

令和元年9月2日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08384

研究課題名(和文) 難治性アトピー性皮膚炎の個別化治療を可能とするマイクロバイーム移植法の開発

研究課題名(英文) Skin microbiome transplantation to patients with atopic dermatitis; in vitro study

研究代表者

杉田 隆 (Sugita, Takashi)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10312076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎病態の中には既存の治療薬に抵抗な難治性アトピー性皮膚炎が存在する。本疾患は「増悪期」と「寛解期」が周期的に繰り返されることから、それに伴い皮膚のマイクロバイームも周期的に変化する。真菌マラセチアは本症の増悪因子の一つであるが、その細胞傷害性を低下させる能力を有する細菌としてStaphylococcus sp. MPU-7を分離した。皮膚角化細胞を用いた検討から当該菌株は、マラセチアによる細胞傷害能を低下させるのみならず皮膚バリア機能関連タンパク質および抗菌ペプチドの発現を上昇させた。本菌株は、皮膚マイクロバイーム移植の候補となりうる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎の小児期から思春期の我が国における有病率は10%にも達するが年齢とともにその率は減少する。しかしその一部は成人になっても寛解せずに難治化する場合がある。近年、ヒトのマイクロバイームは多くの疾患に関与することが明らかになり、潰瘍性大腸炎等には糞便を移植するマイクロバイーム治療が臨床の場に供されている。本研究は、対象療法が主たる治療法となるアトピー性皮膚炎について、その患者の皮膚環境をマイクロバイームを移植することにより治療しようとする新しい発想である。そのための候補株を選定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Atopic dermatitis is a disease where there are repeated exacerbation and remission, and skin microbiome can also be changed during exacerbation and remission periods. Fungus Malassezia is one of the exacerbating factors of atopic dermatitis. In this study, we have succeeded in isolating Staphylococcus sp. MPU-7 from patients as a bacterium with the ability to reduce cell cytotoxicity. The microorganism was also able to increase the expression of skin barrier function related proteins and antimicrobial peptides in vitro. There are considerations for strain MPU7-1 to be a candidate for skin microbiome transplantation.

研究分野：微生物学 医療薬学

キーワード：アトピー性皮膚炎 マイクロバイーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は皮膚バリアー機能の遺伝的な異常により多様な抗原刺激に反応する慢性アレルギー疾患であるため、炎症に対する対症療法(外用ステロイド薬など)が治療の基本となる。皮膚には多様な微生物(真正細菌と真菌)が常在しているがこれが悪化因子となる症例が存在する。そのため、皮膚微生物叢(以下、マイクロバイオーム)をコントロールすることでアトピー性皮膚炎の治療が可能となると考え、研究を遂行してきた。その結果、真菌マラセチアに対する特異的 IgE 抗体が患者血清中に産生され、それは重症度と相関すること、また 真菌マイクロバイオームとも相関することを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎の病態の中には既存の治療薬に抵抗な難治性アトピー性皮膚炎が存在する。本疾患は「増悪期(強い掻痒)」と「寛解期(掻痒の寛解)」が周期的に繰り返されることから、それに伴い皮膚のマイクロバイオームも周期的に変化する。本疾患の治療目標は掻痒のない「寛解期」の持続的維持であるため、これを可能とする適正なマイクロバイオームを外 的に患者皮膚に移植することは新しい治療法を提供すると考えられる。本研究では、1) 患者皮膚のマイクロバイオームの解析、2) これらの皮膚角化細胞に対する免疫応答能の解析、3) 移植用マイクロバイオームの選別、を行う。

3. 研究の方法

a) アトピー性皮膚炎患者の皮膚マイクロバイオームの解析

増悪期と寛解期の皮膚検体の皮膚マイクロバイオームを MiSeq を用いて網羅的に解析した。細菌叢は 16S rRNA の V1-V3、真菌叢は D1/D2 LSU 領域を解析に供した。得られたリードは Quiime および in house BLAST を用いてマイクロバイオームを同定した。

b) 皮膚マイクロバイオームの皮膚角化細胞に対する免疫応答

アトピー性皮膚炎の増悪因子の一つである *Malassezia* による細胞傷害性を低下させるためのマイクロバイオーム、すなわちマイクロバイオーム移植療法のための候補を見いだすための工程である。患者の寛解期の皮膚より分離したマイクロバイオームの中から *Staphylococcus* sp. MUP7-1 株を選定し、これを *Malassezia* と皮膚角化細胞(以下、NHEK)と共に培養し細胞傷害性を LDH と MTT 法で評価した。

c) 移植用マイクロバイオームの評価

上述した b) において皮膚マイクロバイオーム移植の候補菌株として *Staphylococcus* sp. MPU7-1 株を選別することができた。次に、当該菌株を用いてマイクロバイオーム移植のための用量設定を行うための検討を行った。この場合、皮膚上には生細胞と死細胞が混在しているはずである。そこで、まず皮膚鱗屑中の生死判別を行った。Propidium monoazide (PMA) は DNA に対して親和性を有する光反応色素で細胞膜不透過性の性質を示す。死細胞は細胞膜が損傷されているため PMA 処理では死細胞のみが修飾される。よって生細胞と死細胞を分別定量できる。

4. 研究成果

a) アトピー性皮膚炎患者の皮膚マイクロバイオームの解析

増悪期に *Staphylococcus aureus*、寛解期に *Staphylococcus epidermidis* が優位であることは良く知られているが、寛解期は *S. epidermidis* よりもむしろ *S. hominis* や *S.*

capitis 等の CNS 優位であることが明らかにされた。その他、*Streptococcus* spp.、*Corynebacterium* spp. や *Acinetobacter* spp. が優位菌種として検出できた。寛解期では *Propionibacterium* spp. も相対的に優位になった。これは皮膚環境が弱酸性になっていることを意味していると推察された。また、真菌叢は両期間で *Malassezia restricta* および *M. globosa* が優位であったが、両菌種の定着比率は寛解期の方が、*M. restricta* が優位であった。また、*Malassezia* の定着量を qPCR で定量したところ、定着量は増悪期の方が高かった。得られたリードを主成分分析した結果、細菌叢および真菌叢のいずれも増悪期と寛解期で異なるクラスターを形成した。以上、本年度の研究成果をまとめると、増悪期から寛解期でマイクロバイオームは、細菌では菌種レベルの変化が生じ、真菌では構成種は変わらないが構成比率は変化することが明らかになった。

b) 皮膚マイクロバイオームの皮膚角化細胞に対する免疫応答

一定濃度における *Malassezia* による傷害性を *Staphylococcus* sp. MPU7-1 株の存在下で低下させた。しかしながら、MPU7-1 株の添加濃度によってはパラドキシカルな作用も認められた。すなわち、むしろ細胞傷害性が上昇した濃度が存在した。ヒト皮膚は病原体の侵入を防ぐために皮膚細胞同士をつなぎあわせる皮膚バリア機能関連タンパク質を発現している。*Malassezia* および MPU7-1 株培養時におけるこれらの関連タンパク質の遺伝子発現変動を RT-qPCR で測定した。その結果、claudin と occludin の発現は混合培養時には上昇した。また、感染防御のためにヒトは抗菌ペプチドであるディフェンシンを分泌させる。両菌株の存在下でこの発現を上昇させた。以上のことから、特定濃度の MPU7-1 株はアトピー性皮膚炎増悪因子である *Malassezia* の細胞傷害能を低下させ、また皮膚バリア機能を亢進させる能力を有することが示された。

c) 移植用マイクロバイオームの評価

PMA 処理鱗屑から得られた DNA を定量 PCR 解析したところ、実際に半数以上の細胞は死細胞であることが判明した。そのため MPU7-1 株の生死細胞の比率を変えることが必要である。真菌マイクロバイオームでは *Malassezia* が大部分を占め、かつアトピー性皮膚炎の増悪因子である。MPU7-1 株の生死細胞の比率を変えて、ヒト角化細胞 (NHEK) への細胞傷害性を LDH および MTT 法で評価した。その結果、特定の生死細胞比率が *Malassezia* の NHEK への細胞傷害能を有意に低下させることができた。さらに IL8、TNF α などの炎症性サイトカイン量を ELISA で測定した。特定の細胞比率ではこれらのサイトカイン産生量も低下させた。以上、MPU7-1 は皮膚マイクロバイオーム移植療法に実践しうる可能性がある有用な菌株であることが判明した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. 杉田 隆、張 音実、マラセチアと脂漏性皮膚炎・アトピー性皮膚炎 どこまで関与しているのか? どのような機序で関与しているのか?、皮膚アレルギーフロンティア、14, 19-22, 2016.
2. Tanaka A, Cho O, Saito C, Saito M, Tsuboi R, Sugita T. Comprehensive pyrosequencing analysis of the bacterial microbiota of the skin of patients with seborrheic dermatitis. Microbiol. Immunol. 60, 521-526, 2016.
3. Cho O, Sugita T. Low DNA sequence diversity of the intergenic spacer 1 region in the human skin commensal fungi *Malassezia sympodialis* and *M. dermatis* isolated

- from patients with Malassezia-associated skin diseases and healthy subjects. Mycopathologia 181, 839-841, 2016.
4. Cho O, Sugita T. Comprehensive analysis of the fungal microbiota of the human external auditory canal using pyrosequencing – The external auditory canal exhibits low fungal species diversity. Medical Mycol. J. 58, E1-4, 2017.
 5. Lim HJ, Jeon YD, Kang SH, Shin MK, Lee KM, Jung SE, Cha JY, Lee HY, Kim BR, Hwang SW, Lee JH, Sugita T, Cho O, Myung H, Jin JS, Lee YM. Inhibitory effects of Euphorbia supina on Propionibacterium acnes-induced skin inflammation in vitro and in vivo. BMC Complement Altern. Med. 18, 263, 2018.
 6. 杉田 隆:マラセチアとマラセチア皮膚炎の発症機序、Monthly Book Derma, 269, 49-54, 2018.

〔学会発表〕(計 26 件)

1. 井上瑞菜、張 音美、齋藤磨美、坪井良治、杉田 隆、ヒト表皮角化細胞に対する *Malassezia* と細菌 *Acinetobacter* の作用、第 60 回日本医真菌学会総会・学術大会、2016/09、東京
2. 井上瑞菜、張 音実、齋藤磨美、坪井良治、杉田 隆、皮膚における *Acinetobacter* の菌叢解析と皮膚角化細胞に及ぼす影響、第 60 回日本薬学会関東支部大会、2016/09、東京
3. 井上瑞菜、張 音実、杉田 隆、Molecular detection of *Acinetobacter* spp. from the skin of patients with skin diseases、第 90 回日本細菌学会総会、2017/03、仙台
4. 448. 張 音実、井上瑞菜、杉田 隆、Comprehensive analysis of the skin bacterial microbiota of healthy Japanese individuals、第 90 回日本細菌学会総会、2017/03、仙台
5. 張 音実、井上瑞菜、杉田 隆、疑似微小重力環境で皮膚常在真菌 *Malassezia* が皮膚角化細胞に与える影響、日本薬学会第 137 年会、2017/03、仙台
6. 大久保友隆、張 音実、杉田 隆、アトピー性皮膚炎治療薬が皮膚常在菌 *Malassezia* に与える影響、日本薬学会第 137 年会、2017/03、仙台
7. 井上瑞菜、張 音実、杉田 隆、皮膚炎患者皮膚における *Acinetobacter* 叢の解析とヒト皮膚角化細胞に及ぼす影響、日本薬学会第 137 年会、2017/03、仙台
8. 須藤綾子、張 音実、倉門早苗、杉田 隆、皮膚常在真菌 *Malassezia furfur* のバイオフィーム形成と抗真菌薬耐性、日本薬学会第 137 年会、2017/03、仙台
9. 杉田 隆、シンポジウム：微生物叢・環境メタゲノム最前線、皮膚真菌叢解析が明らかにしたこと — 健康、疾患、そして宇宙 —、NGS 現場の会 第 5 回大会、2017/06、仙台
10. 井上瑞菜、張 音実、杉田 隆、*Acinetobacter ursingii* 培養上清の *Staphylococcus* spp. の細胞傷害性に対する作用、第 61 回日本薬学会関東支部大会、2017/09、東京
11. 張 音実、井上瑞菜、海野瑞季、杉田 隆、シンポジウム：ヒト皮膚の真菌マイクロバイーム - 真菌と細菌の相互作用 -、第 61 回日本医真菌学会総会・学術集会、2017/09、金沢
12. Sugita T, Cho O. Workshop: Skin fungal microbiome of patients with

- Malassezia*-related skin diseases. 15th International Congress of Mycology and Eukaryotic Microbiology, IUMS 2017, 2017/07, Singapore
13. Cho O, Matsuda Y, Ogishima D, Inoue M, Sugita T. Microbiota in the skin of healthy Japanese individuals between the neonate and adolescent periods. 15th International Congress of Mycology and Eukaryotic Microbiology, IUMS 2017, 2017/07, Singapore
 14. 井上瑞菜、張 音実、杉田 隆、皮膚上のアシネトバクターは黄色ブドウ球菌の細胞傷害性を増悪させるか、日本薬学会第 138 年会、2018/03、金沢
 15. 張 音実、海野瑞季、杉田 隆、角栓中のマイクロバイオーーム解析とケラチノサイトへ与える影響： *Malassezia* と *Propionibacterium acnes* 、日本薬学会第 138 年会、2018/03、金沢
 16. 大久保友隆、井上瑞菜、張 音実、杉田 隆、アトピー性皮膚炎患者皮膚より分離した non-*Staphylococcus aureus* と真菌 *Malassezia* との相互作用、日本薬学会第 138 年会、2018/03、金沢
 17. 杉田 隆、なぜ、皮膚に微生物が存在するのか -皮膚マイクロバイオーームの破綻と再構築-、第 61 回日本医真菌学会総会・学術集会、2017/09、金沢
 18. 張 音実、井上瑞菜、海野瑞季、杉田 隆、ヒト皮膚の真菌マイクロバイオーーム -真菌と細菌の相互作用-、第 61 回日本医真菌学会総会・学術集会、2017/09、金沢
 19. 杉田 隆、皮膚マイクロバイオーームとしてのマラセチア、第 117 回日本皮膚科学会総会、2018/06、広島
 20. 杉田 隆、皮膚マイクロバイオーームの解析とその制御戦略、第 48 回北陸真菌懇談会、2018/07、金沢
 21. Cho O, Unno M, Sugita T. Comprehensive Analysis of the Microbiome of the Horny Plug, and Interaction of *Malassezia* Species and *Propionibacterium acnes* in Keratinocytes. 20th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) 2018, 2018/07, Amsterdam, The Netherlands
 22. Sugita T, Unno M, Cho O. Comprehensive Analysis of the microbiome of keratotic plugs, and interactions between *Malassezia* and *Propionibacterium (Cutibacterium) acnes*. 20th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) 2018, 2018/07, Amsterdam, The Netherlands
 23. 張 音実、海野瑞季、杉田 隆、角栓中の主要菌種 *Malassezia* と *Propionibacterium acnes* の正常ヒト表皮角化細胞での相互作用、第 62 回日本医真菌学会総会・学術集会、2018/09、東京
 24. 大久保友隆、張 音実、杉田 隆、カルシニューリン阻害薬が皮膚常在菌 *Malassezia* およびケラチノサイトに与える影響、第 62 回日本医真菌学会総会・学術集会、2018/09、東京
 25. 杉田 隆、シンポジウム：皮膚マイクロバイオーーム研究は何を明らかにしたか ~健康、疾病、そして宇宙、第 63 回日本放線菌学会学術講演会、2018/11、東京
 26. 加藤隼平、張 音実、小山真珠、大久保友隆、中嶋拓海、杉田 隆、皮膚マイクロバイオーーム *Staphylococcus aureus* とステロイド薬がヒト皮膚角化細胞に与える細胞障害性、日本薬学会第 139 年会、2019/03、千葉

〔図書〕(計1件)

1. 張 音実、杉田 隆:実験医学別冊・今すぐ始める!メタゲノム解析 実験プロトコール、第3章 4. 皮膚における真菌叢解析、pp 156-161、服部正平編集、羊土社、2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名: