

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18831

研究課題名(和文)腸内細菌叢と遺伝子変異の相互作用に着目した滲出型AMDの病態解明

研究課題名(英文) Gut microbiome and genetic variants in exudative age-related macular degeneration

研究代表者

安田 正幸 (Yasuda, Masayuki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00569585

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)：加齢黄斑変性(AMD)は成人中途失明原因の上位を占める重要な眼疾患である。本研究では、滲出型AMD(wAMD)を有する患者を対象とし、フリーラジカル分析装置を用い、血中の酸化ストレス度(dROM)、抗酸化力(BAP)を測定しwAMDの関連を調べた。その結果、wAMD群においてdROMとは有意に高値であった($P<0.01$)。さらに、対象者の糞便からDNAを抽出し、16Sメタゲノム解析を行ったところ、wAMDではBacteroidetes門とVerrucomicrobia門の構成に有意な変化を認めた。本研究により、酸化ストレスや腸内細菌叢の変化がwAMDの病態に関連することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢黄斑変性(AMD)は失明原因として頻度が高い疾患であり、超高齢社会を迎える本邦において、特に対策が必要な疾患である。滲出型の加齢黄斑変性(wAMD)は高額な薬剤の継続治療が必要になることが多く、病態解明と新たな治療の確立が必要である。本研究の結果から、酸化ストレスや腸内細菌叢の変化がwAMDの病態に関連することが示唆された。この成果は、将来的にwAMDの個別化予防医療に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Age-related macular degeneration (AMD) is an important ocular disease that is one of the leading causes of blindness in adults. In this study, we investigated the relationship of blood oxidative stress marker (i.e., oxidative stress level (dROM) and antioxidant capacity (BAP)) with exudative AMD (wAMD) using a free radical analyzer. The results showed that dROM was significantly higher in the wAMD group ($P<0.01$). Next, we extracted DNA from the feces of the wAMD patients, then, performed 16s rRNA sequence. The results showed significant changes in the composition of the phylum Bacteroidetes and Verrucomicrobia in wAMD. This study suggests that oxidative stress and changes in the gut microbiota are associated with the pathogenesis of wAMD.

研究分野：眼科学

キーワード：加齢黄斑変性 酸化ストレス 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (AMD) は世界中で失明原因として頻度の高い眼疾患で、超高齢化社会に伴い患者数は年々増加している。AMD は、進行性の網膜色素上皮細胞 (RPE) 障害と視細胞障害を伴う萎縮型 (dry AMD) と脈絡膜新生血管による出血や浮腫を伴う滲出型 (wAMD) に大別され、本邦を含むアジアでは wAMD が大部分を占めている。wAMD は滲出性変化を引き起こす脈絡膜新生血管に対する抗血管内皮増殖因子 (VEGF) 薬によって治療されるが、高額な上に繰り返し投与が必要である。さらに、wAMD の抗 VEGF 薬に対する治療反予後は個人差が大きく個別化医療の確立や新たな治療標的の創出が急務である。

AMD は遺伝的素因の関連が比較的強く (Fritsche et al. *Nat genet* 2016 Feb;48(2):134-43)、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) によって、*ARMS2* と *CFH* 遺伝子の寄与が大きいことが知られている。しかし、それらの遺伝子の一塩基多型 (SNP) マーカーを用いても AMD の臨床像の個人差を十分説明できない。AMD は遺伝子変異だけでなく喫煙や食事といった環境要因も重要な役割を果たす多因子疾患である。環境要因の一つとして微生物叢が大きな注目を集めている。その中でも、腸管内には約 100 兆個の細菌があるとされ、この正常腸内細菌叢構造の破綻 (dysbiosis) が、酸化ストレスや慢性炎症を引き起こし、様々な加齢性疾患の病態に関与することが判明している。興味深いことに、補体副経路の抑制因子である *CFH* 遺伝子の変異と肺炎クラミジア感染の遺伝子環境相互作用が AMD の進行リスクを上昇させることも報告されている。以上より、加齢黄斑変性は遺伝子変異だけでなく酸化ストレスが関与し、環境要因として dysbiosis が関与していると仮説を立てた。

2. 研究の目的

上記の背景から、滲出型加齢黄斑変性の病態を細分化し個別化医療を確立するために、酸化ストレスと腸内細菌叢に着目して研究を行った。滲出型加齢黄斑変性の有無や病型に関与する酸化ストレスマーカーと腸内細菌の探索をした。

3. 研究の方法

本研究では、東北大学病院眼科外来に通院し、少なくとも片眼に滲出型 AMD (wAMD) を有する患者を対象とした。wAMD は眼底所見、光干渉断層計、蛍光眼底造影から典型 AMD、ポリープ状脈絡膜血管症 (PCV)、網膜内血管腫状増殖 (RAP) のサブタイプに分類した。対照群は滲出型 AMD を有しない白内障患者または黄斑前膜・黄斑円孔患者とした。血液を採取し DNA 抽出を行った。フリーラジカル分析装置 (Wismerll 社) を用い、血中の酸化ストレス度 (dROM)、抗酸化力 (BAP) を測定し酸化ストレスマーカーと wAMD の関連を Mann-Whitney U test、Kruskal-Wallis test による群間比較で調べた。

腸内細菌叢解析を行うために、wAMD 患者 11 例と滲出型 AMD を有しない患者 (対照者) 8 例から OMNIgene. GUT kit (DNA Genotek Inc, Ottawa, Canada) を用いて糞便を採取した。便を 780ul の Lysis バッファーで懸濁した後、MORA ビーズチューブ (AMR 社) に移した。MM-400 にて最大速度で 3 分間の機械的破碎を実施し、上清を 5 分煮沸し、Genefind V2 による自動精製を行った。最終的に 80ul の滅菌水にて DNA を溶出させた。ロングプライマ

一を応用した2段階PCRにより、

(http://jp.support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.html)、ターゲット配列となるV3-V4領域を増幅後、インデックスとアダプターを付与しライブラリーを作製した。MiSeq (MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA))により次世代シーケンス解析を行った。Qiime (Caporaso et al., Nat Methods. 2010 May;7(5):335-6)でシーケンスしたデータの解析を行った。

4. 研究成果

〈酸化ストレスマーカーと滲出型加齢黄斑変性の関連〉

WAMDは25例(25眼)と対照群の19例19眼の臨床的背景の比較では、年齢と喫煙歴がwAMDで有意に高かった(それぞれ、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.018$) (表1)。

dROMはwAMDで有意に高値であったが($P < 0.01$)、男女別に解析したところ、男性でのみ有意に高値であった(男: $P < 0.001$ 、女:0.64) (図1)。一方、BAPは有意差を認めなかった。WAMDのサブタイプ別の解析では、典型AMDのdROM中央値が他のサブタイプに比べ高値であったが有意差を認めなかった($P = 0.36$)。両眼性と片眼性のwAMDで酸化ストレスマーカーを比較したが有意差は認めなかった。年齢と喫煙歴はwAMDのリスクとして知られているが、これらを説明変数として含む多変量ロジスティック解析においても、dROMが高いことが有意にwAMDと関連していた(OR:1.03、 $p < 0.018$) (表2)。

酸化ストレスはWAMDの病態に重要な役割を果たすとされている。これまで、欧米人のwAMDで皮膚に蓄積する終末糖化産物を反映する皮膚自発蛍光がwAMDと関連することが報告されている。本邦においても、松浦らからwAMDとdROMに相関があることが報告されている(Matsuura et al., BMC Ophthalmology (2020) 20:56)。本研究では、wAMDの主要なリスクファクターである、年齢、喫煙歴を含む多重ロジスティック解析も行い、dROMが高値であることとwAMDに有意な関連があることを同定した。wAMDの臨床サブタイプ間で比較したところ、典型AMDのdROM中央値が他のサブタイプより高値であったが、統計学的な有意差を認めなかった。酸化ストレス度の指標であるdROMはwAMDのリスク指標として有用な可能性があるが、症例を増やした前向き研究による検証が必要である。また、dROMは非特異的なマーカーであり、生体試料解析によってdROM値に影響を与える分子を同定し、病態解明を進める必要がある。

表1. 臨床的背景

	対照群	wAMD	P値
N	19	25	
年齢(歳)	68.0 [65.0, 73.0]	76.0 [74.0, 85.0]	0.001
性別 = 男/女 (%)	7/12 (36.8)	17/8 (68.0)	0.080
喫煙歴	6 (31.6)	18 (72.0)	0.018
wAMD サブタイプ (tAMD/PCV/RAP)	NA	15/7/3	NA

連続変数にはMann-Whitney U検定を、名義変数にはFisherの正確検定を用いた。

表 2. 酸化ストレスマーカーdROM と wAMD の関連

応答変数	説明変数	調整オッズ比	P値
wAMD	年齢 (歳)	1. 26	< 0. 01
	性別 (男性)	1. 3	0. 81
	喫煙歴	21. 6	0. 022
	dROM	1. 03	0. 018

多変量ロジスティック回帰分析.

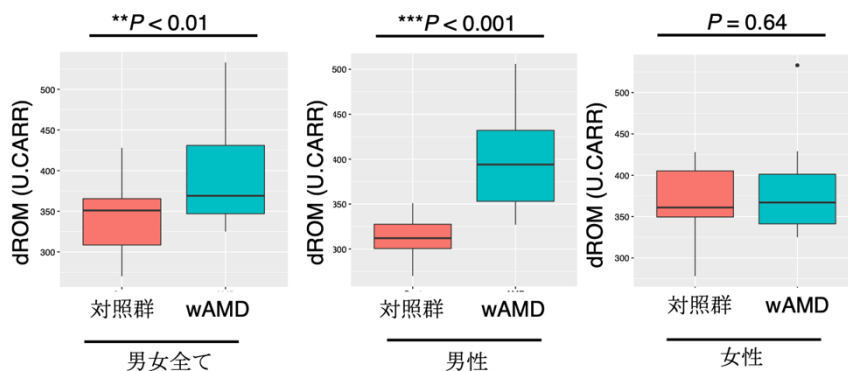
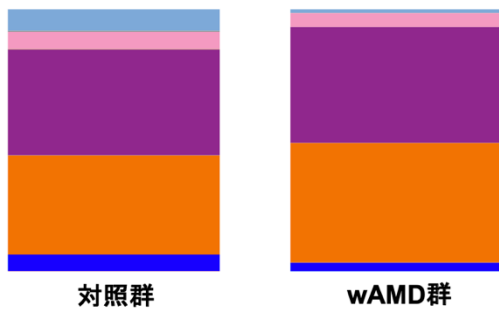


図 1. wAMD の血中 dROM 値

〈腸内細菌叢と wAMD〉

WAMD と対照者の糞便から DNA 抽出し次世代シーケンサーで 16SrDNA 解析を行った。16SrDNA 解析によって得られた配列から類似度解析を行ったところ、全体を通して、Bacteroides 門 (41.8%) と Firmicutes 門 (42.3%) の比率が高かった (図 2)。UniFrac 距離を用いた主座標解析によるクラスタリングの結果、PC1 と PC2 の寄与率はそれぞれ 33.95%、15.94%であった (図 3)。WAMD と対照者と細菌叢を比較したところ、wAMD では Bacteroidetes 門と Verrucomicrobia 門の構成に有意な変化を認めた (Bacteroidetes 門: $P = 0.026$ 、Verrucomicrobia 門: $P < 0.019$) (図 2)。本研究で同定された Bacteroidetes 門はグラム陰性菌でヒトの腸内に存在する菌の中で多くを占め、腸内の脂質代謝や炎症にも関与している。バクテロイデス門によって活性化された NfKB シグナルが炎症性腸疾患の病態に関わるとされている。さらに、バクテロイデス門は動脈硬化性疾患や神経変性疾患などさまざまな疾患にも関与することが報告されている (Gibiino et al., Dig Liver Dis. 2018 Jul;50(7):635-639, Wexler. Clin Microbiol Rev. 2007 Oct;20(4):593-621.)。Verrucomicrobia 門はグラム陰性菌で、Foxp3 遺伝子を介して免疫制御に関わり炎症性腸疾患の病態となる低悪性度慢性炎症の治療標的となる可能性が示唆されている (Lindenberg et al., Sci Rep. 2019 Sep 3;9(1):12674.)。以上のことから、Bacteroidetes 門と Verrucomicrobia 門の構成異常は慢性炎症を介して wAMD の病態に関与することが示唆される。本研究は、wAMD 患者の血中 DNA も採取しており、将来的には遺伝子変異情報と統合解析し、さらに、症例の増加や前向き研究によって wAMD の個別化医療の確立につながることを期待される。



Legend	Taxonomy	Total %	Cont %	AMD %
	k_Archaea;p_Euryarchaeota	0.0%	0.1%	0.0%
	k_Bacteria;p_Actinobacteria	4.8%	6.3%	3.3%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes	41.8%	37.9%	45.7%
	k_Bacteria;p_Cyanobacteria	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Firmicutes	42.3%	40.5%	44.2%
	k_Bacteria;p_Fusobacteria	0.1%	0.1%	0.0%
	k_Bacteria;p_Lentisphaerae	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria	5.9%	6.5%	5.4%
	k_Bacteria;p_SR1	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Spirochaetes	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Synergistetes	0.2%	0.4%	0.0%
	k_Bacteria;p_TM7	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Tenericutes	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Verrucomicrobia	4.8%	8.2%	1.4%
	k_Bacteria;p_Thermi	0.0%	0.0%	0.0%

図 2. wAMD と対照群の腸内細菌叢の比較

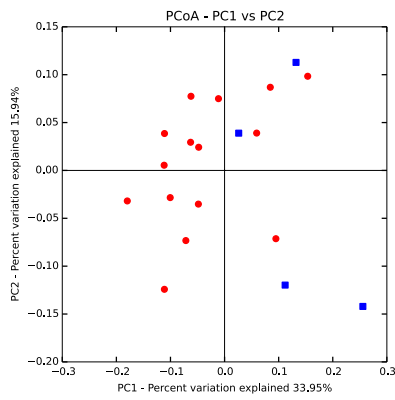


図 3. 腸内細菌叢の主座標分析 ●wAMD ■対照群

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安田正幸
2. 発表標題 滲出型加齢黄斑変性における酸化ストレスの評価
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
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
---------	---------