

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09436

研究課題名(和文) 腸管・口腔・結膜囊細菌叢解析による眼疾患診断法の開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic method for eye diseases by analysis of intestinal / oral / conjunctival sac bacterial flora

研究代表者

横倉 俊二 (Yokokura, Shunji)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：30400378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：視神経炎14例、ぶどう膜炎55例、緑内障80例、ドライアイ70例、健常者80例から、糞便・唾液・結膜囊洗浄液を採取し、DNA抽出を行い、次世代シーケンズを実施した。その後OTU (Operational taxonomic unit)解析によるグループ化、更に類似度検索を行った。各疾患群と健常者群との間で細菌叢のUniFrac解析を行った。その結果視神経炎では腸内細菌3例、ぶどう膜炎では腸内細菌18例、口腔内細菌11例、結膜囊細菌6例が、緑内障では腸内細菌12例、口腔内細菌11例、結膜囊細菌6例が、ドライアイでは腸内細菌12例、口腔内細菌10例、結膜囊細菌13例がそれぞれ同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内・口腔内・結膜囊細菌叢の変化が病態に関わっていると予想される眼疾患としては自己免疫性眼疾患(視神経炎、ぶどう膜炎)、緑内障、ドライアイが挙げられる。次世代シーケンサーを用いて腸内・口腔内・結膜囊細菌叢の変化を同時に解析した結果、失明に直結する自己免疫性眼疾患、ならびに眼科のcommon diseaseであり、市場規模が極めて大きい緑内障やドライアイの発症・悪化にこれら細菌叢の変化が関与している可能性が見いだされた。

研究成果の概要(英文)：Feces, saliva, and conjunctival sac lavage fluid were collected from 14 cases of optic neuritis, 55 cases of uveitis, 80 cases of glaucoma, 70 cases of dry eye, and 80 cases of healthy subjects, DNA was extracted, and a next-generation sequence was performed. After that, grouping by OTU (Operational taxonomic unit) analysis and similarity search were performed. UniFrac analysis of the bacterial flora was performed between each disease group and the healthy subject group. As a result, 3 cases of enterobacteria were identified for optic neuritis. In uveitis, 18 cases of gut bacteria, 11 cases of oral bacteria, and 6 cases of conjunctival sac bacteria were identified. In glaucoma, 12 cases of gut bacteria, 11 cases of oral bacteria, and 6 cases of conjunctival sac bacteria were identified. In dry eye, 12 cases of gut bacteria, 10 cases of oral bacteria, and 13 cases of conjunctival sac bacteria were identified.

研究分野：眼科学

キーワード：次世代シーケンサー 細菌叢 自己免疫性眼疾患 緑内障 ドライアイ

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、個々の細菌の全ゲノムを解析するのみならず、従来のシーケンサーでは困難であった、難培養細菌も含めた細菌叢全体の機能を解析する Microbiome 研究が可能となった。特に糞便等を用いた Microbiome 研究は内科領域で早期に開始され、炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease, IBD)をはじめとする全身性自己免疫異常の患者において、腸内細菌叢のプロファイルが正常人と大きく異なっていることが判明している。全身性自己免疫異常の発症に関しては、複数のゲノム関連解析(GWAS)において、疾患感受性遺伝子と疾患の発症リスクとの間の相関が想定よりも低いことが判明しており (Wahren-Herlenius M and Dorner T, Lancet 2013)、翻って Microbiome に代表される環境因子が疾患感受性遺伝子と共に存在することが発症に大きく関わっていることが判明した(Hygiene 仮説、Okada H, et al. Clin Exp Immunol 2010)。このように腸内炎症性疾患への関与をその端緒とした正常腸内細菌叢 Microbiome 研究により、正常腸内細菌層の破綻が肥満、糖尿病、さらには自己免疫疾患、神経変性疾患などの様々な疾病発症に関与している可能性が現在までに報告されている (Shen S, et al. Clin. Transl. Immunol. 2016 および Boulangé CL, et al. Genome Med. 2016)。

一方で眼科領域においても、視神経炎の原因となる多発性硬化症や視神経脊髄炎、またぶどう膜炎などの自己免疫疾患の発症に腸内細菌叢が関与している可能性が指摘されている (Tremlett H, et al. Ann. Neurol. 2017)。また腸内細菌叢以外においても、口腔内細菌叢の破綻が引き起こす慢性炎症が、神経変性疾患の側面を持つ緑内障発症・進行に関与している可能性が報告されている (Astafurov K, et al. Oral Microbiome Link to Neurodegeneration in Glaucoma. 2014)。しかしこれらの研究は十分な症例数や条件で検討されているとは言い難い。更に眼表面も常在細菌を有しているが、次世代シーケンサーによる解析により、眼表面も多様な常在細菌叢を有しており (Willcox MDP. Exp. Eye Res.; 2013)、腸内と同様に自然免疫機能などの恒常性維持のための機能を持っている可能性が指摘されている。このようにこれまで断片的になされてきた研究により、腸内・口腔内・結膜囊細菌叢の変化が病態に関わっていると予想される眼疾患としては自己免疫性眼疾患 (視神経炎、ぶどう膜炎)、緑内障、ドライアイが挙げられる。次世代シーケンサーを用いて腸内・口腔内・結膜囊細菌叢の変化を同時に解析することで、失明に直結する自己免疫性眼疾患、ならびに眼科の common disease であり、市場規模が極めて大きい緑内障やドライアイの発症・悪化にこれら細菌叢の変化が関与していることが見いだされれば、細菌叢を制御することでこれら疾患の発症・悪化を防止することが可能になると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は次世代シーケンサーを用いた常在細菌叢解析により、腸内・口腔内・結膜囊細菌叢の変化が特定の眼疾患の有病率や悪化・進行などに与える影響を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では自己免疫性眼疾患(視神経炎、ぶどう膜炎)、緑内障、ドライアイを有する患者を主な対象とし(視神経炎 20 例、ぶどう膜炎 80 例、緑内障 80 例、ドライアイ 80 例)それぞれの腸内・口腔内・結膜囊細菌叢と疾患の関連について解析を行う。20 歳以上を対象とし、性別は問わない。またコントロールとして健常者 80 例のサンプルも採取し、解析を行うこととした。

菌種 DNA 解析法としては比較的簡便に行え、かつ定量性が高い既報の方法 (Kim SW, et al. DNA Res 2013) を用いて行う。自己免疫性眼疾患 (視神経炎、またはぶどう膜炎)・緑内障・ドライアイのいずれかと診断された患者と健常者の糞便・唾液・結膜囊洗浄液から DNA を抽出し、洗浄・乾燥させた後 TE 溶液に溶解する。次に 16S rRNA 遺伝子の V1-V2 可変領域を、バーコード配列を組み込んだプライマーを用いた PCR で増幅させた後、アガロースゲル電気泳動を行い、370bp 付近の増幅産物を専用キットでビーズ化して精製し、これを用いて次世代シーケンスを行う。シーケンス後のデータ (16S reads) より精度が低いもの、キメラ配列が疑われるものは除外してから OTU (Operational taxonomic unit、系統樹を描く際の操作上の生物種単位) 解析によるグループ化を行い、公共 16S データベースを用いて類似度検索を行い、各サンプルでの細菌の組成を決定する。その後自己免疫性眼疾患群と健常者群の細菌叢の UniFrac 解析を行い、両群の構成細菌の相違度を解析する。更に両群の 16S reads をクラスタリングし、各 OTU の reads 数を比較することで、自己免疫性眼疾患群に特徴的な菌種の同定を行う。また得られたシーケンスデータから BLAST 解析によりヒトリファレンス配列を除去し、既報 (Noguchi H et al. DNA Res 2008) にある MetaGeneAnnotator を用いてメタゲノム解析を行うことで、疾患特異的な細菌遺伝子の同定を行う。尚、結膜囊採取物に関しては、病原微生物が結果に影響を及ぼす可能性があるため、眼科領域で病原微生物の包括的解析に用いられている Multiplex PCR を用いて、常在菌ではない病原微生物が検出された検体は解析対象から外す。

4. 研究成果

研究参加への同意が得られた視神経炎 14 例、ぶどう膜炎 55 例、緑内障 (正常眼圧型) 80 例、

ドライアイ (BUT 短縮型) 70 例、および健常者 80 例から、糞便・唾液・結膜囊洗浄液を採取し、Kim SW らの方法 (DNA Res 2013) を用いて DNA 抽出を行い、次世代シーケンスを実施した。結膜囊洗浄液については、抽出 DNA を用いて Multiplex PCR を行い、病原微生物の存在が疑われた症例は解析から外した (8 例)。その後 OTU (Operational taxonomic unit) 解析によるグループ化を行い、公共データベースを用いた類似度検索を行って各症例サンプルでの細菌組成を決定した。各疾患群それぞれと健常者群との間で細菌叢の UniFrac 解析を行った。その結果ぶどう膜炎、緑内障、ドライアイ群それぞれで、健常者群とは異なる細菌組成が見い出された。更に得られたシーケンスデータから BLAST 解析を用いてヒトリファレンス配列を除去し、Noguchi H らの方法 (DNA Res 2008) を用いてメタゲノム解析を行った。その結果疾患毎に以下の数の細菌が疾患特異的細菌の候補として同定された。即ち、視神経炎では腸内細菌 3 例、ぶどう膜炎では腸内細菌 18 例、口腔内細菌 11 例、結膜囊細菌 6 例が、緑内障では腸内細菌 12 例、口腔内細菌 11 例、結膜囊細菌 6 例が、ドライアイでは腸内細菌 12 例、口腔内細菌 10 例、結膜囊細菌 13 例がそれぞれ同定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Yoshida M, Hosogai M, Yokokura S, Sato K, Hariya T, Kobayashi W, Okabe T, Todokoro D, Nakazawa T.	4. 巻 38 (9)
2. 論文標題 Bilateral Necrotizing Herpes Simplex Keratitis in an Immunocompetent Patient With Genetic Analysis of Herpes Simplex Virus 1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 1185-1188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IC0.0000000000002026.	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 Yoshida M, Yokokura S, Nishida T, Mochizuki K, Suzuki T, Maruyama K, Otomo T, Nishiguchi KM, Kunikata H, Nakazawa T.	4. 巻 20 (1)
2. 論文標題 Endogenous endophthalmitis caused by group B streptococcus; case reports and review of 35 reported cases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 126-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12886-020-01378-0.	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 Yoshida M, Hariya T, Yokokura S, Maruyama K, Sato K, Sugita S, Tomaru Y, Shimizu N, and Nakazawa T.	4. 巻 24 (12)
2. 論文標題 Diagnosing superinfection keratitis with multiplex polymerase chain reaction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Infect Chemother.	6. 最初と最後の頁 1004-1008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2018.06.012.	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 Yoshida M, Yokokura S, Kunikata H, Takada N, Maruyama K, Toyokawa M, Kashio K, Kaku M, and Nakazawa T.	4. 巻 38 (2)
2. 論文標題 Endophthalmitis associated with Purpureocillium lilacinum during infliximab treatment for surgically induced necrotizing scleritis, successfully treated with 27-gauge vitrectomy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 841-847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10792-017-0532-4.	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 Yoshida M, Hariya T, Yokokura S, Kobayashi W, Watanabe R, Ishii T, Nakazawa T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Concomitant herpes simplex keratitis and autoimmune-associated ulcerative keratitis in rheumatoid arthritis patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Ophthalmol Case Rep.	6. 最初と最後の頁 100648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoc.2020.100648.	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 針谷 威寛
2. 発表標題 角膜感染症におけるMultiplex PCRストリップによる病原体の検索
3. 学会等名 角膜カンファランス2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 針谷 威寛、横倉 俊二、小林 航、中澤 徹
2. 発表標題 Multiplex PCRにてサイトメガロウイルス陽性となった症例の特徴
3. 学会等名 第45回日本角膜学会 / 第37回日本角膜移植学会
4. 発表年 2021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	針谷 威寛 (Hariya Takehiro) (60569573)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	

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