

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：32684

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15524

研究課題名(和文) マイクロバイオーム解析に基づく難治性尋常性ざ瘡の個別化治療法開発と病態の理解

研究課題名(英文) Understanding of pathology intractable acne vulgaris based on microbiome analysis

研究代表者

張 音実 (Cho, Otomi)

明治薬科大学・薬学部・特任研究員

研究者番号：50573466

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)：角栓中のマイクロバイオームは、1) アクネ菌型、2) 細菌多様性型、3) マラセチア型に大別された。細菌多様性型由来の菌株は、尋常性ざ瘡の標準的治療薬であるクリンダマイシン、ドキシサイクリン、ミノサイクリンに低感受性であったが、マラセチア型群はケトコナゾール、ミコナゾールに感受性を示した。このことから、細菌多様性型が難治性となると考えられた。複数の菌種が存在した場合、ある細胞比率では炎症性サイトカイン産生が相乗的に増加あるいは減少した。このことが、症例により炎症能が異なり、また治療薬の応答性が異なる原因であると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尋常性ざ瘡はグラム陽性細菌であるアクネ菌を起因菌として発症する慢性炎症性の皮膚炎であるが、既存の抗菌薬に不応答な難治性尋常性ざ瘡が存在する。この原因が、アクネ菌のみではなく、多様性型と真菌型であることを明らかにした。また、存在する菌種により炎症誘導能が異なることも判明した。つまり、角栓のマイクロバイオームを解析することで難治性尋常性ざ瘡の個別化治療が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Microbiome in pus is divided into three types, 1) *P. acnes*-type, 2) Diversity-type, and 3) *Malassezia*-type. The strains obtained from the patients with diversity-type showed low sensitive to the standard treatments for acne vulgaris, clindamycin, doxycycline, and minocycline, whereas *Malassezia* was sensitive to ketoconazole and miconazole. It was considered that the diversity-type would be intractable. When multiple species were colonized, inflammatory cytokine production was synergistically increased or decreased at a certain cell ratio. This was considered to be the cause of the different inflammatory ability and the different responsiveness of the therapeutic drug depending on the case.

研究分野：免疫生物学

キーワード：尋常性ざ瘡 マイクロバイオーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

尋常性ざ瘡は、一般には「アクネ」あるいは「ニキビ」とも言われる思春期以降に顔面や胸背部に発症する慢性炎症性の皮膚炎である。毛包に皮脂がたまった初期症状を「面皰」、これが炎症性となると「丘疹」、より進行した場合は「膿疱」とよぶ。毛包中の皮脂腺に脂質代謝異常が生じ、これに毛包中に存在するマイクロバイオーームがリパーゼにより皮脂を分解しその分解産物が炎症を惹起する。同時に、マイクロバイオーームは炎症性サイトカイン産生(IL-1、IL-8やTNF-)も誘導する。原因となるマイクロバイオーームは、一般にはグラム陽性細菌であるアクネ菌(*Cutibacterium acnes*)と考えられている。日本皮膚科学会の治療ガイドラインによれば、アクネ菌の増殖抑制には克林ダマイシンの外用、ドキシサイクリンあるいはミノサイクリンの内服が最もエビデンスの高いレベルとして強く推奨されている。しかしながら、これらの抗菌薬投与に不応答な症例が存在する。これは、抗菌薬に対する耐性化の問題よりも、患者個人で異なる毛包マイクロバイオーームに対応した抗菌薬が投与されていないことが大きな原因であると考える。

2. 研究の目的

尋常性ざ瘡はグラム陽性細菌であるアクネ菌を起因菌として発症する慢性炎症性の皮膚炎であるが、既存の抗菌薬に不応答な難治性尋常性ざ瘡が存在する。先行研究からアクネ菌あるいは細菌を含まない毛包が存在することを明らかにした。従って、毛包中のマイクロバイオーームを明らかにし(診断)、この情報に基づいて抗菌薬を選択することは治療上の合理性がある(個別化治療)。本研究では、1) 患者毎の毛包マイクロバイオーームを網羅解析し、2) 適切な抗菌薬(細菌+真菌)を選択する。3) 難治性尋常性ざ瘡の病態の理解のために、脂腺細胞および皮膚角化細胞に対する炎症惹起の機序を免疫学的に明らかにする。以上の情報に基づいて難治性尋常性ざ瘡の個別化治療を目指した診断および治療の開発へと展開できる臨床薬学的統合情報を取得する。

3. 研究の方法

a) 角栓中のマイクロバイオーームの網羅的解析

角栓検体から DNA を抽出後、Illumina MiSeq を用いて網羅的に解析した。細菌マイクロバイオーームは 16S rRNA の V1-V3、真菌マイクロバイオーームは 26S rRNA の D1/D2 領域を解析に供した。得られたリードはクリーンアップ後に QIIME v2 および in house BLAST により同定した。多様性は Shannon diversity index で解析した。

b) 薬剤感受性試験

各々分離株について CLSI ガイドラインに準拠して抗細菌薬および抗真菌薬の感受性を測定した。

c) 角栓中の微生物種の局在

角栓を上下に分割し、それぞれを calcofluor white と PI で染色後、蛍光顕微鏡で観察した。

d) ケラチノサイト(NHEK)に対する免疫応答

細菌と *Malassezia* の共存状態がケラチノサイトに対してどのような免疫応答を示すか検討した。単独あるいは共存下での炎症性サイトカイン産生を ELISA および TLR の発現を RT-qPCR で調べた。

4. 研究成果

a) 角栓中のマイクロバイオーームの網羅的解析

真菌はいずれの検体でも *Malassezia restricta* が最も優位菌種で、*M. globosa* がこれに続いた。細菌は *Cutibacterium acnes* が優位であり、次いで *Bifidobacterium* であった。解析アルゴリズムを改変し詳細な角栓型別を行った。その結果、1) アクネ菌型、2) 細菌多様性型、3) マラセチア型に大別された。1)は従来より知られているが2)および3)は新規に得られた知見である。よって難治型のざ瘡は2) and/or 3)が原因である可能性が高い。

b) 薬剤感受性試験

多様性群由来分離株は、尋常性ざ瘡の標準的治療薬であるクリンダマイシン、ドキシサイクリン、ミノサイクリンに低感受性を示した。一方、*Malassezia* はケトコナゾール、ミコナゾールに感受性を示した。このことから、多様性型の症例には、従来の治療薬には抵抗性を示す可能性があることが示された。

c) 角栓中の微生物種の局在

真菌は外側に細菌は両側に存在していた。*Malassezia* は好気性、アクネ菌は嫌気性という菌の性状を反映している。すなわち、酸素分圧に起因していると考えられた。

e) ケラチノサイト(NHEK)に対する免疫応答

Bifidobacterium はアクネ菌が産生誘導する IL-8 を抑制した。一方で、*Malassezia* はアクネ菌が誘導する IL-6 / IL-8 産生を増加させたが、TLR2 には影響を与えなかった。さらに、*Malassezia* とアクネ菌の相乗効果を異なる MOI 比率で検討したところ、特定の MOI 比で IL6/IL8 の産生が有意に増加した。このことは、角栓に存在する菌種の組み合わせ、あるいは存在比率が炎症の進展に重要な役割を有することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3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 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	4. 巻 18
2. 論文標題 Inhibitory effects of Euphorbia supina on Propionibacterium acnes-induced skin inflammation in vitro and in vivo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Complement Altern. Med	6. 最初と最後の頁 263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12906-018-2320-8.	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 Higashide S, Cho O, Matsuda Y, Ogishima D, Kurakado S, Sugita T.	4. 巻 158
2. 論文標題 Rapid detection of Lactobacillus crispatus and Lactobacillus iners in vaginal specimens by loop-mediated isothermal amplification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Microbiol Methods	6. 最初と最後の頁 18-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mimet.2019.01.011.	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 杉田 隆、張 音実、高島昌子	4. 巻 45
2. 論文標題 真菌（病原性酵母）	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床と微生物	6. 最初と最後の頁 235-240
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 無
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 杉田 隆、張 音実、倉門早苗	4. 巻 45
2. 論文標題 病原真菌のゲノム解析から得られる情報	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 化学療法の領域	6. 最初と最後の頁 235-240
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 無
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 Unno M, Cho O, Sugita T	4. 巻 61
2. 論文標題 Inhibition of Propionibacterium acnes lipase activity by the antifungal agent ketoconazole	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Microbiol. Immunol	6. 最初と最後の頁 42-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12464.	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8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Cho O, Unno M, Sugita T
2. 発表標題 Comprehensive Analysis of the Microbiome of the Horny Plug, and Interaction of Malassezia Species and Propionibacterium acnes in Keratinocytes
3. 学会等名 20th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 張 音実、海野瑞季、杉田 隆
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第62回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 張 音実、海野瑞季、杉田 隆
2. 発表標題 角栓中のマイクロバイオーーム解析 - 真菌と細菌の正常ヒト表皮角化細胞での相互作用
3. 学会等名 第39回関東医真菌懇話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 張 音実、井上 瑞菜、海野 瑞季、杉田 隆
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第61回日本医真菌学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 海野瑞季、張 音実、杉田 隆
2. 発表標題 角栓中に存在するMalasseziaとPropionibacterium acnesの直接鏡検と相互作用
3. 学会等名 第61回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 張 音実、海野 瑞希、杉田 隆
2. 発表標題 角栓中のマイクロバイオーーム解析とセラチノサイトへ与える影響: Malassezia と Propionibacterium acnes
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上 瑞菜、張 音実、杉田 隆
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Cho O, Matsuda Y, Ogishima D, Inoue M, Sugita T
2. 発表標題 Microbiota in the skin of healthy Japanese individuals between the neonate and adolescent periods
3. 学会等名 15th International Congress of Mycology and Eukaryotic Microbiology, IUMS 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----