

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09372

研究課題名(和文)喘息発症における上咽頭細菌叢の関与：16s rRNA解析を用いた網羅的検討

研究課題名(英文) Involvement of nasopharyngeal flora in the onset of asthma: Comprehensive study using 16s rRNA analysis

研究代表者

高橋 奈央 (TAKAHASHI, NAO)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：40743919

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)：過去の報告よりProteobacteriaの増加は喘息患者の下気道のマイクロバイオームの一つの特徴であると考えられている。また、特定の細菌が喘息の重症化や表現型に関与する可能性が示唆されており、M.catarrhalis,S.pneumoniae,H.influenzaeのいずれかが優勢な喘息患者は、好中球炎症の割合が高く、喘息の罹患年数が長く、一秒率が低いことも報告されている。今回の結果は2症例であったが、上咽頭でのHaemophilus属の割合が低い結果になっているが、今後の症例数を増やした検討が必要である

研究成果の学術的意義や社会的意義

以前肺は無菌的な環境にあると考えられていたが、2010年にHiltyらが肺にも特有の細菌叢が存在することを報告し、肺におけるマイクロバイオームが喘息の表現型に及ぼす影響について注目されている。Proteobacteriaの増加は喘息患者の下気道のマイクロバイオームの一つの特徴であり、M.catarrhalis,S.pneumoniae,H.influenzaeのいずれかが優勢な喘息患者は、好中球炎症の割合が高く、喘息の罹患年数が長く、一秒率が低いことも報告されている。今回の結果は2症例であり、上咽頭でのHaemophilus属の割合が低い結果になっているが、症例数を増やした検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：From previous reports, the increase in Proteobacteria is considered to be one of the characteristics of the lower respiratory tract microbiome in asthmatic patients. It has also been suggested that certain bacteria may be involved in the aggravation and phenotype of asthma, and asthma patients with predominant M. catarrhalis, S. pneumoniae, or H. influenzae have neutrophil inflammation. It has also been reported that the rate is high, the number of years of asthma is long, and the forced expiratory volume in one second is low. The result of this time was 2 cases, but the ratio of Haemophilus genus in the nasopharynx is low, but it is necessary to consider increasing the number of cases in the future.

研究分野：咽喉頭

キーワード：気管支喘息 上咽頭細菌叢

## 1. 研究開始当初の背景

我が国における気管支喘息の有病率は7.5%と高度であり、医療経済上の大きな問題点となっている。また、治療法が進んだ現在においても喘息による突然死が年間2000件発生している。このような状況を改善するためには、喘息の発症メカニズムを解明し、その予防に努めることが肝要である。喘息は本来アレルギー疾患であり、特にアトピー型ではハウスダストなどの吸入抗原に対するI型アレルギーによって発症する。同じくI型アレルギーで発症するアレルギー性鼻炎と喘息は合併することも多い。このような事から、最近、気管支など下気道と鼻咽腔など上気道との間には、one airway, one disease と言う概念が提唱され、喘息を下気道アレルギー疾患として、また、アレルギー性鼻炎を上気道のアレルギー疾患として別々にとらえるのではなく、気道全体をひとつのアレルギー疾患の標的臓器として捉えるべきであるとの考え方が広まってきた。また、非アトピー性の成人型喘息は好酸球性炎症の要素が強く、同じく好酸球性の上気道炎症である好酸球性副鼻腔炎との合併も多い。小児では咽頭扁桃切除が喘息症状を改善させるとの報告もあり (Clevin et al. *Pediatr. Res.* 2014)、上気道の慢性炎症が下気道に悪影響し喘息を発症、あるいは悪化させているのではないか、という仮説が立てられている。具体的には上気道の慢性感染症が下気道へ波及し気道上皮細胞の破壊、剥離、慢性炎症による気道の弾力性の低下を来している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、上咽頭の細菌叢に注目し、喘息患者と非喘息患者における咽頭扁桃(上咽頭)の細菌叢の差異を16S rRNA解析(マイクロバイオーム解析)を用いて網羅的に検討し、喘息発症に関連する上咽頭細菌叢を同定し、最終的にはこれらへの介入により喘息発症の予防法を確立することを目標とする。

### (16S rRNA解析)とは?

人体には細胞数の10倍以上の微生物が存在し細菌叢を形成している。これらはマイクロバイオームと呼ばれ直接感染症を引き起こすことなく、肥満や免疫疾患など人体の健康状態へ影響を及ぼすことが知られている。我々は小児に特異的な口蓋扁桃の細菌叢に関して16SrRNA解析を用いて報告した。

また、マイクロバイオームと疾患の関連に関しては、病巣扁桃感染症であるIgA腎症の口蓋扁桃ではOSAS扁桃と比べ細菌叢が変化していることを見出し、疾患発症に関する細菌叢の変化を報告した (Watanabe H, Takahashi N, et al. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2016 in press)

細菌検査は検体を採取し培地で培養し同定する方法が一般的であるが、今回用いる16S rRNA解析では培養に向かない難培養性の細菌を含め一気に網羅的に検討できるメリットがある。一般の細菌検査と異なり、菌数の多い起炎菌だけでなく細菌叢の変化を調べることが可能であり、特に慢性感染症や起炎菌以外の細菌が病態に関与する可能性のある疾患では得に有用な検査法である。今回我々は以前と同様の手法を喘息に応用し、喘息例の上咽頭細菌叢を非喘息例と比較検討し、喘息発症における上咽頭細菌叢の関与を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

対象は、当科において睡眠時無呼吸症候群で咽頭扁桃摘出術、口蓋扁桃摘出術を施行した患者で喘息群20例、非喘息群20例とする。

図3に示したように手術によって切除した咽頭扁桃、口蓋扁桃組織(数mm)を採取し、細かく切断し、-80℃で保存し、その後PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kitを用いてDNAを抽出する。

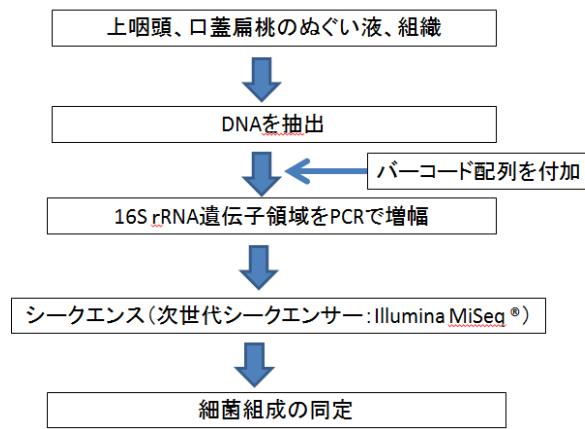


図3: 16S rRNA解析の手順

さらに抽出した DNA の中の 16SrRNA 遺伝子の V4 領域を PCR で増幅する。アニーリング温度は 56°C で 35 サイクル行い、試薬は KOD-Plus-Ver.2 を使用し、プライマーは 515F,806R を使用する。PCR によって大量に得られた DNA のヌクレオチドの塩基配列を次世代シークエンサー (Illumina MiSeq®) にてシークエンスし、得られた配列データからバーコード配列を除去し、データベースにある既知菌種に帰属させることにより、細菌ゲノムを同定する。

また咽頭扁桃、口蓋扁桃のぬぐい液も採取し、同様に 16SrRNA 解析を用いて網羅的に解析し、手術標本の結果と比較する。ぬぐい液においても喘息群と非喘息群で比較する。

図4のように患者を喘息群および非喘息群に分け、上咽頭細菌叢、口蓋扁桃細菌叢、上咽頭ぬぐい液、口蓋扁桃ぬぐい液細菌叢を解析し、上咽頭細菌叢、上咽頭ぬぐい液の細菌叢の比較検討を行う。喘息症例に対しては気管支喘息の病勢評価に有用であるとされている呼気 NO、最大呼気流量値、喘息症状スコアを手術前、術後半年に測定し、比較する。

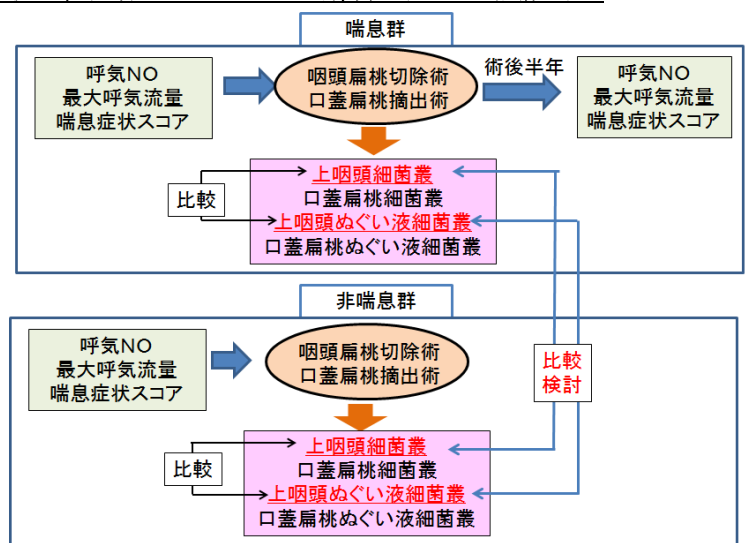


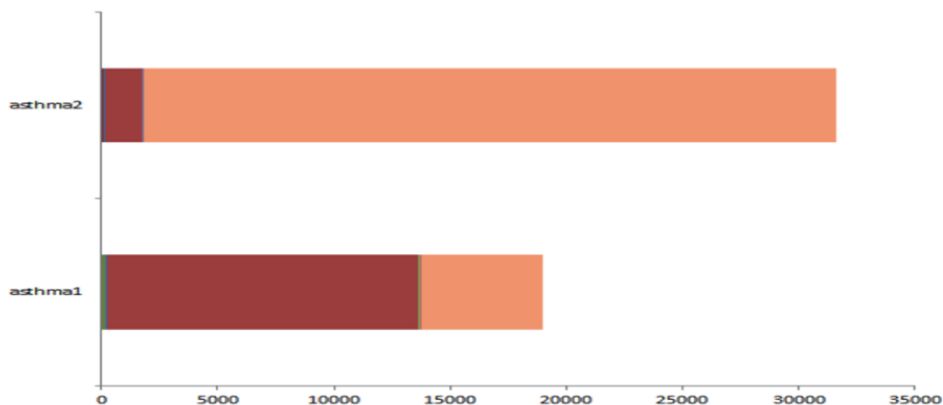
図4: 研究計画の流れ

#### 4. 研究成果

結果 喘息症例 asthma1 健常症例 asthma2 とした細菌のゲノム数に差はみられたがぬぐい液での DNA 抽出は可能であった。

【細菌属の絶対数】

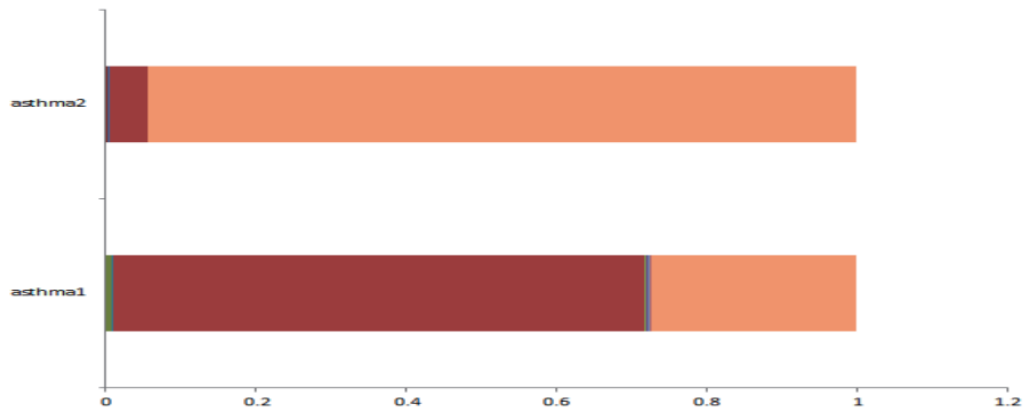
【細菌属の絶対数】





【細菌属の比率】 OTU の数が異なっていたが2症例とも属レベルでの細菌の同定が可能であった。喘息群は *corynebacterium* 属の占める割合が多く、健常群は *Staphylococcus* 属の占める割合が多かった

【細菌属の比率】



**考察** 以前、肺は無菌的な環境にあると考えられていたが、2010年に Hilty らが肺にも特有の細菌叢が存在することを報告し、以来肺におけるマイクロバイオームが喘息の表現型に及ぼす影響について注目されている。Hilty らは喘息患者と COPD 患者と健常人を対象に気管支鏡を用いて下気道検体をブラッシングにて採取し、16SrRNA 解析にて細菌叢の違いを検討した。その結果、喘息患者では Proteobacteria が増加し、Bacteroidetes が低下していることを報告し、特に proteobacteria の中では Haemophilus 属の増加が顕著であった。これより Proteobacteria の増加は喘息患者の下気道のマイクロバイオームの一つの特徴であると考えられている。また、特定の細菌が喘息の重症化や表現型に関与する可能性が示唆されており、*M.catarrhalis*,*S.pneumoniae*,*H.influenzae* のいずれかが優勢な喘息患者は、好中球炎症の割合が高く、喘息の罹患年数が長く、一秒率が低いことも報告されている。今回の結果は2症例であったが、上咽頭での Haemophilus 属の割合が低い結果になっているが、今後の症例数を増やした検討が必要である。

**要約** 今回2症例ではあったが喘息症例、健常症例の上咽頭ぬぐい液で 16SrRNA 解析による解析を行なったところ上咽頭細菌叢の採取は可能であった。また2症例に差異がみられた。傾向などを述べるには至らず、今後症例を重ねて検討したい。また難治性の喘息群に関しても検討を重ねる予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Nao Takahashi, corresponding author Kaori Ikeda, Genki Iwai, Kaori Shinbori, Hironori Baba, Takanobu Sasaki, Kuniyuki Takahashi, Yuka Morita, and Arata Horii  | 4. 巻<br>278             |
| 2. 論文標題<br>Prediction of effectiveness of potassium-competitive acid blocker and serotonin noradrenaline reuptake inhibitor on abnormal sensation in the throat: use of patient-reported outcome measures (PROMs)      | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Eur Arch Otorhinolaryngol.   | 6. 最初と最後の頁<br>1483-1489 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s00405-020-06544-0  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Hiroki Yamaguchi, Shin Goto, Nao Takahashi, Masafumi Tsuchida, Hirofumi Watanabe, Suguru Yamamoto, Yoshikatsu Kaneko, Koichi Higashi, Hiroshi Mori, Yukio Nakamura, Arata Horii, Ken Kurokawa, Ichiei Narita | 4. 巻<br>36              |
| 2. 論文標題<br>Aberrant mucosal immunoreaction to tonsillar microbiota in immunoglobulin A nephropathy   | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Nephrol Dial Transplant.   | 6. 最初と最後の頁<br>75 - 86   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/ndt/gfaa223   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Takahashi N  | 4. 巻<br>45              |
| 2. 論文標題<br>Reliability and validity of the Japanese version of the Glasgow Edinburgh Throat Scale (GETS-J): Use for a symptom scale of globus sensation.   | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Auris Nasus Larynx   | 6. 最初と最後の頁<br>1041-1046 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.anl.2018.02.001.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Sano M   | 4. 巻<br>34              |
| 2. 論文標題<br>Polysomnography as an indicator for cervicomedullary decompression to treat foramen magnum stenosis in achondroplasia.  | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Childs Nerv Syst   | 6. 最初と最後の頁<br>2275-2281 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s00381-018-3880-0.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高橋奈央  |
| 2. 発表標題<br>「耳鼻咽喉科・頭頸部外科領域におけるマイクロバイオーム」口蓋扁桃のマイクロバイオーム 特にIgA腎症に関連して |
| 3. 学会等名<br>日本耳鼻咽喉科感染症学会（招待講演）                                      |
| 4. 発表年<br>2020年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)              | 備考 |
|-------|---|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 堀井 新<br><br>(Horii Arata)<br><br>(30294060)       | 新潟大学・医歯学系・教授<br><br><br>(13101)    |    |
| 研究分担者 | 林 正周<br><br>(Hayashi Masachika)<br><br>(40463997) | 新潟大学・医歯学総合病院・助教<br><br><br>(13101) |    |

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1件

|   |                    |
|---|--------------------|
| 国際研究集会<br>Combined Otolaryngology Spring Meetings | 開催年<br>2019年～2019年 |
|---|--------------------|

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 |
|---------|---------|