

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08532

研究課題名(和文) 原発性線毛不全症の慢性気道感染病態に見られる微生物叢のメタ16S解析と臨床的意義

研究課題名(英文) 16S rRNA-based metagenomic analysis of the microbiota in chronic airway infection observed in primary ciliary dyskinesia and its clinical significance

研究代表者

慶長 直人 (Keicho, Naoto)

公益財団法人結核予防会 結核研究所・副所長・副所長

研究者番号：80332386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：原発性線毛不全症(primary ciliary dyskinesia; PCD)は、主に線毛の構造/機能遺伝子の異常に起因する稀な先天性疾患であり、日本人ではDRC1遺伝子の大規模欠失症例が約半数を占める。気道上皮細胞の線毛運動が障害されるため、PCDは慢性気道感染症を伴い、その病態の解明は症状のコントロールに重要である。本研究では、PCD患者の喀痰中の細菌叢と真菌叢のゲノム解析を行い、下気道の微生物叢の多様性や分布を明らかにした。DRC1欠損症例に特徴的であった細菌は、今後の病態の解明への寄与が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2019年に我々の研究チームが見出したDRC1大規模欠失アレルは、日本人の主要なPCD原因変異であるだけでなく、最近、韓国からも同様な報告が見られる。このDRC1遺伝子異常によるPCDの詳細な病態解析は、アジアに見られる慢性上下気道感染症の病態解明、診断、治療に大きく貢献し、今後、遺伝子検査を含む早期診断体制の確立、患者や家族に対する適切な遺伝カウンセリング、さらに難病指定による医療費の助成、新規治験の推進などの施策を後押しするものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare genetic disorder mainly caused by abnormalities of the structural and functional components of motile cilia. A large deletion of the DRC1 gene accounts for about half of the PCD cases in Japan. Because of the disruption of mucociliary clearance in the airway epithelium, PCD is associated with chronic airway infection, and elucidation of its pathogenesis is important for the control of the disease. In this study, amplicon-based microbiome analyses of bacterial and fungal flora in the sputum samples from PCD patients revealed the diversity and distribution of microbiota in their lower respiratory tract; bacteria that were characteristic of DRC1-deficient cases are expected to contribute to future understanding of the pathogenesis of the disease in Asian countries.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：原発性線毛機能不全症候群 鼻腔NO測定 遺伝子検査 電子顕微鏡検査 副鼻腔気管支症候群 不妊

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

原発性線毛不全症 (primary ciliary dyskinesia; PCD) は、運動性線毛の機能に関わる遺伝子の異常に起因する稀な先天性疾患であり、50 前後の遺伝子がある原因として知られている。気道上皮の粘液線毛クリアランスが障害されることにより抗酸菌感染を含め、慢性の上下気道感染症を生じやすい。非特異的症状が主徴となるため診断困難であり、先天性疾患でありながら成人後に発見される症例が多い。

2019 年に我々の研究チームが同定した *DRC1* 遺伝子のエクソン 1-4 を含む大規模欠失アレル (Morimoto K, *et al.* Mol Genet Genomic Med, 2019) は、日本人の主要な PCD 原因変異であり、そのホモ接合体は原因遺伝子変異の判明した PCD 症例全体の約半数を占めている。韓国人症例もしばしばみられることが報告されているが、非アジア人では認められず、日韓共通の創始者変異と考えられた。これらの患者では電子顕微鏡 (EM) 検査で線毛超微細構造に典型的な異常は検出されず、また内臓逆位は見られず、成人期に副鼻腔気管支症候群 (sinobronchial syndrome; SBS) とみなされるか、びまん性汎細気管支炎 (diffuse panbronchiolitis; DPB) と診断されているものと推測される (Keicho N, *et al.* Mol Genet Genomic Med, 2020)。言い換えると現在も慢性副鼻腔炎を伴う原因不明の気管支拡張症の中に成人 PCD 患者が少なからず存在すると考えられる。これらの患者の中から臨床的に何をマーカーとして PCD を鑑別すべきか、また DPB と異なりマクロライド抗菌薬に反応しない症例が多いとすれば、何を指標に治療を進められるのか。これらの疑問に対して欧米における嚢胞性線維症 (cystic fibrosis, CF) などの慢性気道感染症を示す症例で臨床病態、進行度、治療反応性との関連で注目されている喀痰中の微生物ゲノム解析の検索範囲を真菌にまで広げてわが国の PCD の病態と微生物叢との関連を検討することとした。

2. 研究の目的

DRC1 遺伝子異常による PCD 患者、欧米で代表的なダイニン外腕欠損をきたす遺伝子などの異常による PCD 患者、それ以外の気管支拡張症患者由来の喀痰材料を用い、嫌気性菌、抗酸菌、真菌を含む下気道由来の微生物叢の多様性、分布を比較し、さらに臨床疫学情報、鼻腔 NO 検査、EM 検査の結果を参照し、このアジア人に特徴的な *DRC1* 欠損による PCD の気道感染・炎症病態と関連する微生物叢とその意義を明らかにするとともに、今後のわが国の上下気道慢性感染症のメタ 16S 解析に関する基礎データの創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) PCD の症例集積と遺伝子診断を含めた検査一式の実施については、本研究と並行してプロジェクトが進行しており、そこから得られたデータを参照した。実際に本研究では PCD が疑われて複十字病院を受診した患者から遺伝子解析のための採血、鼻腔 NO 測定、EM 検査用の鼻粘膜生検が行われるタイミングで喀痰を採取した。(倫理委員会承認済み)

口腔内細菌の混入を減らすため、蒸留水で口をすすいだ後にプラスチック容器に排痰を促した。喀痰検体は速やかに DNA/RNA Shield (Zymo) 液に分注し、抽出まで -80 で保存した。

(2) 喀痰検体は融解後に、FastPrep-24 5G (MP バイオ) を用いてビーズ破碎処理を行ったのちに Zymo BIOMICS DNA Microprep Kit (Zymo) を用いて DNA の精製、回収を行った。喀痰は多くの宿主細胞を含み、PCR を介さない解析法では十分な微生物のデータ取得が期待できないため、Illumina 社から公開されている PCR アンプリコンシークエンス手法を選択した。細菌叢解析には 16S rRNA の一部をターゲットとする方法 (*1)、真菌叢解析には、nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) 領域の PCR 産物の解析 (*2) を実施した。MiSeq (Illumina) を用いて、300 x2 サイクルのシークエンスを行った。ZymoBIOMICS™ Microbial Community Standard をコントロールに用いた。

(3) 得られたリードは、品質評価とクオリティトリミングの後、16S rRNA 配列は、Silva SSU database (release 138) をデータベースとして、QIIME2 (<https://qiime2.org>)、CLC Genomics Workbench ver. 23.0.4 Microbial Genomics Module (QIAGEN) で解析した。ITS は、UNITE 97% (version 7.2) をデータベースとした。

(4) 一部の検体は、ロングリードシークエンサー GridION (オックスフォードナノポア) を用いて 16S rRNA 遺伝子全体の long-PCR アンプリコンシークエンスを行った。

*1:

https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf

*2:

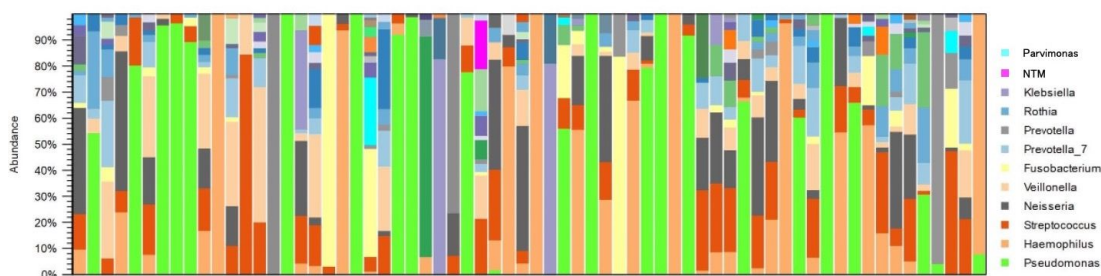
4. 研究成果

(1) 研究期間中に全体で 67 症例から喀痰の提供を受けた。PCD 疑いで鼻腔 NO 測定と遺伝子解析が実施された症例はそのうち 58 例であった。鼻腔 NO 値がカットオフの 77 を下回る症例が 41 例、原因遺伝子変異が明らかになった 32 症例のうち 18 例は両アレルの *DRC1* 変異が PCD の原因であった。検体の殆どが唾液であった症例と遺伝子解析が行われなかった症例は除外した後、喀痰採取が確実に行われた 52 症例を解析対象とした。

(2) 細胞壁構造により DNA 抽出が困難な非結核性抗酸菌や真菌などからもゲノム DNA を得るためにはビーズ破砕ステップが必須である。そのため事前に非結核性抗酸菌や真菌の感染が臨床細菌学的検査から判明している患者検体を用いて DNA 抽出条件の検討を行い、非結核性抗酸菌や真菌の配列検出が効率良く行える系を構築した。また菌の検出に偏りが生じないことを ZymoBIOMICS™ Microbial Community Standard を対照として用いることで確認した。

(3) *Pseudomonas aeruginosa* の定着により、得られたリードの多くが *Pseudomonas aeruginosa* 配列で占められる症例がしばしば観察されたが(図 1)、PCD 遺伝子異常とは有意な関連はなかった。

図1 喀痰検体の16S rRNA配列解析結果

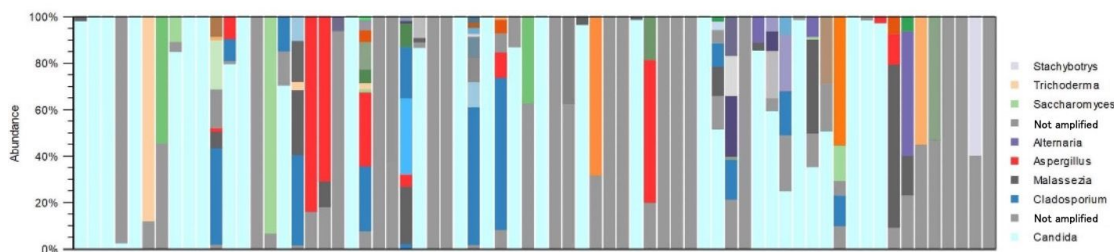


また通常の培養法では検出されない *Prevotella*, *Villonella* 属など嫌気性菌群が頻繁に検出された。

DRC1 変異による PCD 症例 (n=18) と、*DRC1* 以外の線毛関連遺伝子に原因変異が同定された症例 (n=13) の比較では、*DRC1* 変異による PCD 症例で *Fusobacterium* と *Parvimonas* の配列が有意に多く検出された。*Fusobacterium* は、人の口腔・咽頭・腸管に常在する偏性嫌気性無芽胞グラム陰性桿菌、*Parvimonas* は口腔、消化管の細菌叢を構成するグラム陽性嫌気性球菌である。いずれも口腔に常在するが、*DRC1* 変異による PCD 症例の喀痰検体で多く検出された結果については、さらに検討が必要と考えられた。

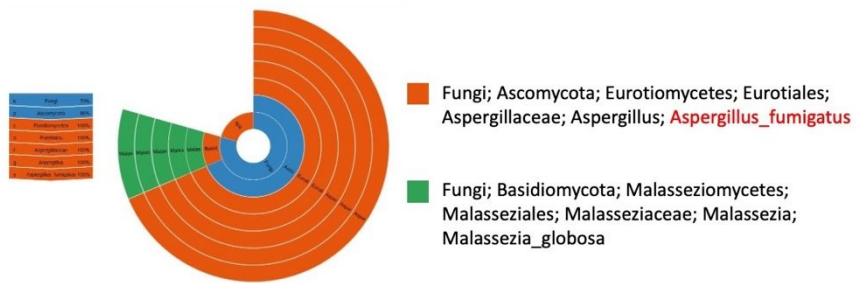
ITS を用いた真菌解析においては、*Aspergillus* (7 例)、*Candida* (22 例)、*Cladosporium* (9 例)、*Penicillium* (2 例)、*Trichoderma* (3 例)、*Malassezia* (7 例) 等の配列の存在が認められた(図 2)。

図2 喀痰検体のITS配列解析結果



Aspergillus は男性に多く検出され、*Candida* の検出は年齢と強く相関し、高齢者ほど検出率が高かった。特に PCD 遺伝子異常と有意に関連するものはなかったが、PCD のうち重症度が高いと言われる *CCDC40* が原因の症例で、*Aspergillus fumigatus* の配列が多く検出されたものがあった(図 3)。

図3 *CCDC40*症例 ITS解析結果



本研究は、希少遺伝子疾患である PCD 症例を我が国で集積して初めて喀痰微生物叢を解析したもので、アジア人に特徴的な *DRC1* 遺伝子異常による PCD から得られた結果は、今後の PCD の病態解明、診断、治療に大きく貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Keicho N, Hijikata M, Morimoto K, Homma S, Taguchi Y, Azuma A, Kudoh S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Primary ciliary dyskinesia caused by a large homozygous deletion including exons 1-4 of DRC1 in Japanese patients with recurrent sinopulmonary infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Genet Genomic Med	6. 最初と最後の頁 19-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mgg3.1033	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 森本耕三, 土方美奈子, Tz-Chun Guo, 宮林亜希子, 山田博之, 慶長直人	4. 巻 4
2. 論文標題 原発性線毛機能不全症候群	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 呼吸臨床	6. 最初と最後の頁 e00103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24557/kokyurinsho.4.e00103	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 Furuuchi Koji, Seto Shintaro, Nakamura Hajime, Hikichi Haruka, Miyabayashi Akiko, Wakabayashi Keiko, Mizuno Kazue, Oka Teruaki, Morimoto Kozo, Hijikata Minako, Keicho Naoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel Screening System of Virulent Strains for the Establishment of a <i>Mycobacterium avium</i> Complex Lung Disease Mouse Model Using Whole-Genome Sequencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0045122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.00451-22	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 Hijikata Minako, Morimoto Kozo, Takekoshi Daisuke, Shimoda Masafumi, Wakabayashi Keiko, Miyabayashi Akiko, Guo Tz-Chun, Yamada Hiroyuki, Keicho Naoto	4. 巻 68
2. 論文標題 Analysis of Aberrant Splicing Events and Gene Expression Outliers in Primary Ciliary Dyskinesia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 702 ~ 705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2022-0394LE	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 慶長直人
2. 発表標題 Primary ciliary dyskinesia in Japan- Primary ciliary dyskinesiaの基礎と臨床
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本耕三, 古内浩司, 大澤武司, 荒川健一, 田中良明, 吉森浩三, 土方美奈子, 慶長直人, 大田健
2. 発表標題 アジア人における創始者変異が疑われた、DRC1の広範囲欠失を有する原発性線毛機能不全症候群の一例
3. 学会等名 第177回 日本結核・非結核性抗酸菌症学会関東支部学会第238回 日本呼吸器学会関東地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森本耕三, 土方美奈子, KnowlesMichael, 慶長直人
2. 発表標題 アジア人における創始者変異が疑われたDRC1の広範囲欠失を有する原発性線毛機能不全症候群の一例
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 福井 次矢、高木 誠、小室 一成	4. 発行年 2023年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2192
3. 書名 今日の治療指針 2023年版 [デスク判]	

1. 著者名 長谷川直樹、森本耕三	4. 発行年 2022年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 212
3. 書名 気管支拡張症Up to Date	

1. 著者名 線毛機能不全症候群の診療の手引き作成委員会	4. 発行年 2023年
2. 出版社 日本鼻科学会誌	5. 総ページ数 108
3. 書名 線毛機能不全症候群の診療の手引き	

〔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	土方 美奈子 (Minako Hijikata) (90332387)	公益財団法人結核予防会 結核研究所・生体防御部・部長 (82801)	
研究分担者	森本 耕三 (Kozo Morimoto) (40511879)	公益財団法人結核予防会 結核研究所・抗酸菌部 細菌科・研究員 (82801)	

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