

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19544

研究課題名（和文）皮膚細菌叢による病原細菌ゲノム進化時の「進化的リスクマネジメント戦略」制御法

研究課題名（英文）Novel method for controlling "Evolutionary risk management strategy" during genome evolution of pathogenic bacterial by skin microbiota

研究代表者

松岡 悠美（Matsuoka, Yuumi）

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：10402067

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：軽表皮*S. aureus*感染マウスモデルを用いて、マウスにおける*S. aureus*のagr遺伝子領域の変異獲得モデルを確率した。この系を用いて、菌叢のメタトランスクリプトーム解析を行ったが、同手法においては本マウスモデルが適切では無いと考えられる結果であった。また、*in vitro*において、agr変異獲得のメカニズム解析を行った。agr遺伝子変異は、agr遺伝子発現が頻繁にON-OFFとなる条件で高率に誘導されることが研究から明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎は、先進国で小児の罹患率は15 - 20%にも達する。一方、途上国ではほとんど認められないという疾患特性から、皮膚バリア機能異常、アレルギー素因などの遺伝的要素に加え、古くからの衛生仮説に代表される環境要因が大きな役割を果たしていると考えられている疾患である。環境要因のひとつとして皮膚常在細菌と病原細菌である*S. aureus*の関与が近年注目されている。*S. aureus*は通常健康人の皮膚で増殖して病原性を発揮することはなく、このメカニズムを解析することで、アトピー性皮膚炎の病態を解明し、新規治療ターゲットの基盤を創出できる可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：Using the cutaneous *S. aureus*-infected mouse model, we established a mutation acquisition model for the agr gene region of *S. aureus* in mice. Using this system, we performed metatranscriptome analysis of bacterial flora, but the results suggest that this mouse model is not suitable for this method. In addition, we further analyzed the mechanism how *S. aureus* acquired agr mutation *in vitro*. Studies have shown that agr gene mutations are highly induced under conditions where agr gene expression is frequently turned on and off.

研究分野：皮膚免疫学、微生物学

キーワード：皮膚細菌叢 黄色ブドウ球菌 皮膚 細菌ゲノム トランスクリプトーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、常在細菌叢解析法は広く疾患の病態解明のため用いられ、細菌叢に限らず、真菌叢、ウイルス叢を内包した微生物叢解析を行うことが先端研究として注目されている。われわれ宿主を構成する細胞数を遥かに凌駕する数のこれらの共生体は“第2の指紋”と称されるほどユニークな多様性と保存性を兼ね備えている。しかしながら、常在細菌叢解析をベースにした疾患病態の解明がその多様性を切り口にした解析法であると捉え、その保存性を解析する方法はこれまでに確立されていない。ヒトにおける“指紋”の保存性を決定しているのがヒトゲノムであるように、細菌の“指紋”を決定しているのは細菌ゲノムである。そこで、細菌叢保存性を決定している細菌ゲノムの皮膚定着に関係する規定因子と、細菌叢および宿主との相互関係を明らかにすることで、従来の常在細菌叢解析とは異なる、多様性および保存性の両側面からの革新的な解析手法を確立する。

2. 研究の目的

本研究開発では、経表皮 *S. aureus* 感染マウスモデルを用いた宿主や常在細菌(叢)による *S. aureus* ゲノム進化と“進化的リスクマネージメント戦略”機構の制御系解析と共に排除のメカニズム解明を目指す

3. 研究の方法

1) 経表皮 *S. aureus* 感染マウスモデルを用いた *S. aureus* 排除過程における細菌叢解析および *S. aureus* ゲノム解析:

我々が確立した *S. aureus* 経表皮マウスモデルを改変し、*S. aureus* 排除時におこる常在細菌叢の変遷および、*S. aureus* のゲノム修飾パターンを経時的に解析する。我々の経表皮 *S. aureus* 感染モデルでは、フィルムドレッシング材を用い1週間菌液を皮膚に貼付させ炎症反応の惹起を観察するという方法をとっている。これは、マウス皮膚でもヒト同様 *S. aureus* は常在細菌としては存在せず、フィルムドレッシング材による密閉・湿潤環境を維持しないと、皮膚に *S. aureus* を維持することができないという予備実験段階で得られた知見に基づいており、実際、フィルムドレッシング剤を除去すると2-3週間の後にはほとんどの *S. aureus* が排除される。これは、マウス皮膚でもヒト同様 *S. aureus* は常在細菌としては存在せず、フィルムドレッシング材による密閉・湿潤環境を維持しないと、皮膚に *S. aureus* を維持することができないという予備実験段階で得られた知見に基づいており、実際、フィルムドレッシング剤を除去すると2-3週間の後にはほとんどの *S. aureus* が排除される。そこで、この排除過程を逆に利用することにより、排除過程の細菌叢解析を経時的に行う。サンプルの採取はスワブによる皮膚擦過で採取する。スワブにより採取したサンプルからバクテリア DNA を抽出する。同時に TSB や BHI アガープレート、および、卵黄添加マンニット食塩培地にて *S. aureus* 菌数の確認と、培養可能な常在細菌は純培養の上、16SrRNA-DNA シークエンスにて菌種を同定し、ライブラリーとして保存する。得られた *S. aureus* はイルミナ社の Miseq シークエンスにて全ゲノム情報を取得し、ヒト乳児で確認されたような、ゲノム修飾パターンが存在するかどうか、検討を行う。

2) 経表皮 *S. aureus* 感染マウスモデルを用いた *S. aureus* 排除過程における細菌および、宿主のメタトランスクリプトーム解析:

S. aureus のニッチを排除し増殖する常在性の細菌種を同定し、解析ターゲットとする。また、排除される過程で起こる *S. aureus* および常在細菌叢の AIP を含めた遺伝子発現の経時的変化をメタトランスクリプトーム解析により明らかにする。メタトランスクリプトーム解析は、サンプル中の複雑な微生物群によってコードされたすべての RNA を解析するため、病原微生物と常在細菌叢の相互作用を理解するのに最適である。同時に、メタトランスクリプトーム解析は、宿主由来産物をターゲットとした解析を並行して行う。これにより、病原体との宿主免疫系などの相互作用の理解も可能となる。解析のため、次世代シーケンサーを用いた RNA シークエンスを行う。これらの解析により、現在想定している常在性の *Staphylococcus* 属以外の細菌についても *S. aureus* 進化的リスクマネージメント戦略機構の抑制を起こすことができる由来産物を網羅的に解析することが可能である。

3) 経表皮 *S. aureus* 感染マウスモデルを用い制御因子の *in vivo* における役割解析: メタトランスクリプトーム解析などから得られた候補因子を発現する菌株と、*S. aureus* の相互作用について検討を行う。菌株の遺伝子をノックアウトするなどして、*S. aureus* の *agr* 発現

への影響を確認する。

4. 研究成果

1) 経表皮 *S. aureus* 感染マウスモデルを用いた *S. aureus* 排除過程における細菌叢解析および *S. aureus* ゲノム解析、*S. aureus* 排除過程における細菌および、宿主のメタトランスクリプトーム解析：

マウス皮膚に *S. aureus* を人工的に感染させ、その後同株を 10 週間まで追跡し、変異が獲得されるかを検討した。すると、マウス皮膚上でも、皮膚からの排除とともに、*S. aureus* の *agr* 遺伝子領域に変異が獲得されることがわかった。そこで、競合する微生物を同定するため、菌叢解析、および菌株の単離を行ったところ、マウスでは *S. lentus* のいくつかの菌株が存在する場合に、皮膚からの排除が促進され、*S. aureus* の *agr* ゲノム上に変異が誘導されていた。変異を、サンガーシークエンスおよび、次世代シークエンサーによる全ゲノム解析で解析したところ、塩基の挿入や欠失により機能喪失が起こっていると考えられた。つぎに実際に、変異の機能を確認するため、Agr 支配領域から発現する RNA の遺伝子発現、および、Agr 発現依存性にルシフェラーゼを発現する菌株にそれぞれの皮膚から単離した *S. aureus* の培養上清を添加し、発現を確認した。この実験により、マウス皮膚上で確認された *agr* 変異は、機能喪失型の変異であることが、ヒトでの我々の先行研究と同様に確認できた。

つぎに、*S. aureus* 排除機構に焦点を当て、マウスモデルを用いて常在細菌叢解析、メタトランスクリプトーム解析を上記モデルで行った。すると、メタトランスクリプトーム解析では、人工的に *S. aureus* を感染させた場合に *S. aureus* の菌数が多くなりすぎて、メタトランスクリプトーム解析を行う場合に、殆どのリードが *S. aureus* 由来となってしまう、宿主常在微生物の遺伝子発現の解析には適していないということが明らかとなった。そこで、本研究に関しては、解析対象のマウスを、人工的な *S. aureus* 感染マウスモデルから、アトピー性皮膚炎に類似した皮膚炎を自然発症するマウスにおける *S. aureus* に変更吸える必要があると考えられた。

2) in vitro における *S. aureus* 変異誘導のメカニズム解析：

まず、*agr* 変異が獲得される理由について、in vitro モデルで検証を行い、これが細菌ゲノム上の、遺伝子の転写と複製の競合によるものであることを明らかにした。すなわち、Agr クオラムセンシングが頻繁に ON-OFF となるような常在細菌との競合が生じるような皮膚などの環境下では、クオラムセンシングが頻繁に ON-OFF となるため、*S. aureus* ゲノムの転写と複製の競合による不安定化が引き起こされ、変異が誘導されている可能性を見出した。一方で、*agr* 遺伝子発現が一定レベル抑制されている条件などでは、変異の獲得が起こる頻度は減少した。この in vitro モデルについては、現在論文として投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Baldry M, Nakamura Y, Nakagawa S, Frees D, Matsue H, Nunez G, Ingmer H.	4. 巻 218(6)
2. 論文標題 Application of an agr-Specific Antivirulence Compound as Therapy for Staphylococcus aureus-Induced Inflammatory Skin Disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Infect Dis	6. 最初と最後の頁 1009-1013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/infdis/jiy259.	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuumi Matsuoka-Nakamura
2. 発表標題 Cutaneous retention of Staphylococcus agr virulence promotes atopic dermatitis development
3. 学会等名 The 2nd Chiba University-UC San Diego Symposium “Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine”, (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakamura Y, Takahashi H, Takaya A, Inoue Y, Katayama Y, Kusuya Y, Oguma R, Yamade F, Shimojo N, Nunez G, Matsue H
2. 発表標題 Cutaneous acquisition of Staphylococcus-sensing agr mutations protects against atopic dermatitis
3. 学会等名 International Eczema Council at SID meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakamura Y, Takahashi H, Takaya A, Inoue Y, Katayama Y, Kusuya Y, Oguma R, Yamaide F, Shimojo N, Nunez G, Matsue H
2. 発表標題 Protection against atopic dermatitis through acquisition of Staphylococcus quorum-sensing agr mutations in the skin
3. 学会等名 第42回日本研究皮膚科学会
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
--	---------------------------	-----------------------	----