

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08150

研究課題名(和文)肺マイクロバイーム解析に基づくIPF急性増悪の病態解明と革新的治療法への展開

研究課題名(英文)Elucidation of the pathophysiology of acute exacerbation of IPF based on lung microbiome analysis and development of innovative treatment strategies

研究代表者

千葉 弘文(Chiba, Hirofumi)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40347175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：無菌であるとされてきた下気道にも、多様性に富んだマイクロバイームの存在が明らかになった。申請者らはIPFに焦点をあて、患者のBALF中のマイクロバイーム解析を行った。その結果、マイクロバイームの多様性の喪失が早期死亡と相関すること、特定の細菌群の増殖が疾患進行と相関することを示した。一方、急性増悪の発症とマイクロバイームの変容との関連については、イベント数が少ないため、示すことができなかった。今後の継続課題とした。マウスのブレオマイシン投与モデルでは、マイクロバイームがIPFと近似した変化をしめすことが明らかになった。今後このモデルも用いて病態の解明と治療戦略の検討を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IPFの病態に肺内マイクロバイームが関連することが示され、これら菌体成分のToll様受容体等、パターン認識受容体を介した自然免疫応答等が本症でも重要な検討領域になると考えられる。本研究により、今後の研究に対する方向性を示すことができた。また、マウスのブレオマイシン投与肺線維症モデルの肺内マイクロバイームがヒトIPF患者の肺内マイクロバイームと近似していることを示せたことは、今後、同モデルを用いることにより、IPFの病態の解明、マイクロバイームに焦点を当てた治療戦略の検討が簡便となった。

研究成果の概要(英文)：The presence of a diverse microbiome has also been revealed in the lower respiratory tract, which has been considered sterile. Applicants focus on IPF. A microbiome analysis in the patient's BALF was performed. The results showed that (1) loss of microbiome diversity correlates with mortality, and (2) growth of specific bacterial groups correlates with disease progression. On the other hand, the relationship between the onset of acute exacerbations and the transformation of the microbiome could not be shown due to the small number of events. This is a continuing issue for the future. In a mouse bleomycin administration model, it was revealed that the microbiome showed changes similar to IPF. In the future, this model will also be used to elucidate the pathophysiology and examine treatment strategies.

研究分野：間質性肺疾患

キーワード：特発性肺線維症 マイクロバイーム 急性増悪 自然免疫 ディスバイオシス

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーの登場により、消化管、皮膚、尿路などにおける常在細菌叢、すなわちマイクロバイオームの研究が急速に進歩している。その成果は、我々の想像をはるかに越えて、マイクロバイオームと様々な疾患との密接な関連を明らかにした。一方、長らく、無菌であるとされていた下気道にも、生物多様性に富んだマイクロバイオームの存在が示され(Charlson ES, et al. AJRCCM. 2011) 呼吸器感染症、COPD、気管支喘息など、肺疾患との関連が報告されている。

IPF と肺マイクロバイオームとの関連を示す報告として、IPF 患者の BALF 中の 16S rRNA のコピー数の測定から、肺内の細菌負荷と死亡率との相関が示された (Molyneaux PL, et al. AJRCCM. 2014)。さらに、IPF 患者において、肺マイクロバイオームの変化(dysbiosis)により惹起された自然免疫反応(Toll 様受容体シグナル)が肺線維芽細胞の応答に影響することが示されている (Huang Y, et al. AJRCCM. 2017)。現在、IPF の病態を解く新たな領域として、欧米の国際学会でもマイクロバイオームに高い関心が寄せられている。IPF とマイクロバイオームは、ともに民族差が示されていることから、日本人における検討も重要と考えられるが、現時点で、日本からの論文報告はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、IPF と肺マイクロバイオームの研究を進め、以下の項目を達成することである。

(1) IPF 急性増悪の病態と肺マイクロバイオームとの関連の解明

IPF 患者のマイクロバイオームの dysbiosis と急性増悪発症との関連を解析する。さらに、マウスモデルを用いて IPF で増殖する特定細菌群と肺局所の自然免疫の動態 (TLR を介する炎症反応とそれを制御する SP-A と SP-D の動態) を調べ、急性増悪発症に至るメカニズムを解明する。

(2) 急性増悪予測バイオマーカーの開発

急性増悪発症患者と非発症患者の肺マイクロバイオームの比較から、発症患者のプロファイルの特徴を見出し、急性増悪予測バイオマーカーとしての可能性を探る。

(3) 急性増悪治療法 (予防法) の開発

マウスモデルを用い、IPF 患者で増殖する特定細菌群を標的とした抗菌薬治療およびワクチン治療について、申請者らが所有する組換え可溶性 TLR 分子(sTLR)と組換えサーファクタント蛋白質(rSP-A と rSP-D)を投与し、自然免疫を介した過剰炎症に対する抑制効果を目的とした治療法について検討し、臨床応用への基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) IPF 患者の肺マイクロバイオーム変化と急性増悪発症との関連の検討、及び、急性増悪予測バイオマーカーの探索 (千葉、齋藤、黒沼)

マイクロバイオーム解析は、BALF 中の DNA を抽出し、細菌の 16S rRNA を増幅・精製する。その後、本学所有の Ion Torrent のプラットフォームを用いて、菌種の同定を行う。菌量の同定は Real time PCR 法を用いる。解析後の追跡調査で、急性増悪を発症した患者の肺マイクロバイオームの特徴から標的細菌群を同定する。その特徴が発症予測バイオマーカーと成り得るかを検討する。

(2) IPF 患者のマイクロバイオーム解析結果と自然免疫構成分子との関連の探索 (千葉、黒沼)

患者 BALF 中の自然免疫に関与する TLR ファミリーと関連分子、サーファクタント蛋白質や TGF- 等各種サイトカインの発現をフローサイトメトリー法、Real time PCR 法、ELISA 法を用いて測定し、マイクロバイオーム解析の結果得られたプロファイルおよび標的細菌群との関連性を調べる。

(3) IPF 患者で増殖する特定細菌群が宿主の自然免疫に与える影響を検討 (千葉、齋藤)

マウスモデルに標的細菌群または細菌群由来の分子(ペプチドグリカンなど)を、経気道的に投与し、標的細菌群が惹起する TLR 介在炎症反応について、TLR ファミリーと関連分子の発現やそのシグナルの異常、及び、SP-A と SP-D の影響を調べる。

(4) IPF 急性増悪の治療法 (予防法) 開発に向けた検討 (千葉、齋藤)

抗菌治療へ展開する第一歩として、マウスモデルを用い、標的細菌群に対して有効な抗菌薬の投与、ワクチンの接種を行い、マイクロバイオームに与える影響を観察する。さらに、急性増悪のリスク因子とされるステロイド投与による肺マイクロバイオームの変化を観察する。

標的細菌群が惹起する過剰炎症から急性増悪に至る過程で関わると想定される Toll 様受容体と関連分子、および、肺サーファクタント蛋白質が治療標的となると考えられる。標的細菌群由来の分子を加え、過剰な炎症を惹起させたマウスモデルを用い、申請者らが作成した組換え可溶性 TLR 分子(sTLR)と組換えサーファクタント蛋白質(rSP-A と rSP-D)を投与し、過剰な炎症反応を抑制する中和効果について検討する。

4 . 研究成果

(1) マイクロバイオームの多様性の喪失が早期死亡と相関すること、特定の細菌群の増殖が疾患進行と相関することを示した。一方、急性増悪の発症とマイクロバイオームの変容との関連については、イベント数が少ないため、示すことができなかった。今後の継続課題とした。マウスのプレオマイシン投与モデルでは、マイクロバイオームが IPF と近似した変化をしめすことが明らかになった。今後このモデルも用いて病態の解明と治療戦略の検討を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Asai Yuichiro, Chiba Hirofumi, Nishikiori Hirotaka, Kamekura Ryuta, Yabe Hayato, Kondo Shun, Miyajima Satsuki, Shigehara Katsunori, Ichimiya Shingo, Takahashi Hiroki	4. 巻 20
2. 論文標題 Aberrant populations of circulating T follicular helper cells and regulatory B cells underlying idiopathic pulmonary fibrosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12931-019-1216-6	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 Yoshikawa Takumi, Otsuka Mitsuo, Chiba Hirofumi, Ikeda Kimiyuki, Mori Yuki, Umeda Yasuaki, Nishikiori Hirotaka, Kuronuma Koji, Takahashi Hiroki	4. 巻 20
2. 論文標題 Surfactant protein A as a biomarker of outcomes of anti-fibrotic drug therapy in patients with idiopathic pulmonary fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Pulmonary Medicine	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12890-020-1060-y	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 Takahashi Youhei, Saito Atsushi, Chiba Hirofumi, Kuronuma Koji, Ikeda Kimiyuki, Kobayashi Tomofumi, Arika Shigeru, Takahashi Motoko, Sasaki Yasushi, Takahashi Hiroki	4. 巻 19
2. 論文標題 Impaired diversity of the lung microbiome predicts progression of idiopathic pulmonary fibrosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12931-018-0736-9	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hirofumi Chiba
2. 発表標題 Clinical significance of serum SP-D as a biomarker for antifibrotics in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF): Post hoc analysis of a phase 3 trial of pirfenidone in Japan
3. 学会等名 European Respiratory Society Congress 2019（国際学会）
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	齋藤 充史 (SAITO Atsushi) (00768939)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	

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
---------	---------