

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09720

研究課題名（和文）眼感染症病巣のRNAシーケンス網羅解析による病態解明

研究課題名（英文）Molecular pathology of infectious keratitis utilizing nucleic acid sequencing and quantification

研究代表者

井上 幸次（Inoue, Yoshitsugu）

鳥取大学・医学部・プロジェクト研究員

研究者番号：10213183

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）：感染性角膜炎をより適切に診断、及び管理するため、病原体およびホストの反応面から分子生物学的手法により、病態の検証を図った。病原体種別には、PCRを用いたsequencingによる同定手法の探索及び最適化を図った。病態面においては、特に単純ヘルペスに関して、分子病理と臨床的特徴、予後との関連を明らかにした。さらに、臨床検体からのRNA網羅的解析の最適化を図った後、各種病原体において特徴的に活性化される分子経路、さらに、ステロイド治療の開始の選択に利用可能な分子経路の探索を図った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

角膜混濁は失明原因の上位を占めており、感染性角膜炎はその重要な原因となる。適切な診断及び治療の選択が視力予後の改善に必須である。一方、いかに診断し、治療するのかに関して十分な指針は策定されていない。そこで、原因病原体の同定手法の確立と評価、さらには分子病態の探索を試みた。これにより、より妥当性のある診断及びマネジメント手法の設計に資する分子病態を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In order to better diagnose and manage infectious keratitis, we have attempted to verify the pathogenesis of the disease by molecular biological methods from the perspective of pathogen and host reaction. For each pathogen, we explored and optimized identification methods using PCR-based sequencing. In terms of pathogenesis, we clarified the relationship between molecular pathology, clinical features, and prognosis, especially for herpes simplex. In addition, after optimizing the comprehensive RNA analysis of clinical specimens, we searched for molecular pathways that are characteristically activated in various pathogens and that can be used to select the initiation of steroid therapy.

研究分野：眼科学

キーワード：感染性角膜炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

眼感染症は quality of life において非常に重要な視覚を障害する疾患であり、その治療は視覚を守る上できわめて重要である。その治療の基本は感染している微生物を排除することであり、前提として何が感染しているかを特定することが診断のポイントとなる。そのため、結膜ぬぐい液や角膜擦過物、あるいは眼内液を用いて塗抹検鏡や培養が古くから行われてきた。また、最近では polymerase chain reaction (PCR)法が利用されるようになり、細菌・真菌のみならず、アメーバやウイルスの検索も進んでいる。更には量を測定する real-time PCR や、多種類の微生物を一度に検索する multiplex PCR についての研究も成され、保険適用へ向けて先進医療が行われ、実用化がめざされている。しかし、PCR 法で標的としていない病原体が原因となるケース、治療開始後であり PCR 法でも検出されないケース、検出されても起因微生物がどうか不明のケース（常在菌や無症候排泄されたヘルペスウイルス、環境に偏在する真菌など）、そもそも感染ではなかったケースなどが影響して、高い精度で間違いのない診断をすることは極めて困難である。つまり、病原体 DNA をターゲットとして検出する手法のみでは、炎症性疾患を感染性か非感染性か判定することさえ、しばしば難渋する。

一方、感染症は感染する微生物によってのみおこるのではなく、感染したホストによる免疫反応も含めた炎症、組織破壊、その後の消炎と創傷治癒を含めた一連の病態によって成り立っている。ホストの反応が重要であるがゆえに、非感染性であっても感染と鑑別しにくい事例があるのである。特に透明組織や神経組織が多い眼の場合、この病態が過剰だと、たとえ起因微生物が駆逐されたとしても、透明性や神経機能が損なわれ、重篤な視力障害をきたしてしまう。この過剰な病態を抑制するには副腎皮質ステロイド薬の使用が有用であり、広く使用されている。しかし、その使用のタイミングが早いと起因微生物を増やすことになり遅いと効果が得られない。また、非感染性であれば当然使用した方がよいが、もし感染であればかえって悪化させてしまう。結局我々はまだ眼感染症に伴う病態について、十分な情報を知りえていない。このような病態を理解する上でさまざまな分子についての研究が行われてはいるが、多くの知見は細胞レベルや動物実験から得られたものであり、あるいは特定の代表的な分子をみるに留まっている。そこで、実際のヒトの眼感染症において生じている病態においてどのような分子が関与しているかを包括的に理解しなければ、感染の病態の全体像を把握することは難しい。また病態を理解してこそより適切な治療の選択につながる。この診断と治療の両面において、ホストの分子のパターンを把握すれば、起因微生物を狙った PCR のみでは得られない診断精度と治療指針が得られる可能性がある。

### 2. 研究の目的

眼感染症の病巣から採取された試料を RNA 解析に供し、病態の把握と感染性か非感染性かの鑑別、起因微生物の判定に有用な RNA プロフィールあるいは RNA 種の同定を行い、診断精度の向上のみならず、副腎皮質ステロイド薬投与を含めた治療方針の決定に有用かを検証することを目的とする。

本研究は起因微生物そのものをつかまえることに注力してきた培養や病原体 DNA をターゲットとして検出する手法とは一線を画し、その微生物に対する局所でのホスト側の反応を RNA を用いて詳細に検討することによって、診断や治療に役立てようとする試みである。たとえば、特定の RNA 種あるいは、分子経路が活性化されていれば、細菌感染やヘルペス感染などの判別が可能になるのではと考えている。また、mRNA を網羅解析し、特定の分子ネットワークあるいはパスウェイに関連した分子群が増加しておれば副腎皮質ステロイドを使用した方がよい、そういった指針へ向けての基礎データを取得する新しい試みであり、眼感染症診療のパラダイムシフトをめざすことを目的とする。

また、従来の培養や病原体 DNA をターゲットとして検出する手法や臨床所見と組み合わせることによって更に精度をあげていき、画像による診断 AI とリンクさせることも目的としている。これにより、角膜疾患を専門とする医師であってもよりすぐれた診断精度や治療成績に高め、さらに非専門であっても診断精度の向上による医療の均てん化に資する可能性がある。また、感染に伴う炎症の鍵となる分子が同定できれば、副腎皮質ステロイドによらず、その分子を抑制する新たな治療に道を開く可能性がある。更には、この眼感染症という、病巣部の試料が得やすい分野で得られた知見と手法が他のさまざまな感染症治療においても RNA を検索していくという感染症診療自体のパラダイムシフトにつながる可能性があると考えている。

### 3. 研究の方法

細菌、真菌、アカントアメーバやウイルス感染が疑われる、あるいは感染の除外を必要とする角膜炎、ぶどう膜炎、網膜炎などの炎症性眼疾患の患者を対象として結膜ぬぐい液、角膜擦過物、前房水あるいは硝子体液を採取する。結膜ぬぐい液、角膜擦過物は各2サンプルを採取し、前房水あるいは硝子体液は採取したサンプルを2分割する。これを、Real-time PCR 検査による病原体 DNA 検索と次世代シーケンサーを用いた RNA の網羅的発現解析に供する。あわせて、臨床データの詳細な情報も集積する。

患者サンプルの集積を行う。Real-time PCR 検査による病原体 DNA 検索については、診断に使用するため、その都度ターゲットとして可能性のある病原体について real-time PCR を行う(細菌 16s ribosomal DNA、真菌 28s ribosomal DNA、ヘルペスウイルス群6種、アデノウイルス)。細菌や真菌においては、経過上、診断の判定が困難な場合は PCR sequencing を行う。細菌の場合、16s ribosomal DNA 領域を用いる。一方、真菌においては、角膜感染症において有効な対象領域に関しては十分な知見がない。そこで、ITS(Internal transcribed spacer)、18S Ribosomal RNA(small subunit)、28S Ribosomal RNA(large subunit)、EF1 (elongation factor 1)、RPB1(RNA polymerase II largest subunit)を対象に適切な sequencing 領域の同定を図る。

次に、病巣部検体についての RNA(mRNA 及び miRNA)の網羅的発現解析については、角膜擦過物、涙液、前房水の各々について抽出手法の至適化及び網羅的解析手法の確立を図る。まず、前眼部の miRNA プロファイルについては、これまで十分な知見がない。そこで正常者を含めたサンプルから、検査手法のばらつき、変動の少ない miRNA 群、さらにはそれらの分子経路の annotation を図る。

RNA の網羅的解析には、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析手法の確立を図る。まず、表面から採取される検体は微量であるため、採取手法の至適化、さらに妥当性のある網羅的解析手法の選択に移る。これを通じて、高い再現性がえられやすいサンプル部位やサンプリング手法の選択を図る。

Real-time PCR 検査及び sequencing による病原体 DNA 検索については、その都度行うが、RNA(mRNA 及び miRNA)の網羅的発現解析については、測定ごとのばらつきを減らすために、サンプルを集積後、バッチ毎のサンプルとして行う。

RNA sequencing 後のカウントデータは正規化後、R 環境下において DESeq2 を用いて負の二項分布に基づく一般化線形モデルを用いて、群ごとの発現変動遺伝子群の抽出を行う。次に抽出した発現変動遺伝子に基づき、Ingenuity Pathway Analysis を用いて主要発現ネットワークやパスウェイの同定を行う。次に、それぞれの感染症に特徴的な RNA の抽出を図るため、upstream 解析、ネットワーク解析を行いもっとも有意なパスウェイに関連する遺伝子の抽出、絞り込みを図る。

#### 4. 研究成果

感染性角膜炎の確定診断にいたるうえで病原体の同定は必須である。そこで、局所から検出される微生物 DNA の評価を行った。まず、同定不能、あるいは同定が困難であることがあるのは、細菌及び真菌である。まず細菌の場合、16s ribosomal DNA 量の定量にくわえ、未同定の場合同領域の PCR sequencing の有用性を評価した。その結果、定量 PCR にて 概ね 1000 copies 以上あれば、ほとんどの症例で同定可能であることが判明した。また、量的な観点から常在菌との鑑別も比較的容易であることが判明した。

次に、真菌の同定手法の確立に入った。とくに、感染性角膜炎における真菌の同定手法に関しては、どの領域の sequencing が有効なのか確立されていない。そこでまず、病巣部検体を培養することなく直接 PCR-sequencing する手法の確立にはいった。対象領域として ITS(Internal transcribed spacer)、18S Ribosomal RNA(small subunit)、28S Ribosomal RNA(large subunit)、EF1 (elongation factor 1)、RPB1(RNA polymerase II largest subunit)に対して検証を行った結果、50 例の真菌性角膜炎において全例 sequencing により同定できた。なかでも通常用いられてきた ITS 領域の sequencing でなく RPB1 領域の sequencing がもっとも同定率が高いことが判明した。

次に、病巣部の病原体定量による病態解析を行った。まず、ヘルペス性角膜炎における病巣部 HSV 量の有用性の評価を行った。その結果、上皮型の病変においては、HSV 量の顕著な増大がみられるが、実質型の再発においては、わずかししか検出されなかった。さらに、再発であっても実質型の場合、正常でも検出される shedding としての HSV 量と判別が困難であることが判明した。あわせて、HSV 量がいかなる要因により影響をうけているのかを検証した。その結果、アトピー性皮膚炎の存在、なかでも眼瞼炎をとともう場合高度に HSV 量がふえることが判明した。さらに再発に関してもアトピー性皮膚炎の存在がもっとも再発しやすくなる要因として重要であることが判明した。

ヘルペス性角膜炎は、再発をくりかえしやすく他の病原体による感染性角膜炎との鑑別が困難である。そこで、ヘルペス性角膜炎の患者を対象に局所サイトカインのプロフィール測定の有用

性を検討した。これには、ヘルペス性角膜炎患者の涙液を1、2、3、4、6ヶ月において涙液を経時的に採取しIL-1a、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-23、interferon- $\alpha$ 、interferon- $\beta$ 、interferon- $\gamma$ 、CCL2、VEGFのサイトカイン量をELISAにより測定した。比例ハザードモデルによる解析の結果、これらのサイトカインの中でとくにIL-8及びinterferon- $\gamma$ が再発抑制にかかわることが判明した。このことは、再発時の病態としてウイルス増殖による角膜上皮からのIL-8の誘導がおこり、CD4T細胞の活性化がおこっている機序が推定された。

以上より、涙液の評価により病態が推定できる可能性が示唆された。

次に、病態解析のためのRNA解析手法の検討に入った。まず、RNAのソースとして涙液は簡便に採取可能であり、非侵襲的なりキッドバイオプシーの検体と有用性が高い。とくに、涙液には、細胞外小胞が比較のおおくふくまれており内部にmiRNAやmRNAを保有する。これらのプロフィールは、有用な病態診断として使える可能性が高いことが報告されている。しかしながら、感染性角膜炎のみならず正常者における涙液エクソソーム中のmiRNAのプロフィールや関連する分子経路は知られていない。そこで、まず正常者を対象にしてどのようなmiRNAが安定的に発現するのかの評価を行った。涙液細胞外小胞において高発現であったのは、miR-323-3p、miR-548a-3p、miR-516a-5pであり、高発現miRNAは、組織障害や異常の調節や、癌化抑制機能に関連していた。また、とくに発現の安定性が高いのは、miR-520hとmiR-146b-3pであった。つまり、涙液の細胞外小胞におけるmiRNAは、眼表面の恒常性維持に関与する機能を持つと推定された。一方、miRNAは、機能が冗長であり、特定のmiRNA単独では、病態が判定しがたい可能性があることも判明してきた。

そこで、病巣からのRNAの評価に移った。まず、病巣から安定的に採取可能なRNA量の評価及び採取法の最適化を行った。次にSAGE法を用いてトランスクリプトームデータを取得し、有意な発現変動遺伝子(発現比>5)を抽出した。これを用いてネットワーク解析を施行した。細菌性角膜炎及びヘルペス性角膜炎ともに、病原体誘導性サイトカインストーム、顆粒球の接着、創傷治癒がもっとも有意なcanonical pathwayとして抽出された。一方、細菌性角膜炎とヘルペス性角膜炎を区別する分子を探索した結果、細菌性ではヘルペス性に比べCXCR1、CXCR2、補体C5レセプター2、アルカリフォスファターゼの有意な増大を含め多くの好中球関連遺伝子の増大、さらに天然免疫系の防御機構としてのインフラマゾームに関連したNLRP12の増大を認めた。また、細菌性においては、特徴的に細胞外マトリックスのリモデリングにかかわる分子(コラーゲン12A1、16A1、17A1)も特徴的な誘導を認めた。

一方、ヘルペス性角膜炎においては、MHC class Iの高度な誘導が特徴的であり、CD8の活性化による抗ウイルス作用の発動が示唆された。また、CXCL9、10、11の高度な誘導、間葉転換に関連するカテニンの誘導を特徴的に認めた。

さらに、細菌性角膜炎において、ステロイド治療を検討すべき病期にかかわる遺伝子の探索をすすめた。その結果、上皮の角化、アポトーシス実行段階にかかわるネットワークの関連を認め、upstream regulatorとしてケラチン14、ephrin A4、ROCK2を認め、これらが、ステロイドを開始可能なマーカーとなる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yutaka Omatsu, Yumiko Shimizu, Tomoko Haruki, Yoshitsugu Inoue, Dai Miyazaki.	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of atopic conditions on development and recurrences of infectious keratitis.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Allergol Int.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2024.01.008.	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 Torimura Airu, Kanei Saki, Shimizu Yumiko, Baba Takashi, Uotani Ryu, Sasaki Shin-ichi, Nagase Daisuke, Inoue Yoshitsugu, Ochiya Takahiro, Miyazaki Dai	4. 巻 68
2. 論文標題 Profiling miRNAs in tear extracellular vesicles: a pilot study with implications for diagnosis of ocular diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 70～81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10384-023-01028-0. Epub 2023 Nov 10.	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 春木智子, 宮崎 大, 岡本直記, 清水由美子, 井上幸次
2. 発表標題 実質型角膜ヘルペス治療中止後の涙液中サイトカインの経時推移と再発の関連
3. 学会等名 フォーサム2022せとうち（第58回日本眼感染症学会・第64回日本コンタクトレンズ学会総会・第55回日本眼炎症学会・第10回日本涙道・涙液学会総会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大松 寛, 宮崎 大, 清水由美子, 春木智子, 井上幸次
2. 発表標題 単純ヘルペスウイルス角膜炎再発とウイルス再活性化に関わる要因の評価
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 大松 寛, 清水由美子, 春木智子, 宮崎 大, 井上幸次
2. 発表標題 単純ヘルペスウイルス角膜炎再発に関わる要因の評価
3. 学会等名 第35回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大松 寛, 宮崎 大, 清水由美子, 春木智子, 井上幸次
2. 発表標題 単純ヘルペスウイルスの再活性化と角膜炎再発におけるアトピー性皮膚炎の寄与
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大松 寛, 宮崎 大, 清水由美子, 春木智子, 井上幸次
2. 発表標題 アレルギー疾患の単純ヘルペスウイルス角膜炎再発への寄与の構造方程式モデリング
3. 学会等名 第5回日本眼科アレルギー学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大松 寛, 清水由美子, 春木智子, 宮崎 大, 井上幸次
2. 発表標題 角膜ヘルペス再発における気象因子の影響
3. 学会等名 第67回山陰眼科集談会 第112回鳥取大学眼科研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大松 寛, 清水由美子, 春木智子, 井上幸次, 宮崎 大
2. 発表標題 単純ヘルペスウイルス角膜炎の再発における気候因子の影響
3. 学会等名 フォーサム2023大阪 (第59回日本眼感染症学会・第56回日本眼炎症学会・第65回日本コンタクトレンズ学会総会・第11回日本涙道・涙液学会総会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大松 寛, 清水由美子, 春木智子, 井上幸次, 宮崎 大
2. 発表標題 アレルギー関連疾患を有する症例におけるステロイド点眼と上皮型角膜ヘルペス再発の関連性
3. 学会等名 第6回日本眼科アレルギー学会学術集会
4. 発表年 2023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
研究分担者	宮崎 大  (Miyazaki Dai)  (30346358)	鳥取大学・医学部・教授   (15101)	
研究分担者	春木 智子  (Haruki Tomoko)  (90838153)	鳥取大学・医学部附属病院・助教   (15101)	

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