

令和 4 年 4 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08569

研究課題名(和文) バイオインフォマティクスによるウイルス性心筋炎予後判定・治療に寄与する分子の同定

研究課題名(英文) Bioinformatics analyses for identification of molecules which contribute to prognosis and treatment in viral myocarditis

研究代表者

尾村 誠一 (Omura, Seiichi)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：80462480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：新規のウイルス性心筋炎モデルであるタイラーウイルス感染マウスを用いた本研究により、低侵襲性のバイオマーカーとなりうる分子を血液中および糞便中において同定した。血液中では、心筋トランスクリプトームデータとのパターンマッチングにより、Xaf1やOasl2などの自然免疫関連遺伝子が見出された。糞便中でも様々な腸内細菌量に変化が見られ、中枢神経系内の炎症性疾患における遺伝子発現変化との相関が見られた。特にCoprococcusはIgAとの相関が検出された。今後、タイラーウイルス感染モデルにおけるIgAおよび血小板の役割について、研究を展開していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行により、ウイルス性心筋炎診断に寄与する新規のバイオマーカーとなりうる分子を同定した。また、炎症性疾患において血小板関連遺伝子の発現量増加や中枢神経系におけるIgA遺伝子の増加など、これまでほとんど研究されてこなかった分子の重要性が示唆された。今後、炎症性疾患におけるこれらの分子の役割について、更なる研究を展開していく。本研究により、ウイルス性心筋炎の病期診断において、より正確かつ患者に負担の少ない低侵襲性の診断方法が確立され、より適切な治療の適用が可能となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Using a novel model of viral myocarditis, Theiler's murine encephalomyelitis virus-infected mouse, our study identified the molecules in the blood and feces as minimally invasive biomarkers. In the blood, pattern matching with myocardial transcriptome data correlated with innate immunity-related genes, such as Xaf1 and Oasl2. In feces, we observed microbiota changes which correlated with changes in gene expression in inflammatory diseases in the central nervous system. In particular, Coprococcus was correlated with IgA gene expression. In the future, we will study the roles of IgA and platelets in Theiler's virus-infected mouse.

研究分野：ウイルス学、免疫学、バイオインフォマティクス

キーワード：ウイルス性心筋炎 バイオマーカー 腸内細菌叢 トランスクリプトーム 血小板 免疫グロブリンA

## 1. 研究開始当初の背景

心筋炎は突然死の原因疾患であり、40歳以下では突然死の20-42%が心筋炎によるとの報告もある(1)。主原因はウイルス感染であり、ピコルナウイルス科に属するウイルスなどが高頻度に検出される[急性および慢性心筋炎の診断・治療に関するガイドライン(2009年改訂版)]。ウイルス性心筋炎は3病期に分かれ、第1期は心筋細胞へのウイルス感染・増殖による直接的傷害と宿主の自然免疫反応、第2期はウイルスに対する獲得免疫反応および心筋に対する自己免疫反応の誘導、第3期は心臓線維化による機能障害および拡張型心筋症への進行が特徴である。各病期とも重篤な場合死に至るため適切な治療が必要であるが、病期により治療法は異なり、病期判別がきわめて重要である。例えば第2期に有効な免疫抑制薬は第1期ではウイルス増殖を促進し、疾患を増悪する可能性がある。また、心筋炎の確定診断には心筋生検を実施し、病理学的に細胞浸潤を観察することが必要とされてきた(2)。しかし、例えばウイルス増殖は顕著であるが心筋に細胞浸潤が乏しい第1期のみを病態を示し死に至ることがあり、この場合病理学的検査では診断に至らない(3)。このように心筋生検は患者の負担が大きいかかわらず、確定診断に至らない症例があり問題である。我々はこれまでに、ピコルナウイルス科に属するタイラーウイルスをマウスに感染させ、心筋炎を誘導した。経時的な心臓遺伝子発現解析により、第1期は自然免疫系、第2期は獲得免疫系、第3期は心筋リモデリングに関連する遺伝子の特徴的な発現増加を見出し、第3期まで進行するヒト心筋炎の新規モデルを確立した。そこで、本モデルを用いて心筋炎の各病期を反映する代替マーカーを同定できればヒト心筋炎への応用も可能となり、侵襲の少ない血液サンプル、糞便サンプルを用いて心筋炎の診断・病期判定が可能となるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が確立したウイルス性心筋炎モデルを用いて、各病期における心臓・血液のトランスクリプトームデータおよび糞便マイクロバイオームデータのバイオインフォマティクス解析を行い、心臓の病態を反映する代替マーカーを同定することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 心筋炎マウスモデルの作製

C3H/HeN マウスを用い、タイラーマウス脳脊髄炎ウイルスを脳内または腹腔内に接種した。経過観察のために、経時的に体重を測定、臨床症状を観察した。

### (2) トランスクリプトーム解析

マウスから臓器(脊髄、心臓、血液など)を採取し、RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いて Total RNA を抽出した。HiSeq (Illumina) を用いた RNA sequencing を米国の受託解析会社 MR DNA (TX, USA) に依頼し、得られたデータを Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) (4) により解析した。

### (3) 腸内細菌叢解析

マウスから糞便を採取し、QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。MiSeq (Illumina) を用いた 16S rRNA sequencing を MR DNA に依頼し、得られたデータを QIIME2 を用いて解析した。

### (4) バイオインフォマティクス、統計解析

統計解析環境ソフトウェアである R を用いて、主成分分析やパターンマッチングなどを行った。グラフの作成には Origin Pro 2020 (OriginLab Corporation) を用いた。

## 4. 研究成果

まず、タイラーウイルス感染による心筋炎誘導効率を、実験マウスの販売会社間で比較を行った。例として C3H マウスについては、日本クレア株式会社 (CLEA) と日本エスエルシー株式会社 (SLC) から入手したマウスを用い、タイラーウイルスを腹腔内または脳内に接種した(図1)。その結果、タイラーウイルスの腹腔内接種ではどちらのマウスでも100%心筋炎病変が見られた。それに対して脳内接種では違いが見られ、CLEA から入手したマウスでは40~50%に病変が見られたのに対し、SLC から入手したマウスでは0~20%に軽度の病変が見られたのみであった。

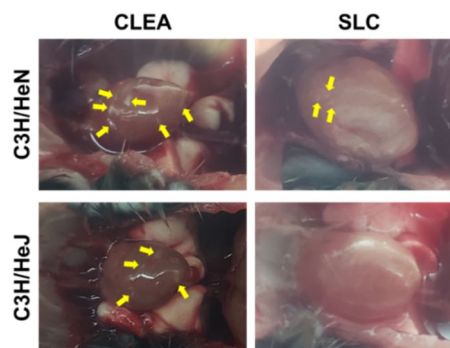


図1. タイラーウイルス感染による心筋炎病変

この C3H/HeN マウスの心筋炎モデルを用いた研究では、これまでに心筋のトランスクリプトーム解析において、3つの病期に特異的な遺伝子発現を明らかにし、病期判別バイオマーカーの候補遺伝子として同定した。しかし、これらをバイオマーカーとして用いるには、患者に負担

のかかる心筋の生検が必要になる。そこで、低侵襲性である血液中の代替マーカーを同定するために、血液サンプルを用いたトランスクリプトーム解析を行った。得られたデータのうち、有意に発現が変化した遺伝子のデータを用いて主成分分析を行った結果、急性期 (Day 4)、亜急性期 (Day 7)、慢性期 (Day 60) の群間で異なる分布が見られた (図 2)。因子負荷量を計算すると、purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 12 (*P2ry12*)、glycoprotein 9 (platelet) (*Gp9*)、pro-platelet basic protein (*Ppbbp*) などの血小板関連遺伝子が正の相関、interferon-induced protein 44 (*Ifi44*)、interferon regulatory factor 7 (*Irf7*) などのインターフェロン誘導性自然免疫関連遺伝子が負の相関を示した (5)。

また、心筋炎の病態を判別できる血中代替バイオマーカーを同定するため、心筋トランスクリプトームの各病期における PCA の第一主成分と血液トランスクリプトームデータとのパターンマッチングを行った。その結果、急性期では血中の XIAP associated factor 1 (*Xaf1*) や GTPase, very large interferon inducible pseudogene 1 (*Gvin1*)、2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2 (*Oasl2*) などの自然免疫関連遺伝子の発現との高い相関が見られた。亜急性期におけるパターンマッチングでは急性期と同様に自然免疫関連遺伝子が高い相関を示したほか、ATP synthase や ATPase など ATP binding に関する遺伝子などの相関が見られた。

近年様々な疾患において腸内細菌叢の寄与が報告されてきており、心筋炎などの炎症性疾患においてもいくつか報告がなされてきている。本研究においても、タイラーウイルス感染モデルと腸内細菌叢の変化との関連性を調べるため、16S rRNA sequencing により腸内細菌叢解析を行った (6)。その結果、タイラーウイルス感染により、S24-7 科に属する細菌や *Anaeroplasm* 属菌において大きな変化が見られた (図 3)。その一方で、*Dorea* 属や *Marvinbryantia* 属、*Coprococcus* 属の細菌量が、存在量としては少ないが有意に変化しており、その変化は中枢神経系の免疫関連遺伝子の発現変化との高い相関が見られた。特に、免疫グロブリン A (IgA) は感染慢性期において有意に増加しており、かつ *Coprococcus* 属菌の変化との相関が見られた (図 4)。以上の結果より、タイラーウイルス感染モデルにおいても腸内細菌叢の寄与が見出され、腸内細菌叢変化を疾患のバイオマーカーとして応用できることが示唆された。現在、IgA の炎症性疾患への寄与をさらに研究するため、IgA ノックアウトマウスの作製を行っている。

さらに、タイラーウイルス感染モデル血液中において血小板関連遺伝子の発現量増加が見られたので、血小板の役割を明らかにするために、血小板中の遺伝子発現およびウイルスゲノムの検出を試みた。結果として、血小板中からタイラーウイルスゲノムを検出することはできなかったが、ヒストンや転写に関連する遺伝子や免疫関連遺伝子など様々な遺伝子の発現量の変化が見られた。さらに心筋炎における血小板の役割について明らかにするために、抗体投与により血小板を枯渇させ、心筋炎にどのような影響が見られるかについて研究を進め

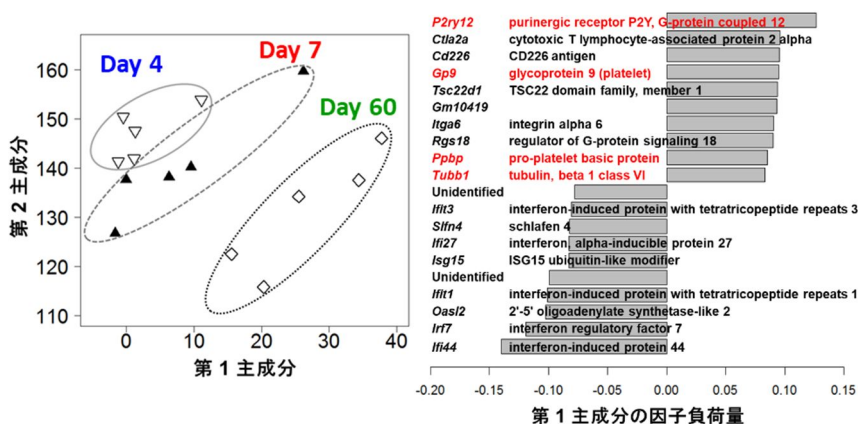


図 2. 血液トランスクリプトームデータの主成分分析

図 2. 血液トランスクリプトームデータの主成分分析

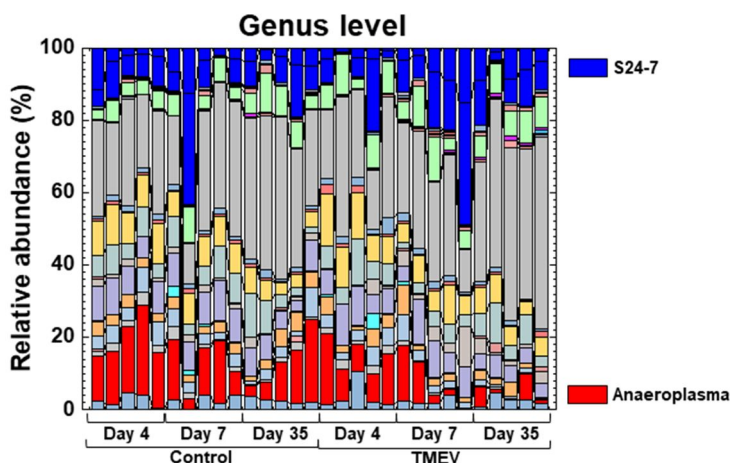


図 3. タイラーウイルス感染後、急性期 (Day4)、亜急性期 (Day7)、慢性期 (Day 35) における腸内細菌叢の変化

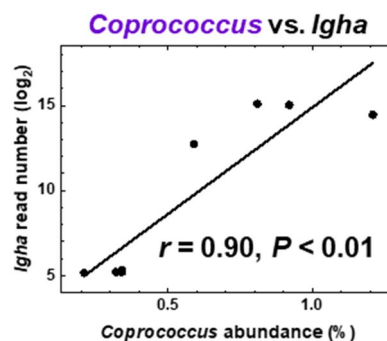


図 4. タイラーウイルス感染モデルにおける腸内細菌 *Coprococcus* と遠隔臓器である中枢神経系の IgA 発現量との相関

ていく予定である。

また、ポリフェノールの一つであるクルクミンが抗炎症作用を持つことから、タイラーウイルス感染と同様に炎症性疾患モデルとして用いられる実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルに対するクルクミン化合物 (Curcumin  $\beta$ -D-Glucuronide, CMG) の作用について検討したところ、神経炎症に対して効果が見られ、また腸内細菌叢にも変化が見られた (7)。今後、CMG の心筋炎への作用についても検討していきたいと考えている。

#### <引用文献>

1. Eckart RE, Scoville SL, Campbell CL, Shry EA, Stajduhar KC, Potter RN, et al. Sudden death in young adults: a 25-year review of autopsies in military recruits. *Ann Intern Med.* 2004 Dec 7;141(11):829–34.
2. Caforio ALP, Pankuweit S, Arbustini E, Basso C, Gimeno-Blanes J, Felix SB, et al. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J.* 2013 Sep;34(33):2636–48, 2648a–2648d.
3. Kühl U, Schultheiss H-P. Myocarditis. *Dtsch Arztebl Int.* 2012 May;109(20):361–8.
4. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013 Jan;29(1):15–21.
5. 尾村誠一, 角田郁生. 多発性硬化症の成因研究最前線：多発性硬化症のタイラーウイルスモデルは神経炎症と心筋炎を誘導する. *Pharma Medica.* 2021;39(8):67–71.
6. Omura S, Sato F, Park A-M, Fujita M, Khadka S, Nakamura Y, et al. Bioinformatics analysis of gut microbiota and CNS transcriptome in virus-induced acute myelitis and chronic inflammatory demyelination; potential association of distinct bacteria with CNS IgA upregulation. *Front Immunol.* 2020 Jul;11:1138.
7. Khadka S\*, Omura S\*, Sato F\*, Nishio K, Kakeya H, Tsunoda I. Curcumin  $\beta$ -D-glucuronide modulates an autoimmune model of multiple sclerosis with altered gut microbiota in the ileum and feces. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:772962. \*These authors contributed equally.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sato Fumitaka, Nakamura Yumina, Katsuki Aoshi, Khadka Sundar, Ahmad Ijaz, Omura Seiichi, Martinez Nicholas E., Tsunoda Ikuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Curdlan, a Microbial $\alpha$ -Glucan, Has Contrasting Effects on Autoimmune and Viral Models of Multiple Sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 805302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2022.805302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Khadka Sundar, Omura Seiichi, Sato Fumitaka, Nishio Kazuto, Kakeya Hideaki, Tsunoda Ikuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Curcumin $\alpha$ -D-Glucuronide Modulates an Autoimmune Model of Multiple Sclerosis with Altered Gut Microbiota in the Ileum and Feces	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 772962
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2021.772962	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 尾村 誠一、角田 郁生	4. 巻 39
2. 論文標題 連載 Medical Scope 多発性硬化症の成因研究最前線 ～多発性硬化症のタイラーウイルスモデルは神経炎症と心筋炎を誘導する～	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharma Medica	6. 最初と最後の頁 67～71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34449/J0001.39.08_0067-0071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Omura Seiichi, Sato Fumitaka, Park Ah-Mee, Fujita Mitsugu, Khadka Sundar, Nakamura Yumina, Katsuki Aoshi, Nishio Kazuto, Gavins Felicity N. E., Tsunoda Ikuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Bioinformatics Analysis of Gut Microbiota and CNS Transcriptome in Virus-Induced Acute Myelitis and Chronic Inflammatory Demyelination; Potential Association of Distinct Bacteria With CNS IgA Upregulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.01138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Park Ah-Mee, Khadka Sundar, Sato Fumitaka, Omura Seiichi, Fujita Mitsugu, Hsu Daniel K., Liu Fu-Tong, Tsunoda Ikuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Galectin-3 as a Therapeutic Target for NSAID-Induced Intestinal Ulcers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 550366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.550366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Omura Seiichi, Sato Fumitaka, Martinez Nicholas E., Park Ah-Mee, Fujita Mitsugu, Kennett Nikki J., Cvek Urska, Minagar Alireza, Alexander J. Steven, Tsunoda Ikuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Bioinformatics Analyses Determined the Distinct CNS and Peripheral Surrogate Biomarker Candidates Between Two Mouse Models for Progressive Multiple Sclerosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.00516	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yun J.W., Cvek U., Kilgore P.C.S.R., Tsunoda I., Omura S., Sato F., Zivadinov R., Ramanathan M., Minagar A., Alexander J.S.	4. 巻 229
2. 論文標題 Neurolymphatic biomarkers of brain endothelial inflammatory activation: Implications for multiple sclerosis diagnosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 116 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2019.05.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 SAKAMOTO DAISUKE, TAKAGI TOSHINORI, FUJITA MITSUGU, OMURA SEIICHI, YOSHIDA YASUNORI, IIDA TOMOKO, YOSHIMURA SHINICHI	4. 巻 39
2. 論文標題 Basic Gene Expression Characteristics of Glioma Stem Cells and Human Glioblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 597 ~ 607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.13153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Omura S, Khadka S, Sato F, Nakamura Y, Nishio N, Kakeya H, and Tsunoda I
2. 発表標題 Curcumin monoglucuronide (CMG) treatment alters the gut microbiota, regulating an autoimmune model for multiple sclerosis
3. 学会等名 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2021). The 2nd International Symposium on Chemical Communication (ISCC2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朴雅美、尾村誠一、佐藤文孝、藤田貢、角田郁生
2. 発表標題 ガレクチン-3は腸内細菌叢に影響し、NSAIDsによる小腸潰瘍の増悪因子として働く
3. 学会等名 第24回腸内細菌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角田郁生、尾村誠一、佐藤文孝、崎山奈美江、Sundar Khadka、中村優美和、朴雅美、藤田貢
2. 発表標題 タイラーウイルスによる急性灰白脳脊髄炎・多発性硬化症動物モデル：分子相同性から腸内細菌叢まで
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤文孝、カドカ・スングル、尾村誠一、朴雅美、藤田貢、中村優美和、西尾和人、掛谷秀昭、角田郁生
2. 発表標題 プロドラッグ型クルクミンCMGによる実験的自己免疫性脳脊髄炎の抑制と小腸細菌叢変化
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾村誠一, 佐藤文孝, 朴雅美, 藤田貢, 角田郁生
2. 発表標題 多発性硬化症ウイルスモデルにおける中枢神経系炎症性病態と腸内細菌叢変化との関連性の検討
3. 学会等名 第23回腸内細菌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾村誠一, 佐藤文孝, 藤田貢, 朴雅美, カドカ スンダル, 角田郁生
2. 発表標題 多発性硬化症ウイルスモデルにおける腸内細菌叢の変化と中枢神経系炎症性脱髄病変との関連
3. 学会等名 第31回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾村誠一, 佐藤文孝, 藤田貢, 朴雅美, スンダル・カドカ, 角田郁生
2. 発表標題 ウイルス性脳脊髄炎モデルにおける中枢神経病態と腸内細菌叢との関連性
3. 学会等名 第24回日本神経感染症学会総会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾村誠一, 佐藤文孝, Sundar Khadka, 中村優美和, 甲木蒼紫, 西尾和人, 掛谷秀昭, 角田郁生
2. 発表標題 多発性硬化症動物モデルにおける水溶性プロドラッグ型クルクミン CMG の治療効果と腸内細菌叢変化
3. 学会等名 「化学コミュニケーションのフロンティア」第6回公開シンポジウム
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Omura S, Nishio K, Tsunoda I
2. 発表標題 Communication between CNS and gut microbiota in a viral model for multiple sclerosis
3. 学会等名 The 1st International Symposium on Chemical Communication (ISCC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato F, Omura S, Martinez NE, Range T, Ekshyyan L, Minagar A, Alexander JS, Tsunoda I
2. 発表標題 Glatiramer acetate is safe for a virus-induced demyelinating disease model
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato F, Omura S, Park A-M, Fujita M, Khadka S, Sakiyama N, Katsuki A, Nakamura Y, Nishio K, Tsunoda I
2. 発表標題 Altered microbiota could affect distinct CNS immune gene expressions in the Theiler's virus model of MS
3. 学会等名 Sendai Conference 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato F, Omura S, Park A-M, Fujita M, Khadka S, Nishio K, Tsunoda I
2. 発表標題 Alteration of microbiota and immune gene expressions in the central nervous system in a picornavirus-induced acute flaccid myelitis model
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	Brunel University London			
米国	Louisiana State University			