

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11244

研究課題名（和文）次世代シーケンサーを用いた菌叢解析による感染型不育症の病態解明と治療法の確立

研究課題名（英文）The investigation of the pathology of infectious recurrent pregnancy loss by microbiota analysis of genital flora by 16S rRNA gene sequencing.

研究代表者

北折 珠央（KITAORI, TAMAO）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・講師

研究者番号：40444989

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：子宮頸管粘液と膣分泌物を採取した不育症患者群119症例、コントロール群39症例の合計316検体を用いて次世代シーケンサーを用いて菌叢解析を行った。患者群とコントロール群を比較すると細菌叢の種類のは患者群で有意に低く、“Firmicutes門”の占める割合が多い傾向にあり、TM7門はコントロール群に多数認められる傾向にあった。この結果から妊娠の継続には生殖器の細菌叢は種類が豊富であること、“Firmicutes門”に属する細菌の増加が流産を蜂起する可能性が示唆され、“TM7門”が妊娠継続になんらかの役割を持っている可能性が考えられる。現在論文投稿準備中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から特定の菌が増えるのではなく多様な細菌が適切な割合で共存できる環境が妊娠継続に必要であるとわかった。不妊症では常在菌以外の菌の除菌や膣内をラクトバチルス属を含んだ菌叢に構築する治療が有用であったという報告もある。今回の研究成果から不育症患者でも同様の治療が有効である可能性があり、それについて新たな研究を行う予定で準備している。今後、今回得られたデータをもとにしてより高度な解析を行っていく予定である。これらの今後予定している解析、研究はすべて不育症領域においては初めての知見となるものであり感染型不育症の病態解明、治療法の開発に大きく貢献するものであると我々は考えている。

研究成果の概要（英文）：Cervical mucus and vaginal secretions were collected from a total of 119 cases in the RPL group and 39 cases in the control group. Microbiota analysis was performed using a next-generation sequencer from these 316 samples. When comparing the patients and control groups, the richness of bacterial flora was significantly lower in the patient group. Phylum Firmicutes tend to occupy a large proportion of the phylum in patients group, and phylum TM7 is predominantly in the control group. The results show that the bacterial flora of the reproductive organs is rich in variety for the continuation of pregnancy and that the increase in the number of bacteria belonging to phylum Firmicutes may cause a miscarriage, and that the phylum TM7 may have some role of the continuation of the pregnancy. The paper is currently being prepared for submission.

研究分野：不育症

キーワード：不育症 菌叢解析 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

1) 不育症と中・後期流産

私たちは流産や死産を繰り返し、児を得られない不育症の研究を長年行ってきた。不妊症とくらべると、不育症という疾患の認知度は社会的には高くない。しかし、その頻度は4.2%であることを私たちは報告し全国紙の一面に掲載された。不育症では10週未満の初期流産が95%を占める。しかし、妊娠13~20週頃に破水、出血、腹痛などを伴いその結果、死産に至る不育症の一群は確実に存在する。反復初期流産にくらべると少なく、抗リン脂質抗体のように研究や治療しやすい対象ではないため研究が進んでこなかった。

2) 感染との関連

早産の原因が細菌性膣症に由来する子宮内感染によって起こることは証明されており、22週未満の中・後期流産も早産と同様に起こると考えられる。しかし原因菌は培養検査の診断の難しさから特定されず、治療法も確立されていないのが現状であり不育症診療における課題であった。かつて不育症の6~7割は原因不明とされていたが私たちは流産絨毛染色体分析により不育症患者でも41%に胎児染色体異常をみとめ、真の原因不明は25%であることを報告した¹⁾。この原因不明の中には感染型の不育症が含まれていると考えられる。私たちは妊娠初期に炎症性マーカーであるIL6が上昇している症例では生児獲得率が低いことを証明した²⁾。初期流産の中にも出血やポリープの反復、絨毛膜羊膜炎など微生物の感染に起因する不育症が存在すると推定する。

3) 次世代シーケンサーを用いた菌叢群解析

近年、腸内微生物の全メタゲノム解析により2型糖尿病で特異的な微生物マーカーが糖尿病の分類に応用できる可能性が示された³⁾。非肥満者群と肥満者群の菌叢解析により、肥満に関連した合併症の発症リスクが高い可能性のあるサブセットを見分けることもできている⁴⁾。さらに大腸癌や肝癌のマーカーも報告されている。早産の菌叢解析も行われ、305人の早産患者の胎盤病理組織と羊水中の培養による微生物の同定、IL-6値との関係から菌叢解析の有用性が示された⁵⁾。しかし菌叢解析を用いた不育症の研究は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は未だほぼ手つかずと言える感染型流産の病態解明を行うことである。次世代シーケンサーによる16srRNA菌叢解析という新たな手法を用いて不育症患者の膣分泌物液、頸管粘液の菌叢解析を行い、これまで培養検査などでは検出が難しかった菌についても網羅的に調べ健常人と比較検討することで不育症に多い菌叢や特異的な菌を同定する。感染型流産の病態解明ができれば除菌や菌叢の構築などにより治療法が未確立で対応に苦慮していた感染型不育症に対しての治療法を確立できる可能性があると考えている。

3. 研究の方法

概要

不育症患者と健常女性の非妊娠時および妊娠初期の子宮頸管粘液と膣分泌物液を採取し、DNA抽出を行う。各検体の16srRNAのV3-V4領域をPCR法にて増幅し精製、濃度調整を

行いライブラリを作成する。得られたライブラリを次世代シーケンサーにてシーケンスし遺伝子配列をデータベースと照合して得た一次解析データから各検体の菌叢を解明しデータをコントロールと比較することで不育症に特異的に多い菌種や菌叢群を同定する。

対象

2016年4月から2019年4月までに名古屋市立大学病院産婦人科を受診した不育症患者に対して系統的検査を行い子宮奇形、抗リン脂質抗体症候群、夫婦染色体異常などの明らかな原因がなく18歳から40歳までの健康な119症例（非妊時90症例 妊娠初期29症例）より書面によるインフォームドコンセントを得て膣分泌物液、頸管粘液を採取した。

コントロールとして同時期に名古屋市立大学病院産婦人科、名古屋市立西部医療センター産婦人科を受診した18歳から40歳までの流産歴のない健康な経産婦38症例（非妊時11症例 妊娠初期27症例）にインフォームドコンセントを得て膣分泌物液、頸管粘液を採取した。（Table 1）検体採取は膣内、頸管内に滅菌コットンスワブを10秒ほど押し当て採取、即座に溶解 buffer に浸し、-80 の暗所にて冷凍保存とした。

Table1 患者背景

	不育症群 (n=119)		コントロール群 (n=38)	
	非妊時(n=90)	妊娠初期(n=29)	非妊時(n=11)	妊娠初期(n=27)
年齢	32.9 ± 4.27	32.4 ± 3.72	35.25 ± 3.36	34.96 ± 3.43
流産回数	2.36 ± 0.83	2.38 ± 0.67	0	0
生理不規則回数	0.31 ± 0.55	0.59 ± 0.85	1.41 ± 0.75	1.22 ± 0.49
妊娠回数		8.23 ± 3.24		11.42 ± 3.56

DNA 抽出

採取した検体は滅菌条件下にて QIAmp DNA Microbiome Kit(QIAGEN GmbH Hilden, Germany)を使用してメーカーのプロトコルに従って DNA 抽出した。

ライブラリ調整

ライブラリの準備は Miseq System (Illumina, inc., San Diego, CA, USA) のプロトコルに従って行った。各検体の DNA 濃度を Qubit dsDNA HS Assay Kit を使用して測定し、各検体を同量の DNA 濃度で混合したシーケンシングライブラリを作成した。一つのライブラリに含める検体の数を 80 検体としてライブラリ ~ (全 317 検体) を得た。

シーケンス

ライブラリ ~ をそれぞれ 15pg に希釈し、MiSeq Reagent Kit v3(600cycle)を使用して Illumina MiSeq Sequence Platform で共同研究者である早川卓志の協力により京都大学霊長類研究所で行った。ライブラリー、 はデータを得ることができたが、 に関してはシーケンスがかからず機材の原因なども考慮しマクロジェン・ジャパンに外注を依頼し SPRI select Kit(Beckman Coulter inc., Brea, CA, USA)を使用しメーカーのプロトコルに従いサイズセクションを行ったのちシーケンスを行うことができた。

一次解析

得られたシーケンスデータの解析には VSEARCH v1.10.2、Claident v0.2.2016.04.07、QIIME 9.1、および VEGAN v2.4-1 ソフトウェアデータベースを使用した。シーケンスデータをローカルアライメント検索ツール(BLAST)および分類データベース(v20160219)と照合し門、綱、目、科、属、種のレベルでの各 OTU の識別を行った。各 OTU の分類学的識別にはリボソームデータベースプロジェクト(RDP)分類器を使用して実行した。Qcauto

アルゴリズムの基準によってフィルタリングされた非細菌 OTU および読み取りは、下流の統計分析から除外され一次解析データを得た。一次解析データから有効なシークエンスリード数を揃えるため特にばらつきの大きい 25 検体を除外とし最終的な検体数は不育症患者群 118 症例 225 検体、コントロール群 37 症例 61 検体となった。

4. 研究成果

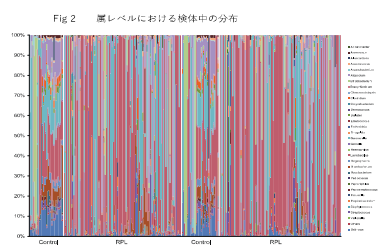
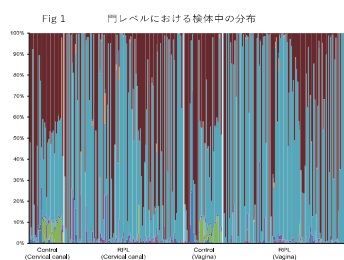
一次解析データからシークエンスデータを集計し Table2 で示すデータを得た⁶⁾。一次解析のデータより希薄化曲線の傾きを求め、傾き ≥ 0.01 のサンプルは高次解析にもちいないこととし合計 25 サンプルを高次解析の対象外とした。

Table 2 一次解析の結果

総リード数	15,092,474	
サンプル当たりの有効リード数	最小値	最大値
	19	350,526
総Operational taxonomic unit(OTU)数	10,253 (アーキア、不明を含む)	
総バクテリアOTU数	9,255	
サンプル当たりのバクテリアOTU数	最小値	最大値
	4	1,058

菌種の同定

各 OTU の門綱目科属種のレベルで判定し、それぞれの各サンプルのリード数の割合を計算した。門レベルと属レベルで患者群(RPL)、コントロール群(control)、頸管粘液(cervical mucous)、膣分泌物液(vaginal fluid)によりグループ化しグラフ化した (Fig 1 , Fig 2)。



結果

細菌叢の種類 richness を評価したところ不育症における細菌叢の richness はコントロール群に対して統計的に有意に低いことがわかった。Fig 1 から門レベルでは各検体中の菌の構成としては Actinovacteria 門、Firmicutes 門、TM7 門の OTU に分類される 3 群が支配的であり既報告と矛盾はなかった。患者群ではコントロール群と比較して Firmicutes 門の占める割合が多い傾向にあった。TM 7 門はコントロール群に多数認められる傾向にあった。また同一検体内での頸管粘液と膣分泌物の比較ではほぼ同じような菌の構成となっている傾向があった。Fig2 の属レベルでは各検体中には Arcanobacterium 属、Atopobium 属、Escheichia 属、Lactbacillus 属が特に多くの割合を占めており、そのうち Lactbacillus 属は特に表全体を見ても支配的に分布していた。これは膣内の常在菌であり膣内の自浄作用にラクトバチルス属が大きく貢献をしているという通説と矛盾しない結果となった。

結語

本研究の結果から、妊娠の継続には生殖器の細菌叢は種類が豊富であることが必要である可能性を示唆している。門レベルでは Firmicutes 門に属する細菌の増加が流産を蜂起する可能性を示唆され、TM 7 門が妊娠継続に何らかの役割を持っている可能性も考えられる。さらに属レベルではコントロール群では菌の構成割合が似ている検体が多く、適切な菌種

が適切な数や割合で存在していることが妊娠継続に必要である可能性が示唆された。不育症に特異的な菌や菌叢の特定までにはいたっていないが、この結果により特定の菌が増えるのではなく多様な細菌が適切な割合で共存できる環境が妊娠継続に望ましいということが考えられ、これは不育症領域において初めての知見であり大きな成果である。不妊症ではラクトバチルス属の腔分泌物中の割合が妊娠成立に重要であり常在菌以外の菌の除菌や腔内をラクトバチルス属を含んだ菌叢に構築するなどの治療が有用であったという報告もある⁷⁾。今回の研究成果から不育症患者でも同様の治療が有効である可能性があり、それについて新たな研究を行う予定で準備している。

今後、今回得られたデータをもとにして主成分分析、クラスタリング解析などのより高度な解析を行っていく予定である。また以下の項目についても比較検討を予定している。 妊時における不育症患者群とコントロール群の各菌叢の比較、 妊娠初期における不育症患者群とコントロール群の各菌叢の比較、 すべての検体での腔分泌物検体と頸管粘液検体の菌叢の比較、 不育症患者群における非妊時検体と妊娠初期検体の各菌叢の比較、 コントロール群の非妊時検体と妊娠初期検体の各菌叢の比較、 不育症患者群の中でも出血持続、絨毛膜下血腫、絨毛膜炎など感染が疑われる症例とコントロール群の各菌叢の比較、非妊娠時における不育症患者群、コントロール群の月経周期の変動。

これらの今後予定している解析、研究はすべて不育症領域においては初めての知見となるものであり感染型不育症の病態解明、治療法の開発に大きく貢献するものであると我々は考えている

<引用文献>

- 1) Sugiura-Ogasawara M et al. Abnormal Embryonic Karyotype Is the Most Frequent Cause of Recurrent Miscarriage. Hum Reprod.27(8):2297-303.2012.
- 2) Hattori Y et al. Uterine Cervical Inflammatory Cytokines, interleukin-6 and -8, as Predictors of Miscarriage in Recurrent Cases. Am J Reprod Immunol. 58(4):350-7.2007
- 3) Qin J et al. A Metagenome-Wide Association Study of Gut Microbiota in Type 2 Diabetes. Nature. 490(7418):55-60.2012
- 4) Le Chatelier E et al. Richness of Human Gut Microbiome Correlates With Metabolic Markers. Nature. 29;500(7464):541-6.2013
- 5) Combs CA et al. 17-hydroxyprogesterone Caproate for Preterm Rupture of the Membranes: A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. Am J Obstet Gynecol. 213(3):364.e1-12. 2015.
- 6) Hayakawa T et al. First Report of Foregut Microbial Community in Proboscis Monkeys: Are Diverse Forests a Reservoir for Diverse Microbiomes? Environ Microbiol Rep. 2018 Dec;10(6):655-662.
Kyono K et al. A Pilot Study and Case Reports on Endometrial Microbiota and Pregnancy Outcome: An Analysis Using 16S rRNA Gene Sequencing Among IVF Patients, and Trial Therapeutic Intervention for Dysbiotic Endometrium. Reprod Med Biol 25 18:72-82.2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ryosuke Mori, Yasuhiko Ozaki, Fumiko Ozawa, Hiroyuki Yoshihara, Shinobu Goto, Tamao Kitaori, Takashi Hayakawa, Mayumi Sugiura
2. 発表標題 The investigation of pathogenic bacteria in female genital flora of patients with recurrent pregnancy loss by 16S rRNA gene sequencing
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
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
研究分担者	杉浦 真弓 (SUGIURA MAYUMI) (30264740)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	尾崎 康彦 (OZAKI YASUHIKO) (50254280)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究協力者	森 亮介 (MORI RYOSUKE)		
研究協力者	早川 卓志 (HAYAKAWA TAKASHI)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	吉原 紘行 (YOSHIHARA HIROYUKI)		
研究協力者	小澤 史子 (OZAWA FUMIKO)		