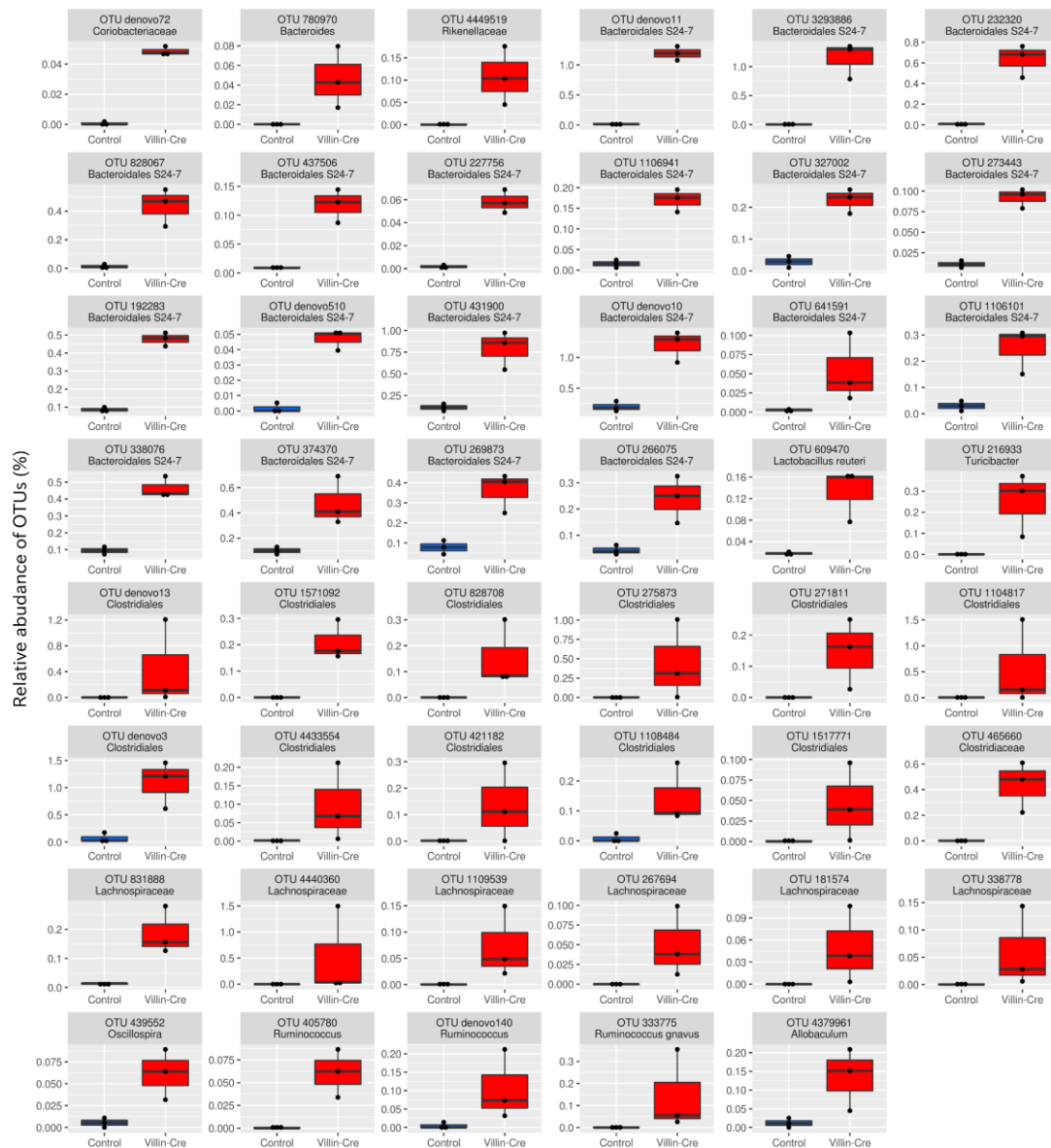


図 3-10 大腸炎を誘導していない *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群 (赤) と *Gankyrin^{fl/fl}* マウス群 (青) のそれぞれの直腸の間で前者にてより有意に高い頻度を示した OTU (FDR 値 < 0.05)

本図は Sakurai, Nishiyama, et al., 2020 より転載[†]。

[†] 本図の使用は CC-BY ライセンスにより許諾されている。本ライセンスの内容は、<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> に掲示されている。

3.5 考察

3.5.1 ガンキリンは腸内細菌群集の制御因子として重要な役割を果たす

IBD 患者の腸粘膜におけるガンキリンの遺伝子発現量が、炎症性サイトカイン TNF- α と IL-17 の遺伝子発現量と相関していたことから、本がんタンパク質は大腸炎の増悪を促進することで、大腸炎関連がんの発症を促していると考えられていた (Sakurai, et al., 2017a)。しかし、これらの予想と反し、遺伝子ノックアウトにより小腸と大腸におけるガンキリンの発現を抑制した *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群とそのコントロールとして用意した *Gankyrin^{fl/fl}* マウス群に大腸炎を誘発させた結果、前者にてより重度の大腸炎が生じることが共同研究者により突き止められた。さらに、大腸炎を誘導した *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群では、腸内細菌の群集構造の制御に関与している抗菌ペプチド α -defensin の小腸上部における発現が著しく減少していた (図 3-2B)。これらの結果から、本研究ではガンキリンの遺伝子発現の抑制により生じた大腸炎の増悪に、腸内細菌の群集構造の変化が関係していると新たに考え、本仮説の検証のため 16S rRNA アンプリコン解析を実施した。その結果、大腸炎を誘発させた *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群と *Gankyrin^{fl/fl}* マウス群との間で腸内細菌の群集構造が盲腸で有意に異なることが判明した (図 3-4)。これらの結果から、ガンキリンは α -defensin の小腸上部での遺伝子発現を促すことで、腸内細菌の群集構造を制御していることが新たに示唆された。一方で、具体的にどのような原理でガンキリンは α -defensin の遺伝子発現を亢進しているのかは不明である。小腸上部での α -defensin の分泌は Paneth 細胞によって行われているため、Paneth 細胞におけるガンキリンの遺伝子発現が α -defensin の分泌に関与していること

が考えられる。本仮説を検証するためには、今後、Paneth 細胞から特異的にガンキリン遺伝子がノックアウトされているマウスを作成し、それらの腸内細菌群集を調べる必要がある。

3.5.2 ガンキリンの発現抑制により生じた大腸炎の増悪と腸内細菌の群集構造の変化との関係性

大腸炎を誘発させた実験では、*Gankyrin^{fl/fl}* マウス群と比べて *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群にて炎症に寄与し得る *Bilophila* sp. (盲腸と直腸：1 個の OTU)、*Helicobacter japonicum* (直腸：1 個の OTU)、*Helicobacter* spp. (直腸：2 個の OTU) が有意により多く検出された (図 3-5; 図 3-6)。*H. japonicum* は、炎症性サイトカインである inducible nitric oxide synthase (iNOS)、IFN- γ 、IL-17A、TNF- α の発現増加により、炎症を増悪させることが、大腸炎モデルマウスにて証明されている (Shen, et al., 2016)。したがって、大腸炎を誘導した *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群にて測定された IFN- γ および IL-17A の遺伝子発現の有意な増加は、*H. japonicum* の増加と関係していたと考えられる (図 3-6)。また、*Helicobacter* は、他の臨床研究で IBD 患者の腸内細菌群集にて、健常者より多く検出されており、これらの増加は本研究で観測された大腸炎の増悪に関係していたことが考えられる (Yu, et al., 2015)。上記の他に、*Bilophila* の増加も見られたが、これらに含まれる菌種は、大腸炎の増悪と関係している硫化水素を産生する (図 3-5; 図 3-6) (Warren, et al., 2005; Singh, et al., 2015; Beaumont, et al., 2016)。したがって本細菌の増加は、大腸炎の増悪に関与していた可能性がある (Singh, et al., 2015; Beaumont, et al., 2016)。また、大腸炎を

誘導していない実験では、多数の OTU が、*Villin-Cre;Gankyrin^{f/f}* マウス群と *Gankyrin^{f/f}* マウス群との間で有意差を示したが、これらの中に上記の悪玉菌は含まれていなかった (図 3-7; 図 3-8; 図 3-9; 図 3-10)。つまり、上記の悪玉菌の変動は、大腸炎が生じている場合に限られていた。今後、無菌マウスの使用などにより、ガンキリン遺伝子の発現抑制に伴う大腸炎の増悪が、腸内細菌群集の構造変化によるものなのか検証する必要があるものの、これらの結果からガンキリンの遺伝子発現の抑制により生じた大腸炎の増悪に悪玉菌の増加が寄与していた可能性が示唆された。

3.6 結論

ガンキリンは IBD 患者の腸粘膜にて過剰に発現しており、炎症性サイトカインの発現の亢進により大腸炎の増悪やそれに伴う大腸炎関連がんの発症を促すと考えられていた。しかし、小腸から大腸にかけてガンキリン遺伝子をノックアウトした *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウスに大腸炎を誘導した結果、コントロールの *Gankyrin^{fl/fl}* マウス群より重度の大腸炎が生じることが共同研究者である櫻井俊治博士らの研究チームにより発見された。さらに、より重度の大腸炎を示したマウスにて、腸内細菌群集を制御する α -defensin の発現が著しく低下していることが共同研究者らの調査により分かった。そこで、本研究では、腸内微生物群集の解析を実施した。その結果、大腸炎を誘導した *Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群と *Gankyrin^{fl/fl}* マウス群の間では腸内細菌の群集構造が異なることが分かった。さらに、個々の OTU の頻度を比較した結果、*Villin-Cre;Gankyrin^{fl/fl}* マウス群にて *Bilophila* spp.、*Helicobacter japonicum*、*Helicobacter* spp. などの悪玉菌が増加していた。これらの結果から、ガンキリンはがんタンパク質としての側面を持つ一方で、同時に腸内細菌の群集構造の制御に関与しており、腸管におけるガンキリンの遺伝子発現の抑制は悪玉菌の増加を伴う腸内細菌の群集構造の変化を引き起こし、これにより大腸炎の増悪を招く可能性が示唆された。

4章 炎症性腸疾患患者の腸内における溶原性ファージの細菌群集及び疾患への影響の調査

4.1 概要

炎症性腸疾患 (IBD) の病態に、腸内細菌群集だけでなく、それらに感染する *Caudovirales* 目の溶原性ファージが関与していることが、近年の研究により示唆されている。本研究では、腸内メタゲノムから構築したゲノムデータに基づき、溶原性ファージと宿主細菌を関連付けることにより、IBD の病態におけるファージの役割について調査を行った。本調査により、極めて多様な系統の腸内細菌が増殖能を保持した溶原性ファージに感染していることが判明した。また、溶原性ファージの群集組成は個人により大きく異なることが分かった。一方で、非 IBD 患者と比較して活動期の潰瘍性大腸炎では、善玉菌である *Bacteroides uniformis* および *B. thetaiotaomicron* の頻度が有意に少なく検出されたのに対し、それらに感染する溶原性ファージの頻度は有意に多く検出された。これらの結果から、溶原性ファージが IBD の病態に関与していることが示唆された。なお、本章の研究は、Nishiyama, et al., 2020 に掲載された。

4.2 序論

4.2.1 クロウン病と潰瘍性大腸炎の病態

クローン病 (CD) と潰瘍性大腸炎 (UC) は、炎症性腸疾患 (IBD) に含まれる難病であり、IBD として診断される症例の大多数を占める。CD と UC の代表的な症状は、どちらも消化管における慢性的な炎症だが、CD では炎症が消化管の全部位にて散発的に生じるのに対し、UC の炎症の発生個所は大腸に限局している。CD および UC の詳細な原因は不明だが、遺伝や環境因子 (例; 食事、抗生物質、薬物) に加え、腸内細菌群集が、これらの病態に強く関与していると考えられている (Kühn, et al., 1993; Zuo, et al., 2018; Lloyd-Price, et al., 2019)。さらに、近年では、腸内細菌に感染するファージも、これらの疾患の病態に関与していることが、示唆されている (Norman, et al., 2015; Zuo, et al., 2019; Maronek, et al., 2020)。

4.2.2 溶原性ファージの生活環

ヒト腸内に存在するウイルスの大部分は、溶原サイクルと溶菌サイクルの二種の生活環を通じて増殖するファージ、すなわち溶原性ファージによって占められている (Garmaeva, et al., 2019; Howard-Varona, et al., 2017)。溶原サイクルでは、宿主である細菌のゲノムに溶原性ファージのゲノムがプロファージと呼ばれる状態で組み込まれ、宿主ゲノムと共に複製される。この過程で、宿主ゲノムに、抗生物質耐性や毒素産生能などの形質が宿主細菌に導入されることがある (Argov, et al., 2017)。一方で、溶菌サイクルでは、新たなファージ粒子がプロファージから複製され、宿主細菌を溶菌した後、新たな細菌に感染する。

4.2.3 CD と UC における溶原性ファージの役割

IBD 患者と健常者との間で腸内における *Caudovirales* 目の組成や種多様性(リッチネス)が大きく異なることから、これらの溶原性ファージは溶菌や形質導入により腸内細菌を制御することで、IBD の病態に関与していることが、近年示唆された (Norman, et al., 2015; Zuo, et al., 2019)。しかし、ヒト腸内のウイルスの多くは属や種などの詳細なレベルで生物学的分類が割り当てられていないため、過去の文献からそれらの宿主を推定することは難しい。また、既に分類されたウイルスの生物学的分類についても、新たにゲノム配列が決定されたウイルスに対応するため、International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) によって、常に見直しが行われている点に留意する必要がある。実際、上記の *Caudovirales* 目の定義は、2018年に *Ackermannviridae* 科と *Herelleviridae* 科を含むように変更されている (Garmaeva, et al., 2019)。こうした問題に対応するため、マウスの腸内微生物群集を対象とした Kim らの研究ではメタゲノムから読み取られた断片的な塩基配列の情報から再構築した微生物ゲノムの塩基配列の比較により、溶原性ファージの宿主の特定が行われた (Kim, et al., 2018)。一方で、筆者の知る限り、ヒトの腸内微生物群集を対象とした研究ではそうした試みは行われていない。そこで、本研究では、腸内メタゲノムから再構築したゲノムデータに基づいて、溶原性ファージを宿主細菌と関連付けることにより、CD および UC の病態における、溶原性ファージの役割について調査を行った。

4.3 方法

4.3.1 IBDMDB データデポジトリ

本研究は、IBD Multi'omics Database (IBDMDB) の研究チームが公開している、IBD 患者などの腸内微生物群集を対象とした全メタゲノムショットガンシーケンシング (WMGS) データを用いて実施した (Lloyd-Price, et al., 2019; Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium, 2014)。本データセットには、1338 セットの WMGS データが含まれており、CD 患者 65 人、UC 患者 38 人、非 IBD 患者 27 人から約一年間、定期的に採取した便サンプルから、次世代シーケンサー Illumina HiSeq の使用により得た、腸内微生物群集のゲノム断片の短い配列 (101 bp×2; 以後、リード) によって構成されている。なお、非 IBD 患者とは、大腸がんの検診や胃腸の異常のため診察を受けた患者の内、IBD と診断されなかった患者を指す。また、本 WMGS データの前処理は、IBDMDB の研究チームによって事前に実施されている。具体的には、AnADAMA2 パイプライン (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/anadama2>) の使用により、リードの低品質領域および、ヒトゲノムと一致したリードの全域が除去されている。本研究では、前述の前処理された WMGS データおよび、付随するメタデータ (患者番号、年齢、性別など) を、IBDMDB デポジトリ (<http://ibdmdb.org>) から入手し、後の解析に使用した。

4.3.2 CD と UC 患者の重症度の定義づけ

本研究では、各 CD 患者の健康状態を、Harvey-Bradshaw index (HBI) スコアが 5 以上の場合、活動期の CD とし、同スコアが 5 未満の場合、寛解期の CD

と定義した (Harvey, et al., 1980)。また、各 UC 患者の健康状態を、simple clinical colitis activity index (SCCAI) スコアが 5 以上の場合、活動期の UC とし、同スコアが 5 未満の場合、寛解期の UC と定義した (Walmsley, et al., 1998)。

4.3.3 コンティグ・アセンブリ

ゲノム断片 (コンティグ) の構築のため、まず、十分なリードがシーケンスされた便サンプル (最低 10,000 リード) を後の解析の使用に選択した。そして、MEGAHIT (バージョン 1.1.4) (--kmin 21, --kmax 251, --k-step 10) (Li, et al., 2015) を用いて、サンプル毎にリードを集め、コンティグの作成 (アセンブリ) を行った。また、頻度の少ない微生物のゲノムを再構築するため、同一患者のサンプルに由来するリードを混ぜ、同手法により、コンティグのアセンブリを実施した。

4.3.4 溶原性ファージの操作的分類群の作成

腸内微生物群集のウイルスゲノムを得るため、VirSorter (version 1.0.5) (--db 2, --diamond) を用いて、コンティグ内のウイルス領域を予測した (Roux, et al., 2015)。この際、ウイルス領域の誤同定を減らすため、Roux, et al., 2015 の推奨に従い、配列長が 10 kbp より長いコンティグから VirSorter カテゴリ 1、2、4、5 と予測された領域を後の解析に選択した。そして、CD-HIT-EST (version 4.6.8) (-c 0.95, -aS 0.85, -n 10, -g 1) を用いて、配列同一性閾値 95% でウイルス領域を viral OTU に種レベルでグループ化した (Li, et al., 2006)。この後、溶原性ファージに由来する viral OTU を同定するため、MetaGeneMark (version 4.30)

を使用して、viral OTU のコンティグ配列からペプチド配列を抽出し、これらのペプチド配列を、Pfam-A データベース (version 33.0) に登録されている既知タンパク質ドメインと hmmscan (version 3.3) (--cut_ga) を用いて比較した (Zhu, et al., 2010; Eddy, 2011; El-Gebali, et al., 2019)。そして、次のウイルスインテグララーゼのタンパク質ドメインのいずれかを持つ viral OTU を溶原性ファージとして同定した : PF00589, PF02899, PF09003, PF14659, PF13356, PF13495, PF12834, PF12835, PF13009, PF14657, PF02914, PF02316, PF02920, PF09299 (El-Gebali, et al., 2019)。また、vConTACT v2.0 (version 0.9.12) (--rel-mode Diamond、 --db ProkaryoticViralRefSeq94-Merged) のを用いて、各 viral OTU に対してそれぞれの代表 (最長) 配列を基に属レベルの生物学的分類を割り当てた (Bin Jang, et al., 2019)。

4.3.5 細菌ドラフトゲノム (MAG) の構築

細菌ドラフトゲノム (MAG) を構築するため、METAWRAP (version 1.1.8) (binning、 --metabat2、 --maxbin2、 --concoct) を用いた (Uritskiy, et al., 2018)。具体的には、まず、Burrows–Wheeler aligner を用いて、各コンティグに対してリードをマッピングすることにより、各コンティグのサンプル毎の頻度を算出した (Li, et al., 2009a)。次に、MaxBin2 (version 2.2.5)、MetaBAT2 (version 2.12.1)、CONCOCT (version 1.0.0) を用いて、サンプル毎の頻度および k-mer 出現頻度分布に基づき、各コンティグをそれぞれの MAG にグループ化 (ビンニング) した (Wu, et al., 2016; Kang, et al., 2019; Alneberg, et al., 2014)。そして、METAWRAP binning_refiner を用いて、ゲノム毎に、異なるビンニングツールに

より生成された MAG を混ぜ合わせた。その後、ゲノム毎に、混ぜ合わせた MAG の中から最適なものを、CheckM (version 1.0.13) (lineage_wf) によって算出した完成率と冗長度に基づいて、選出した (Parks, et al., 2015)。これらの中から、完成率が 70%以上で且つ冗長度が 10%以下の MAG を後の解析に選択した。この後、他のサンプルのアセンブリなどにより得られた MAG と同一なものを纏めるため、dRep (version 2.2.2) を用いて、MAG 同士でゲノム比較を行い、genome-wide average nucleotide identity 99%かつ aligned fraction 60%の閾値で、同一性を示したものを、同一の MAG クラスタに分類した (Olm, et al., 2017)。最後に、各 MAG クラスタから、完成率、冗長度、strain heterogeneity、N50、ゲノムサイズに基づいて、代表 MAG を選択し、それらに対して GTDB-Tk (version 1.0.2) (classify_wf) を用いて、NCBI 方式の生物学的分類を割り当てた (Olm, et al., 2017、Chaumeil, et al., 2019)。これらの内、6つの MAG クラスタは古細菌に分類されたため、それらを除いた 3133 個の細菌由来の MAG クラスタを選択し、後の解析に使用した。

4.3.6 細菌ドラフトゲノムに基づいた系統樹の作成

メタゲノムから再構築した細菌ドラフトゲノムの系統樹を作成するため、まず MetaGeneMark (version 4.30) を用いて、各 MAG クラスタの代表 MAG からペプチド配列を抽出した (Zhu, et al., 2010)。次に、PhyloPhlAn (version 0.99) (--user_tree) を用いて、これらのペプチド配列から系統樹を作成した (Segata, et al., 2013)。具体的には、まず、各代表 MAG から抽出したペプチド配列の中から PhyloPhlAn の 400 個のマーカートンパク質 (細菌や古細菌に保持されて

いるタンパク質のコレクション)と一致するものを、USEARCH (version 5.2.236) による配列比較により同定した (Segata, et al., 2013; Edgar 2010)。その後、MUSCLE (version 3.8.31) を用いて、マーカータンパク質と一致した MAG のタンパク質からアライメントを作成した (Edgar 2004)。そして、FastTree (version 2.1.11) を用いて、本アライメントを基に系統樹を作成し、iTOL (version 5.6) により視覚化した (Price, et al., 2010; Letunic, et al., 2019)。

4.3.7 Viral OTU への宿主の割り当て

先行研究に基づいて、ビニングおよび、basic local alignment search tool (BLAST) を用いた手法により、viral OTU の宿主を割り当てた (Camacho, et al., 2009; Waller, et al., 2014; Gao, et al., 2018; Kim, et al., 2018)。ビニングに基づく手法では、対象の viral OTU の配列を含む MAG クラスタを宿主とした。BLAST に基づいた方法では、BLASTn (version 2.8.1) (-perc_identity 95、-evaluate 1e-50、-word_size 11) を用いて、プロファージ配列 (VirSorter によりカテゴリ 4 または 5 に分類されたコンティグ上のウイルス領域) の両端にある配列を他の MAG に含まれているコンティグの配列と比較した (Camacho, et al., 2009)。この際、プロファージ配列の両端の配列 (250 bp 未満の長さのものは不使用) が、配列類似度 95%以上、クエリ・カバレッジ 80%以上の閾値で一致したコンティグを持つ MAG クラスタを宿主とした。また、配列が長いクエリ (プロファージ配列の両端の配列) は、プロファージ領域の端から 1000 bp になるよう事前に短くした。

4.3.8 Viral OTU および MAG クラスタへのリード・マッピング

それぞれのサンプルにおける、各 viral OTU および MAG クラスタの頻度を得るため、IBDMDB から入手した、1338 個のサンプルの腸内メタゲノムのリードを、bowtie2 (version 2.3.4.3) (--maxins 1000) の使用により、それぞれの代表配列にマッピングした (Langmead, et al., 2012)。次に、CoverM (version 0.3.0、<https://github.com/wwood/CoverM/>) (--proper-pairs-only) を使用し、対象配列に対し、80%以上アラインメントされ、95%以上の配列類似度を示したリードのみを、上記のマッピングにより得た bam ファイルに残した。さらに、samtools (version 1.9) (-f 3, -F 2304) を使用し、正しく対象配列にアラインメントされていなかったリードを除外した (Li, et al., 2009b)。そして、これらの bam ファイルに対し、samtools (version 1.9) の idxstat を使用する事で、各 viral OTU および MAG クラスタにマッピングされたリード数を入手し、各サンプルの頻度を記録したカウントテーブルを作成した (Li, et al., 2009b)。

4.3.9 ファージ対宿主比の算出

各 viral OTU のファージ対宿主比は、サンプル毎に viral OTU の fragments per kilobase of transcript per million mapped reads (FPKM) を宿主の FPKM (複数の宿主がある場合はそれらの FPKM の合計) で割ることで算出した。なお、誤ったファージ対宿主比の検出防止のため、宿主にマップされたリードが 100 未満の場合、ファージ対宿主比は算出しなかった。

4.3.10 α と β 多様性の評価

以降の解析では、MAG クラスタや viral OTU の代表配列に 100 万以上のリードがマッピングされた 1290 個のサンプルを対象に実施した。 α 多様性の評価では、まず phyloseq R パッケージ (version 1.30.0) を用いて、各サンプルから最小サンプルのリード数と同じ量のリードを無作為に抽出し、得たリードの数をそれぞれがマッピングされているゲノムの長さに基づいて正規化することで、カウントテーブルを作成した (McMurdie, et al., 2013)。その後、同ツールを用いて、同カウントテーブルを基に各サンプルの Shannon 指数値を算出した (McMurdie, et al., 2013)。この処理を 10 回繰り返し、各サンプルの平均値を後の解析に使用した。そして、各サンプルにおける腸内微生物群集の α 多様性に対する疾患 (diagnosis factor) の影響の統計的有意性を評価するため、nlme R パッケージ (version 3.1-147) の使用により、以下の線形混合効果モデルを用いた (Pinheiro, et al., 2020)。

Shannon's diversity index ~ disease status + sex + consent age + antibiotics + chemotherapy + immunosuppressants + site name + (1|participant ID).

この際、Wald 検定を用いて、統計的有意性 (p 値) を算出した。また、リッチネス (OTU 数) に基づいた α 多様性の評価も同手法により実施した。

β 多様性の評価では、Bray-Curtis 非類似度を用いて、各サンプル間の腸内微生物群集の類似度を算出した。具体的には、まず、phyloseq R パッケージを用いて、各サンプルから最小サンプルのリード数と同じ量のリードを無作為に抽出し、得たリードの数をそれぞれがマッピングされているゲノムの長さに基づいて正規化することで、カウントテーブルを作成した (McMurdie, et al., 2013)。その後、同ツールを用いて、同カウントテーブルを基に各サンプル間の類似度を

Bray-Curtis 非類似度を用いて算出した。そして、phyloseq R パッケージの Adonis 検定により、腸内微生物群集の分散に対する個人差の影響を評価した。また、同一の手法を用いて、腸内微生物群集の分散に対する疾患の影響を評価した (McMurdie, et al., 2013; Anderson, 2001)。ただし、この際、ゲノム長でリードカウントを正規化する前に、リードカウントを個人ごとに平均化した。さらに、類似度行列の可視化のため、uniform manifold approximation and projection for dimension reduction (UMAP) (version 0.4.2) (n_neighbors = 30、min_dist = 0.3、n_components = 2、metric = braycurtis) を用いて、各行列を二次元空間に投影した (McInnes, et al., 2018)。また、プログラムの実行の際に、並列化のため、GNU parallel (バージョン 20180322) を使用した (Tange, 2011)。

4.3.11 各群間における viral OTU および MAG クラスタの頻度比較

疾患状態により、統計的に有意な頻度差を示す腸内微生物の検出のため、metagenomeSeq R パッケージ (バージョン 1.30.0) の fitZig 関数を使用した (Paulson, et al., 2013)。具体的には、まず、viral OTU または MAG クラスタ (以後、比較項目) の内、比較するサンプル群のいずれにおいても、25%以下のサンプルにしか検出されなかったものを除外した。次に、比較項目のサンプル毎のリード数を metagenomeSeq の cumulative sum scaling 法に基づき正規化した。そして、次のパラメータを基に作成した zero-inflated Gaussian mixture model を用いて、比較項目が群間で示す頻度差の統計的有意性を検証した：応答変数 = 正規化したリード数；説明変数 = 疾患状態、性別、臨床研究参加への同意時の患者の年齢、抗生物質の使用有無、免疫抑制剤の使用有無、病院、正規化因子；プロ

ツッキング変数=患者 ID。この際、本ツールの著者らの推奨に従い、正規化因子を cumulative sum scaling 法により調整した (Paulson, et al., 2013)。また、より精度を高める目的で最大反復数をデフォルトの 10 から 100 に引き上げた。そして、上記の統計モデルの使用により得た結果から、FDR 値 (Benjamini-Hochberg 法により多重比較の補正をした p 値) が 0.1 未満で、log2 fold-change の値が 1 以上の頻度差を示した比較項目 (viral OTU または MAG クラスタ) に着目した。これらの内、著者らの推奨に従い、偽陽性を減らす目的で、有効サンプルサイズが平均未満の比較項目を除外した。さらに、比較項目がより多く検出された群における頻度の中央値が、より少なく検出された群における頻度の中央値を、上回るもののみを有意とした。なお、上記の統計モデルに必要な変数の内の一つである同意年齢の情報が欠損していたため、CD 患者 (参加者 ID C3031) に属する 10 個のサンプルは本解析から除外した。

4.4 結果

4.4.1 ヒト腸内の溶原性ファージの大多数の生物学的分類は未知

IBDMDB の研究チームが作成した、UC、CD、および、非 IBD 患者から採取した 1327 個の便サンプルから得た WMGS データセットを活用し、17,536,516 個のコンティグを再構築した。次に、ヒト腸内の溶原性ファージ群集の組成を調べるため、これらのコンティグの遺伝子組成を精査し、50,624 個のウイルス領域を同定した。そして、これらのウイルス領域を配列類似性に基づいて、種レベルでまとめた結果、17,331 個の viral OTU が得られた。これらの内、ウイルスインテグラーゼ遺伝子を保有し、かつ、いずれかのサンプルで 10 より高いファージ対宿主比を示した 1797 個の viral OTU を、増殖能を保持した（欠損ファージではない）溶原性ファージとみなした。これらの内、既知ウイルスゲノムとの配列比較により生物学的分類の割り当てることができたのは、28 個（1.56%）の viral OTU のみであった。なお、生物学的分類を割り当てることができた viral OTU は、*Caudovirales* 目に含まれる属に属していた（図 4-1A）。また、これらの代表配列長の中央値は 33,609 bp（最短：4331 bp、最長：313,294 bp）だった。

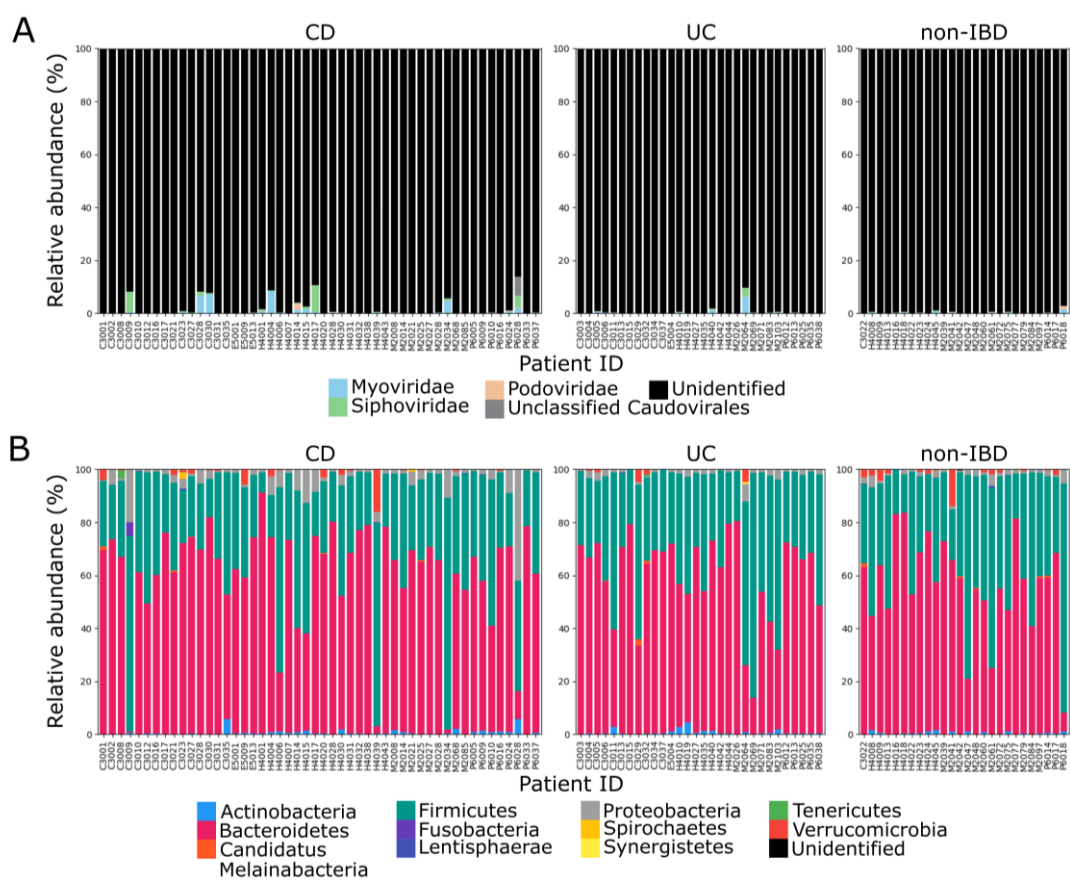


図 4-1 各サンプルにおける腸内微生物群集の組成

(A) 溶原性ファージと (B) 細菌について患者毎に、各生物学的分類群の相対頻度の平均を算出した。本図は Nishiyama, et al., 2020 より転載[†]。

[†] 本図の使用は CC-BY ライセンスにより許諾されている。本ライセンスの内容は、<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>に掲示されている。

4.4.2 ヒト腸内の溶原性ファージは幅広い系統の細菌に感染

ヒト腸内の溶原性ファージの宿主範囲を定めるため、細菌ドラフトゲノム (MAG) をコンティグから再構築した。具体的には、サンプル毎の頻度および k-mer 出現頻度分布に基づいてゲノム毎にコンティグをまとめることで、完成率が 70%より高く、かつ冗長度が 10%未満な MAG が 15,906 個、再構築された。次に、他のサンプルなどから再構築された、ほぼ同一な (gANI \geq 99%、aligned fraction \geq 60%) MAG 同士を、3133 の MAG クラスタにまとめた。これらの MAG クラスタの大部分 (91.3%) は、ヒトの腸内に最も多くいる、Bacteroidetes 門と Firmicutes 門の細菌に属していた (図 4-1B) (Cresci, et al., 2015)。また、これらの MAG クラスタの代表 MAG の配列長の中央値は、2,635,319 bp (最短 : 685,598 bp、最長 : 6,988,682 bp) だった。

上記により得た MAG クラスタと viral OTU のゲノム配列の比較により、1153 個 (36.8%) の細菌ゲノム (MAG クラスタ) が、溶原性ファージ (viral OTU) に感染していることが判明した (図 4-2)。さらに、生物学的分類的には、溶原性ファージの宿主は、Actinobacteria 門、Bacteroidetes 門、Firmicutes 門、Proteobacteria 門および、Verrucomicrobia 門 (12 綱、13 目、28 科、63 属、101 種に対応) における、広範囲な系統の細菌に分布していることがわかった (図 4-3A)。そして、溶原性ファージの宿主範囲を理解するため、宿主の共通祖先を測定した結果、94.8%の viral OTU は、種または属レベルでの狭い宿主範囲を有することが判明した (図 4-3B)。

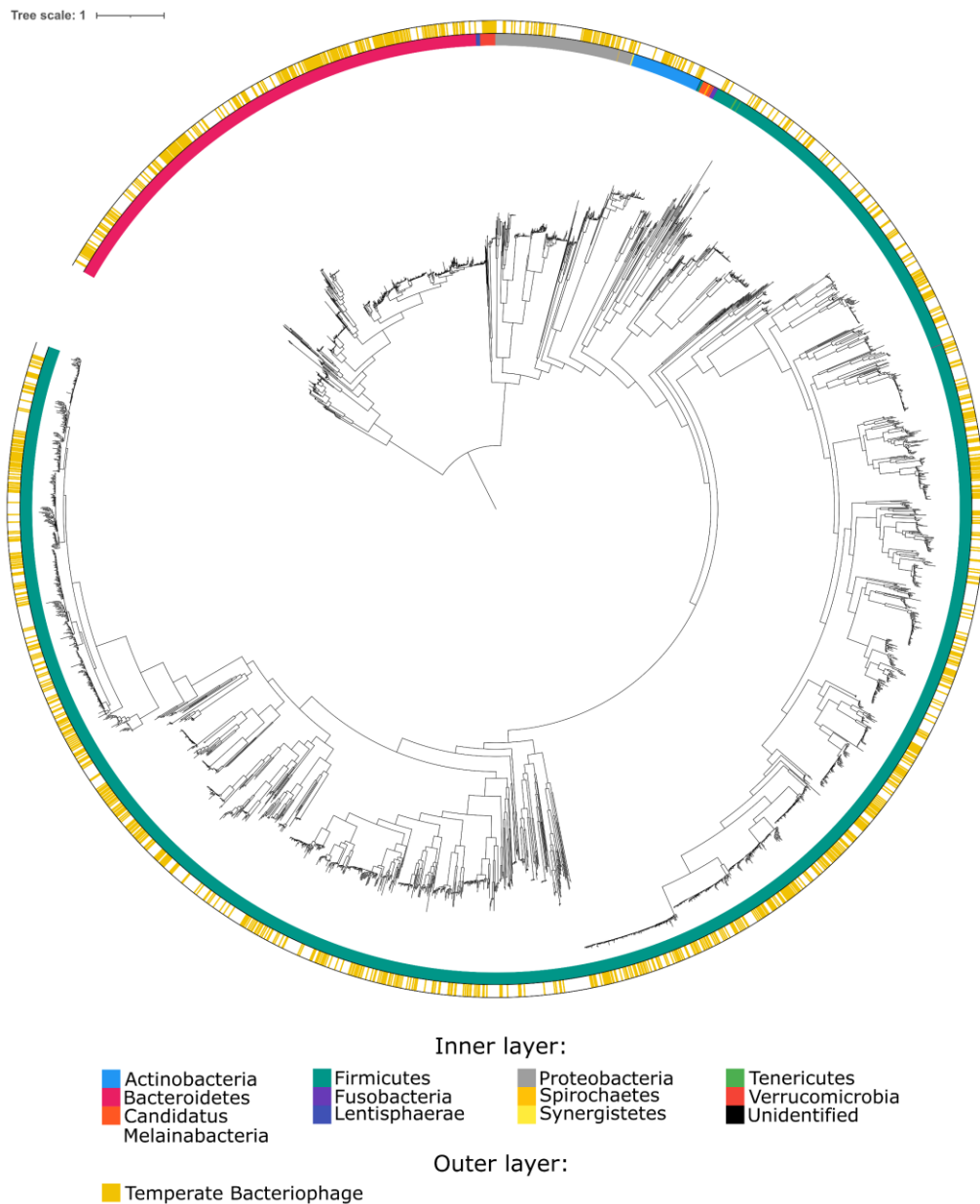


図 4-2 IBD などの腸疾患患者の腸内メタゲノムから再構築した MAG クラスターの系統樹
 内層は各系統樹の枝先にある MAG クラスターに割り当てられた門レベルでの生物学的分類群を、外層は溶原性ファージへの感染の有無を示している。本図は Nishiyama, et al., 2020 より改変[†]。

[†] 本図の使用は CC-BY ライセンスにより許諾されている。本ライセンスの内容は、<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>に掲示されている。

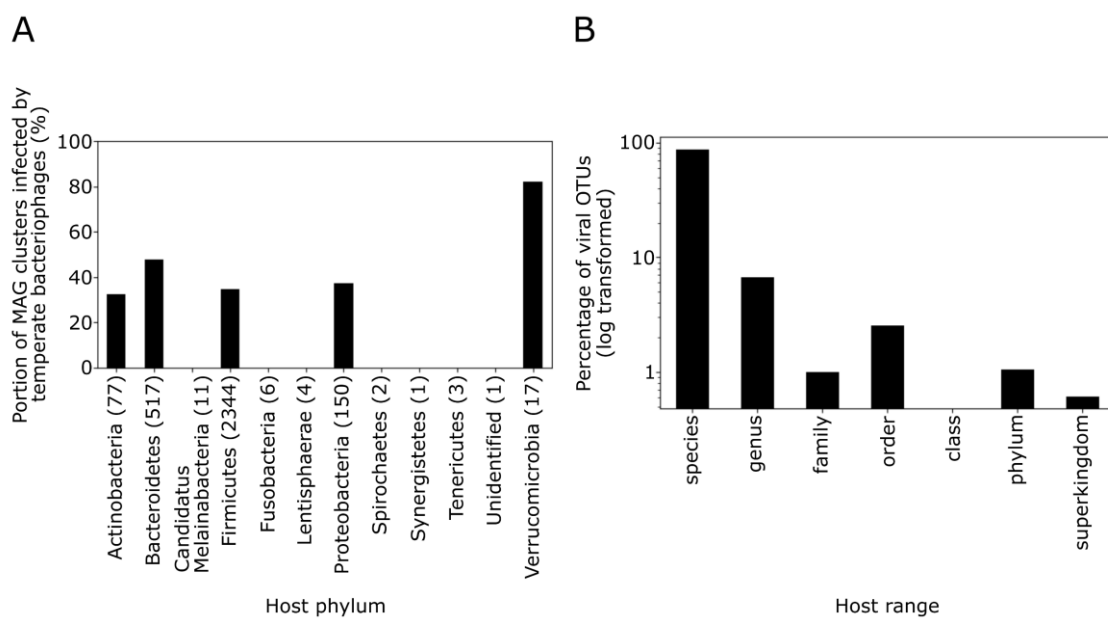


図 4-3 溶原性ファージの宿主に関する統計情報

(A) 門毎に溶原性ファージに感染している細菌 (MAG クラスタ) の割合を算出。(B) さらに、溶原性ファージの宿主域を階層ごとに算出。本図は Nishiyama, et al., 2020 より改変†。

† 本図の使用は CC-BY ライセンスにより許諾されている。本ライセンスの内容は、<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>に掲示されている。

4.4.3 CD および UC 群はそれぞれ非 IBD 群と同程度の α 多様性を示す

一般的に、CD や UC 患者の腸内微生物群集の α 多様性は、健常者と比較して低下しているとされているが、本研究では、予想と反して、CD および UC 患者と非 IBD 患者との間に明確な差はみられなかった (Kostic, et al., 2014)。具体的には、Shannon 指数値および、リッチネスの指標を用いることで、異なる疾患状態に属するサンプル群における細菌および溶原性ファージの α 多様性を比較した。その結果、ほとんどの比較にて、非 IBD 患者より IBD 患者にてより低い α 多様性が見られたが、統計的有意性は認められなかった (Holm 法による補正後 p 値 > 0.05)。また、先行研究に基づいて、各サンプルにて、ファージ対宿主比が 10 を超えたものを溶菌サイクルの溶原性ファージと定義し、それらを対象とした比較を実施したが、上記と同じく、統計的有意性は認められなかった (Holm 法による補正後 p 値 > 0.05) (Waller, et al., 2014)。

4.4.4 腸内微生物群集の組成は個人により大きく異なる

各サンプル間の腸内微生物群集の類似度を Bray-Curtis 非類似度に基づいて評価し、可視化のため得られた類似度行列を UMAP により二次元の空間に投影した (図 4-4)。その結果、溶原性ファージおよび細菌群集の組成は、個人により大きく異なることが判明した (Adonis 検定; 溶原性ファージ: 効果量 = 0.71、 p 値 < 0.0001 ; 細菌: 効果量 = 0.70、 p 値 < 0.0001)。なお、各サンプル間の溶菌サイクルの溶原性ファージ群集の類似度に対する、Adonis 検定を用いた個人差の影響の検証については、対象が検出できなかったサンプルが多くあったため実行できなかった。さらに、同検定を用いて、これらの微生物の群集のサンプル

間の類似度に対する疾患状態の影響についても検討したが、有意な差は認められなかった (p 値 >0.05)。

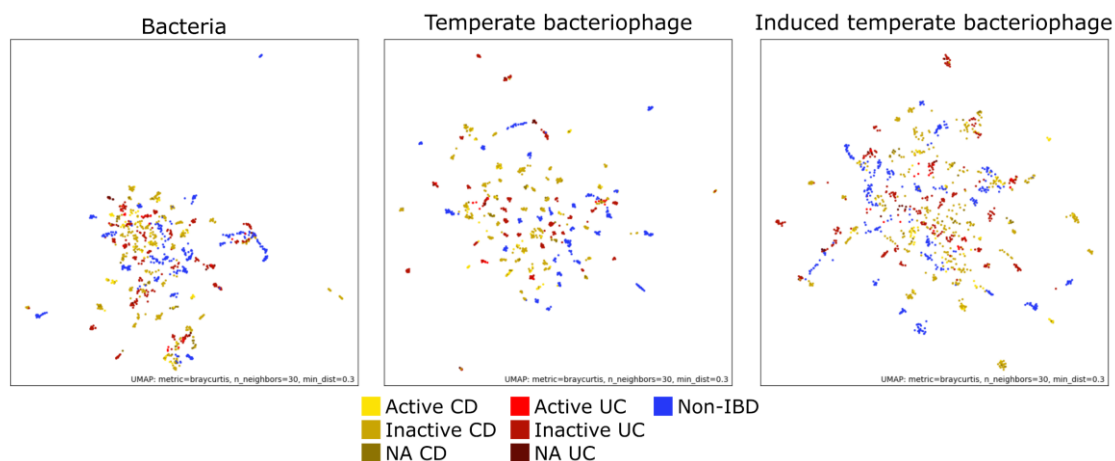


図 4-4 各サンプル間の腸内細菌群集の類似度

Bray-Curtis 非類似度に基づいて各サンプル間の細菌 (Bacteria)、溶原性ファージ (Temperate bacteriophage)、溶菌サイクル途中の溶原性ファージ (Induced temperate bacteriophage) の類似度を測定し、可視化のため得られた類似度行列を UMAP により二次元の空間に投影。本解析で使用したサンプルは次の通りである：24 人の活動期の CD 患者に属す 87 サンプル、48 人の寛解期の CD 患者に属す 448 サンプル、17 人の状態不明 (NA) な CD 患者に属す 45 サンプル、9 人の活動期の UC 患者に属す 29 サンプル、29 人の寛解期の UC 患者に属す 298 サンプル、7 人の状態不明 (NA) な UC 患者に属す 21 サンプル、26 人の非 IBD 患者に属す 362 サンプル。HBI スコアが不明な CD 患者を状態不明 (NA)、SCCAI スコアが不明な UC 患者を状態不明 (NA) とした。本図は Nishiyama, et al., 2020 より転載[†]。

[†] 本図の使用は CC-BY ライセンスにより許諾されている。本ライセンスの内容は、<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> に掲示されている。

4.4.5 疾患状態により頻度の異なる溶原性ファージおよび細菌の検出

IBD の病態に対する腸内微生物群集の役割をより詳細に理解するため、CD および UC 患者と非 IBD 患者との間で溶原性ファージ (viral OTU) と細菌 (MAG クラスタ) の頻度の比較解析を実施した。この際、FDR 値 <0.1 でかつ偽陽性のリスクを低減するために方法「4.3.11」で定めた基準を満たすものを有意とした。まず、CD 患者と非 IBD 患者の間の比較を行った結果、活動期の CD と非 IBD 患者の間に 182 個の viral OTU の頻度が、寛解期の CD と非 IBD 患者の間に 105 個の viral OTU の頻度が、有意に異なっていた (FDR 値 <0.1) (図 4-5)。さらに、細菌を対象とした比較では、活動期の CD と非 IBD 患者の間に 54 個の MAG クラスタの頻度が、寛解期の CD と非 IBD 患者の間に 102 個の MAG クラスタの頻度が、有意に異なっていた (FDR 値 <0.1) (図 4-6)。これらの内、CD 患者にて、より多い頻度を示した MAG クラスタの大部分は、*Dialister invisus* に属していた (活動期の CD にて 24 個の MAG クラスタが、寛解期の CD にて 24 個の MAG クラスタが該当)。また、CD 患者にて、より少ない頻度を示した MAG クラスタの大部分は、*Faecalibacterium prausnitzii* に属していた (活動期の CD にて 7 個の MAG クラスタが、寛解期の CD にて 20 個の MAG クラスタが該当)。興味深いことに、有意差を示した前述の viral OTU の内、2 例を除いて、それらの宿主は、viral OTU とは異なり有意差を示さなかった。

次に、UC 患者と非 IBD 患者の間の比較を行った。この際、FDR 値 <0.1 でかつ偽陽性のリスクを低減するために方法「4.3.11」で定めた基準を満たすものを有意とした。その結果、活動期の UC と非 IBD 患者の間に 145 個の viral OTU の頻度が、寛解期の UC と非 IBD 患者の間に 126 個の viral OTU の頻度が有意

に異なっていた (図 4-5)。さらに細菌を対象とした比較では、活動期の UC と非 IBD 患者の間で 160 個の MAG クラスターの頻度が、寛解期の CD と非 IBD 患者の間で 89 個の MAG クラスターの頻度が有意に異なっていた (FDR 値<0.1) (図 4-6)。これらの内、活動期の UC 患者にて、より多い頻度を示した MAG クラスターの大部分は、*Clostridium* spp. (21 個の MAG クラスター) に属していた一方で、活動期の UC 患者にてより少ない頻度を示した MAG クラスターの大部分は、*Alistipes* spp. (28 個の MAG クラスター) と *Bacteroides* spp. (58 個の MAG クラスター) に属していた。また、寛解期の UC 患者にて、より多い頻度を示した MAG クラスターの大部分は、*Bacteroides* spp. (14 個の MAG クラスター) と *Clostridium* spp. (25 個の MAG クラスター) に属していた。興味深いことに、viral OTU 0791、0838、0802、1592 は活動期の UC 群にてより多く検出されたのに対し、これらの宿主にそれぞれ該当する MAG クラスター 0358、0655、0655、2980 は逆の傾向 (活動期の UC 群にてより少なく検出) を示した。これらの宿主は、いずれも、善玉菌に属している：*Bacteroides uniformis* (MAG クラスター 0358、0655)、*Bacteroides thetaiotaomicron* (MAG クラスター 2980)。これらと合わせて、活動期の UC と非 IBD との間で、96 個 (66.2%) の viral OTU の宿主は統計的に有意な同様の傾向を示さなかった。また寛解期の UC と非 IBD との間で、111 個 (88.1%) の viral OTU の宿主は統計的有意差を示さなかった。

active CD vs non-IBD inactive CD vs non-IBD active UC vs non-IBD inactive UC vs non-IBD

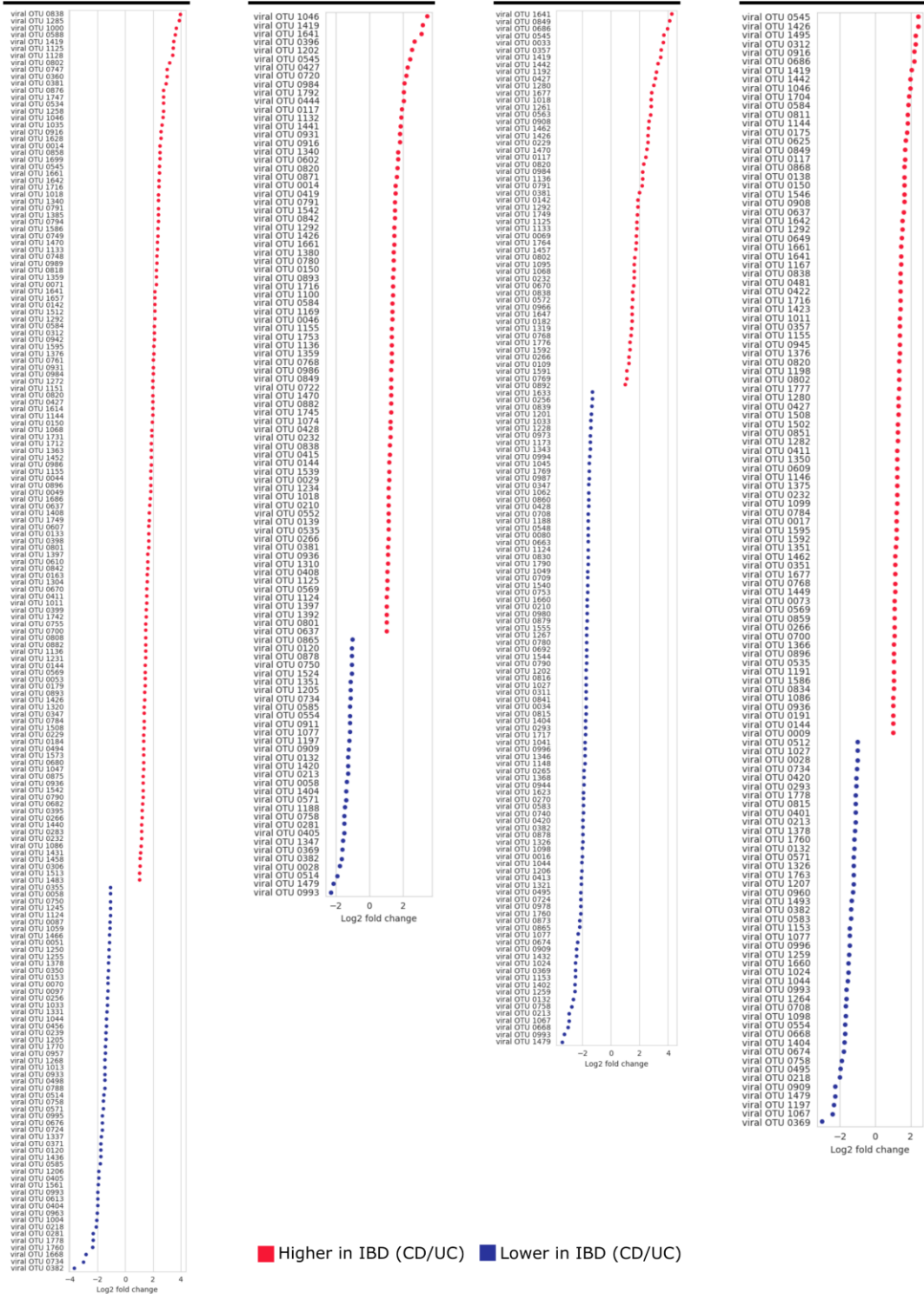
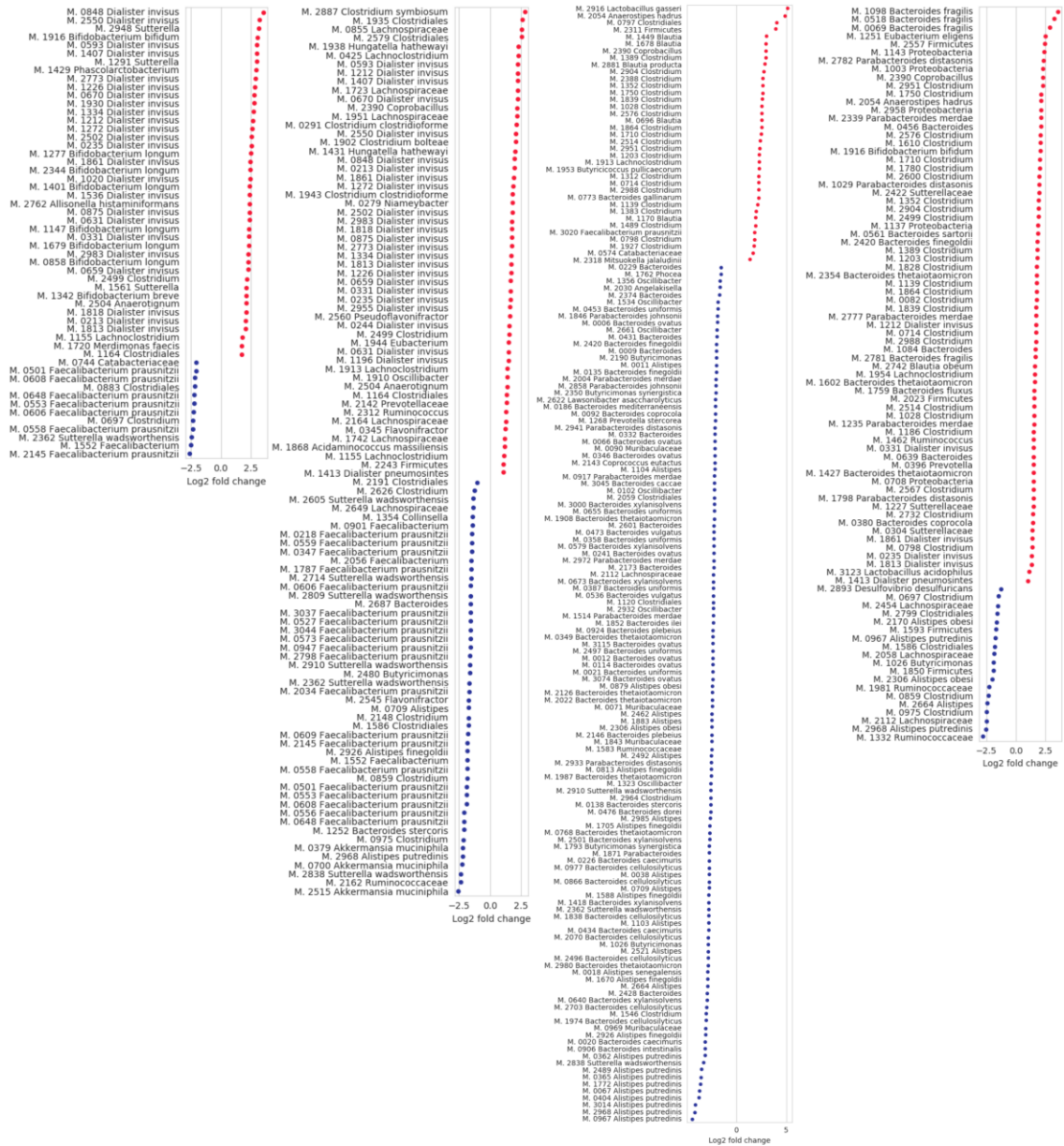


図 4-5 各サンプル間にて有意な頻度差 (FDR 値<1.0) を示した viral OTU の増減

本解析では次のサンプルを使用した：24 人の活動期の CD 患者に属す 87 サンプル、48 人の寛解期の CD 患者に属す 448 サンプル、9 人の活動期の UC 患者に属す 29 サンプル、29 人の寛解期の UC 患者に属す 298 サンプル、26 人の非 IBD 患者に属す 362 サンプル。本図は Nishiyama, et al., 2020 より転載[†]。

[†] 本表の使用は CC-BY ライセンスにより許諾されている。本ライセンスの内容は、<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>に掲示されている。

active CD vs non-IBD inactive CD vs non-IBD active UC vs non-IBD inactive UC vs non-IBD



■ Higher in IBD (CD/UC) ■ Lower in IBD (CD/UC)

図 4-6 各サンプル間にて有意な頻度差 (FDR 値<1.0) を示した MAG クラスターの増減
 本解析では次のサンプルを使用した：24 人の活動期の CD 患者に属す 87 サンプル、48 人の寛解期の CD 患者に属す 448 サンプル、9 人の活動期の UC 患者に属す 29 サンプル、29 人の寛解期の UC 患者に属す 298 サンプル、26 人の非 IBD 患者に属す 362 サンプル。本図は Nishiyama, et al., 2020 より転載[†]。

[†] 本図の使用は CC-BY ライセンスにより許諾されている。本ライセンスの内容は、<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> に掲示されている。

4.5 考察

4.5.1 溶原性ファージはヒト腸内における細菌群集の生態に関与している

本研究では、溶原性ファージは、幅広い系統の細菌に感染することで、腸内細菌の群集構造に影響を及ぼしている可能性を示した。ヒト腸内のウイルス群集の大部分は未知であることが先行研究にて報告されているが、本研究においても、28 個 (1.56%) の viral OTU を除いて、ほぼ全ての溶原性ファージの属レベルでの生物学的分類は不明であった (図 4-1A) (Norman, et al., 2015; Zuo, et al., 2019; Shkoporov, et al., 2019; Shkoporov, et al., 2018)。この問題に対処するため、メタゲノムから再構築した微生物ゲノム同士の配列比較により、宿主を割り当てたところ、溶原性ファージは Actinobacteria 門、Bacteroidetes 門、Firmicutes 門、Proteobacteria 門、および、Verrucomicrobia 門にわたる幅広い系統の細菌に感染していることが分かった (図 4-2; 図 4-3A)。また、これらの大多数 (94.8%) の溶原性ファージの宿主範囲は、種または属レベルの狭い範囲であることが分かった (図 4-3B)。ヒト腸内に加え、様々な環境から採取した溶原性ファージを対象とした先行研究では、99%は種または属レベルの宿主範囲を持つことが報告されており、前述の内容と類似している (Gao, et al., 2018)。

4.5.2 IBD などの胃腸疾患患者の腸内における溶原性ファージの組成は個人により異なる

各サンプル間の腸内微生物群集の組成の類似度を評価した結果、IBD および他の胃腸疾患患者の腸内における、溶原性ファージおよび、細菌の組成は、個人により大きく異なることが分かった (図 4-4)。一方で、これらの群集の組成の

ばらつきに対する疾患状態の影響は統計的に有意ではなかった。同様の傾向は、同患者の腸内における、既知微生物種のみを対象とした IBDMDB の研究チームによる解析でも報告されている (Lloyd-Price, et al., 2019)。しかし、異なる疾患状態の間では、多数の微生物が有意差を示した。したがって、特にサンプル毎のシーケンス量が多く、個人に固有な微生物が検出される際には、群集単位 (マクロな視点) での解析に加え、個々の微生物の変動に着目することが、IBD の病態に対する腸内微生物群集の影響を理解する上で重要だと考えられた。

4.5.3 溶原性ファージは疾患状態に特異的な腸内微生物の群集構造の形成に参与している

それぞれの疾患状態の間における、各溶原性ファージの頻度差と、それらの宿主の頻度差を照らし合わせた結果、非IBD患者と比較して活動期のUC患者で、4つの溶原性ファージ (viral OTU 0791、0838、0802、1592) が、より多く検出されたのに対し、それらの宿主 (*B. uniformis*: MAG クラスタ 0358 と 0655、*B. thetaiotaomicron*: MAG クラスタ 2980) は、より少なく検出された (図 4-5; 図 4-6)。興味深いことに、これらの宿主はいずれも、腸炎の抑制に働くことが、実験的に証明されている。*B. uniformis* は、ヒト大腸がん細胞における、インターロイキン-8 (炎症性サイトカインの一種) の産生を抑制することが報告されている (Hiippala, et al., 2020)。*B. thetaiotaomicron* については、本細菌を大腸炎モデルマウスに投与した結果、腸炎が抑制された (Delday, et al., 2019)。さらに、無菌マウスに本細菌を投与した結果、腸管バリア機能の維持に有用なインターロイキン-6 の、腸管上皮内リンパ球による分泌量の上昇が誘導された (Kuhn, et

al., 2018)。上記と合わせて、活動期の UC vs. 非 IBD の比較で有意差を示した 96 個 (66.2%) の viral OTU の宿主は統計的に有意な同様の傾向を示さなかった (図 4-5; 図 4-6)。また、寛解期の UC vs. 非 IBD の比較では 111 個 (88.1%) の viral OTU の宿主は有意差を示さなかった (図 4-5; 図 4-6)。加えて、活動期の CD vs. 非 IBD および寛解期の CD vs. 非 IBD の比較では、有意差を示した viral OTU のうち 2 個を除き、その宿主は有意差を示さなかった (図 4-5; 図 4-6)。シングルセル viral-tagging 法 (Džunková, et al., 2019) などの実験科学的アプローチによる検証が必要なものの、これらの結果から、溶原性ファージは、宿主の溶菌により、UC や CD などの疾患に特異的な腸内微生物の群集構造の形成に関与している可能性が考えられる。

4.6 結論

本研究では、メタゲノムの塩基配列データから未知な微生物のゲノムをも再構築することで、IBD などの腸疾患患者の腸内における溶原性ファージと細菌との関係を調査した。その結果、これまでの予想よりさらに幅広い系統の細菌が溶原性ファージに感染していることが示唆された。さらに、非 IBD 患者と比較して、活動期の UC 患者にて、腸炎の抑制に有用な善玉菌である *B. uniformis* と *B. thetaiotaomicron* がより少なく検出されたのに対し、それらに感染している溶原性ファージはより多く検出された。本研究ではインテグラーゼ遺伝子の有無やファージ対宿主比により増殖能を保持した溶原性ファージだと推定されたものに焦点を絞って解析したが、個々の微生物のゲノムを解読することのできるシングルセルゲノム解析技術の発達・応用により、ヒト腸内に潜む未知のファージが今後さらに多く発見されることが期待される。また、今後、他の研究に役立つことを期待し、本研究の過程で構築した膨大な数の溶原性ファージと細菌のゲノム配列を所属研究室の ftp サイト (<ftp://ftp.genome.jp/pub/db/community/ibd-phage>) にて公開した。これらのゲノム配列の具体的な活用例として、他の研究で得られたゲノム配列との比較による腸内微生物ゲノムカタログの作成・拡充や、他の疾患で得られた腸内微生物群集のゲノム配列との比較などが挙げられる。

5章 総括

腸内微生物群集の研究は、1680 年代に Leeuwenhoek が顕微鏡で自身の便から細菌を発見したことから始まった。その後、純粋培養法が 1881 年に Koch により確立され、腸内から多種多様な微生物が分離された。そして、サンガー法に基づいたシーケンシング技術が 1977 年に開発されたことで、培養などによる分離を経ずに微生物のゲノム配列を解読することが可能になった。さらに、次世代シーケンサーなどに代表されるシーケンシング技術の開発により、大量のメタゲノム配列を網羅的にかつ効率的に解読することが可能となった。こうしたゲノム配列の解読技術の発展により、ヒト腸内微生物群集の全体像が 2006 年に初めて解明された (Gill, et al., 2006)。その後、IBD、慢性膵炎、2 型糖尿病などの様々な疾患で腸内における微生物の群集構造が健康状態のものから大きく異なることが発見され、現在ではヒトの健康維持に腸内微生物群集が大きく関わっていると考えられている (Qin, et al., 2010; Human Microbiome Project Consortium, 2012; Qin, et al., 2012; Jandhyala, et al., 2017)。

本研究では、筆者は、近畿大学医学部附属病院消化器内科との共同研究や単独研究を通じ、塩基配列の大規模データを情報科学技術の活用により紐解くことで、腸内環境の恒常性維持や疾患の改善・増悪に関係する腸内微生物群集の特徴を抽出した。具体的には、2 章では、パンクレリパーゼを投与したマウスの腸内細菌群集の 16S rRNA アンプリコン解析により、本薬剤は既知の機序に加え、*A. muciniphila* などの腸内粘膜の保護に有用な善玉菌を増やすことで効果を発揮する可能性を提示した。3 章では、大腸炎が増悪したガンキリンノックアウトマウ

スの腸内細菌群集を 16S rRNA アンプリコン解析により調べることで、ガンキリンはがんタンパク質である一方で、腸内細菌群集の制御因子として大腸炎の増悪を招く *H. japonicum* などの悪玉菌を抑制する役目を持つ可能性を示唆した。そして、4 章では、IBD 患者などの腸内微生物群集から作成された WMGS 解析データを基に細菌・ウイルスゲノムを再構築した。これにより、溶原性ファージが幅広い系統の細菌に感染していることを突き止め、これらは活動期の UC では、善玉菌を溶菌することで病状の持続または悪化に寄与している可能性を示した。

上記の研究を通じ、筆者は、次世代シーケンサーから得られた膨大な塩基配列情報から解読した知見を、実験を通して得られた微生物に関する既存の知見と照らし合わせることで、ヒトの健康維持に対する腸内微生物群集の役割について新たな知見を導き出した。ヒトと腸内微生物群集をとりまく現象は複雑であり、個別の微生物が具体的にどのような機序でヒトの健康状態へ影響しているのか調べることには限界があるため、網羅的な微生物群集のゲノム配列の解析などにより、数多くの候補から研究対象の現象に関わっている可能性のある微生物を抽出する必要がある。本研究を通じて筆者が膨大な塩基配列の情報から抽出した腸内微生物群集の特徴が、それぞれの現象の原因または結果として断定するためにはさらに多くの検証を要するものの、これらの知見は今後、個別の腸内微生物がヒトの健康に影響を与える仕組みの解明への糸口となると期待される。

謝辞

本研究は、京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンター化学生命科学研究領域の緒方博之教授のご指導のもとに実施しました。同教授には修士課程在籍以来、本研究をはじめとした様々な研究活動を通じて、研究者としての心構えや研究の本質など、様々な事柄についてご指導頂きました。心より感謝申し上げます。

同研究室の五斗進博士（現ライフサイエンス統合データベースセンター）、Romain Blanc-Mathieu 博士（現 Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives）、遠藤寿博士、岡崎友輔博士、吉沢明康博士（現京都大学大学院薬学研究科薬科学専攻薬品製剤設計学大講座製剤機能解析学分野）には研究を行うにあたり、様々な事柄についてご指導を頂きました。心より感謝申し上げます。

櫻井俊治博士（近畿大学医学部附属病院消化器内科）、永井知行博士（同所属）、岡崎能久博士（同所属）には共同研究の機会を与えて頂きました。心より感謝申し上げます。また、本研究を行うにあたりご協力頂きました全ての共同研究者の皆様に厚く御礼申し上げます。

石濱泰教授（京都大学大学院薬学研究科薬科学専攻薬品製剤設計学大講座製剤機能解析学分野）、小柳義夫教授（京都大学大学院薬学研究科薬科学専攻生体分子薬学大講座分子ウイルス学分野）にはお忙しい中、論文審査を引き受けてくださいましたことに対し、心より感謝申し上げます。

修士課程・博士課程時に在籍した京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学専攻医薬創成情報科学大講座統合ゲノミクス分野（化学研究所バイオインフォマティクスセンター化学生命科学研究領域）の皆様には、様々な助言や議論をしてくださり、ありがとうございました。心より感謝申し上げます。

最後に、研究生生活を支えてくださった家族と友人の皆様にも心より感謝申し上げます。本研究の一部は JSPS 科研費 JP19J14228 および MEXT 科研費 JP16H06429, JP16K21723, JP16H06437 の助成を受けたものです。

参考文献

1. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*. 2014;6:237ra65.
2. Adachi T, Sakurai T, Kashida H, Mine H, Hagiwara S, Matsui S, Yoshida K, Nishida N, Watanabe T, Itoh K, Fujita J, Kudo M. Involvement of heat shock protein a4/apg-2 in refractory inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21:31–9.
3. Alneberg J, Bjarnason BS, de Bruijn I, Schirmer M, Quick J, Ijaz UZ, Lahti L, Loman NJ, Andersson AF, Quince C. Binning metagenomic contigs by coverage and composition. *Nat Methods*. 2014;11:1144–6.
4. Anderson M.J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol*. 2001;26:32–46
5. Argov T, Azulay G, Pasechnik A, Stadnyuk O, Ran-Sapir S, Borovok I, Sigal N, Herskovits AA. Temperate bacteriophages as regulators of host behavior. *Curr Opin Microbiol*. 2017;38:81–87.
6. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J; MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473:174–80.
7. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007;369:1641–57.
8. Beaumont M, Andriamihaja M, Lan A, Khodorova N, Audebert M, Blouin JM, Grauso M, Lancha L, Benetti PH, Benamouzig R, Tomé D, Bouillaud F, Davila AM, Blachier F. Detrimental effects for colonocytes of an increased exposure to luminal hydrogen sulfide: The adaptive response. *Free Radic Biol Med*. 2016;93:155–64.

9. Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F, Vitale L, Pelleri MC, Tassani S, Piva F, Perez-Amodio S, Strippoli P, Canaider S. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol.* 2013;40:463–71.
10. Bin Jang H, Bolduc B, Zablocki O, Kuhn JH, Roux S, Adriaenssens EM, Brister JR, Kropinski AM, Krupovic M, Lavigne R, Turner D, Sullivan MB. Taxonomic assignment of uncultivated prokaryotic virus genomes is enabled by gene-sharing networks. *Nat Biotechnol.* 2019;37:632–639.
11. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30:2114–20.
12. Braganza JM, Lee SH, McCloy RF, McMahon MJ. Chronic pancreatitis. *Lancet.* 2011;377:1184–97.
13. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:421.
14. Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics.* 2010b;26:266–7.
15. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010a;7:335–6.
16. Chaumeil PA, Mussig AJ, Hugenholtz P, Parks DH. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics.* 2019;36:1925–7.
17. Chehoud C, Dryga A, Hwang Y, Nagy-Szakal D, Hollister EB, Luna RA, Versalovic J, Kellermayer R, Bushman FD. Transfer of Viral Communities between Human Individuals during Fecal Microbiota Transplantation. *mBio.* 2016;7:e00322.
18. Cresci GA, Bawden E. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. *Nutr Clin Pract.* 2015;30:734–46.
19. de la Iglesia-García D, Huang W, Szatmary P, Baston-Rey I, Gonzalez-Lopez J, Prada-Ramallal G, Mukherjee R, Nunes QM, Domínguez-Muñoz JE, Sutton R; NIHR Pancreas Biomedical Research Unit Patient Advisory Group. Efficacy of pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis: systematic review and meta-analysis. *Gut.* 2017;66:1354–1355.
20. Delday M, Mulder I, Logan ET, Grant G. *Bacteroides thetaiotaomicron* Ameliorates Colon Inflammation in Preclinical Models of Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2019;25:85–96.

21. D'Haese JG, Ceyhan GO, Demir IE, Layer P, Uhl W, Löhr M, Rychlik R, Pirilis K, Zöllner Y, Gradl B, Foerster D, Möbius J, Henniges F, Friess H. Pancreatic enzyme replacement therapy in patients with exocrine pancreatic insufficiency due to chronic pancreatitis: a 1-year disease management study on symptom control and quality of life. *Pancreas*. 2014;43:834–41.
22. Duan Y, Llorente C, Lang S, Brandl K, Chu H, Jiang L, White RC, Clarke TH, Nguyen K, Torralba M, Shao Y, Liu J, Hernandez-Morales A, Lessor L, Rahman IR, Miyamoto Y, Ly M, Gao B, Sun W, Kiesel R, Hutmacher F, Lee S, Ventura-Cots M, Bosques-Padilla F, Verna EC, Abraldes JG, Brown RS Jr, Vargas V, Altamirano J, Caballería J, Shawcross DL, Ho SB, Louvet A, Lucey MR, Mathurin P, Garcia-Tsao G, Bataller R, Tu XM, Eckmann L, van der Donk WA, Young R, Lawley TD, Stärkel P, Pride D, Fouts DE, Schnabl B. Bacteriophage targeting of gut bacterium attenuates alcoholic liver disease. *Nature*. 2019;575:505–511.
23. Džunková M, Low SJ, Daly JN, Deng L, Rinke C, Hugenholtz P. Defining the human gut host-phage network through single-cell viral tagging. *Nat Microbiol*. 2019;4:2192–2203.
24. Eddy SR. Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput Biol*. 2011;7:e1002195.
25. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:1792–7.
26. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010 Oct 1;26(19):2460–1.
27. El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, Qureshi M, Richardson LJ, Salazar GA, Smart A, Sonnhammer ELL, Hirsh L, Paladin L, Piovesan D, Tosatto SCE, Finn RD. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res*. 2019;47:D427–D432.
28. Evans JM, Morris LS, Marchesi JR. The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *J Endocrinol*. 2013;218:R37–47.
29. Gao C, Major A, Rendon D, Lugo M, Jackson V, Shi Z, Mori-Akiyama Y, Versalovic J. Histamine H2 Receptor-Mediated Suppression of Intestinal Inflammation by Probiotic *Lactobacillus reuteri*. *mBio*. 2015;6:e01358-15.
30. Gao NL, Zhang C, Zhang Z, Hu S, Lercher MJ, Zhao XM, Bork P, Liu Z, Chen WH. MVP: a microbe-phage interaction database. *Nucleic Acids Res*. 2018;46:D700–D707.
31. Garmaeva S, Sinha T, Kurilshikov A, Fu J, Wijmenga C, Zhernakova A. Studying the gut virome in the metagenomic era: challenges and perspectives. *BMC Biol*. 2019;17:84.
32. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006;312:1355–9.

33. Grander C, Adolph TE, Wieser V, Lowe P, Wrzosek L, Gyongyosi B, Ward DV, Grabherr F, Gerner RR, Pfister A, Enrich B, Ciocan D, Macheiner S, Mayr L, Drach M, Moser P, Moschen AR, Perlemuter G, Szabo G, Cassard AM, Tilg H. Recovery of ethanol-induced *Akkermansia muciniphila* depletion ameliorates alcoholic liver disease. *Gut*. 2018;67:891–901.
34. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet*. 1980 ;1:514.
35. Hiippala K, Kainulainen V, Suutarinen M, Heini T, Bowers JR, Jasso-Selles D, Lemmer D, Valentine M, Barnes R, Engelthaler DM, Satokari R. Isolation of Anti-Inflammatory and Epithelium Reinforcing Bacteroides and Parabacteroides Spp. from A Healthy Fecal Donor. *Nutrients*. 2020;12:935.
36. Howard-Varona C, Hargreaves KR, Abedon ST, Sullivan MB. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J*. 2017;11:1511–1520.
37. Hu J, Nomura Y, Bashir A, Fernandez-Hernandez H, Itzkowitz S, Pei Z, Stone J, Loudon H, Peter I. Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status. *PLoS One*. 2013 Nov 6;8(11):e78257.
38. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486:207–14.
39. Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The Integrative Human Microbiome Project: dynamic analysis of microbiome-host omics profiles during periods of human health and disease. *Cell Host Microbe*. 2014;16:276–89.
40. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287:G7–17.
41. Jandhyala SM, Madhulika A, Deepika G, Rao GV, Reddy DN, Subramanyam C, Sasikala M, Talukdar R. Altered intestinal microbiota in patients with chronic pancreatitis: implications in diabetes and metabolic abnormalities. *Sci Rep*. 2017;7:43640.
42. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:W5–9.
43. Kang DD, Li F, Kirton E, Thomas A, Egan R, An H, Wang Z. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. *PeerJ*. 2019;7:e7359.
44. Kim MS, Bae JW. Lysogeny is prevalent and widely distributed in the murine gut microbiota. *ISME J*. 2018;12:1127–1141.
45. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology*. 2014;146:1489–99.
46. Kuhn KA, Schulz HM, Regner EH, Severs EL, Hendrickson JD, Mehta G, Whitney AK, Ir D, Ohri N, Robertson CE, Frank DN, Campbell EL, Colgan SP. Bacteroidales recruit

- IL-6-producing intraepithelial lymphocytes in the colon to promote barrier integrity. *Mucosal Immunol.* 2018;11:357–368.
47. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 1993;75:263–74.
 48. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012;9:357–9.
 49. Lederberg J. Infectious history. *Science.* 2000;288:287–93.
 50. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* 2019 ;47:W256–W259.
 51. Li D, Liu CM, Luo R, Sadakane K, Lam TW. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics.* 2015;31:1674–6.
 52. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009a;25:1754–60.
 53. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009b;25:2078–9.
 54. Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics.* 2006;22:1658–9.
 55. Lim ES, Zhou Y, Zhao G, Bauer IK, Droit L, Ndao IM, Warner BB, Tarr PI, Wang D, Holtz LR. Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nat Med.* 2015;21:1228–34.
 56. Lindkvist B. Diagnosis and treatment of pancreatic exocrine insufficiency. *World J Gastroenterol.* 2013;19:7258–66.
 57. Lloyd-Price J, Arze C, Ananthakrishnan AN, Schirmer M, Avila-Pacheco J, Poon TW, Andrews E, Ajami NJ, Bonham KS, Brislawn CJ, Casero D, Courtney H, Gonzalez A, Graeber TG, Hall AB, Lake K, Landers CJ, Mallick H, Plichta DR, Prasad M, Rahnavard G, Sauk J, Shungin D, Vázquez-Baeza Y, White RA 3rd; IBDMDB Investigators, Braun J, Denson LA, Jansson JK, Knight R, Kugathasan S, McGovern DPB, Petrosino JF, Stappenbeck TS, Winter HS, Clish CB, Franzosa EA, Vlamakis H, Xavier RJ, Huttenhower C. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature.* 2019;569:655–662.
 58. Lopetuso LR, Petito V, Graziani C, Schiavoni E, Paroni Sterbini F, Poscia A, Gaetani E, Franceschi F, Cammarota G, Sanguinetti M, Masucci L, Scaldaferrì F, Gasbarrini A. Gut Microbiota in Health, Diverticular Disease, Irritable Bowel Syndrome, and Inflammatory Bowel Diseases: Time for Microbial Marker of Gastrointestinal Disorders. *Dig Dis.* 2018;36:56–65.

59. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15:550.
60. Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:8228–35.
61. Mackos AR, Eubank TD, Parry NM, Bailey MT. Probiotic *Lactobacillus reuteri* attenuates the stressor-enhanced severity of *Citrobacter rodentium* infection. *Infect Immun.* 2013;81:3253–63.
62. Mackos AR, Galley JD, Eubank TD, Easterling RS, Parry NM, Fox JG, Lyte M, Bailey MT. Social stress-enhanced severity of *Citrobacter rodentium*-induced colitis is CCL2-dependent and attenuated by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Mucosal Immunol.* 2016;9:515–26.
63. Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics.* 2011;27:2957–63.
64. Maronek M, Link R, Ambro L, Gardlik R. Phages and Their Role in Gastrointestinal Disease: Focus on Inflammatory Bowel Disease. *Cells.* 2020;9:1013.
65. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads *EMBnet.J.*, 2011;17:10–12
66. McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, Andersen GL, Knight R, Hugenholtz P. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 2012;6:610–8.
67. McInnes L., Healy J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. *J. Open Source Softw.* 2018;3:861.
68. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One.* 2013;8:e61217.
69. Meehan CJ, Beiko RG. A phylogenomic view of ecological specialization in the Lachnospiraceae, a family of digestive tract-associated bacteria. *Genome Biol Evol.* 2014;6:703–13.
70. Minot S, Bryson A, Chehoud C, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD. Rapid evolution of the human gut virome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:12450–5.
71. Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, Kawashima K, Nagata S, Nomoto K, Yamashiro Y. Sensitive Quantitative Analysis of the Meconium Bacterial Microbiota in Healthy Term Infants Born Vaginally or by Cesarean Section. *Front Microbiol.* 2016;7:1997.
72. Nawrocki EP, Kolbe DL, Eddy SR. Infernal 1.0: inference of RNA alignments. *Bioinformatics.* 2009;25:1335–7.
73. Nishiyama H, Endo H, Blanc-Mathieu R, Ogata H. Ecological Structuring of Temperate Bacteriophages in the Inflammatory Bowel Disease-Affected Gut. *Microorganisms.* 2020;8:1663.

74. Nishiyama H*, Nagai T*, Kudo M, Okazaki Y, Azuma Y, Watanabe T, Goto S, Ogata H, Sakurai T. Supplementation of pancreatic digestive enzymes alters the composition of intestinal microbiota in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495:273–279. (*, 共同筆頭著者)
75. Norman JM, Handley SA, Baldrige MT, Droit L, Liu CY, Keller BC, Kambal A, Monaco CL, Zhao G, Fleshner P, Stappenbeck TS, McGovern DP, Keshavarzian A, Mutlu EA, Sauk J, Gevers D, Xavier RJ, Wang D, Parkes M, Virgin HW. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell*. 2015;160:447–60.
76. Olm MR, Brown CT, Brooks B, Banfield JF. dRep: a tool for fast and accurate genomic comparisons that enables improved genome recovery from metagenomes through de-replication. *ISME J*. 2017;11:2864–2868.
77. Ostaff MJ, Stange EF, Wehkamp J. Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Mol Med*. 2013;5:1465–83.
78. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res*. 2015;25:1043–55.
79. Paulson JN, Stine OC, Bravo HC, Pop M. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat Methods*. 2013;10:1200–2.
80. Perez-Muñoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*. 2017;5:48.
81. Pinheiro J., Bates D., DebRoy S., Sarkar D., Heisterkamp S., Willigen B.V. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R Package Version 3.1-147. 2020 Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
82. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One*. 2010;5:e9490.
83. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J; MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464:59–65.
84. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M,

- Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012;490:55–60.
85. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*. 2016;4:e2584.
 86. Roux S, Enault F, Hurwitz BL, Sullivan MB. VirSorter: mining viral signal from microbial genomic data. *PeerJ*. 2015;3:e985.
 87. Sakurai T, Higashitsuji H, Kashida H, Watanabe T, Komeda Y, Nagai T, Hagiwara S, Kitano M, Nishida N, Abe T, Kiyonari H, Itoh K, Fujita J, Kudo M. The oncoprotein gankyrin promotes the development of colitis-associated cancer through activation of STAT3. *Oncotarget*. 2017a;8:24762–24776.
 88. Sakurai T, Kashida H, Komeda Y, Nagai T, Hagiwara S, Watanabe T, Kitano M, Nishida N, Fujita J, Kudo M. Stress Response Protein RBM3 Promotes the Development of Colitis-associated Cancer. *Inflamm Bowel Dis*. 2017b;23:57–65.
 89. Sakurai T, Kashida H, Watanabe T, Hagiwara S, Mizushima T, Iijima H, Nishida N, Higashitsuji H, Fujita J, Kudo M. Stress response protein cirp links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. *Cancer Res*. 2014;74:6119–28.
 90. Sakurai T*, Nishiyama H*, Nagai T, Goto S, Ogata H, Kudo M. Deficiency of Gankyrin in the small intestine is associated with augmented colitis accompanied by altered bacterial composition of intestinal microbiota. *BMC Gastroenterol*. 2020;20:12. (*, 共同筆頭著者)
 91. Salzman NH. Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: détente at mucosal surfaces. *Gut Microbes*. 2010;1:401–6.
 92. Segata N, Börnigen D, Morgan XC, Huttenhower C. PhyloPhlAn is a new method for improved phylogenetic and taxonomic placement of microbes. *Nat Commun*. 2013;4:2304.
 93. Shannon CE. A mathematical theory of communication *Bell Syst. Tech. J.*, 1948;27:379–423
 94. Shen Z, Feng Y, Muthupalani S, Sheh A, Cheaney LE, Kaufman CA, Gong G, Paster BJ, Fox JG. Novel *Helicobacter* species *H.japonicum* isolated from laboratory mice from Japan induces typhlocolitis and lower bowel carcinoma in C57BL/129 IL10^{-/-} mice. *Carcinogenesis*. 2016;37:1190–1198.
 95. Shkoporov AN, Clooney AG, Sutton TDS, Ryan FJ, Daly KM, Nolan JA, McDonnell SA, Khokhlova EV, Draper LA, Forde A, Guerin E, Velayudhan V, Ross RP, Hill C. The Human Gut Virome Is Highly Diverse, Stable, and Individual Specific. *Cell Host Microbe*. 2019;26:527–541.e5.

96. Shkoporov AN, Ryan FJ, Draper LA, Forde A, Stockdale SR, Daly KM, McDonnell SA, Nolan JA, Sutton TDS, Dalmaso M, McCann A, Ross RP, Hill C. Reproducible protocols for metagenomic analysis of human faecal phageomes. *Microbiome*. 2018;6:68.
97. Singh SB, Lin HC. Hydrogen Sulfide in Physiology and Diseases of the Digestive Tract. *Microorganisms*. 2015;3:866–89.
98. Tange O. GNU Parallel—The Command-Line Power Tool. *USENIX Mag*. 2011;36:42–47.
99. Ullman TA, Itzkowitz SH. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*. 2011;140:1807–16.
100. Uritskiy GV, DiRuggiero J, Taylor J. MetaWRAP—a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis. *Microbiome*. 2018;6:158.
101. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev*. 2012;70:S38–44.
102. Vonlaufen A, Spahr L, Apte MV, Frossard JL. Alcoholic pancreatitis: A tale of spirits and bacteria. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2014;5:82–90.
103. Waller AS, Yamada T, Kristensen DM, Kultima JR, Sunagawa S, Koonin EV, Bork P. Classification and quantification of bacteriophage taxa in human gut metagenomes. *ISME J*. 2014;8:1391–402.
104. Walmsley RS, Ayres RC, Pounder RE, Allan RN. A simple clinical colitis activity index. *Gut*. 1998;43:29–32.
105. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:5261–7.
106. Warren YA, Citron DM, Merriam CV, Goldstein EJ. Biochemical differentiation and comparison of *Desulfovibrio* species and other phenotypically similar genera. *J Clin Microbiol*. 2005;43:4041–5.
107. Whitcomb DC, Bodhani A, Beckmann K, Sander-Struckmeier S, Liu S, Fuldeore M, Pollack PF, Khurmi RP. Efficacy and Safety of Pancrelipase/Pancreatin in Patients With Exocrine Pancreatic Insufficiency and a Medical History of Diabetes Mellitus. *Pancreas*. 2016;45:679–86.
108. Wu YW, Simmons BA, Singer SW. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics*. 2016;32:605–7.
109. Yu Q, Zhang S, Li L, Xiong L, Chao K, Zhong B, Li Y, Wang H, Chen M. Enterohepatic *Helicobacter* Species as a Potential Causative Factor in Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94:e1773.

110. Zamani P, Matbou Riahi M, Momtazi-Borojeni AA, Jamialahmadi K. Gankyrin: a novel promising therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46:1301–1313.
111. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* 2000;7:203–14.
112. Zhu W, Lomsadze A, Borodovsky M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:e132.
113. Zuo T, Lu XJ, Zhang Y, Cheung CP, Lam S, Zhang F, Tang W, Ching JYL, Zhao R, Chan PKS, Sung JJY, Yu J, Chan FKL, Cao Q, Sheng JQ, Ng SC. Gut mucosal virome alterations in ulcerative colitis. *Gut.* 2019;68:1169–1179.
114. Zuo T, Ng SC. The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory Bowel Disease. *Front Microbiol.* 2018;9:2247.