

喘息発症における咽頭扁桃細菌叢の関与 16SrRNA 解析を用いた網羅的検討

新潟大学医歯学総合病院 耳鼻咽喉科
医員 高橋 奈央

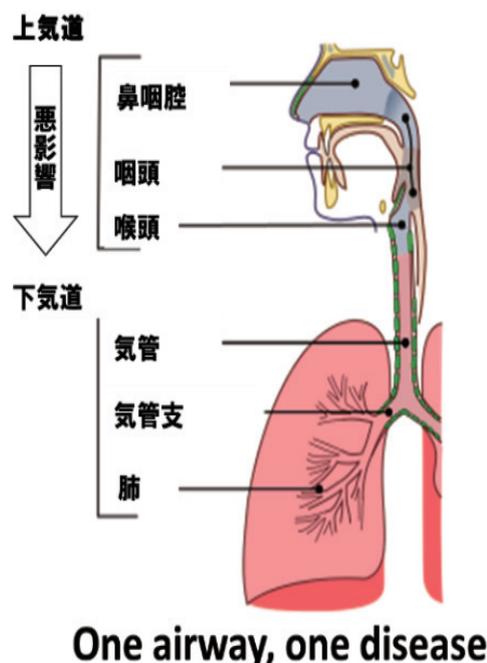
(共同研究者)

新潟大学医歯学総合病院 耳鼻咽喉科 教授 堀井 新
新潟大学医歯学総合病院 耳鼻咽喉科 助教 馬場 洋徳

はじめに

喘息は治療法が進んだ現在でも突然死の原因となっている。また、我が国における気管支喘息の有病率は7.5%と高率であり、医療経済上も大きな問題点となっている。最近の研究では喘息は単一の疾患ではなく、いくつかの表現型（フェノタイプ）が存在する複雑な疾患群であり、とくに難治性喘息患者にはフェノタイプに基づいた治療薬の開発と治療選択が有用である。気管支など下気道と鼻咽腔など上気道との間には、one airway, one disease と言う概念が提唱され、上咽頭の慢性炎症が気管支に悪影響し喘息を発症するのではないか、という考えがある。実際、咽頭扁桃切除、口蓋扁桃摘出術が喘息症状を改善させたとの報告（Levin et al. *Pediatr. Res.* 2014）もある。本研究は網羅的遺伝子解析法である16SrRNA解析を用いて喘息発症、重症化に関連する上咽頭細菌叢を同定し、喘息発症予防法を開発することを目的とする。

上気道粘膜には無症候性に肺炎球菌などの細菌が定着し、成人の約10%で分離されるといわれている。鼻咽腔への定着は髄膜炎や菌血症といった侵襲性感染症や集団内伝播のfirst stepとして重要な役割を果たすといわれる。これらに対する防御機構としてはIgAなどの粘膜免疫や自然免疫が重要であるといわれる。本研究では上咽頭の細菌叢に注目し、喘息患者と非喘息患者、また喘息のなかで治療奏功群、治療抵抗群にわけ、上咽頭細菌叢の差異を16SrRNA解析（マイクロバイーム解析）を用いて網羅的に検討し、喘息に関連する上咽頭細菌叢を同定し、最終的にはこれらへの介入により喘息発症の予防法を確立することを目標とする。



マイクロバイーム (16SrRNA解析) とは？

人体には細胞数の10倍以上の微生物が存在し細菌叢を形成している。これらはマイクロバイームと呼ばれ直接感染症を引き起こすことなく、肥満や免疫疾患など人体の健康状態へ影響を及ぼすことが知られている。我々は小児に特異的な口蓋扁桃の細菌叢に関して16SrRNA解析を用いて報告した。これにより、個々の細菌叢は多彩であり、細菌培養では検出されない細菌も多く存在していることがわかった。(図1)

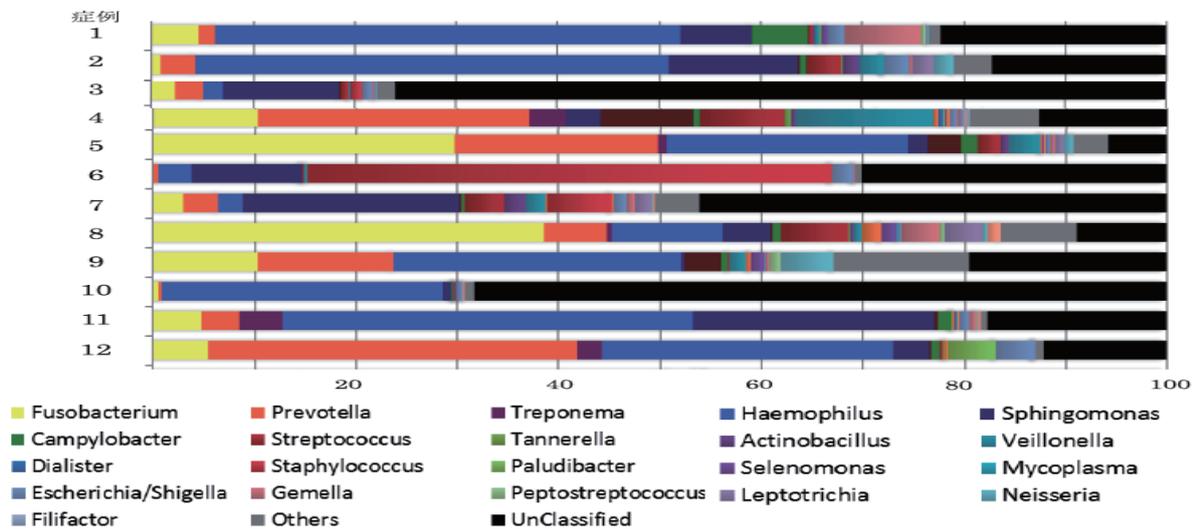


図1: 2016 高橋奈央 小児の口蓋扁桃細菌叢 16SrRNA 解析を用いた検討。日耳鼻より

また、さらに病巣扁桃感染症であるIgA腎症の口蓋扁桃ではOSAS扁桃と比べ細菌叢が変化していることを見出し、疾患発症に関する細菌叢の変化を報告した。

(図2 Watanabe H, Takahashi N, et al. Nephrology Dialysis Transplantation 2016)

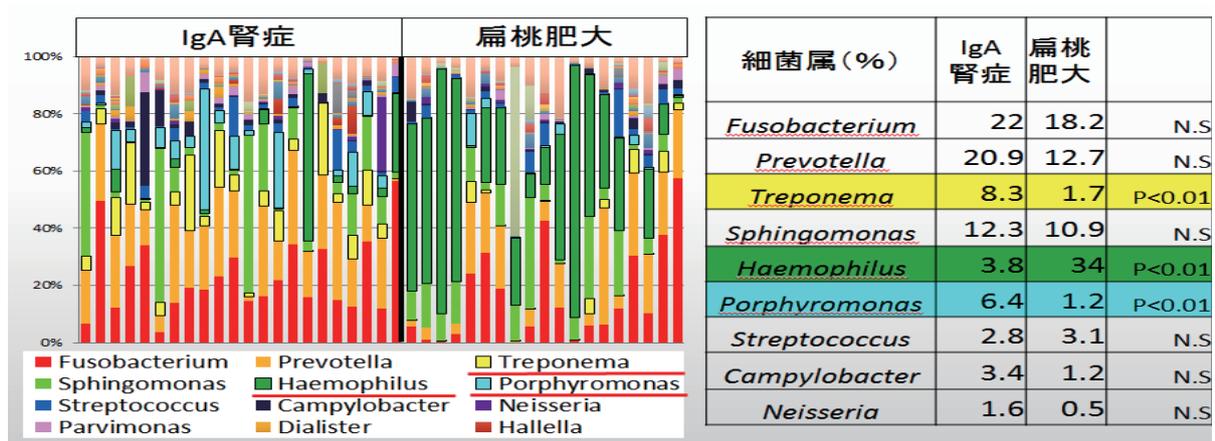


図2: IgA腎症と扁桃肥大の口蓋扁桃細菌叢

細菌検査は検体を採取し培地で培養し同定する方法が一般的であるが、今回用いる16SrRNA解析では難培養性の細菌を含め一気に網羅的に検討できるメリットがある。一般

の細菌検査と異なり、菌数の多い起炎菌だけでなく細菌叢の変化を調べることが可能であり、特に慢性感染症や起炎菌以外の細菌が病態に関与する可能性のある疾患では得に有用な検査法である。今回の提案では実績のある16SrRNA解析法を用いて喘息例の上咽頭細菌叢を健常群と比較し、さらに喘息症例の中でも治療奏功群と抵抗群で比較検討し、喘息発症あるいは重症化における上咽頭細菌叢の関与を明らかにすることを目的とした。

上咽頭には多種多様な細菌が存在すると推測されているが、従来の培養検査では全てを同定することは困難であった。咽頭扁桃に存在する *Streptococcus* が喘息発症に関与するという報告も一部にはあるが、培養検査による結果であり本研究による網羅的な解析でこの結果が追試できるかどうかは定かではない。我々は16SrRNA解析による口蓋扁桃の細菌叢の変化が病巣扁桃感染症であるIgA腎症や習慣性扁桃炎の発症に関与することを確認しており、同法による解析は疾患群と非疾患群の差異を鋭敏に検知することができるかと確信している。よって、気管支喘息においても、もし上咽頭細菌叢がその発症に関与していれば、本研究により喘息群に特異的な上咽頭細菌叢が同定できる可能性は高い。また治療抵抗群に特異的な細菌が同定できればその結果に基づき、当該細菌に対するワクチンの製造、自然免疫賦活療法により喘息発症、重症化を未然に防ぐなどの幅広い応用が期待できる。

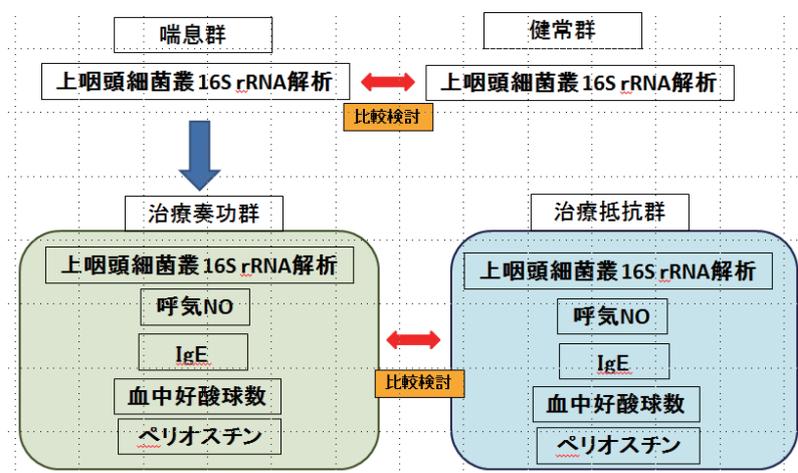
フェノタイプ研究で有名なSARPstudyでは中等症から重症例では喀痰中の好中球と好酸球の両者の炎症が非常に高く、喘息の重症難治化に好酸球性気道炎症とともに好中球気道炎症の重要性が示唆された (Moore WCら J Allergy Clin Immunol.2014)。好中球気道炎症は不可逆性の気道閉塞が顕著であるがその他の臨床的特徴に乏しく、詳細はいまだ解明されていない。上咽頭は以前より下気道細菌感染において着目されており、本研究により上咽頭細菌叢を網羅的に検討することによって、好中球気道炎症の解明につながると考えられる。

本研究では喘息患者の上咽頭ぬぐい液の16SrRNA解析を行い、健常群と比較し、喘息群に特異的な細菌叢の同定を行う。

方法

1. 喘息群 vs 健常群：上咽頭細菌叢

咽頭扁桃細菌叢は上気道による慢性炎症を反映するといわれているがその細菌叢の組成については未だわかっていない。健常者と喘息患者の上咽頭細菌叢を比較し、喘息患者に特異的な細菌叢を同定する。



2. 喘息治療奏功群vs喘息治療抵抗群：IgE,好酸球数、呼気NO、ペリオスチン

さらに治療奏功群と抵抗群に分け、両群の上咽頭細菌叢、気管支喘息の病勢評価に有用であるとされているIgE,好酸球数、呼気NOを比較検討する。また吸入ステロイド薬に治療抵抗する喘息で上昇するといわれるマーカーであるペリオスチンも比較検討する。

対象は、当院呼吸器内科で気管支喘息の診断を受けた成人の喘息患者1名、健康者1名である。図3に示したように採取した上咽頭ぬぐい液をPowerSoil® DNA Isolation Kitを用いてDNAを抽出する。さらに抽出したDNAの中の16SrRNA遺伝子のV4領域をPCRで増幅、PCRによって大量に得られたDNAのヌクレオチドの塩基配列を次世代シーケンサー (Illumina MiSeq®) にてシーケンスし、得られた配列データからバーコード配列を除去し、データベースにある既知菌種に帰属させることにより、細菌ゲノムを同定する。

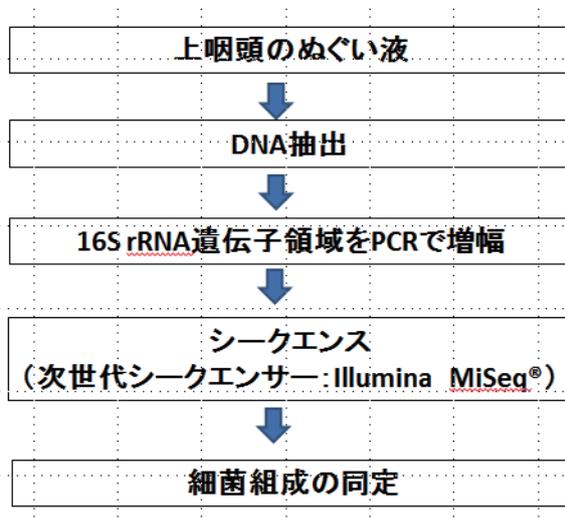
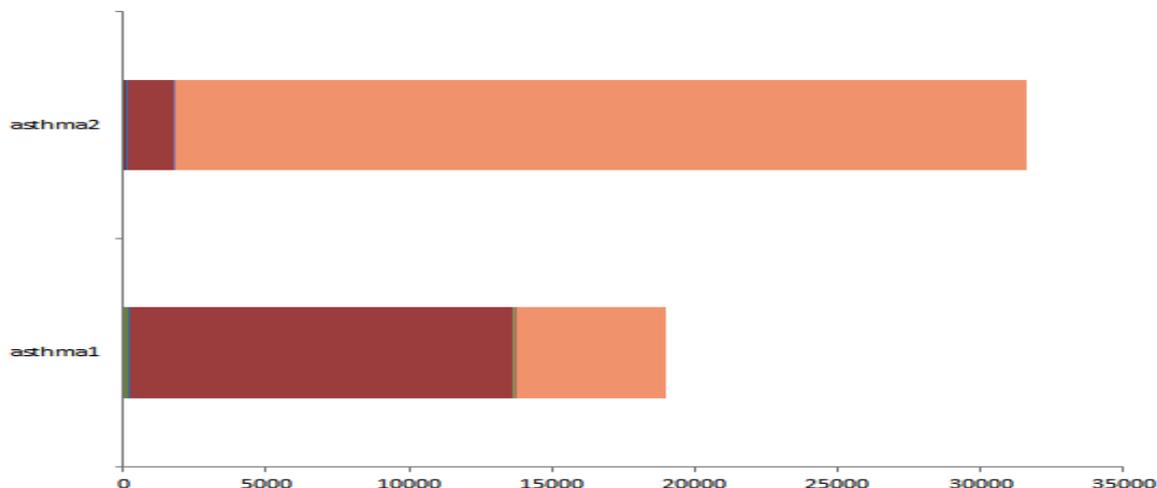


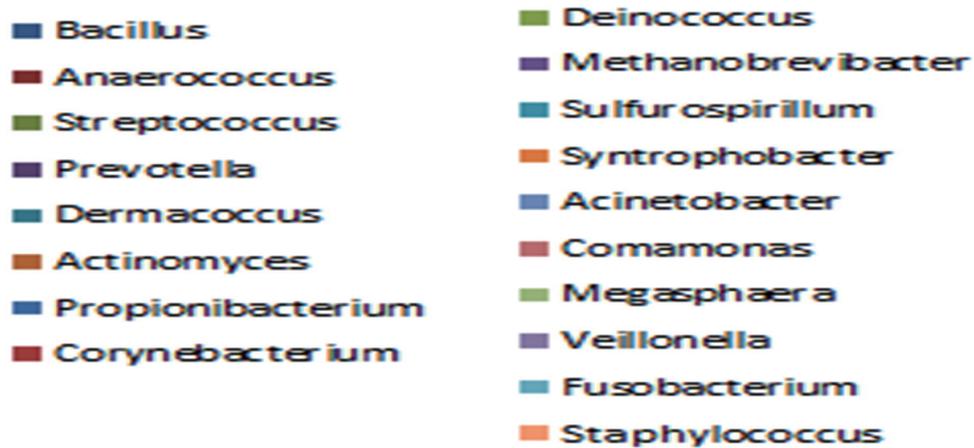
図3：16SrRNA解析の手順

結 果

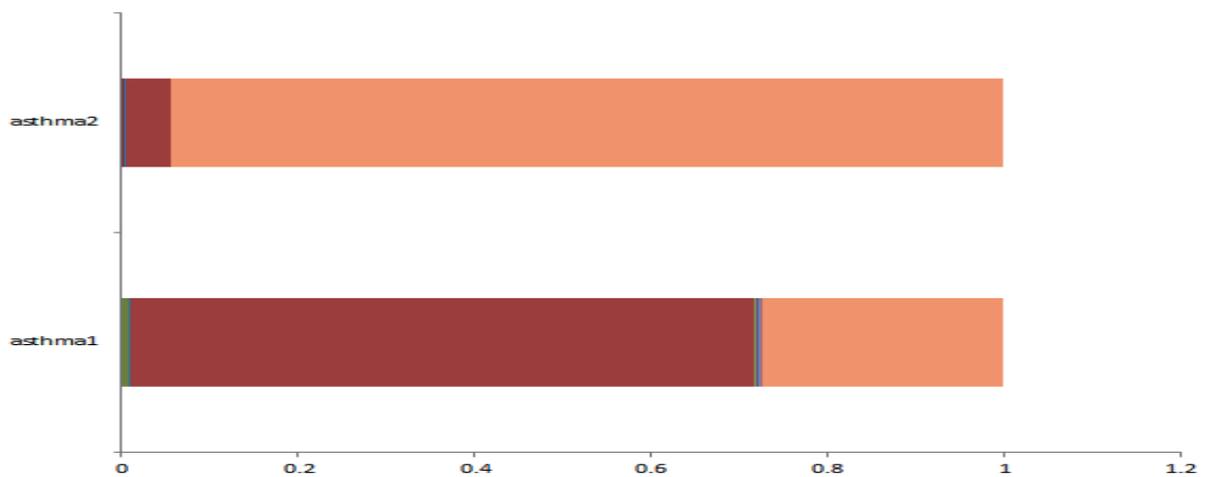
喘息症例 asthma1 健康症例 asthma2とした細菌のゲノム数に差はみられたがぬぐい液でのDNA抽出は可能であった。

【細菌属の絶対数】





【細菌属の比率】



OTUの数が異なっていたが2症例とも属レベルでの細菌の同定が可能であった。

喘息群はcorynebacterium属の占める割合が多く、健常群はStaphylococcus属の占める割合が多かった。

考 察

以前、肺は無菌的な環境にあると考えられていたが、2010年にHiltyらが肺にも特有の細菌叢が存在することを報告し、以来肺におけるマイクロバイームが喘息の表現型に及ぼす影響について注目されている。Hiltyらは喘息患者とCOPD患者と健常人を対象に気管支鏡を用いて下気道検体をブラッシングにて採取し、16SrRNA解析にて細菌叢の違いを検討した。その結果、喘息患者ではProteobacteriaが増加し、Bacteroidetesが低下していることを報告し、特にproteobacteriaの中ではHaemophilus属の増加が顕著であった。これよりProteobacteriaの増加は喘息患者の下気道のマイクロバイームの一つの特徴であると考えられている。また、特定の細菌が喘息の重症化や表現型に関与する可能性が示唆さ

れており、M.catarrhalis,S.pneumoniae,H.influenzaeのいずれかが優勢な喘息患者は、好中球炎症の割合が高く、喘息の罹患年数が長く、一秒率が低いことも報告されている。今回の結果は2症例であったが、上咽頭でのHaemophilus属の割合が低い結果になっているが、今後の症例数を増やした検討が必要である。

要 約

今回2症例ではあったが喘息症例、健常症例の上咽頭ぬぐい液で16SrRNA解析による解析を行なったところ上咽頭細菌叢の採取は可能であった。また2症例に差異がみられた。傾向などを述べるには至らず、今後症例を重ねて検討したい。また難治性の喘息群に関しても検討を重ねる予定である。

文 献

1. Levin J C,et al. Improvement in asthma control and inflammation in children undergoing adenotonsillectomy. *Pediatr Res.*75 (3) :403–8 2014
2. 高橋奈央、相澤直孝、馬場洋徳、堀井 新、後藤 眞、成田一衛他
小児の口蓋扁桃細菌叢：16SrRNA解析を用いた検討. *日耳鼻* 119: 29–36, 2016
3. Watanabe H ,Goto S,Mori H, Higashi K,Hosomichi K,Aizawa N, Takahashi N, Tsuchida M, Suzuki Y,Yamada T,Horii A,Inoue I,Kurokawa K, ,Narita I Comprehensive microbiome analysis of tonsillar crypts in IgA nephropathy *Nephrology, dialysis transplantat*DOI:10.1093/ndt/gfw34
4. Hilty M,et al.Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One.* 5:e8578.2010