

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22998

研究課題名(和文)好酸球性副鼻腔炎における真菌叢マイクロバイオーム研究

研究課題名(英文)Fungal mycobiome in eosinophilic chronic rhinosinusitis

研究代表者

木戸口 正典(Kidoguchi, Masanori)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・特命助教

研究者番号：30880132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性副鼻腔炎(好酸球性副鼻腔炎・非好酸球性副鼻腔炎)と診断された患者179名から鼻腔ぬぐい液の検体を採取した。収集したぬぐい液から微生物叢DNAを抽出した。真菌得意的なinternal transcribed spacer(ITS)領域を増幅するプライマーを使用し、次世代シーケンサーにて増幅した塩基配列を測定し、菌種の種レベルまで系統分類を行った。得られたデータから好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性副鼻腔炎の真菌叢を比較し、真菌叢の多様性や真菌種について解析した。好酸球性副鼻腔炎では重症度が高くなるにつれ、ある特定の真菌種が減少していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好酸球性副鼻腔炎は嗅覚障害や気管支喘息の合併率が高く、鼻腔内にポリープ(鼻茸)が多発し再発率が高い難治性疾患であり、原因としては未だ不明な点が多い。本研究では、好酸球性副鼻腔炎における真菌叢マイクロバイオーム解析を行い、好酸球性副鼻腔炎に特徴的な真菌叢を明らかにした。本研究で見出した特定の真菌をターゲットとして新たな治療法の確立が期待される結果となった。

研究成果の概要(英文)：Nasal swab samples were collected from 179 patients with chronic rhinosinusitis (eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS) and non-eosinophilic chronic rhinosinusitis (non-ECRS)). The microbial DNA was extracted from the samples. The amplified sequences were measured by a next-generation sequencer using primers that amplify the internal transcribed spacer (ITS) region, and phylogenetic classification was performed. The fungal mycobiome of ECRS and non-ECRS were compared and analyzed for diversity and fungal species. It was found that certain fungal species was decreased as the severity of ECRS was increased.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 慢性副鼻腔炎 マイクロバイオーム 真菌

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

慢性副鼻腔炎は膿性鼻汁、後鼻漏、鼻閉を主症状とし、12 週以上持続する慢性炎症性疾患である。慢性副鼻腔炎はさらに、鼻腔における好酸球浸潤などによって好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性副鼻腔炎に大別される。好酸球性副鼻腔炎の原因としては不明な点が多いが、気管支喘息の合併率が高く 2 型サイトカインなどのアレルギー性免疫応答・炎症の関与が示唆され、鼻腔内にポリープ（鼻茸）が多発し難治性で再発率が高いため、その病態解明が急務となっている。アレルギー疾患に関連する環境要因として近年注目されているものに、ヒトと共に生息する微生物叢がある。微生物叢のうち、細菌や真菌を同定する方法は主に培養により行われてきたが、分離や同定が困難な菌種が多く、菌種を網羅的に調査できない点が問題であった。近年では、次世代シーケンズ法を用いることにより DNA 配列を網羅的に取得し、従来同定が困難であった細菌種、真菌種などの微生物を同定することが可能となっている。本研究代表者は、好酸球性副鼻腔炎における細菌叢マイクロバイオームに注目し研究を行ってきた。一方で、副鼻腔炎には、*Alternaria* 属などの真菌がアレルギー反応を介して引き起こすアレルギー性真菌性副鼻腔炎が存在し、好酸球性副鼻腔炎と類似してムチン性鼻汁などを認める。さらに、気管支喘息では真菌叢マイクロバイオームが気管支喘息の病型や病態と関連していることが報告されており、好酸球性副鼻腔炎における真菌のアレルギー性免疫応答・炎症への関与が示唆される。

### 2. 研究の目的

本研究代表者は、今までに環境的な要因のひとつとして細菌叢のマイクロバイオームに着目し研究を行ってきた。本研究では、好酸球性副鼻腔炎における真菌叢マイクロバイオーム解析を行い、病態解明につなげることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は以下の手順により遂行した。

#### ①対象者と検体収集

慢性副鼻腔炎（好酸球性副鼻腔炎・非好酸球性副鼻腔炎）と診断され、鼻副鼻腔手術を受ける患者を対象とした。手術時に、内視鏡下に鼻腔（中鼻道）よりぬぐい液を採取した。

#### ②真菌叢マイクロバイオーム解析

ぬぐい液から DNA を抽出した。抽出された DNA にはヒト由来 DNA の他、細菌、真菌などの共生物が含まれる。真菌特異的な internal transcribed spacer 1 (ITS1) 領域を増幅するプライマーを使用して ITS メタゲノム解析を行った。シーケンズは MiSeq (illumina) を使用した。得られた塩基配列データは解析ソフト R を用いて  $\alpha$  多様性、 $\beta$  多様性、真菌の種レベルまで系統分類を行い、好酸球性副鼻腔炎・非好酸球性副鼻腔炎の真菌叢を比較検討した。

### 4. 研究成果

慢性副鼻腔炎 143 例、コントロール症例 36 例から合計 179 サンプル採取した。179 サンプルから合計 2,831,836 リードが読み取られ、3,473 の ASV に分類された。疾患群ごとにリードカウント数に有意差は見られなかった。真菌の  $\alpha$  多様性・ $\beta$  多様性は好酸球性副鼻腔炎群、非好酸球性副鼻腔炎群、コントロール群で統計的有意差は認めなかった（図 1）。全体の平均存在比率 1%以上の真菌種は Phylum レベルで 2 種、Genus レベルで 4 種、species レベルで 4 種同定され、そのうち、species レベルのある特定の真菌種（真菌 A）が好酸球性副鼻腔炎群で有意に減少していた（図 2）。また、真菌保有率で比較したところ、同様に真菌 A がコントロール群に比べ好酸球性副鼻腔炎群で有意に減少していた。さらに、好酸球性副鼻腔炎群を重症度別に分類したところ、重症になるにつれ真菌 A が段階的に減少していた（図 3）。今後は、本研究で同定した真菌 A が鼻粘膜を介して好酸球性副鼻腔炎にどのような影響を与えているのか検証を行い、好酸球性副鼻腔炎における真菌叢の病態解明を目指す。本研究で見出した真菌 A をターゲットとして新たな治療法の確立が期待される結果となった。

図 1 : 真菌叢の多様性(A, B:  $\alpha$  多様性; C, D:  $\beta$  多様性)

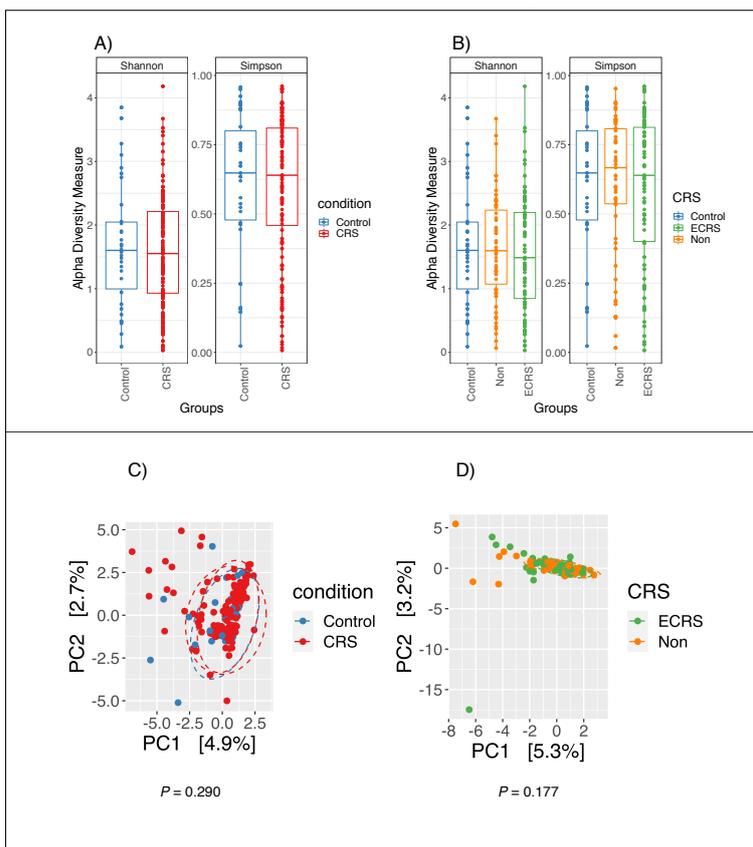


図 2 : 好酸球性副鼻腔炎に特徴的な真菌 A

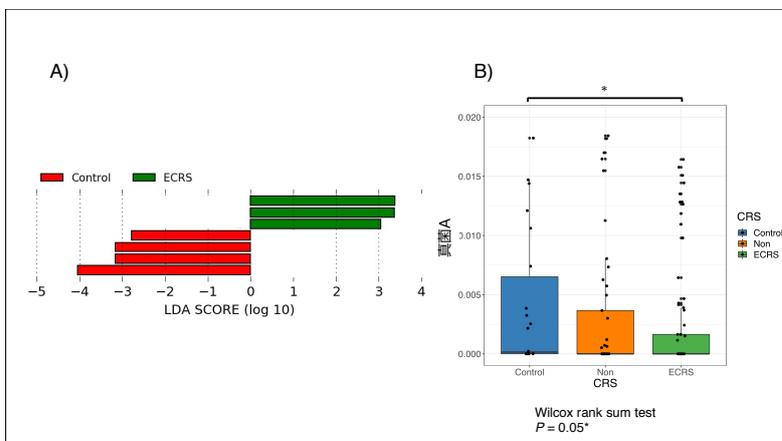
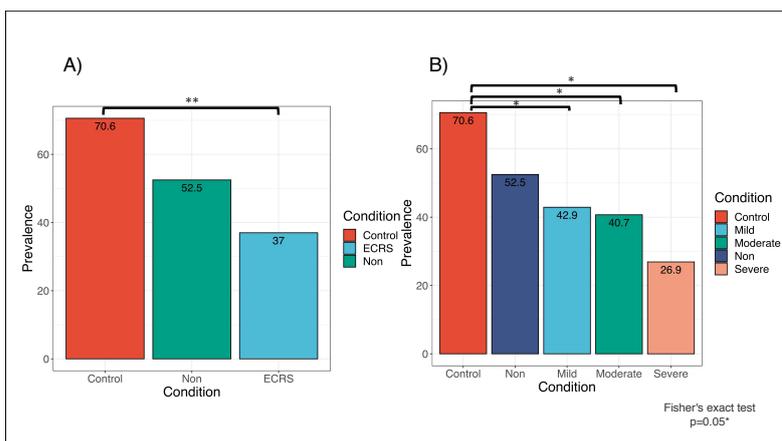


図 3 : 好酸球性副鼻腔炎の重症度と真菌 A



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oka Aiko, Kidoguchi Masanori, Kariya Shin, Fujiwara Tazuko, Yuta Atsushi, Miyashita Hiromi, Higaki Takaya, Ogawa Yukiko, Kanai Kengo, Makihara Sei ichiro, Haruna Takenori, Kunisawa Jun, Adachi Naoto, Koyama Keisuke, Ii Rieko, Noguchi Emiko, Fujieda Shigeharu, Nishizaki Kazunori, Okano Mitsuhiro	4. 巻 76
2. 論文標題 Role of salivary microbiome in IL 10 production and efficacy of sublingual immunotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 2617 ~ 2620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14858	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 木戸口正典	4. 巻 93(1)
2. 論文標題 好酸球性副鼻腔炎の環境的要因 マイクロバイオームについて	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科・頭頸部外科	6. 最初と最後の頁 13-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤枝重治、小山佳祐、足立直人、木戸口正典
2. 発表標題 鼻副鼻腔疾患と細菌叢
3. 学会等名 第122回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keisuke Koyama, Masanori Kidoguchi, Naoto Adachi, Rieko Ii, Yukihiro Kimura, Kazuhiro Ogi, Masafumi Sakashita, Emiko Noguchi, Shigeharu Fujieda
2. 発表標題 The association between the human microbiome in the nasal cavity and the number of sensitization in allergic rhinitis.
3. 学会等名 18th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小山佳祐、木戸口正典、足立直人、井伊里恵子、坂下雅文、野口恵美子、藤枝重治
2. 発表標題 アレルギー性鼻炎における鼻腔・唾液・便のマイクロバイオーム
3. 学会等名 第2回 耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木戸口正典
2. 発表標題 アレルギー性鼻炎と鼻腔マイクロバイオーム
3. 学会等名 第2回 耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 足立直人、木戸口正典、井伊里恵子、小山佳祐、意元義政、坂下雅文、高林哲司、田中康広、野口恵美子、藤枝重治
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いた好酸球性副鼻腔炎の鼻腔真菌叢解析
3. 学会等名 第2回 耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井伊里恵子、足立直人、木戸口正典、野村彩美、高畑淳子、小山佳祐、宮本秀高、廣瀬由紀、岡本昌之、野口恵美子、藤枝重治、松原篤、田淵経司
2. 発表標題 好酸球性中耳炎のマイクロバイオーム解析
3. 学会等名 第2回 耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木戸口正典
2. 発表標題 慢性副鼻腔炎のマイクロバイオーム解析
3. 学会等名 第8回 日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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