

令和 4 年 5 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16518

研究課題名（和文）次世代シーケンス法を用いたARDS末梢気道細菌叢解析による多角的病態解明

研究課題名（英文）Elucidation multilateral pathology by analysis of respiratory tract microbiome of ARDS using next generation sequencing method

研究代表者

京 道人 (Michihito, Kyo)

広島大学・病院（医）・助教

研究者番号：90773937

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）：ARDSは重篤な呼吸不全をきたし、死亡率は最大40%にもいたる致死的な疾患である。その詳細なメカニズムは明らかになっておらず特異的治療はない。我々は次世代シーケンサーを用いて下気道細菌叢を解明し、炎症や予後との関連を明らかにすることを目的とした。本研究より、三つの結果を得た。第一に、肺胞洗浄液中の細菌数は肺胞障害のないコントロール患者と比較して、ARDS患者で増加していた。第二に、ARDS患者の中で病院死亡した患者群では細菌多様性が有意に低下していた。第三に、4菌種のバランスはARDS患者の院内死亡に関連していた。これらはARDS患者の下気道細菌叢が病態形成に關与する可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ARDSは重篤な呼吸不全をきたす致死的な疾患である。近年社会に重大な影響を与えているCOVID-19も重篤化した場合はARDSをきたす。しかし、その発症や重篤化の詳細なメカニズムは明らかになっておらず特異的治療はない。我々は次世代シーケンサーを用いた下気道細菌叢に着目し、炎症や予後との関連を明らかにすることを目的とした。本研究より、予後不良なARDS患者では細菌多様性が有意に低下し、4菌種のバランスの不均衡が認められた。これらはARDS患者の下気道細菌叢が病態形成に關与する可能性を示唆した。今後細菌叢に着目したメカニズムを究明することで、病態解明の一助となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：ARDS is a fatal disease that causes severe injury to alveolar epithelial cells and subsequent severe respiratory failure, which results in high mortality rates of up to 40%. Its onset mechanisms must be elucidated, and novel therapeutic methods must be developed. Our research aimed to clarify whether the lower respiratory tract (LRT) microbiota is associated with ARDS prognosis and the severity of systemic inflammation by using next-generation sequencing. We found three new results in our research. First, the bacterial copy number in the bronchoalveolar lavage fluids was increased in patients with ARDS compared with that in the control. Second, the microbiota diversity was significantly lower in patients with ARDS who died during their hospital stay. Third, the quantitative balance among several characteristic bacteria, including Betaproteobacteria, Staphylococcus, Streptococcus and Enterobacteriaceae, may be involved in the ARDS pathogenesis.

研究分野：救急医学

キーワード：ARDS 細菌叢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) は肺胞上皮細胞の強い傷害とそれに引き続く肺の器質化により、重篤な呼吸不全状態となり死亡率が約 40%にも至る致死的疾患である。集中治療室に入室する重症患者のうち約 10%が ARDS を有するとの報告もあり (Bellani G et al. JAMA 2016)、救急・集中治療領域では最も重要な疾患の一つである。しかし、その病態は未だ不明な点が多く、特異的な治療も存在しない。救命のためには、ARDS の病態を解明すること、特異的な治療開発が重要となる。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーを用いた網羅的解析は様々な臓器における微量細菌叢の同定を行う新たな実験手法である。これにより、従来の培養方法では同定できない微量細菌を高感度に検出することが可能になる。細菌叢の形成は免疫応答にも関与することが近年明らかになっており、間質性肺炎や慢性閉塞性肺疾患の急性増悪における末梢気道細菌叢の関与が報告されている。しかし、ARDS の病態形成における末梢気道細菌叢の意義についてはいまだ十分に検証されていない。そのため、網羅的解析手法を用いた細菌叢の同定によりその影響の評価が可能になると考えられる。

我々のパイロット試験では ARDS 患者はそれぞれに異なる細菌叢を形成し、健康成人では認めない *Bacteroides* 属が検出されることや、*Streptococcus* 属の割合が死亡群で多いといった結果が明らかになっている。それらの細菌はマクロファージや T 細胞を介した炎症性サイトカイン産生に関与しているため、ARDS の病態形成・重症化に深く関与することが予想される。症例を増やし検討することで、更なる細菌の関与を解明することができる。

そこで、申請者らは ARDS 患者の末梢気道細菌叢に着眼し、末梢気道細菌叢が肺胞上皮細胞に与える免疫応答を分子学的視点から明らかにすることで、ARDS の病態解明および新規治療法開発の基礎的検討を試みる。

3. 研究の方法

A. 検体採取・データベースの構築

人工呼吸中の ARDS 患者に対して気管支肺胞洗浄を行った時点で、書面による同意を取得した上で、血液、肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar fluid: BALF) を採取し、解析に用いるまで -80 で凍結保存した。保有しているデータベースに詳細な患者情報 (基礎疾患、使用薬物、動脈血ガス分析、血液マーカー、人工呼吸器日数、予後、生存期間など) を追加し、解析用に整えた。

B. 次世代シーケンス法による末梢気道細菌叢の同定

肺胞洗浄液、肺胞上皮被覆液を用いて細菌のメタゲノム解析を行った。具体的な方法としては、検体を遠心分離し沈殿物内の細菌を、ガラスビーズを用いて物理的に破砕することにより、細菌の DNA を抽出した。細菌の 16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) 内には V1 ~ V9 の超可変領域が存在し、抽出した細菌の 16SrRNA 内の V3 または V6 領域を標的とし PCR を行い、核酸の増幅を行った。それらのアンプリコンに、キットを用いて Ion PGM で次世代シーケンシングを行い、細菌の塩基配列を決定した。得られた塩基配列を既存のデータベース (NCBI Taxonomy DB, Genbank) と照合し、検体中の細菌叢を解析する。また、同時に肺胞洗浄液中の細菌量を real-time PCR により定量的に評価し細菌叢における各細菌の絶対量を決定した。これら次世代シーケンス法を用いたメタゲノム解析は、京都府立医科大学感染病態学 (中屋隆明教授) と共同で研究を進めた。

C. 臨床検体の炎症性サイトカインの測定

A と同一臨床検体 (血液と肺胞洗浄液) 中の、ARDS の予後と関連する報告のある炎症性サイトカイン (IL-6 と 8)、肺胞障害マーカー (RAGE)、血管内皮障害マーカー (Ang2) 濃度を、ELISA 法を用いて測定し、各検体における炎症、線維化、凝固能異常の評価を行った。続いて次世代シーケンサーによって解析した細菌叢の菌種や量と炎症性サイトカイン濃度との関連を解析した。

D. ARDS 重症化における微量細菌叢の相関解析と重症度、治療反応性、生命予後との相関検証

ARDS の診断、重症度、治療反応性、生命予後とメタゲノム解析による細菌叢ならびに炎症性サイトカインとの関連を検討した。

4. 研究成果

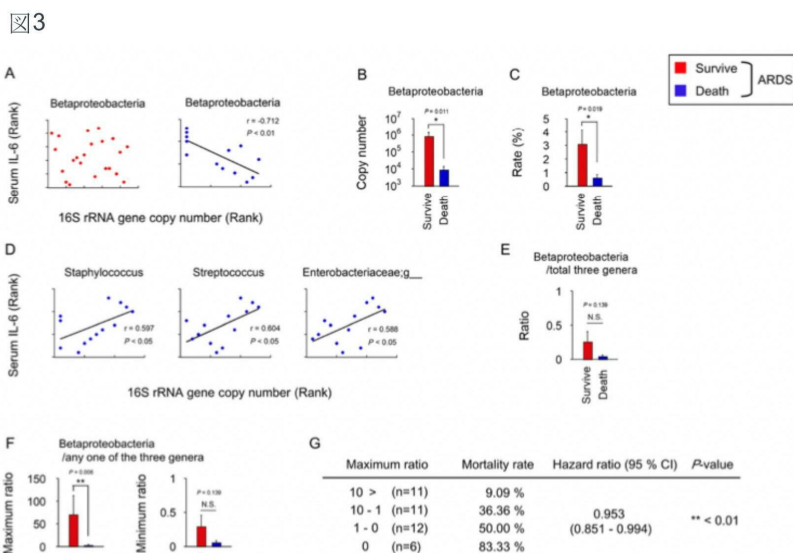
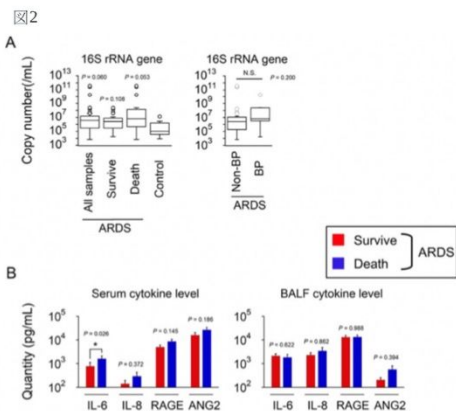
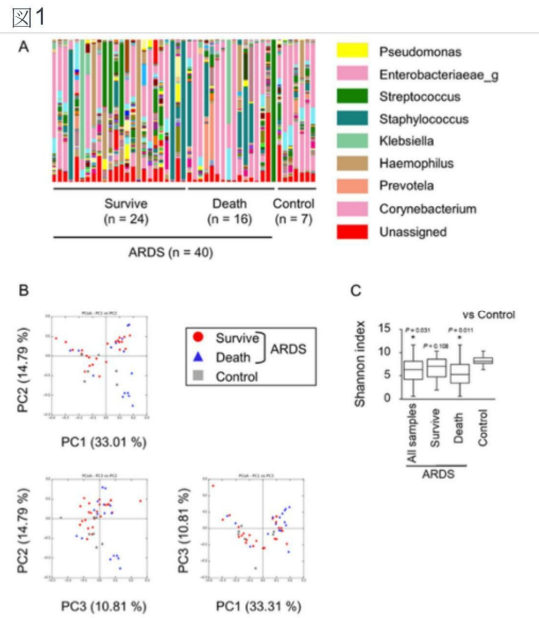
ARDS 患者 40 例と ARDS を呈していないコントロール 7 例の臨床検体を用いて解析を行った。ARDS 患者のうち、院内生存は 24 例であった。

BALF 検体を用いた次世代シーケンス結果を図 1 に示す。ARDS 生存群では死亡群と比較して、細菌の多様性が認められた (図 1A)。細菌叢構造の相同性を UniFrac distance を用いて評価したが、一部の死亡群を除いて大きな違いは認めなかった (図 1B)。細菌の多様性を評価するために Shannon index を用いて各群を比較したところ、ARDS 患者ではコントロール群と比較して有意に Shannon index が低下した ($P = 0.031$)。

次に、BALF 中の細菌量の定量化を行った。BALF 中の細菌絶対量は ARDS 患者群ではコントロール群と比較し有意ではないが多かった (3.83×10^6 vs. 1.01×10^5 copies/mL, $P = 0.06$) (図 2A)。また、ARDS 患者において炎症性サイトカイン (IL-6 と 8)、肺胞障害マーカー (RAGE)、血管内皮障害マーカー (Ang2) を評価したところ、IL-6 が ARDS 死亡群で有意に高く ($P = 0.026$) (図 2B) 後の解析は IL-6 との相関を検討することとした。

ARDS 患者の BALF 中の細菌絶対量が増えていることから、IL-6 との相関を検討したところ、死亡群で BALF 中の細菌絶対量と IL-6 が有意に相関した ($r = 0.615$, $P < 0.05$)。

メタゲノム解析の結果と BALF 中の細菌絶対量の結果から、網および属レベルでの菌の絶対量を算出し、IL-6 との相関を検討した。ARDS 死亡群では、Betaproteobacteria は IL-6 と負の相関があり ($r = -0.712$, $P < 0.01$) Staphylococcus, Streptococcus, Enterobacteriaceae は IL-6 と正の相関を認めた ($r = 0.597$, $P < 0.05$; $r = 0.604$, $P < 0.05$; $r = 0.586$, $P < 0.05$) (図 3A, D)。さらに、Betaproteobacteria の絶対量は死亡群で有意に少なく ($P = 0.011$) (図 3B)、割合も死亡群で少なく ($p = 0.019$) (図 3C) Betaproteobacteria と Staphylococcus, Streptococcus, Enterobacteriaceae いずれかの割合の最大値は死亡群で有意に低かった ($P = 0.006$) (図 3F)。この割合の最大値を用いてコックス比例ハザードモデルによりハザード比を算出したところ、有意に死亡率と関連した (ハザード比 0.953, 95%信頼区間 0.851-0.994, $P = 0.006$) (図 3G)。



結論としては、第一に、肺胞洗浄液中の細菌数はコントロール患者と比較して、ARDS 患者で増加していた。第二に、ARDS 患者の死亡群では細菌多様性が有意に低下していた。第三に、細菌のバランスは ARDS 患者の院内死亡に関連していた。以上より、本研究は ARDS 患者の下気道細菌叢が病態形成に関与する可能性を明らかにした。また、ARDS の病態形成の機序をさらに解明する足がかりになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kyo Michihito, Hosokawa Koji, Ohshimo Shinichiro, Kida Yoshiko, Tanabe Yuko, Shime Nobuaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Prognosis of pathogen-proven acute respiratory distress syndrome diagnosed from a protocol that includes bronchoalveolar lavage: a retrospective observational study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Intensive Care	6. 最初と最後の頁 54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40560-020-00469-w	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 Nishioka Keisuke, Kyo Michihito, Nakaya Takaaki, Shime Nobuaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Proteins produced by Streptococcus species in the lower respiratory tract can modify antiviral responses against influenza virus in respiratory epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes and Infection	6. 最初と最後の頁 104764 - 104764
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.micinf.2020.09.010	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 Michihito Kyo, Keisuke Nishioka, Takaaki Nakaya, Yoshiko Kida, Yuko Tanabe, Shinichiro Ohshimo and Nobuaki Shime	4. 巻 20
2. 論文標題 Unique patterns of lower respiratory tract microbiota are associated with inflammation and hospital mortality in acute respiratory distress syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respir Res	6. 最初と最後の頁 246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12931-019-1203-y	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 Michihito Kyo, Shinichiro Ohshimo, Tadashi Kosaka, Naohisa Fujita and Nobuaki Shime	4. 巻 31
2. 論文標題 Impact of inappropriate empiric antimicrobial therapy on mortality in pediatric patients with bloodstream infection: a retrospective observational study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Chemother	6. 最初と最後の頁 388-393
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/1120009X.2019.1623362	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 Kyo M, Ohshimo S and Shime N	4. 巻 198
2. 論文標題 Should We Abandon APRV in Pediatric ARDS?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Respir Crit Care Med	6. 最初と最後の頁 1459-1460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1164/rccm.201807-1274LE	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 Kyo M, Hosokawa K, Ohshimo S, Kida Y, Tanabe Y, Ota K and Shime N	4. 巻 47
2. 論文標題 High serum potassium level is associated with successful electrical cardioversion for new-onset atrial fibrillation in intensive care unit: a retrospective observational study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anaesth Intensive Care	6. 最初と最後の頁 52-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0310057X18811815	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 Kyo M, Shimatani T, Hosokawa K, Taito S, Kataoka Y, Ohshimo S, Shime N.	4. 巻 9
2. 論文標題 Patient-ventilator asynchrony, impact on clinical outcomes and effectiveness of interventions: a systematic review and meta-analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Intensive Care	6. 最初と最後の頁 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40560-021-00565-5	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 Shimatani T, Yoon B, Kyogoku M, Kyo M, Ohshimo S, Newth CJL, Hotz JC, Shime N, Khemani RG.	4. 巻 18
2. 論文標題 Frequency and Risk Factors for Reverse Triggering in Pediatric Acute Respiratory Distress Syndrome during Synchronized Intermittent Mandatory Ventilation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Am Thorac Soc	6. 最初と最後の頁 820-829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1513/AnnalsATS.202008-10720C	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8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Michihito Kyo, Koji Hosokawa, Shinichiro Ohshimo, Yoshiko Kida, Yuko Tanabe, Kohei Ota, Nobuaki Shime
2. 発表標題 Impact on protocolized diagnostic work-up including Bronchoalveolar lavage for identifying risk factor of acute respiratory distress syndrome: a retrospective observational study
3. 学会等名 The 20th Joint Scientific Congress of the KSCCM and JSICM
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 京 道人、志馬 伸朗
2. 発表標題 ARDS診断における原疾患診断と初期治療
3. 学会等名 第94回日本感染症学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 京 道人、石井 潤貴、志馬 伸朗
2. 発表標題 気管挿管患者における喉頭障害の発生とその対処法
3. 学会等名 第42回日本呼吸療法医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Michihito Kyo, Keisuke Nishioka, Takaaki Nakaya, Yoshiko Kida, Yuko Tanabe, Shinichiro Ohshimo and Nobuaki Shime
2. 発表標題 Lower respiratory tract microbiota is associated with inflammation and hospital mortality in acute respiratory distress syndrome: a pilot study
3. 学会等名 Critical Care Canada Forum 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michihito Kyo, Nobuaki Shime
2. 発表標題 What does esophageal pressure measurement change in ventilator management? -Case presentation-
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting, Japanese Society of Respiratory Care Medicine (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 京 道人, 細川 康二, 鈴木 慶, 志馬 伸朗
2. 発表標題 気道狭窄に対して緊急気道確保を要した症例における挿管手法の検討
3. 学会等名 第47回救急医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 京 道人, 大下 慎一郎, 木田 佳子, 太田 浩平, 細川 康二, 志馬 伸朗
2. 発表標題 先行する病態が不明なARDS"類似"患者の予後は不良である
3. 学会等名 第46回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michihito Kyo, Koji Hosokawa, Shinichiro Ohshimo, Yoshiko Kida, Yuko Tanabe, Nobuaki Shime
2. 発表標題 Impact on protocolized diagnostic work-up including Bronchoalveolar lavage for identifying risk factor of acute respiratory distress syndrome: a retrospective observational study
3. 学会等名 The 20th Joint Scientific Congress of the KSCCM and JSICM (国際学会)
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
---------	---------