

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2016
課題番号：26860902
研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いたスキンマイクロバイオームの解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文)Analysis of skin microbiome using NGS technology and development of novel treatment

研究代表者
富田 秀太(Shuta, Tomida)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：10372111
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：NGSを用いた高解像度メタゲノム解析手法に関する検討を行い、高い再現性をもって細菌叢解析を行う一連の解析フローを構築する事に成功した。また、ファージ接種に対し広く耐性を示すアクネ菌亜種の高精度ドラフトゲノム配列解析の結果から、耐性メカニズムの獲得に寄与すると考えられる特徴的な遺伝子配列を見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a series of protocol to analyze skin microbiome with highly reproducible manner using NGS, providing the basic idea of skin microbiome taken from Japanese people. In addition, based on the highly accurate draft genomes of the bacteriophages of *Propionibacterium acnes*, we succeeded in extraction of unique genome sequences that could affect the sensitivity to the phage infection. These results could shed light on the development of novel treatment against drug resistant *P. acnes*

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：細菌叢 NGS 皮膚 ニキビ 比較ゲノム

1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚は共生細菌群との適切な相互作用を利用することにより、正常なバリアとして機能する健康維持に不可欠な器官である。しかしながら、皮膚の共生細菌叢(スキンマイクロバイオーム)の全貌が明らかになっておらず、我々宿主と共生細菌との相互作用のメカニズム、および疾患発症メカニズムの詳細は未だに解明されていない。

(2) しかしながら近年、サンプルから直接ゲノム DNA を抽出するメタゲノム解析手法と、塩基配列解析技術(シーケンサー)の著しい向上があいまって、皮膚や腸内のマイクロバイオームの解明とその機能解析が飛躍的に進歩している。欧州では腸内細菌の解析を目的として MetaHIT を立ち上げ、その解析を精力的に推し進め、Enterotype(エンテロタイプ:腸内細菌叢型)の解明など目覚ましい成果をあげている。一方米国では Human Microbiome Project (HMP) を立ち上げ、腸内細菌叢のみならず、皮膚や口腔内などのマイクロバイオームの網羅的な解明を目指してきた。

(3) 米国ヒトゲノム研究所の Segre 教授らのグループはアレルギー性皮膚炎の解析を行い、増悪期には黄色ブドウ球菌が支配的にスキンマイクロバイオーム中で増殖する事を報告した(Hong H. et al. 2013 Genome Research)。NY 大の Blaser 教授らのグループは乾癬のスキンマイクロバイオーム研究を展開している。

(4) 一方で、本邦ではヒトゲノム解析計画後、シーケンス技術の新規開発と応用研究の停滞があいまって、マイクロバイオーム研究という今後の発展が見込まれる成長分野において、欧米の後塵を拝する状況となっている。特に次世代シーケンサーをスキンマイクロバイオーム研究に応用した分野での報告は皆無であり、本研究分野の立ち上げは緊急の課題である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では一般的な皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎・乾癬・ざ瘡(ニキビ)患者、およびコントロール群の日本人スキンマイクロバイオームを解析し、細菌叢のカタログを作成するとともに、治療前後での解析から疾患の発症・増悪・治癒との関連細菌の役割を解明する。

(2) 日本人ざ瘡患者のスキンマイクロバイオームを解析し、病原性亜種である RT4, RT5, RT8 型株などの存在の有無を解明する。さらに、NGS を用いた全ゲノム解析から同定した病原性亜種 RT8 に特異的な配列(ターゲット配列)に対する特異的抗体の作成とその効果判定を行い、病原性亜種に特異的な阻害効果を検証するとともに、共培養実験系により、良性亜種 RT6 型株を用いた RT8 型株の増殖抑制効果についても検証する。

(3) 本邦の乾癬患者は 10 万人、罹患率は

0.1% (1/1000 人)と推定されており、2.0% 前後の欧米人の罹患率と比較して著しく低い傾向を示している。このことから、日本人乾癬患者の治療前後でのスキンマイクロバイオームおよび、コントロール群、さらに、欧米人のスキンマイクロバイオームを比較することで、疾患と関連する病原性細菌種の同定と治療的効果を示す良性細菌種の同定を行う。

(4) アトピー性皮膚炎患者のスキンマイクロバイオームを解析するとともに、アトピー性皮膚炎の増悪との関連性が指摘されている黄色ブドウ球菌を中心に、治療前後での亜種(株)レベルの解析を行い、悪性亜種の同定、さらに NGS を用いたターゲット配列の同定を検討する。

3. 研究の方法

本研究では日本人の皮膚のマイクロバイオームを解析し、疾患の増悪・治癒と関連する細菌種とその亜種(株)を同定することにより、新規治療法の有効性を検討する。

年齢と性別のマッチングを考慮して、健常者、アトピー性皮膚炎患者、ニキビ患者、乾癬患者から皮膚のサンプルを収集する。

ゲノム DNA を抽出後、次世代シーケンサー、および第三世代を用いて、16S rRNA 遺伝子の部分および全長配列を対象にメタゲノム解析を実施する。さらに、黄色ブドウ球菌・表皮ブドウ球菌・アクネ菌等の常在菌、および新規病原性細菌に対して全ゲノムシーケンスを実施し、亜種特異的な遺伝子配列(ターゲット配列)の同定を行う。

新規治療法の準備と検討として、RT4 型・5 型アクネ菌は 16S rRNA 配列の変異から、抗生物質耐性を示す。その為にこの亜種を保有している患者には、抗生物質を用いた治療は有効ではない。申請者は以下に示す研究協力体制を構築することで、本研究課題の 2 つ目のポイントとなる新規治療法の開発について、その準備と検討を進める。

RT4 型・5 型・8 型に対する特異的抗体の作成と効果測定(Li 教授(UCLA)との研究協力)。我々は次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行う事によって、RT4 型・5 型・8 型に特異的な遺伝子およびその配列を解明している。具体的には、領域 1,2 には病原菌毒素の配列が含まれている。また領域 3 には、宿主細胞との接着に必須な遺伝子が含まれている。これら特異的遺伝子、およびその翻訳タンパクをターゲットとした抗体を作成する事により、病原性株を特異的に抑制する治療法が可能となる。

治療関連株 RT6 型株を用いた直接的増殖抑制効果(プロバイオティクス効果)。

計 101 サンプル、31,000 リードのほぼ完全長の 16S rRNA を解析した結果から、RT6 型株は有意に健常者(コントロール群)のスキンマイクロバイオームに相関している。また全ゲノム解析結果からもそれを支持する

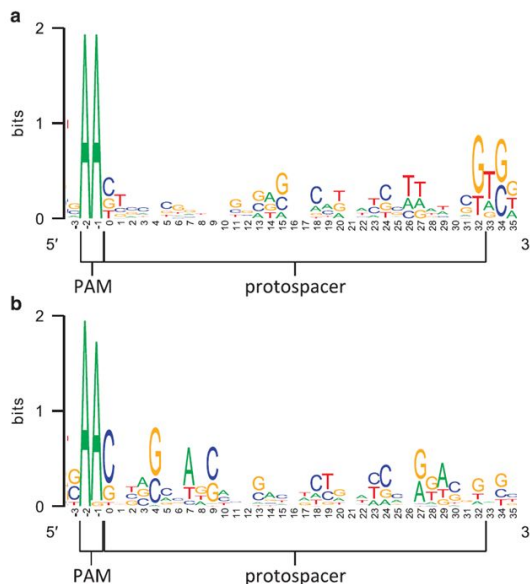
結果が得られている。具体的には、治療関連株 RT6 型株では、リパーゼ遺伝子に変異があり、脂質分解活性が低いことが明らかとなっている。そこで、治療関連株 RT6 型株を用いた RT4 型・5 型・8 型との共培養実験により、直接的増殖抑制効果の有無を確認する。

4. 研究成果

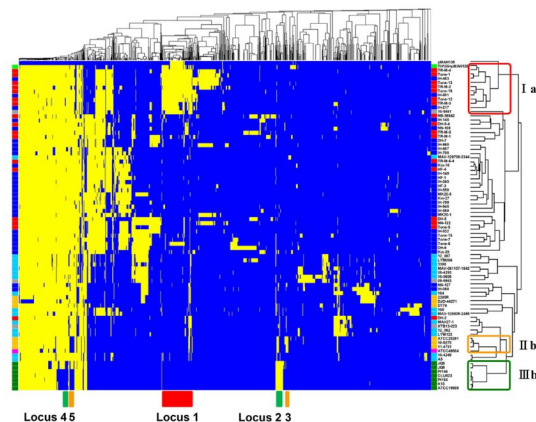
(1) 臨床現場でのサンプリングを想定し、細菌叢の解析系を確立すべく、サンプリング手法、洗顔の影響やサンプリング箇所の検討を実施し、再現性をもってサンプルの抽出を行える条件の検討を行った。具体的には、サンプリング手法として、粘着テープ採取法・綿棒採取法の検討をおこない、粘着テープ採取法の場合、粘着テープ由来の物質によりサンプルからの DNA 抽出に影響があること、使用する綿棒の材質（綿、合成繊維）によってサンプリングの利便性（材質による綿棒の先端の耐久性）が異なることが明らかとなった。また、同一被検者の右ほほから細菌叢のサンプリングを実施した後に洗顔を実施し（洗顔剤等は使用せず）、その後左ほほから細菌叢のサンプリングを実施した。また同一被検者から 1 週間後にサンプリングを実施し、経時的な変化が及ぼす影響を調べた所、検討した範囲内では同一サンプルの類似性が最も高く、洗顔の影響はみられなかった。また 1 週間後のサンプリングでも同一サンプルの類似性が最も高かった。さらに、ほほ、顎、眉間、胸部、ひじの各部からサンプリングを実施し、サンプリング部位としての適性を検討した。

(2) 新規治療法の開発を目的とした研究において、ファージ接種に対し広く耐性を示すアクネ菌亜種の高精度ドラフトゲノム配列解析の結果から、耐性メカニズムの獲得に寄与すると考えられる特徴的な遺伝子配列を見出すことに成功した（発表論文 5）。病原性亜種である RT4, RT5, RT8 型株を含む 67 株のアクネ菌に対し、全ゲノムを解読した 48 種のファージから選別した 15 種のファージを感染させることによって、感受性を観察した。この検討に用いた病原性亜種である RT4, RT5, RT8 型株はファージ感染に対しすべて感受性であった。一方で、IB-III リネージに相当する RT1 型株は 11-12 種のファージに対して抵抗性をしめしていた。この IB-III リネージの RT1 型株に特徴的な遺伝子配列を解析したところ、制限酵素をコードする遺伝子を含んでいることが明らかとなり、ファージ感染に対する抵抗性獲得メカニズムの一端が明らかとなった。さらに、良性亜種 RT6 型株の 1 つは 12 種のファージに耐性をしめしており、3 種のファージに耐性を示した RT2 型株と含めて、II 型リネージに含まれる株に特徴的な CRISPR-CAS 経路に関する特異的なゲノム配列との関係が示唆された。

溶菌感染が出来なかった株由来の Protospacer (a) と溶菌感染した株由来の Protospacer (b) の配列等、機能的な関連性が示される一方で、耐性メカニズムの解読には至っておらず、今後の解析結果がまつれる。



(3) RT4 型・5 型・8 型に対する特異的抗体のデザインや、ファージ感染に抵抗性を示す亜株に特異的な遺伝子配列を解析するパイプラインを用いた研究の展開として、リネージ特異的な遺伝子配列の抽出とその応用を試みた。環境由来の細菌の一部が特異的に呼吸器系の組織に共生することで発症することが知られている非結核性抗酸菌症 (NTM 症) の原因菌として知られている *Mycobacterium avium* complex (MAC、マック) の比較ゲノム解析を行った。計 79 株のゲノム配列を用いた解析から増悪との関連性が示唆される Ia リネージを抽出するとともに、Ia リネージに特徴的なゲノムエレメント (Locus 1) の解析を行った（発表論文 2）。この結果から、パイプラインの汎用性ととも、抽出されたリネージに特徴的なゲノム配列の確認ができた。このことから、特徴的なゲノム配列の解析結果を踏まえた新規治療法の検討における本手法の有用性を確認することができた。



5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)(すべて査読あり)

1. Toh H, Matsubara T, Tomida S, Mimura I, Arakawa K, Kikusui T, Morita H.
Draft Genome Sequence of *Bifidobacterium lemorum* DSM 28807(T) Isolated from the Gastrointestinal Tracts of Ring-Tailed Lemurs (*Lemur catta*).
Genome Announc. 2017, 5(8).
pii: e01656-16.
doi: 10.1128/genomeA.01656-16.
PMID: 28232445;
PMCID: PMC5323624.
2. Uchiya KI, Tomida S, Nakagawa T, Asahi S, Nikai T, Ogawa K.
Comparative genome analyses of *Mycobacterium avium* reveal genomic features of its subspecies and strains that cause progression of pulmonary disease.
Sci Rep. 2017 7:39750.
doi: 10.1038/srep39750.
PMID: 28045086;
PMCID: PMC5206733.
3. Fujii Y, Toh H, Matsubara T, Tomida S, Nguyen CT, Mimura I, Nakamura S, Morita H.
Draft Genome Sequence of Probiotic *Lactobacillus acidophilus* Strain L-55 Isolated from a Healthy Human Gut.
Genome Announc. 2016 4(6).
pii: e01357-16.
doi: 10.1128/genomeA.01357-16.
PMID: 27932651;
PMCID: PMC5146443.
4. Nagai H, Oiso N, Tomida S, Sakai K, Fujiwara S, Nakamachi Y, Kawano S, Kawada A, Nishio K, Nishigori C.
Epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation with noncicatricial alopecia: identification of a recurrent p.P25L mutation in KRT5 in four affected family members.
Br J Dermatol. 2016 174(3):633-5.
doi: 10.1111/bjd.14083.
PMID: 26286811.

5. Liu J, Yan R, Zhong Q, Ngo S, Bangayan NJ, Nguyen L, Lui T, Liu M, Erfe MC, Craft N, Tomida S, Li H.
The diversity and host interactions of *Propionibacterium acnes* bacteriophages on human skin.
ISME J. 2015 9(9):2078-93.
doi: 10.1038/ismej.2015.47.
PMID: 25848871;
PMCID: PMC4542041.

〔学会発表〕(計2件)

富田秀太, 「皮膚マイクロバイオーム解析」, 第115回日本皮膚科学会総会, 2016/6/4, 京都国際会館(京都)
富田秀太, Li H, 「スキンマイクロバイオーム あなたを取り巻く第2のゲノム」, 第59回人類遺伝学会, 2014/11/22, タワーホール船堀(東京)

〔図書〕(計1件)

富田秀太, 科学同人、共生微生物(大野博司編) 2016 37-44

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
富田秀太(TOMIDA, Shuta)
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 10372111

(2)研究分担者: なし

(3)連携研究者: なし

(4)研究協力者: なし