

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17316

研究課題名（和文）遺伝性角化異常症における新規細菌叢特異的治療開発への戦略

研究課題名（英文）Strategies to innovate novel microbiome-based therapies for inherited keratinization disorders

研究代表者

村瀬 千晶（Murase, Chiaki）

名古屋大学・医学系研究科・客員研究者

研究者番号：10846611

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）：採取した皮膚細菌叢の検体につき様々なDNA抽出方法での条件検討を行い、最も効率的に皮膚常在細菌叢のDNAが得られる方法を確立し、DNA抽出を行った。得られたDNAを用いてMiSeqで16S rRNA解析を行い、個々の症例における菌叢解析の結果を集積した。細菌叢全体の遺伝子情報を解明することで、病型や臨床症状に合った細菌叢構成の違いや特徴を評価した。多様な病型の検体を採取し、16S rRNA解析を行うことができたが、個々の症例数としては十分でなく、統合的なデータ解析を得ることは困難であった。研究期間終了後も、引き続き個々の病型や病型間の比較のためのデータ解析を進めていく方針である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では遺伝性角化異常症において、16S rRNA解析の手法を用いて皮膚マイクロバイオームの解析を行うことで、細菌叢特異的治療法の開発に直結する基礎的データを得ることを目的とした。外界から皮膚を守る皮膚バリア機能に生まれつき障害を有する、遺伝性角化異常症において、皮膚細菌叢（マイクロバイオーム）が与える影響に着目した。遺伝性角化異常症患者の皮膚では、健康人の皮膚と比較して、バリア機能の障害から皮膚炎を起こしやすく、細菌の侵入が容易となるため皮膚感染症に罹患しやすい。臨床症状の変化に伴う皮膚マイクロバイオームの変化を観察・評価することは、将来的な細菌叢特異的治療法への応用への基礎となる。

研究成果の概要（英文）：We analysed a variety of methods to extract DNA from the microbiota on the skin, and performed the extraction using the most efficient method. 16S rRNA analysis was performed on the collected DNA through MiSeq, to determine the microbiomic status of each case. By investigating the genetic information of microbiota as a whole, we were able to understand the differences and characteristics associated with disease and clinical symptoms. Although we were able to perform 16S rRNA analysis from samples from a wide range of diseases, unfortunately we were unable to collect an adequate number of samples for each disease, and hence it was difficult to come to an overall conclusion. We aim to continue to collect samples and analyse data to compare the microbiota between cases of the same disease, and also between different diseases.

研究分野：遺伝性角化異常症 皮膚軟部組織感染症 皮膚バリア機能障害

キーワード：遺伝性角化異常症 皮膚細菌叢 皮膚バリア機能障害

1. 研究開始当初の背景

細菌の存在を証明するにあたり、培養することができない細菌は多い。局所に存在する細菌由来遺伝子の配列を調べることで、培養が難しい細菌や、未同定菌を多数含む細菌叢を、菌を単離することなくまとめてそのゲノムを抽出して塩基配列を決定し、把握する分子生物学的的方法として、マイクロバイオーム解析が行われている。

近年、健康人の皮膚表面の全微生物 DNA を直接シーケンスして大量のゲノム情報を得て、メタゲノム解析を行った研究が報告されている(図1)。

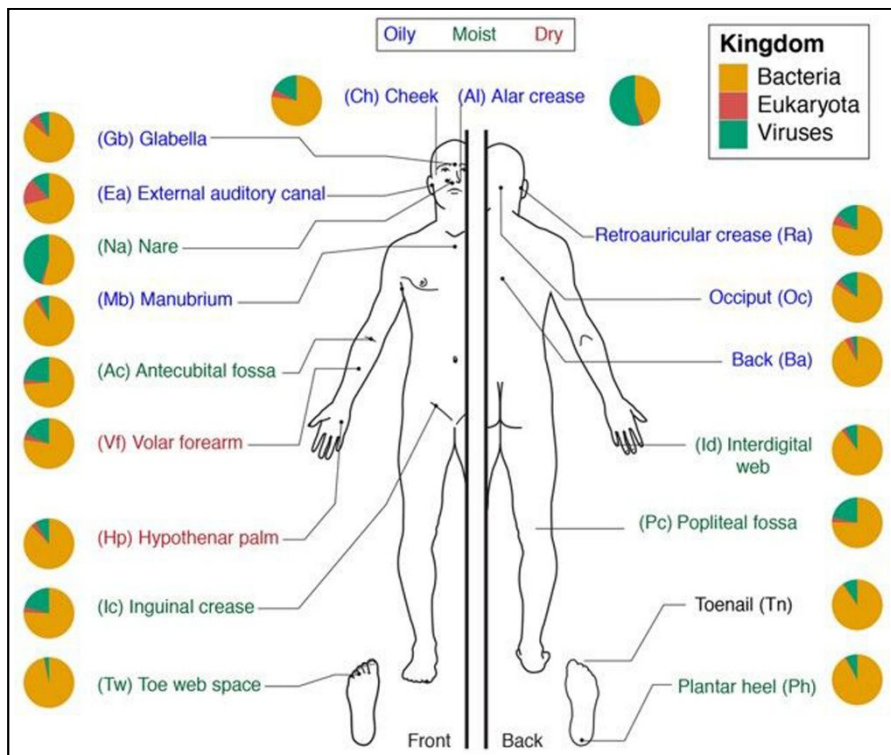


図1. 身体部位による皮膚微生物叢構成の違い

皮膚常在細菌叢は、有害な微生物の定着を防ぐとともに、皮膚免疫システムの調節に影響することが明らかになっており、健康な細菌叢を維持することが皮膚の恒常性の維持、皮膚疾患の発症抑制に重要と考えられている。健康皮膚表面では常在細菌叢の多様性が保たれているが、皮膚炎の状態下などでバランスが破綻すると、多様性が失われた状態(ディスバイオーシス)となる。

遺伝性角化異常症において、皮膚バリア機能障害の重症度に影響を与える病因遺伝子の変異や病型と、皮膚マイクロバイオームには関連性があるのかを解明したいと考えた。特に、遺伝性角化異常症のなかで最も重症度の高い病型である道化師様魚鱗癬(図2)を含む先天性魚鱗癬では、日常生活を送ることが困難なほど、極端な皮膚バリア機能障害を呈し、細菌の二次感染が合併症や後遺症の原因となることが多い。先天性魚鱗癬は稀少疾患であるため、これまで皮膚マイクロバイオームの研究は進んでこなかったが、治療経過や予後に影響を与えるマイクロバイオームを解明することは重要であると考え、今回の研究計画を立案した。



図2. 道化師様魚鱗癬の臨床

2. 研究の目的

本研究は以下の2点を目的とし、遺伝性角化異常症における皮膚マイクロバイオームの役割と臨床的意義について検証する。

先天性魚鱗癬を含めた、遺伝性角化異常症における遺伝的背景と、皮膚マイクロバイオームとの関連を明らかにする。

遺伝性角化異常症の増悪時における皮膚マイクロバイオームの変化を解析し、増悪に関わるディスバイオーシスを予防、治療する方法を検討する。

3. 研究の方法

過去に当科で遺伝子変異を同定し、遺伝子診断がついている遺伝性角化異常症患者を中心に、患者の皮膚を滅菌綿棒（スワブ）で擦過するスワブ法を用いて、皮膚表面の細菌を採取する（図3）。検体の採取は、皮膚炎の起きている時期と炎症の治まっている時期、患部と健常部など、複数箇所から複数回にわたり、採取を行う。採取した検体は速やかに冷却し、DNAを抽出する。マイクロバイオームの解析方法としては、微生物間で高度に保存されている領域（16SリボソームRNA（16S rRNA）遺伝子）の16S

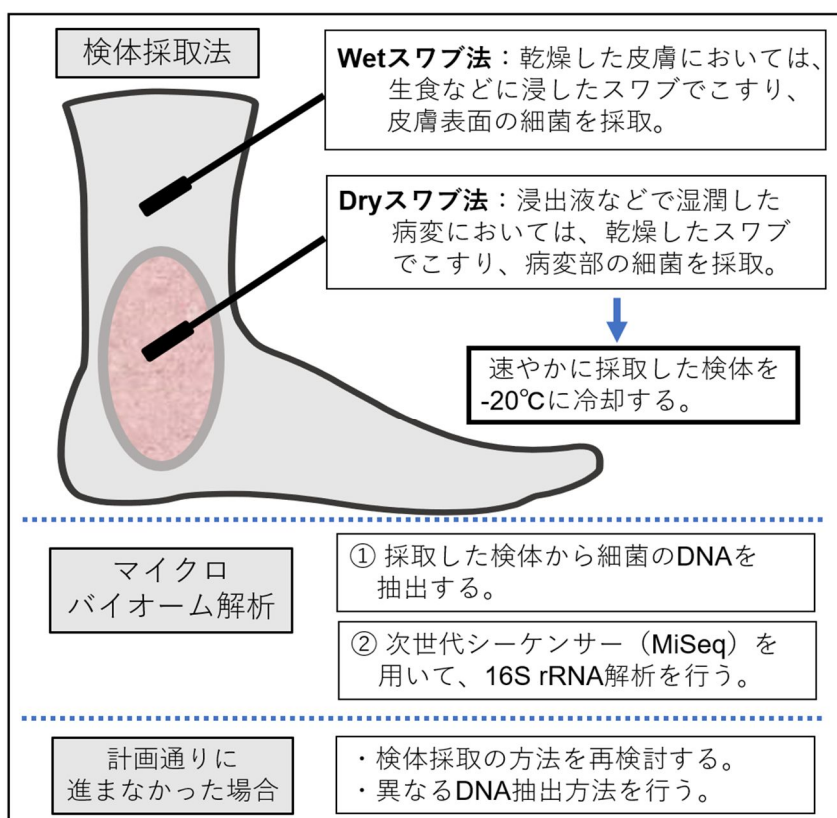


図3. 皮膚マイクロバイオーム解析の方法

アンプリコンの配列データをシーケンスする。次世代シーケンサーはMiSeqを用いて、シーケンスを行う。細菌叢全体の遺伝子情報を解明することで、病型や臨床症状に応じた細菌叢構成の違いや特徴を解明する。患者の皮膚バリア破綻の指標としては、Transepidermal Water Loss（TEWL）を用いる。角層の脂質の構成を評価するためには、セロテープを使用して角層の採取を行う、テープストリッピング法を用いる。

4. 研究成果

外界から皮膚を守る皮膚バリア機能に生まれつき障害を有する、遺伝性角化異常症において、マイクロバイオームが与える影響に着目した。遺伝性角化異常症患者の皮膚では、健康人の皮膚と比較して、バリア機能の障害から皮膚炎を起こしやすく、細菌の侵入が容易となるため皮膚感染症に罹患しやすい。過去に名古屋大学医学部附属病院皮膚科で遺伝子変異を同定し、遺伝子診断がついている遺伝性角化異常症患者を中心に、患者の皮膚を滅菌綿棒

(スワブ)で擦過するスワブ法を用いて、皮膚表面の細菌を採取した。検体の採取は、皮膚炎の起きている時期と炎症の治まっている時期、患部と健常部など、複数個所から複数回にわたり、採取を行った。採取した検体は速やかに冷却し、細菌の細胞壁をビーズ破壊した後、DNAを抽出した。マイクロバイオームの解析方法としては、16S rRNA 遺伝子の 16S アンプリコンの配列データをシーケンスした。次世代シーケンサーは MiSeq を用いて、シーケンスを行った。患者の皮膚バリア破綻の指標として、Transepidermal Water Loss (TEWL) を記録した。角層の脂質の構成を評価するために、スワブ法で細菌叢を検体採取した部位の反対側より、セロテープを使用して角層の採取を行い、テープストリッピング法を用いて脂質の構成を評価した。初年度は、適切な検体採取と解析方法を確立するため、遺伝性角化異常症のうち、まずは少数の病型において皮膚マイクロバイオームの解析を行った。採取した皮膚常在菌の検体につき、様々な DNA 抽出方法での条件検討を行い、最も効率的に皮膚常在細菌叢の DNA が得られる条件検討を行った。得られた DNA を用いて、実際に MiSeq で 16S rRNA 解析を行い、個々の症例における菌叢解析の結果を集積した。次年度は、前年度の研究期間に採取した皮膚細菌叢の検体につき、条件検討を行った DNA 抽出方法で、DNA 抽出を行った。最終年度は、得られた DNA を用いて、MiSeq で 16S rRNA 解析を行い、個々の症例における菌叢解析の結果を集積した。細菌叢全体の遺伝子情報を解明することで、病型や臨床症状に応じた細菌叢構成の違いや特徴を評価した。多様な病型の検体を採取し、16S rRNA 解析を行うことができたが、個々の症例数としては十分でなく、統合的なデータ解析を得ることは困難であった。研究期間終了後も、引き続き個々の病型や病型間の比較のためのデータ解析を進めていく方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学大学院医学系研究科皮膚科学分野のホームページ
<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/derma/>

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