

氏 名 大槻 晋士

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 記 番 号 博士第1027号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項

学 位 授 与 年 月 日 令和7年3月21日

学 位 論 文 題 目 Characterization of the gut phageome of Japanese patients with ulcerative colitis under endoscopic remission
(内視鏡的寛解期にある日本人潰瘍性大腸炎患者の腸内バクテリオファージ叢の特徴)

審 査 委 員	主査	教授	石垣 診祐
	副査	教授	伊藤 靖
	副査	教授	藤本 徳毅

論文内容要旨

※整理番号	1036	(ふりがな) 氏 名	おおつき あきのり 大槻 晋士
博士論文題目	Characterization of the gut phageome of Japanese patients with ulcerative colitis under endoscopic remission (内視鏡的寛解期にある日本人潰瘍性大腸炎患者の腸内バクテリオファージ叢の特徴)		
【目的】 潰瘍性大腸炎(Ulcerative Colitis, UC)は、大腸を中心に再燃寛解を繰り返す慢性腸炎である。未だUCの病因は明らかではないが、遺伝的素因を背景に食事や腸内細菌などの環境因子が加わり腸管粘膜の慢性炎症が発症持続する多因子疾患と考えられている。 腸内微生物叢は細菌、ウイルス、真菌、古細菌で構成され、特に腸内細菌は食物繊維の分解などを通して生体の恒常性の維持に重要な役割を担っている。一方、その多様性の低下や構成の変化はdysbiosisと呼ばれ様々な病態への関与が明らかになっている。 腸内ウイルスの90%以上を占めるバクテリオファージ(ファージ)は、腸内細菌を宿主とし、その生活環により溶菌性ファージと溶原性ファージに分類される。溶菌性ファージは感染した宿主細菌内で自身を複製して溶菌し、溶原性ファージは感染後に宿主細菌の染色体に自身の遺伝子を組み込むことで共生し、宿主周囲の環境変化などをきっかけに自身の複製を再開して溶菌する。 これまで日本人UC患者の腸内ファージ叢についてはほとんど明らかになっていない。今回、出血、炎症、下痢の影響を避けるため、内視鏡的寛解期のUC患者を対象に便中のファージ叢を解析した。 【方法】 滋賀医科大学附属病院に通院している内視鏡的寛解期のUC患者および健常人より糞便サンプルを回収した。細菌を溶菌し細菌由来の核酸を処理除外し、Virus-like particle(VLP)を精製した。VLPから、ファージDNAを抽出し、NovaseqXを用いてショットガンメタゲノムシーケンスを行った。得られたシーケンスデータをPhaBoxを用いて分類した。細菌はDNA抽出後に16SrRNAアンプリコンシーケンスを行い、QIIME2を用いて解析した。 統計解析については細菌およびファージのα多様性(種の豊富さ、均一性)は、Mann-Whitney U検定を行った。β多様性(検体間の種の多様性)については、細菌はUniFrac距離、ファージはBray-Curtis距離を用いて順列多変量分散解析(PERMANOVA)検定を行った。UC患者と健常人の細菌およびファージの多変量解析はMaAsLin2(Multivariate Association with Linear Models)を用い、q(補正p値)<0.25を有意と定義した。細菌とファージの相関はSpearmanの順位相関係数を用いて解析した。 【結果】 UC患者35名および健常人22名の糞便の解析を行った。UC患者のファージ叢は健常人と比較し、α多様性の指標であるShannon index に有意差を認めなかったが($p=0.306$)、Chao-1 indexは有意に低下していた($p<0.01$)。また全体の構成を表すβ多様性はUC患者と健常人の間に有意な差を認めた($p<0.01$)。 ファージは1126種検出され、うち89種はUC患者のみ、143種は健常人のみに存在し、808種は両群に共通していた。UC患者では、健常人と比較し溶原性ファージの割合が増加傾向にあった(UC: 15.2%、健常人5.9%、$p=0.088$)。 宿主の細菌属とファージのタイプ別に分類してMaAsLin2による解析を行うと、UC			

患者で*Odoribacter*、*Ruminococcus*、*Veillonella*属を宿主とする溶菌性ファージが有意に減少していた(すべて $q < 0.1$)。さらに宿主の細菌種とファージのタイプ別に分類して解析を行うと、UC患者で*Corprococcus* sp.、*Bacteroides* KTH8、*Faecalibacterium prausnitzii*を宿主とする溶原性ファージ、*Ruminococcus gnavus*、*Lctovacillus farciminis*を宿主とする溶菌性ファージが増加していた(いずれも $q < 0.25$)。また*Thermosiphon affectus*、*Bacteroides* sp. OF03-11BH、*Odoribacter splanchnicus*を宿主とする溶菌性ファージ、*Ruminococcus* sp. 1xD21-23を宿主とする溶菌性・溶原性ファージがUC患者で減少していた(いずれも $q < 0.25$)。

UC患者腸内細菌叢では健常人と比較し、 α 多様性の指標であるShannon index、Chao-1 indexともに有意に低下していた(それぞれ $p < 0.01$)。また β 多様性はUC患者と健常人の間に有意な差を認めた($p < 0.01$)。UC患者では*Fusicatenibacter*属、*Akkermansia*属、*Eubacterium*属、*Alistipes*属、*Bifidobacterium*属、*Ruminococcus*属が減少し、*Clostridium*属、*Negativibacillus*属、*Ruminococcus gnavus*が増加していた(すべて $q < 0.1$)。

細菌とファージの相関解析を行うと、UC患者で細菌とファージの相関数が低下していた(健常人84に対しUC39)。*Ruminococcus*を宿主とする溶菌性ファージは健常人で正の相関を示した(健常人 $\rho = 0.505$ vs UC患者 $\rho = 0.109$)。一方*Streptococcus*を宿主とする溶原性ファージおよび*Parabacteroides*を宿主とする溶菌性ファージはUC患者で正の相関を示した(それぞれ健常人 $\rho = 0.060$ vs UC患者 $\rho = 0.376$ 、健常人 $\rho = 0.162$ vs UC患者 $\rho = 0.482$)。この結果から、UC患者と健常人でファージと細菌の相関が変化していることが示唆された。

【考察】

UC患者では腸内ファージ叢の変化が生じていることを明らかにした。この変化は細菌叢の変化と関連していたことから、ファージと細菌の相互作用を伴う変化がUCの病態に関与していることが示唆された。

UCの腸内ファージ叢の変化については一定の見解は得られていない。本研究のごとく α 多様性が低下するという報告もあるが増加するという報告もある。これらの違いは糞便からのウイルスの濃縮方法や解析で用いられるウイルスデータベースの違いなどの解析手法に起因する可能性が一因と考えられる。

健康なヒトの腸内では溶菌性ファージが優勢な状態で安定しているとされ、溶原性ファージは細菌をとりまく環境の変化に応じて溶菌サイクルへ移行することで細菌叢の変化を誘導することが報告されている。本研究にてUC患者で溶原性ファージが増加傾向であったことは、寛解期においても溶原性ファージが腸内細菌内に潜伏することによって炎症を誘導する一因になっている可能性が示唆された。

UC患者の*Odoribacter*を宿主とする溶菌性ファージの減少は*Odoribacter*属の減少を伴い、*Ruminococcus gnavus*を宿主とする溶菌性ファージの増加は*Ruminococcus gnavus*の増加を伴っていた。*Odoribacter*は制御性T細胞の誘導など粘膜保護的な働きがある一方、*Ruminococcus gnavus*は粘液の分解により炎症の誘導に関わり、これらの細菌の変化とファージが関連してUCの病態形成に関与している可能性が示唆された。

【結論】

UC患者では、内視鏡的寛解期にあっても腸内ファージ叢が変化しており、病態形成に関与していることが示唆された。

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、
2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

博士論文審査の結果の要旨

整理番号	1036	氏 名	大槻 晋士
論文審査委員	主 査 石垣 診祐 副 査 伊藤 靖 副 査 藤本 徳毅		
(博士論文審査の結果の要旨) 本研究では、内視鏡的寛解期にある日本人潰瘍性大腸炎（UC）患者が有する腸内バクテリオファージ叢の特徴を明らかにすることを目的として、便から Virus-like particle を抽出した DNA をショットガンシーケンスで解析することで phage 解析を行い、同時に細菌叢の解析も行い比較検討した。その結果、以下のような結論に至った。 1. UC 患者では健常者と比較して腸内 phage 叢の α 多様性（種の豊富さ）が低下しており、β 多様性（個体間の相違）が UC と健常者で異なり、構成が変化していた。 2. UC 患者では溶原性 phage が増加傾向であった。 3. 腸内 phage と腸内細菌の増減には相関があった。またこの相関関係は UC 患者と健常者とで異なっていた。 4. UC 患者で <i>Odoribacter</i> を宿主とする溶菌性 phage の減少は <i>Odoribacter</i> の減少を伴っており、一方で <i>R. gnavus</i> を宿主とする溶菌性 phage の増加は <i>R. gnavus</i> の増加を伴っており、phage と宿主の細菌の関連性を示唆した。 以上の研究成果から、寛解期の UC 患者で腸内 phage 叢が腸内細菌叢と関連して変化していることが明らかとなり、病態との関連性を強く示唆する重要な研究成果であった。また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士（医学）の学位論文に値するものと認められた。 (総字数 588 字) (2025年 2月 17日)			