

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18342

研究課題名(和文) ocular surfaceの安定化に関わるマイクロバイオームのメタゲノム解析

研究課題名(英文) Metagenomic analysis of microbiome involved in ocular surface stabilization

研究代表者

浅尾 和伸 (Asao, Kazunobu)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：80866533

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)：メタゲノム解析を用いて、結膜MALTリンパ腫50眼、健常人50眼の結膜真菌叢を同定した。MALT群では多様性が低下、真菌Malasseziaの増加が見られた。MALT群ではアレルギー結膜炎既往が多く(P=0.034)、涙液ムチン濃度低下が認められた(P=0.0368)。疾患発症に真菌叢変化が関与する可能性がある。眼感染症疾患では、培養結果陽性の感染性眼内炎6例6眼を対象とし起炎菌同定を行った。同定された起炎菌は細菌5例真菌1例で、全例培養結果と種のレベルまで一致していた。メタゲノム解析は短時間で起炎菌の同定が可能であり、診断及び適切な治療薬を選択する際に有用な手段と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタゲノム解析を用いて眼表面疾患、眼感染症疾患におけるバイオームの同定を行った。疾患発症の原因が明らかではない結膜MALTリンパ腫では真菌叢変化、眼環境の変化を示すことができた。真菌叢変化の同定は治療介入の指標となり、予防治療へと繋がる可能性がある。緊急疾患である眼感染症疾患である眼内炎において、メタゲノム解析で起炎菌の同定を行ったところ、培養で同定された起炎菌との一致が見られた。この結果は、メタゲノム解析は感染症疾患における起炎菌の同定方法として新たな選択肢となり、引いては適切な抗生剤選択に繋がる可能性を示すことができた。

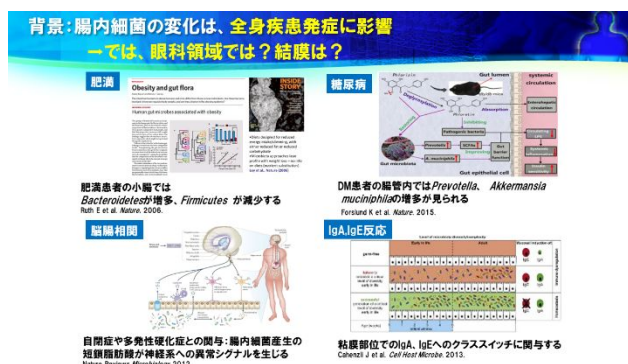
研究成果の概要(英文)：Metagenomic analysis was performed to investigate the fungal differences. Fifty eyes of conjunctival MALT lymphoma and 50 eyes of healthy volunteers were included. At the conjunctiva in conjunctival MALT lymphoma, decrease in diversity and higher prevalence of Malassezia were detected. Patients with conjunctival MALT lymphoma have a significantly higher frequency of allergic conjunctivitis(P=0.0343) and tear mucin concentrations were significantly lower(P=0.0368). Fungal dysbiosis may be involved in the pathogenesis of conjunctival MALT lymphoma. 6 consecutive treatment-naive patients with endophthalmitis were recruited and cultures were positive in all cases. The isolated pathogens were 5 bacteria and one fungus. Pathogens from the metagenomic analysis were consistent with culture results at the species level. This analysis can detect pathogens in the short term, resulting in an accurate diagnosis, appropriate selection of antibiotics.

研究分野：metagenomic analysis

キーワード：microbiome metagenomic analysis endophthalmitis MALT lymphoma

1. 研究開始当初の背景

細菌、真菌などの同定においては、既存の培養法や PCR が用いられてきたが、培養条件の困難さ、プライマーの有無による限界もあり、同定が困難な症例が見受けられた。医療機器の進歩により、2000 年半ばより次世代シーケンサーを用いて 16SrRNA 領域をターゲットとしたゲノムシーケンスを行うことが可能となり、サンプル中の細菌を包括的に同定することが可能となった。これを人体に応用し、ヒトにおける菌叢を同定するヒトゲノムプロジェクトが 2000 年半ばより開始され、体表面、腸管内などにおける細菌叢が同定された。眼疾患においては、その結膜細菌叢の確たるデータベースはなく、疾患発症に伴い変化の解析も進んでいないのが現状であった。そこで、眼表面疾患、眼炎症疾患においてマイクロバイオームの変化を同定し、その変化を是正することが眼環境の安定化に繋げる治療ができないか、との問いに答えるべく研究を開始した。



2. 研究の目的

本研究では、眼表面疾患、眼感染症疾患において、疾患部位におけるマイクロバイオームの同定、続いて発症に伴う変化、治療に伴う変化を解析する。得られた解析結果をもとに、眼部で生じる可能性のある環境変化を検討する。治療指標となりえるバイオーム変化を同定し、生じた変化を是正することでマイクロバイオームを介在した眼疾患治療へ向けた基盤情報取得を研究の目的とした。

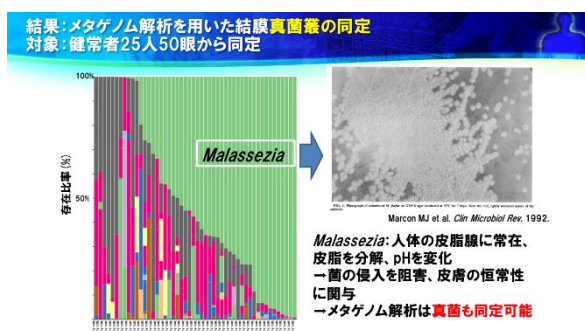
3. 研究の方法

健常者におけるバイオームの同定を行った後、眼表面疾患、眼感染症疾患においてバイオームの同定を行った。対象疾患は、眼表面の腫瘍性疾患(結膜 MALT リンパ腫) 感染性炎症疾患(眼内炎)の各疾患よりサンプル採取を行い、比較検討を行った。対象部位は結膜、マイボム腺、眼周囲皮膚、硝子体からサンプル採取を行い、ゲノム DNA 抽出後、メタゲノム解析を行いバイオームの同定を行った。統計解析は LEfSe 解析を行い、疾患との変異を同定した。涙液環境変化には、健常者と患者から涙液を採取、涙液中ムチン濃度を比較した。

4. 研究成果

(1) 結膜真菌叢の同定と結膜 MALT リンパ腫での真菌叢比較

バイオームには細菌叢、真菌叢が含まれる。眼疾患において細菌叢の報告は多数見受けられるが、真菌叢の報告はほとんどない。今回、健常結膜における独立した真菌叢の存在を明らかにし、結膜 MALT リンパ腫における真菌叢の変化を見出した。結膜 MALT リンパ腫の無治療群結膜におい



ては変化が著明で、多様性が低下していた。真菌叢では、Malassezia の増加が認めら、疾

患発症に伴う変化と考えられた。Malassezia は疾患治療におけるバイオマーカーとなる可能性がある。

(2) 結膜 MALT リンパ腫における環境変化の同定

結膜 MALT リンパ腫においてアレルギー素因の検討を行ったところ、患者群ではアレルギー性結膜炎の既往が有意に高かった。また、涙液ムチン濃度を測定、比較したところ疾患群で有意にムチン濃度の低下が認められた。疾患群では眼表面粘膜で環境変化が生じ、腫瘍発生に関与している可能性が示された。

(3) 眼炎症、感染疾患における起炎菌同定

眼科における、眼炎症、感染疾患での緊急疾患は眼内炎が挙げられる。治療に際して、起炎菌の同定および早期治療が視力予後に直結するため起炎菌の同定は必須である。少数例であるが、眼内炎における起炎菌同定を行うことが出来た。培養陽性例では、培養で得られた起炎菌と、メタゲノム解析で得られた起炎菌との一致が見られた。メタゲノム解析を用いることで、短時間で精度の高い起炎菌の同定ができる可能性が示された。

(4) 研究成果のまとめ

メタゲノム解析により、眼表面疾患、眼炎症・感染症性疾患においてバイオームの同定、疾患発症に伴うバイオームの変化を明らかにすることが出来た。現在、研究成果を学術論文に投稿中である。眼感染症疾患におけるメタゲノム解析を用いた起炎菌の同定について、現在特許申請中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11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 Hashida Noriyasu, Asao Kazunobu, Hara Chikako, Quantock Andrew J., Saita Ryotaro, Kurakami Hiroyuki, Maruyama Kazuichi, Nishida Kohji | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Mitochondrial DNA as a Biomarker for Acute Central Serous Chorioretinopathy: A Case-Control Study | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Medicine | 6. 最初と最後の頁 2022 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2022.938600 | 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 Ando S, Hashida N, Yamashita D, Kawabata T, Asao K, Kawasaki S, Sakurai K, Yoshimori T, Nishida K. | 4. 巻 551 |
| 2. 論文標題 Rubicon Regulates A2E-induced Autophagy Impairment in the Retinal Pigment Epithelium Implicated in the Pathology of Age-related Macular Degeneration | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun | 6. 最初と最後の頁 148-154 |
| 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 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 谷口隆英、橋田徳康、浅尾和伸、丸山和一、西田幸二 | 4. 巻 62 |
| 2. 論文標題 原発巣と転移巣で異なる抗癌剤の反応性を示した肺癌による転移性脈絡膜腫瘍の一例 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 眼科 | 6. 最初と最後の頁 1005-1011 |
| 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 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 家室 怜, 橋田 徳康, 浅尾 和伸, 丸山 和一, 西田 幸二 | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 びまん性強膜炎の前眼部光干渉断層計による治療前後の前部強膜厚の比較 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 眼科臨床紀要 | 6. 最初と最後の頁 387-391 |
| 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 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 井口智詠, 橋田徳康, 浅尾和伸, 丸山和一, 西田幸二 | 4. 巻 64 |
| 2. 論文標題 新型コロナウイルスmRNA ワクチン接種後に発症した前部ぶどう膜炎の2例 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 眼科 | 6. 最初と最後の頁 1195-1203 |
| 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 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 諏訪 貴久, 橋田 徳康, 丸山 和一, 浅尾 和伸, 宮澤 宏輔, 西田 幸二 | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 原発巣と転移巣で抗癌化学療法に対する異なる反応性を呈した転移性脈絡膜腫瘍の一例 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 眼科臨床紀要 | 6. 最初と最後の頁 493-493 |
| 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 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 浅尾 和伸, 橋田 徳康, 丸山 和一, 西田 幸二 | 4. 巻 126 |
| 2. 論文標題 結膜MALTリンパ腫患者におけるアレルギー素因の検討 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 日本眼科学会雑誌 | 6. 最初と最後の頁 304-304 |
| 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 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 藤原 秀, 橋田 徳康, 浅尾 和伸, 丸山 和一, 西田 幸二 | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 転移性悪性黒色腫に対するニボルマブ治療中に網膜色素上皮の散在性増殖変化を認めた1例 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 眼科臨床紀要 | 6. 最初と最後の頁 159-159 |
| 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 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 前野 友希, 浅尾 和伸, 橋田 徳康, 丸山 和一, 西田 幸二 | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 肺小細胞癌の虹彩転移に対し、メソトレキセート硝子体注射と抗VEGF硝子体注射にて経過観察した一例 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 眼科臨床紀要 | 6. 最初と最後の頁 849-849 |
| 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 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 久保田 紘史, 橋田 徳康, 浅尾 和伸, 丸山 和一, 西田 幸二 | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 乳癌の虹彩転移に対してメソトレキセート硝子体内注射が著効した一例 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 眼科臨床紀要 | 6. 最初と最後の頁 538-539 |
| 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 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 大路 怜奈, 橋田 徳康, 若林 卓, 原 千佳子, 浅尾 和伸, 丸山 和一, 西田 幸二 | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 皮膚悪性黒色腫に対するBRAF/MEK阻害薬治療により生じたぶどう膜炎の1例 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 眼科臨床紀要 | 6. 最初と最後の頁 539-539 |
| 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 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13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 浅尾 和伸, 橋田 徳康, 丸山 和一, 西田 幸二 |
| 2. 発表標題 結膜MALTリンパ腫患者におけるアレルギー素因の検討 |
| 3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 浅尾和伸、橋田徳康、北口善之、丸山和一、西田幸二 |
| 2. 発表標題 PR3-ANCA陽性で結膜下に肉芽組織増殖を認めた壊死性強膜炎の1例 |
| 3. 学会等名 第448回大阪眼科集談会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 浅尾 和伸, 橋田 徳康, 丸山 和一, 西田 幸二 |
| 2. 発表標題 眼内炎の起炎菌同定にメタゲノム解析を用いた6症例 |
| 3. 学会等名 第76回日本臨床眼学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 浅尾 和伸 |
| 2. 発表標題 眼炎症疾患の鑑別診断におけるメタゲノム解析の有用性 |
| 3. 学会等名 第15回北摂眼科病診連携の会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 浅尾 和伸、橋田 徳康、山下 大輔、丸山 和一、西田 幸二 |
| 2. 発表標題 結膜MALTリンパ腫における真菌叢解析 |
| 3. 学会等名 フォーサム2021 第57回日本眼感染症学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 諏訪貴久, 橋田徳康, 丸山和一, 浅尾和伸, 宮澤宏輔, 西田幸二 |
| 2. 発表標題 原発巣と転移巣で抗癌剤治療に対する異なる反応性を呈した転移性脈絡膜腫瘍の1例 |
| 3. 学会等名 第445回 大阪府眼科集談会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤原 秀, 橋田 徳康, 浅尾 和伸, 丸山 和一, 西田 幸二 |
| 2. 発表標題 転移性悪性黒色腫に対するニボルマブ治療中に網膜色素上皮の散在性増殖変化を認めた1例 |
| 3. 学会等名 第444回大阪眼科集談会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 前野友希, 浅尾和伸, 橋田徳康, 丸山和一, 西田幸二 |
| 2. 発表標題 肺小細胞癌の虹彩転移に対し、メソトレキセート硝子体内注射と抗VEGFを併用し経過観察した一例 |
| 3. 学会等名 第443回大阪眼科集談会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 浅尾和伸、橋田徳康、丸山和一、西田幸二 |
| 2. 発表標題 結膜MALTリンパ腫におけるdysbiosisに伴う涙液・血清中サイトカインの検討 |
| 3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 橋田徳康, 浅尾和伸, 相馬剛至, 大家義則, 丸山和一, 西田幸二 |
| 2. 発表標題 CMV内皮炎・虹彩炎におけるAIナノボアを用いたウイルス粒子の極短時間1分子同定 |
| 3. 学会等名 第76回日本臨床眼科学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大路 怜奈, 橋田 徳康, 若林 卓, 原 千佳子, 浅尾 和伸, 丸山 和一, 西田 幸二 |
| 2. 発表標題 皮膚悪性黒色腫に対するBRAF/MEK阻害薬治療により生じたぶどう膜炎の1例 |
| 3. 学会等名 第441回大阪眼科集談会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 久保田紘史, 橋田徳康, 浅尾和伸, 丸山和一, 西田幸二 |
| 2. 発表標題 乳癌の虹彩転移に対してメトトレキサート硝子体内注射が著効した一例 |
| 3. 学会等名 第441回大阪眼科集談会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 橋田 徳康, 浅尾 和伸, 山下 大輔, 丸山 和一, 西田 幸二 |
| 2. 発表標題 サルコイドーシス患者における細菌叢の網羅的メタゲノム解析 |
| 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1件

| | |
|-----------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 浅尾和伸、橋田徳康 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 金原出版株式会社 | 5. 総ページ数 6 |
| 3. 書名 強膜炎に対する生物学的製剤による治療 | |

〔出願〕 計1件

| | | |
|---------------------------------|----------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 感染性の硝子体疾患の検出方法 | 発明者 浅尾和伸、橋田徳康、丸山和一、西田幸二 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-039897 | 出願年 2023年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|