

令和元年6月10日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09572

研究課題名(和文) マイクロバイオーム解析に基づく高齢者肺炎の病態解明と革新的予防法への展開

研究課題名(英文) Elucidation of pathological condition of Elderly people pneumonia via analysis of microbiota

研究代表者

柳原 克紀 (YANAGIHARA, Katsunori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：40315239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年、消化管や生殖器、皮膚組織などのマイクロバイオームに基づいて、疾患の発生や予防機序に応用する試みが行われている。肺炎の発症予測や病態解析において口腔内や腸内の環境、すなわちマイクロバイオームが有用ではないかという仮説を立て、それを検証する研究を行った。ヒトを対象にした研究を行う前に、動物モデルを用いた基礎研究が必要である。マウスの肺炎モデルを用いて、マイクロバイオームの変容を解析した。口腔内環境は誤嚥性肺炎のように原因としての認識が強いが、下気道感染症の存在自体で口腔内細菌叢が変容することが示され、下気道から上気道への何らかのフィードバック機能があるものと推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では、高齢者肺炎が急増し、毎年10万人以上が死亡している。高齢者肺炎では様々な原因菌が関与するため、特定の病原体を対象にしたワクチンによる予防効果には限界がある。近年、消化管や生殖器、皮膚組織などのマイクロバイオームを検討し、疾患の発生や予防に応用する試みが行われている。肺炎においても新たな知見が得られることが期待される。本研究は、口腔内および腸内のマイクロバイオーム解析を行い、肺炎の発症機序・病態・予後などを解明するものである。この結果を基に、我が国において死因の第3位となっている高齢者肺炎に対する新しい予防法を構築することを目指す。

研究成果の概要(英文)：The surface of the human body has a unique microbiota; its influence on our health is gradually being revealed. The role of gut microbiota has been shown to be related to our health, as well as to the pathogenesis of local and systemic diseases, including autoimmune, brain, and respiratory diseases.

In this project, the nasal and oral microbial characteristics of a murine model with pneumonia were also studied to determine whether lung infections modify the microbiota. The health status of the lower respiratory tract may influence the oral microbiota, The evaluation of oral microbiota may contribute to monitoring lung health.

研究分野：感染症学

キーワード：マイクロバイオーム 高齢者肺炎 予防法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、消化管や生殖器、皮膚組織などのマイクロバイーム (microbiome、宿主に生存する微生物コミュニティの構成ゲノムの総称) に基づいて、疾患の発生や予防機序に応用する試みが行われており、多くの疾患において研究が進んでいる。2012 年に Human Microbiome Project (HMP) により、ヒト正常マイクロバイームが公表された。(Human Microbiome Project consortium Nature 2012;486:207-14) ヒトゲノムが約 2 万 2 千種類のタンパク質遺伝子をコード化しているのに比べ、ヒト正常マイクロバイームは約 800 万種類をコードしており、360 万倍の遺伝子が関与している。これらのデータから、疾患発症について多くの知見が得られてきた。現在までに、炎症性腸疾患、糖尿病、大腸癌、自閉症、アテローム性動脈硬化症、メタボリック症候群、リウマチならびに多発性硬化症などとの関連性が報告されている。感染症領域でも、骨髄移植患者の腸内のマイクロバイームの多様性が感染症の発症抑止に関わっていることが、明らかにされている。肺炎において実施されたマイクロバイームの研究は、感染局所の検体を用いた原因菌の検索がほとんどである。発症や予防に関する研究は実施されていない。

2. 研究の目的

我が国では、高齢者肺炎が急増し、毎年 10 万人以上が死亡している。高齢者肺炎では様々な原因菌が関与するため、特定の病原体を対象にしたワクチンによる予防効果には限界がある。

近年、消化管や生殖器、皮膚組織などのマイクロバイーム (microbiome、宿主に生存する微生物コミュニティの構成ゲノムの総称) を検討し、疾患の発生や予防に応用する試みが行われている。肺炎においても新たな知見が得られることが期待される。

本研究は、口腔内および腸内のマイクロバイーム解析を行い、肺炎の発症機序・病態・予後などを解明するものである。この結果を基に、我が国において死因の第 3 位となっている高齢者肺炎に対する新しい予防法を構築することを目的とした。

ヒトの検体を用いた研究を実施する前に、方向性を確認することが大切である。

そこで、マウスを用いて下気道感染症発症中の上気道 (鼻腔・口腔) マイクロバイームの特徴を解析した。

3. 研究の方法

6~8 週齢の C57Bl/6J マウスへ、*Klebsiella pneumoniae* KEN-11 株 (1.0×10^4 CFUs/マウス) を経気管的に接種することで、*K. pneumoniae* 肺炎モデルを作成した。発症初期の上気道の細菌叢を評価するために、感染 24 時間後の口腔ぬぐい液、鼻腔洗浄液を採取した。同時点の気管支肺胞洗浄液も採取し、それぞれの細菌叢プロファイルを見るために、各サンプルからの抽出核酸に対して、16s rRNA の V1-V2 領域を対象として Thermo Fisher Scientific 社の Ion PGM を用いてメタシーケンズを行った。細菌叢解析は CLC genomics Workbench で行い、SILVA release 132 をパイプラインとして、多様性の変化を Shannon index (多様性) を用いて評価し、非感染マウスと感染マウス間の Weighted UniRac に対して PERMANOVA 解析を行うことで両群間での細菌叢 (多様性) を比較した。

4. 研究成果

下気道では、多様性に明らか有意差は認めなかったものの、感染マウスでは細菌叢の変容が起きていた。この時点において、両群間の鼻腔の細菌叢は多様性、Weighted UniFrac

共に明らかな差は見られなかった一方、口腔内細菌叢では、Weighted UniFrac に差はないものの、感染マウスで有意な多様性の低下が観察された。感染群では占拠率が科レベルで増加している細菌が感染群で多く、特に、感染群で Carnobacteriaceae 科グループ細菌の上昇が観察された。

本研究では、下気道感染症発症中に鼻腔よりもむしろ口腔内の細菌叢の特徴に変化が観察されることが明らかとなり、下気道感染症の発症早期から口腔内細菌叢の多様性が上昇するという現象は、これまで知られていないことであった。口腔内細菌叢変容がもつ機能的意義についてはさらに解析が必要であるものの、自己免疫疾患や炎症性腸疾患などとの関連が知られるように、下気道感染症も口腔内細菌叢が病態を修飾している可能性も考えられる。口腔内環境は誤嚥性肺炎のように原因としての認識が強いが、下気道感染症の存在自体で口腔内細菌叢が変容することが示され、下気道から上気道への何らかのフィードバック機能があるものと推測された。

今後、具体的な細菌集団の特徴を整理・検証していくことによって、口腔内細菌の特徴をチェックする簡便なスクリーニング検査法の開発や、下気道の健康状態のモニタリングへの活用など、臨床応用の可能性も秘めていると考えられた。たとえば、臨床現場では高齢者や意識障害のある患者での肺炎は臨床所見あるいは症状に乏しく、進行した状態で見つかることがあるが、このような患者の早期の肺炎診断・治療に役立つ可能性があると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Yamakawa H, Kosai K, Kawamoto Y, Akamatsu N, Matsuda J, Kaku N, Uno N, Morinaga Y, Hasegawa H, Yanagihara K.: Performance evaluation of BD Phoenix™, an automated microbiology system, for the screening of IMP-producing Enterobacteriaceae. J Microbiol Methods 145:47-49, 2018. 査読有 doi: 10.1016/j.mimet.2017.12.006.
2. Yanagihara K., Akamatsu N, Matsuda J, Kaku N, Katsumata K, Kosai K. : Susceptibility of Clostridium species isolated in Japan to fidaxomicin and its major metabolite OP-1118. J Infect Chemother 24(6):492-495, 2018. 査読有 doi: 10.1016/j.jiac.2017.12.006.
3. Morinaga Y, Akamatsu N, Matsuda J, Tateno H, Tomaru T, Tanaka A, Morita S, Nakamura M, Kato H, Annaka M, Masuda Y, Itakura Y, Inamatsu T, Yanagihara K.: Diagnostic utilities of a fully automated molecular test for toxigenic Clostridium difficile. J Infect Chemother 24(2):88-91, 2018. 査読有 doi: 10.1016/j.jiac.2017.09.003.
4. Nishimura F, Morinaga Y, Akamatsu N, Matsuda J, Kaku N, Takeda K, Uno N, Kosai K, Hasegawa H, Yanagihara K.: Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase and Underestimation of Extended-Spectrum β -Lactamase in Cefepime-Susceptible Elevated-Ceftazidime-MIC Enterobacteriaceae Isolates. Jpn J Infect Dis 71(4):281-285, 2018. 査読有 doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.469.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：森永 芳智

ローマ字氏名：MORINAGA, Yoshitomo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。