

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：奨励研究

研究期間：2021～2021

課題番号：21H04151

研究課題名 皮膚細菌叢の部分編集によるイヌアトピー性皮膚炎の再発予防法の研究開発

研究代表者

内山 伊代 (Uchiyama, Iyo)

岡山大学・医学部・客員研究員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 470,000円

研究成果の概要：イヌの皮膚疾患で最も多いイヌアトピー性皮膚炎は、再発を繰り返し、慢性化することで問題となっている。そこでエンドライシン（細菌ウイルスであるバクテリオファージ保有の酵素）を利用して、皮膚細菌叢中の特定細菌のみを除菌し、本疾患の発症予防や症状の軽減を目指した。本研究ではアトピー性皮膚炎マウスモデルによるエンドライシン効果の検討を行った。その結果、ブドウ球菌を特異的に除菌することが示された。しかしながら、アトピー性皮膚炎の症状の改善がみられなかった。これは今回使用したマウスモデルに問題があった可能性があるため、その点を解決し、今後につなげていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義は、アトピー性皮膚炎を発症させたマウスモデルにエンドライシン処置をすることで、ブドウ球菌を特異的に除菌できたことである。
本研究成果の社会的意義は、皮膚上で増殖する特定のブドウ球菌だけでなく、その他の細菌によって引き起こされるような感染症の症状緩和や再発予防に応用できることである。

研究分野：獣医学

キーワード：イヌアトピー性皮膚炎 エンドライシン バクテリオファージ

1. 研究の目的

イヌの皮膚疾患で最も多いイヌアトピー性皮膚炎は、再発を繰り返し、慢性化することで問題となっている。発症の要因には、症状を悪化させる要因（増悪要因）として、体質と身の回りの環境（環境要因）、また、遺伝的素因が複雑に関与していると考えられる。その要因の1つに皮膚の細菌叢がある。特に、イヌのアトピー性皮膚炎の皮膚上には、*Staphylococcus pseudintermedius* と呼ばれる特定のブドウ球菌が増殖することが報告されており、ブドウ球菌がアレルゲンになっている可能性がある。

バクテリオファージがコードする酵素「エンドライシン」とは、皮膚細菌叢中の特定細菌のみを除菌する効果を有する。エンドライシンに対する耐性菌の出現も殆どないため、薬剤耐性が騒がれる昨今、新しい抗菌剤として注目されている。そのため、申請者は、イヌアトピー性皮膚炎の皮膚上で増殖するブドウ球菌をエンドライシンにより低減させることで、本疾患の発症予防や症状の軽減ができると考えた。

以上より、イヌアトピー性皮膚炎の再発予防を目指して、皮膚細菌叢を部分編集可能なエンドライシンの研究開発を行う。具体的には、(1)イヌアトピー性皮膚炎における *S. pseudintermedius* のリスク評価を特異的 IgE 検出で行った。また、(2)エンドライシンの分離を行い、(3)アトピー性皮膚炎マウスモデルを使用したブドウ球菌除菌効果の検討を行なった。

2. 研究成果

イヌアトピー性皮膚炎における *S. pseudintermedius* のリスク評価を行った。イヌアトピー性皮膚炎は、生体の IgE 抗体にアレルゲンが結合することで発症する。そのため、アトピー性皮膚炎犬 (N=141) と健康犬血清 (N=20) を使用し、*S. pseudintermedius* 特異的 IgE の検出を行った (図1) その結果、40~60%のイヌアトピー性皮膚炎罹患犬で IgE が陽性であった。本成果は、FEMS Microbiol Lett. 369(1), fnac019, 2022 に発表した。

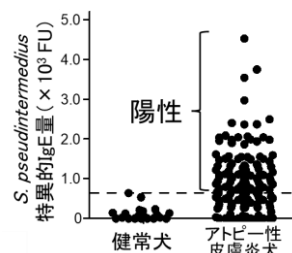


図1. アトピー性皮膚炎犬における *S. pseudintermedius* 特異的IgE量

次に、エンドライシンの分離を行った。先行研究で下水より分離したブドウ球菌に広く感染するファージ S6 (ISME J. 8, 1949-52, 2014) のゲノム解読を行った。

S6 ファージゲノムは全長 267,055 bp であった (Virus Res. submitted)。Dfast のアノテーションにより2つのエンドライシン遺伝子 *ENDO1* と *ENDO2* を発見した (図2)。両遺伝子ともに大腸菌を使用したタンパク質発現系により、組み換えエンドライシンを作製し、*S. pseudintermedius* に対する抗菌活性を測定したところ、両タンパク質とも抗菌活性を有していた。今回はそのうちの ENDO1 を使用し、次の動物実験を行った。

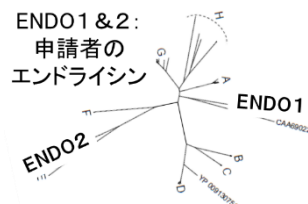


図2. ブドウ球菌ファージ由来エンドライシンの系統樹

第3に、アトピー性皮膚炎マウスモデルによるエンドライシン ENDO1 の効果の検討を行なった。アトピー性皮膚炎マウスモデルは、雌7週齢の NC/Nga マウスの耳介~背部に5%2,4-トルエンジイソシアネート (TDI) を1週目に2回塗布し炎症を発症させた (計9頭)。

2週目以降、炎症反応維持のため0.5%TDIを1週間毎に塗布し、8週間行った。背部皮膚の皮膚炎症状がスコア2.0 (中等度) に至った時点から、塗布群にはグリセリン (5%) とキサントガム (3%) を混和させたエンドライシン 1mg を0.1mL、1日1回耳・頸背部全体に塗布した。非塗布群 (コントロール群) にはグリセリン (5%) とキサントガム (3%) を塗布した。塗布は7週間行った (図3)。

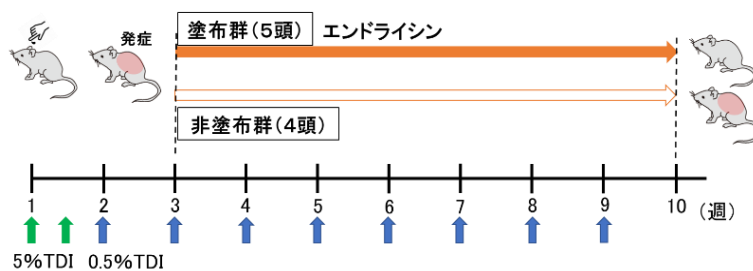


図3. アトピー性皮膚炎マウスモデルでの発症予防効果の検討

マウスの評価は、検討開始1週目から終了10週目の間、経時的に皮膚症状重症度の測定、経皮水分蒸散量測定装置 (VAPO SCAN) を用いた経皮水分蒸散量 (TEWL) の測定、耳・背の皮膚厚・pH の測定を行い、また検討終了10週目に剖検し、耳介リンパ節・血清・皮膚サンプル (耳、背) を使用して生菌数測定、および耳介リンパ節における免疫担当細胞数の測定を行った。

アトピー性皮膚炎マウスモデルによるエンドライシン END01 塗布の効果に関する結果である。はじめに、生菌数測定の結果である。皮膚処置部上の総菌数を測定した結果、非塗布群と塗布群では有意差は見られなかったが、ブドウ球菌数を測定した結果、非塗布群では 3.8×10^3 CFU/mL に対して塗布群では 0 CFU/mL と有意な減少がみられた ($p=0.0286$) (図4)。一方、皮膚症状重症度スコア (図5A)、耳・背の皮膚厚 (図5B)、TEWL 値 (図5C) および耳介リンパ節における免疫担当細胞数 (樹状細胞数、IgE 産生 B 細胞数、T 細胞数) (図5D) においては塗布群と非塗布群に有意差は見られなかった ($p \geq 0.05$)。

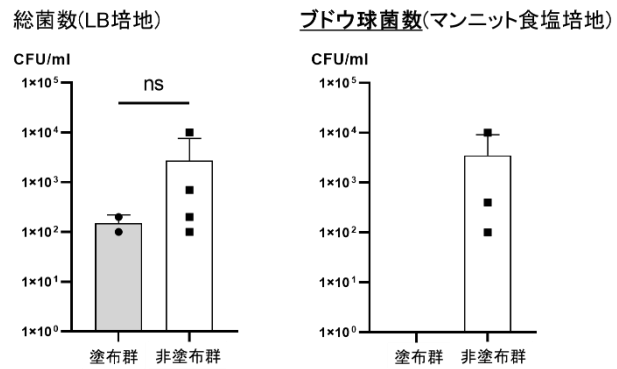


図4. アトピー性皮膚炎マウスモデルによるエンドライシン塗布後の皮膚上の生菌数

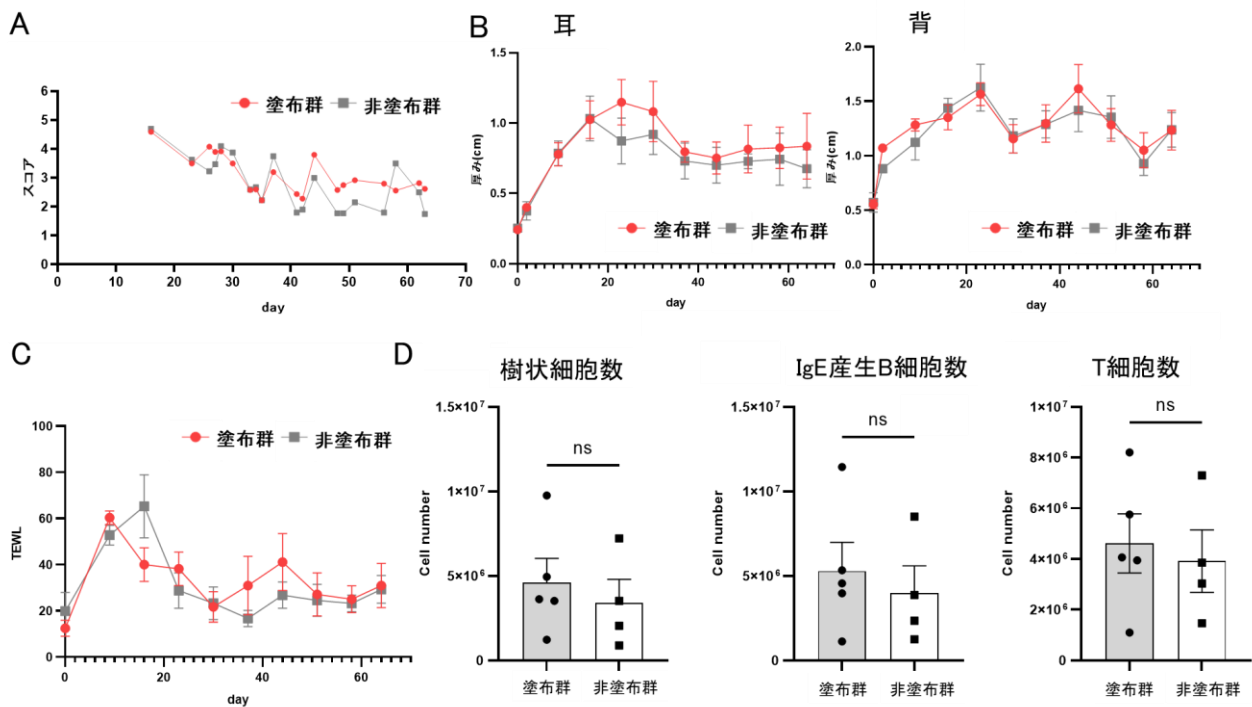


図5. アトピー性皮膚炎マウスモデルによるエンドライシン塗布後の結果
A; 皮膚症状重症度スコア B; 皮膚厚 C; TEWL値 D; 耳介リンパ節の免疫担当細胞数

以上から、アトピー性皮膚炎マウスモデルによるエンドライシン END01 塗布により、ブドウ球菌を特異的に除菌できたことを示した。しかしながらアトピー性皮膚炎の症状の改善がみられなかった。原因として考えられることは、今回使用したマウスモデルは、TDI によってアトピー性皮膚炎症状を惹起させており、自然発症モデルでない。そのため、皮膚上のブドウ球菌を減少させることが、臨床症状の改善にあまり影響しなかったのではないかと推察している。エンドライシンによる治療効果検討において、ブドウ球菌と症状がどのくらいリンクしているのか、ブドウ球菌依存性かどうか重要であると考えられる。今後は、この問題点を解決し、イヌアトピー性皮膚炎だけでなく、ブドウ球菌と直接関連している膿皮症などの再発予防に応用していきたい。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takemura-Uchiyama Iyo, Tsurui Hiroki, Shimakura Hidekatsu, Nasukawa Tadahiro, Imanishi Ichiro, Uchiyama Jumpei, Fukuyama Tomoki, Sakamoto Shuji, Morisawa Keiko, Fujimura Masato, Murakami Hironobu, Kanamaru Shuji, Kurokawa Kenji, Kawamoto Keiko, Iyori Keita, Sakaguchi Masahiro	4. 巻 369
2. 論文標題 Heterogeneous IgE reactivities to Staphylococcus pseudintermedius strains in dogs with atopic dermatitis, and the identification of DM13-domain-containing protein as a bacterial IgE-reactive molecule	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 fnac019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsle/fnac019	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 Matsui Hidehito, Uchiyama Jumpei, Ogata Masaya, Nasukawa Tadahiro, Takemura-Uchiyama Iyo, Kato Shin-ichiro, Murakami Hironobu, Higashide Masato, Hanaki Hideaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Use of Recombinant Endolysin to Improve Accuracy of Group B Streptococcus Tests	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0007721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/Spectrum.00077-21	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 Takeuchi Ippei, Nasukawa Tadahiro, Sugimoto Ryosuke, Takemura-Uchiyama Iyo, Murakami Hironobu, Uchiyama Jumpei	4. 巻 298
2. 論文標題 Analyses of propagation processes of Staphylococcus aureus bacteriophages S13 and S25-3 in two different taxonomies by definitive screening design	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 198406 ~ 198406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virusres.2021.198406	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------