

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19590164

研究課題名（和文）アトピー性皮膚炎の皮膚常在微生物を指標とした治療反応予測因子の系統的検出

研究課題名（英文）Predictors of the response to therapy targeting the cutaneous microbiota in patient with atopic dermatitis

研究代表者：杉田 隆（SUGITA TAKASHI）

明治薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10312076

研究成果の概要（和文）：皮膚常在真菌マラセチアはアトピー性皮膚炎の主要増悪因子の一つであり、これを抗真菌薬で除菌すると症状を軽減することができる。本研究では個別化治療の実践に向けて、抗真菌薬治療の反応予測因子について検討した。その結果、マラセチア特異IgE値とマラセチアの皮膚定着量が治療効果に影響を与える因子であることが判明した。これらの因子に対する定量系を構築したので臨床応用が可能となった。

研究成果の概要（英文）：Fungal cutaneous microbiota, *Malasszia* is one of exacerbating factor of atopic dermatitis. The symptom is improved when the microorganisms is eradicated by antifungal agents. This study investigated the predictors of the response to antifungal therapy. We found that an anti-*Malassezia*-specific IgE antibody and the cutaneous *Malassezia* colonization level affected the response to antifungal therapy. Quantitative methods for analyzing these two factors were also established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：アトピー性皮膚炎、皮膚常在微生物叢、反応予測因子、診断、治療

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は強いかゆみを伴う慢性的な皮膚疾患であり、増悪・寛解を繰り返す。我が国での罹患数は1,000万にも達することから、本疾患は国民病的様相を呈し

ていると考えられる。従って、本疾患の克服は急務な課題である。本疾患は遺伝的素因に加えて食物や環境的要因が複合的に関与する。申請者はこれらの要因に加えて、アレルギーとしての皮膚に常在する微生物

に着目し、以下の説を提唱してきた。1) アトピー性皮膚炎患者の皮膚には抗菌ペプチドが減少しているため皮膚微生物が異常増殖している。2) アトピー性皮膚炎患者では皮膚角質中のセラミドが減少しているため外来異物抗原(微生物)が容易に角質層を通過する。その結果、外来異物抗原が表皮内の抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞に取り込まれ、IgE 産生・炎症反応へと進展していく。

そこで、皮膚常在微生物を制御することでアトピー性皮膚炎の治療が可能であると考えた。平成 16~18 年度の科学研究費補助金により、1)アトピー性皮膚炎の原因となる皮膚微生物が特定の遺伝子型を有する酵母マラセチアであり、全患者に定着していること。2) その除菌にはアゾール系抗真菌薬が適していることを見出した。

この薬学基礎研究成果に基づいて、標準的治療薬であるステロイドあるいはタクロリムスに不応答の患者を対象(難治性)として臨床試験を実施した。その結果、抗真菌薬の投与により、約 70%の患者が改善した。

2. 研究の目的

この皮膚常在増悪微生物除菌療法は、一定の改善率が得られているものの、1)本治療法に不応答な患者や、2)患者により反応性に差異が認められることが判明した。そこで、皮膚常在増悪微生物を指標として抗真菌薬の治療反応予測を行い、個別化治療へ展開することでアトピー性皮膚炎の一層の克服を目指す。

3. 研究の方法

皮膚常在増悪微生物を指標とした抗真菌薬の治療反応予測因子として以下の項目について検討した。

(1) マラセチア菌特異 IgE 抗体値

アトピー性皮膚炎患者の皮膚 *Malassezia* 叢と種特異的 IgE 値の相関を重症度別に比較した。*Malassezia* 叢は、nested PCR および real-time PCR で、患者血清中の特異抗体は ELISA で測定した。

(2) 皮膚鱗屑中の薬物濃度の測定

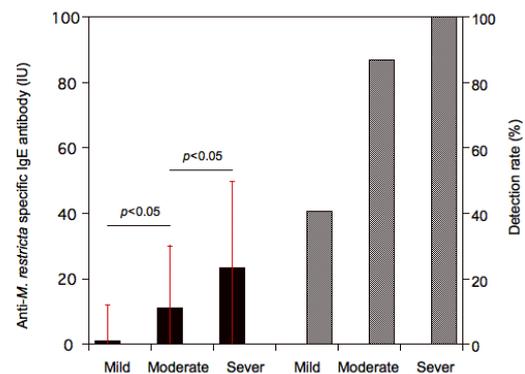
患者鱗屑をアルカリ処理し蒸発乾固後、LC-MS/MS で ITZ および ITZ-OH 体の濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) マラセチア菌特異 IgE 抗体値

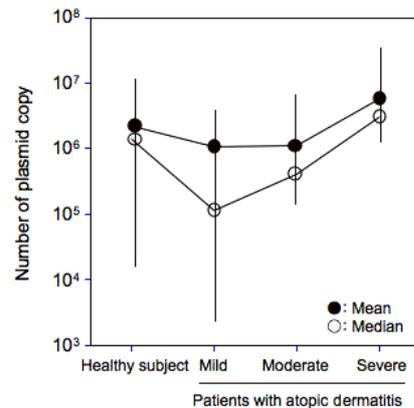
抗 *Malassezia* 特異的 IgE 抗体は、その値および検出率ともに重症度と相関した(Fig. 1)。

Fig. 1. アトピー性皮膚炎患者の重症度と抗*Malassezia*特異IgE抗体産生



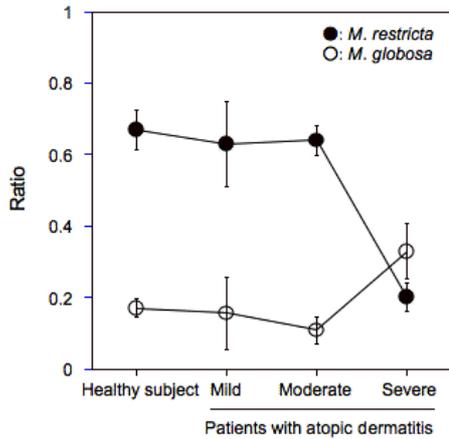
皮膚 *Malassezia* の定着量も重症度と相関した(Fig. 2)。

Fig. 2. アトピー性皮膚炎患者の重症度と*Malassezia*定着量



また主要構成菌種である、*M. globosa* および *M. restricta* の比率は重症例で有意に変化した(Fig. 3)。

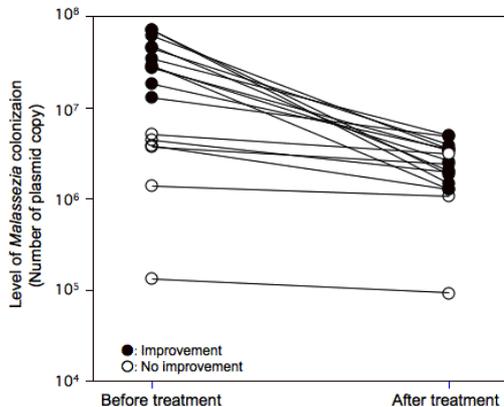
Fig. 3. アトピー性皮膚炎患者の重症度と主要構成菌種の変化



(2) 抗真菌薬治療前後における *Malassezia* 定着量および特異 IgE 値の変化

イトラコナゾール (100 mg) を 4 週間経口投与し、臨床症状の変化と *Malassezia* 定着量および IgE 抗体値の変化を調べた。改善例(>有効)では、有意な定着量の変化が見られたが、不変例では大きな変化は見られなかった(Fig. 4)。

Fig. 4. 抗真菌薬投与前後での皮膚 *Malassezia* 定着量の変化



また、IgE 抗体値の変化も同様であった。有効例は、不変例に比べて定着量が 10 倍以上高く抗体値も高値であった。このことから、治療前の定着量が効果に及ぼす因子のひとつと考えられた。

(3) 皮膚鱗屑中の薬物濃度

LC/MS/MS で未変化体 (ITZ) 濃度は定量検出限界であったが、ITZ-OH は測定可能であった。有効例および不変例に皮膚鱗屑中の薬

物濃度に有意な差異は認められなかった。

(4) マラセチアアレルゲンタンパクの同定 *M. globosa* から新規な IgE 特異的結合タンパクを同定した (MGp42)。この組換え体を用いることで、特異性の高い診断法の開発が可能となる。

以上、本研究では、治療効果に及ぼす因子は投与薬物の鱗屑中濃度ではなく皮膚 *Malassezia* 定着量と特異 IgE 値であることが判明した。

今後、本定量系を用いることにより効果的な抗真菌薬療法が可能になることが示唆された。

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 10 件)

1. Kaga M, Sugita T, Nishikawa A, Wada Y, Hiruma M, Ikeda S. Molecular analysis of the cutaneous *Malassezia* microbiota from the skin of patients with atopic dermatitis of different severities. *Mycoses*. 査読有, 2009 Dec 11. [Epub ahead of print]
2. Ishibashi Y, Kato H, Asahi Y, Sugita T, Nishikawa A. Identification of the major allergen of *Malassezia globosa* relevant for atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci*. 査読有, 55, 185-192, 2009
3. Sugita T, Suzuki M, Goto S, Nishikawa A, Hiruma M, Yamazaki T, Makimura K. Quantitative analysis of the cutaneous *Malassezia* microbiota in 770 healthy Japanese by age and gender using a real-time PCR assay. *Med. Mycol*. 査読有, 2009 May 21:1-5. [Epub ahead of print]
4. Tajima M, Sugita T, Nishikawa A, Tsuboi R. Molecular analysis of *Malassezia* microflora in seborrheic dermatitis patients: comparison with other diseases and healthy subjects. *J. Inv. Dermatol*. 査読有, 128:614-625, 2008
5. Kaneko T, Makimura K, Abe M, Shiota R, Nakamura Y, Kano R, Hasegawa A, Sugita T, Shibuya S, Watanabe S, Yamaguchi H, Abe S, Okamura N. A revised culture based identification system for *Malassezia*. *J. Clin. Microbiol*. 査読有, 45:3737-42, 2007.
6. Takahata Y, Sugita T, Kato H, Nishikawa A, Hiruma M, Muto M. Cutaneous *Malassezia* flora in atopic dermatitis differs between adults and children. *Br. J. Dermatol*.

査読有, 157: 1178-1182, 2007

7. Takahata Y, Sugita T, Hiruma M, Muto K. Quantitative analysis of *Malassezia* in the scale of patients with psoriasis using a real-time PCR assay. Br. J. Dermatol. 査読有, 157: 670-3, 2007

8. Amaya M, Tajima M, Okubo Y, Sugita T, Nishikawa A, Tsuboi R. Molecular analysis of *Malassezia* microflora in the lesional skin of psoriasis patients. J. Dermatol. 査読有, 34:619-24, 2007.

9. Kato H, Sugita T, Ishibashi Y, Nishikawa A. Evaluation of the levels of specific IgE against *Cryptococcus diffluens* and *Cryptococcus liquefaciens* in patients with atopic dermatitis. Microbiol Immunol. 査読有, 51:945-50, 2007

10. 杉田隆、皮膚常在菌 *Malassezia* の菌学と関連疾患、Visual Dermatology, 査読無, 7, 540-541, 2008

[学会発表] (計 29 件)

1. 永田理恵、杉田隆、比留間政太郎、中村靖、石黒共人、氏平崇文、太田武雄、太田剛史、長野宏史、荻島大貴、新生児と母親の皮膚マラセチア菌叢に関する検討、日本産婦人科学会、2010/04、東京

2. Sugita T, Recent progress of basic research on cutaneous microbiota, *Malassezia* and related-skin disease、日本研究皮膚科学会、第34回年次学術大会・総会、2009/12、博多

3. 永田理恵、杉田隆、比留間政太郎、中村靖、長野宏史、荻島大貴、新生児への母親の皮膚マラセチア菌の伝播に関する検討、第30回関東医真菌懇話会、2009/10、東京

4. 菅原二陽、石橋芳雄、杉田隆、西川朱實、ヒト表皮ケラチノサイトのTSLP産生における*Malassezia*の影響、第30回関東医真菌懇話会、2009/10、東京

5. 杉田隆、皮膚常在微生物とアトピー性皮膚炎、日本薬学会第129年会、2009/3、京都

6. 荻谷ゆみ子、杉田隆、加藤博司、西川朱實、比留間政太郎、武藤正彦、成人と小児のアトピー性皮膚炎患者間における皮膚*Malassezia* 叢の解析、第52回日本医真菌学会総会 2008/9、長崎

7. 菅原二陽、石橋芳雄、杉田隆、西川朱實、マラセチア刺激によるヒト表皮角化細胞のTSLP産生、第52回日本医真菌学会総会 2008/9、長崎

8. 加藤博司、杉田隆、高畑ゆみ子、武藤正彦、比留間政太郎、石橋芳雄、西川朱實、乾癬患者における、*Malassezia globosa*、及び *M restricta* に対する血清中特異的 IgG および IgA 抗体の検討、第52回日本医真菌学会総会、2008/9、長崎

9. 加賀麻弥、杉田隆、白木祐美、西川朱實、

比留間政太郎、池田志孝、アトピー性皮膚炎患者の重症度と皮膚マラセチア菌叢の相関関係、第52回日本医真菌学会総会 2008/9、長崎

10. 菅原二陽、石橋芳雄、杉田隆、西川朱實、マラセチア刺激によるヒトケラチノサイトの TSLP 産生誘導、日本薬学会第128年会、2008/3、横浜

11. 杉田隆、皮膚マラセチアの多様性と病原性、第32回東海医真菌懇談会、2008/2、名古屋

12. 杉田隆、アトピー性皮膚炎と皮膚常在菌、第57回日本アレルギー学会学術大会、2007/11、横浜

13. 加藤博司、杉田隆、石橋芳雄、西川朱實、ヒトの皮膚に常在する*Malassezia* 7菌種の特異的IgE抗体の検討、第57回日本アレルギー学会秋季学術大会、2007/11、横浜

14. 金子孝昌、植村浩一、阿部美知子、塩田量子、杉田隆、長谷川篤彦、渡辺晋一、山口英世、安部茂、*Malassezia* 同定法の評価並びに主要三菌種の簡易同定法、第51回日本医真菌学会総会、2007/11、岐阜

15. 石橋芳雄、加藤博司、杉田隆、西川朱實、アトピー性皮膚炎に関連する*Malassezia restricta* 特異抗原の解析、第51回日本医真菌学会総会、2007/11、岐阜

16. 加藤博司、杉田隆、石橋芳雄、西川朱實、高畑ゆみ子、武藤正彦、比留間政太郎、アトピー性皮膚炎患者における、*Malassezia globosa*、*M restricta* 特異的 IgG および IgA 抗体の検討、第51回日本医真菌学会総会、2007/11、岐阜

17. 高畑ゆみ子、杉田隆、比留間政太郎、武藤正彦、乾癬患者における real-time PCR を用いた *Malassezia* の定量解析、日本研究皮膚科学会第32回年次学術大会、2007/4、京都

1. Sugita T, The *Malassezia* microbiota in patients with *Malassezia*-related skin diseases: The significance of analysis using a molecular-based culture-independent method, 4th Trends in Medical Mycology, Athens, Grece, 2009/10

2. Onder M, Kalkan A, Tevlek C, Gürer MA, Sugita T, Molecular analysis of cutaneous *Malassezia* load in Turkish patients with atopic dermatitis in different anatomical sites with different severities, 4th Trends in Medical Mycology, Athens, Grece, 2009/10

3. Ishibashi Y, Kato H, Asahi Y, Sugita T and Nishikawa A, *Malassezia* colonization and the IgE antibody response in atopic dermatitis, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Tokyo
4. Tajima M, Sugita T, Nishikawa A and Tsuboi R, Molecular analysis of *Malassezia*

microflora in seborrheic dermatitis patients: Comparison with other diseases and healthy subjects, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Tokyo

5. Sugawara K, Ishibashi Y, Sugita T and Nishikawa A, Thymic stromal lymphopoietin secretion from human keratinocytes during exposure to *Malassezia* species, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Tokyo

6. Miyamoto M, Sugita T, Tajima M, Ito T, Kato Y, Tsuboi R, Kato H and Nishikawa A, *Malassezia* microbiota and specific IgE antibody production in patients with atopic dermatitis, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Tokyo

7. Ishibashi Y, Asahi Y, Kato H, Sugita T and Nishikawa A, Identification of the major allergen of *Malassezia globosa* relevant for atopic dermatitis, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Tokyo

8. Kato H, Sugita T, Ishibashi Y, Nishikawa A, Takahata Y, Muto M and Hiruma M, Evaluation of specific IgE and IgA levels against *Malassezia* species in sera of patients with atopic dermatitis, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Tokyo

9. Sugita T, Molecular Epidemiology of the cutaneous *Malassezia* microbiota in *Malassezia*-related skin diseases, Satellite Symposia, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Beijing

10. Ishibashi Y, Asahi Y, Kato H, Sugita T and Nishikawa A, Major allergen components of *Malassezia restricta* in patients with atopic dermatitis, Satellite Symposia, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Beijing

11. Sugita T and Nishikawa A, Molecular analysis of cutaneous *Malassezia* in patients with *Malassezia*-related skin disease using Real-Time PCR, 12th International Congress of Mycology, Meeting of the three divisions of the International Union of Microbiological Union (IUMS) 2008, 2008/8, Istanbul, Turkey

12. Sugita T, Taxonomy and phylogeny of the genus *Malassezia*, Japan-China Pan-Asia Pacific Mycology Forum, 2008/7, Changchun, China

〔図書〕（計 1 件）

1. Sugita T, *In Malassezia and the Skin : Science and Clinical Practice*, eds by Boekhout, T, Guého-Kellermann, E, Maysers, P, Velegaki A. pp. 65-120, Springer, ISBN:9783642036156

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.my-pharm.ac.jp/sugita/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 隆 (SUGITA TAKASHI)

研究者番号 : 10312076