

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07208

研究課題名(和文) マイクロバイオームからひも解く難治性アトピー性皮膚炎の増悪機序の解明と疾患制御

研究課題名(英文) Elucidation of exacerbation mechanisms and disease control of atopic dermatitis unraveled from the microbiome

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：3次元ケラチノサイトモデルを用いた検討から、マラセチアはアトピー性皮膚炎の増悪にも抑制にも関与する可能性が示された。また新規に分離したDelftia属菌は、健康皮膚の主要構成菌種であるコアグラウゼ陰性ブドウ球菌の増殖を阻害することで黄色ブドウ球菌へのディスバイオーシスを誘導していると考えられた。増悪因子である黄色ブドウ球菌による炎症誘発が真菌Malasseziaにより抑制されることが明らかになった。以上、アトピー性皮膚炎の増悪機序解明と治療に対する新たな視点を提供できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、アトピー性皮膚炎の病態におけるマイクロバイオームの役割を明らかにした。真菌マラセチアと黄色ブドウ球菌の相互作用、新たに同定されたDelftia属菌の影響、マラセチアが炎症を抑制する能力の検証は、皮膚疾患の発症・増悪機序を理解するための基盤となった。さらに、遺伝子欠損株の作製とその評価は、疾患の分子メカニズムの解明に寄与した。

研究成果の概要(英文)：We examined the skin immune response of Malassezia, a fungi constituting one of the exacerbating microbiomes of atopic dermatitis, and assessed the impact on the microbiome of worsening microbes newly isolated from the skin of patients with atopic dermatitis. As a result, Malassezia was indicated as potentially contributing to both the exacerbation and suppression of atopic dermatitis. The newly isolated Delftia species were thought to induce dysbiosis toward Staphylococcus aureus by inhibiting the growth of coagulase-negative staphylococci, a major component of normal skin. Furthermore, by focusing on the interaction between bacteria and fungi, it became clear that inflammation induced by Staphylococcus aureus, an exacerbating factor, is suppressed by the fungus Malassezia.

研究分野：微生物学

キーワード：マイクロバイオーム アトピー性皮膚炎 マラセチア

1．研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は、国民の約 1,000 万人が罹患しており、国民病的な様相を呈している。この疾患の中には、既存の治療薬に反応しない難治性型が存在し、その発症割合は上昇していることから新たな治療薬の開発は急務となる。アトピー性皮膚炎患者の皮膚はマイクロバイームが破綻している状態であるため、それを適正化することで治療に寄与できると考えられる。

2．研究の目的

難治性アトピー性皮膚炎患者の皮膚は、他の疾患では見られない異常細菌によって占有され、マイクロバイームが破綻している。そこで、この異常細菌を排除し、適正なマイクロバイームに再構築することで治療に寄与できると考えた。そのために、難治性アトピー性皮膚炎患者の病変部に特異的に存在する新たに発見された異常細菌(悪玉菌)が引き起こす炎症の機序を解明し、破綻したマイクロバイームを再構築するための移植用菌株(カクテル)を作製して、マイクロバイーム移植療法の確立に向けた情報提供を目指す。

3．研究の方法

- 1) 真菌マラセチアによる皮膚免疫応答の検討: 3次元ケラチノサイトモデルを作製し、マラセチアを添加後、24時間後の炎症性サイトカインと抗菌ペプチド産生を検討した。
- 2) アトピー性皮膚炎患者の皮膚から新たに分離した悪化微生物のマイクロバイームへの影響: 16S rRNA および全ゲノム解析から該当菌株を同定した。また、該当菌株がブドウ球菌に与える影響を調べるために、その解糖系、TCA 回路関連遺伝子の発現と ROS 産生を検討した。
- 3) マイクロバイームとしての細菌と真菌の相互作用: 真菌マラセチアの細胞壁、細胞膜などの成分を分画し、NF- κ B 経路と Caspase I 経路への作用を検討した。
- 4) マラセチアの遺伝子欠損株の作製: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) 法を用いて、形質転換体を作製した。

4．研究成果

- 1) 真菌マラセチアの皮膚免疫応答の検討: 本試験で作製した三次元培養表皮モデルによる検討から、IL-8 や HBD-2 の産生が抑制され、マラセチアの表皮バリアや皮膚免疫応答を評価できることが示された。さらに、このモデルを用いて、マラセチアと増悪因子である黄色ブドウ球菌を共培養し、RNA-seq による網羅的な遺伝子発現と炎症性サイトカイン産生を調べた。その結果、マラセチア存在下では、黄色ブドウ球菌の病原因子関連遺伝子の発現が減少し、また、マラセチア存在下では黄色ブドウ球菌単独で誘導される炎症性サイトカイン発現が抑制された。これらの結果から、マラセチアはアトピー性皮膚炎の増悪に対して抑制的に作用することが示唆された。
- 2) アトピー性皮膚炎患者の皮膚から新たに分離した悪化微生物のマイクロバイームへの影響: 該当分離株は分類学的に *Delftia* 属菌と同定された。*Delftia* の培養上清に *S. epidermidis* を曝露させると、*S. epidermidis* の解糖系及び TCA 回路関連遺伝子の発現と ROS 産生が亢進した。これらの結果から、該当菌株が健常皮膚の主要な構成菌種であるコアグラゼ陰性ブドウ球菌の増殖を阻害し、黄色ブドウ球菌に対するディスバイオーシスを誘導する可能性が示唆された。
- 3) マイクロバイームとしての細菌と真菌の相互作用: マラセチアの特成分が NF- κ B 経路と Caspase I 経路を抑制した。アトピー性皮膚炎患者の血清中には *Malassezia* 特異的な IgE 抗体が産生されることから、*Malassezia* が病態を増悪させる可能性がある。一方で、特定の存在比率で

は、*Malassezia* が炎症を抑制する可能性も示唆された。したがって、皮膚マイクロバイオーームが関与する疾患においては、マイクロバイオーームの破綻、ディスバイオーシスの是正が重要であることが考えられた。

4) マラセチアの遺伝子欠損株の作製：*Malassezia restricta* と *Malassezia globosa* の遺伝子欠損株を作製することに初めて成功した。この方法を用いてマラセチアの菌体外分泌タンパク質、細胞構成成分、およびシグナル伝達系をコードする遺伝子を網羅的に欠損させた。欠損株を用いて細胞培養系で評価した結果、特定の成分が炎症応答に寄与していることが明らかになった。

以上の成果から、マラセチアの特典成分を用いることで、アトピー性皮膚炎の増悪菌種である黄色ブドウ球菌による炎症応答を抑制することが可能であることが明らかになった。これは、移植用カクテル成分の候補となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ohkubo T, Matsumoto Y, Cho O, Ogasawara Y, Sugita T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Delftia acidovorans secretes substances that inhibit the growth of Staphylococcus epidermidis through TCA cycle-triggered ROS production.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	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） 10.1371/journal.pone.0253618	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 杉田 隆、張 音実	4. 巻 313
2. 論文標題 皮膚とマイクロバイオーム	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Monthly Book Derma	6. 最初と最後の頁 1-7
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 Matsumoto Y, Nakashima T, Cho O, Ohkubo T, Kato J, Sugita T	4. 巻 528
2. 論文標題 Pyruvate-triggered TCA cycle regulation in Staphylococcus aureus promotes tolerance to betamethasone valerate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and biophysical research communications	6. 最初と最後の頁 318-321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.05.035.	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 Ohkubo T, Matsumoto, Cho O, Ogasawara Y, Sugita T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete genome sequence of Citrobacter koseri Strain MPUCK001	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiol. Resour. Announc	6. 最初と最後の頁 e01128-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01228-20.	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 Cho O, Matsumoto Y, Yamada T, Sugita T	4. 巻 2
2. 論文標題 Agrobacterium tumefaciens-mediated gene transfer in a major human skin commensal fungus, <i>Malassezia globosa</i> .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Appl. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 827-836
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/applmicrobiol2040063	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 Cho O, Matsumoto Y, Yamada T, Sugita T	4. 巻 60
2. 論文標題 Establishment of a gene recombination method for a major human skin commensal fungus, <i>Malassezia restricta</i> , using <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -mediated gene transfer system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Med. Mycolog	6. 最初と最後の頁 myac077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mmy/myac077.	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19件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 張 音実、杉田 隆
2. 発表標題 皮膚マイクロバイオームとしての <i>Malassezia</i> が黄色ブドウ球菌の遺伝子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第65回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大久保友隆、松本靖彦、張 音実、小笠原裕樹、杉田 隆
2. 発表標題 皮膚常在菌である <i>Staphylococcus epidermidis</i> に対する <i>Delftia acidovorans</i> の増殖抑制作用
3. 学会等名 第 33 回 微生物シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大久保友隆、松本靖彦、杉田 隆
2. 発表標題 Delftia acidovorans の Staphylococcus epidermidis に対する増殖抑制作用におけるアルカリストレスの関与
3. 学会等名 第104回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田望歩、張 音実、杉田 隆
2. 発表標題 三次元培養表皮モデルを用いたMalassezia の皮膚免疫応答
3. 学会等名 第65回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 張 音実、松本靖彦、杉田 隆
2. 発表標題 皮膚真菌マイクロバイオームの優位菌種であるMalassezia restrictaおよびM. globosaの遺伝子組換え法の確立
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大久保友隆、松本靖彦、小笠原裕樹、杉田 隆
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎に關与するブドウ球菌属細菌に対してDelftia acidovoransが示す増殖抑制作用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田望歩、張 音実、杉田 隆
2. 発表標題 三次元培養表皮モデルを用いたヒト皮膚常在真菌 <i>Malassezia restricta</i> に対する皮膚免疫応答
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊香那子、張 音実、杉田 隆
2. 発表標題 ステロイド薬存在下での皮膚マイクロバイオーームとしての <i>Malassezia</i> と <i>Cutibacterium acnes</i> の相互作用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東 澗那、張 音実、杉田 隆
2. 発表標題 癬風の病態に関与する皮膚常在真菌 <i>Malassezia furfur</i> のMAPK-mating経路を介した菌糸誘導の制御
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉田 隆、張音実
2. 発表標題 侵襲性酵母様真菌感染症に対する診断・治療法の開発 - 皮膚常在菌 <i>Malassezia</i> が引き起こす感染症に二形成変換が関与するか
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大久保友隆、松本靖彦、張 音実、杉田 隆
2. 発表標題 Delftia属細菌はアルカリストレスを介してROS産生を誘導することで表皮ブドウ球菌の増殖を抑制する
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊香那子、張 音実、大久保友隆、加藤隼平、杉田 隆
2. 発表標題 皮膚マイクロバイオームとしてのMalassezia はToll様受容体を介したアクネ菌の炎症を抑制するか？
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大久保友隆、松本靖彦、張 音実、加藤隼平、小笠原裕樹、杉田 隆
2. 発表標題 Delftia acidovoransが放出する物質は、TCA回路の活性化を介したROSの産生誘導によりStaphylococcus epidermidisの増殖を抑制する
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大久保友隆、松本靖彦、張 音実、杉田 隆
2. 発表標題 Delftia 属細菌のStaphylococcus epidermidis に対するTCA回路の活性化を介した増殖抑制作用
3. 学会等名 第103回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤隼平、張 音実、大久保友隆、渡邊香那子、杉田 隆
2. 発表標題 皮膚常在菌Malassezia による黄色ブドウ球菌由来のIL-18 の産生抑制
3. 学会等名 第64回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 張 音実、加藤隼平、渡邊香那子、大久保友隆、杉田 隆
2. 発表標題 皮膚常在真菌Malassezia とC. acnes の正常ヒト表皮角化細胞での相互作用
3. 学会等名 第64回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大久保友隆、張 音実、加藤隼平、杉田 隆
2. 発表標題 生死を考慮した皮膚マイクロバイオームの網羅的解析
3. 学会等名 第64回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤隼平、張 音実、大久保友隆、杉田 隆
2. 発表標題 Malassezia とS. aureus 共培養におけるNHEK の免疫応答
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大久保友隆、張 音実、松本靖彦、加藤隼平、小笠原裕樹、杉田 隆
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎への関与が示唆されるDelftia属菌
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会、2020/09
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 杉田 隆、張 音実	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 4
3. 書名 進化する皮膚科学 機能研究・臨床・評価・製品開発の最前線	

1. 著者名 杉田隆、張音実	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 7
3. 書名 ヒト常在菌叢と生理機能・全身疾患	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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