

令和元年6月10日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10178

研究課題名(和文)炎症性皮膚疾患患者における腸内細菌叢の解析

研究課題名(英文)Analysis of intestinal microbiota in patients with inflammatory skin diseases

研究代表者

藤田 英樹 (FUJITA, Hideki)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：10323544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：慢性蕁麻疹患者20名における多様性解析では、腸内細菌叢は軽症例と重症例でほぼ同様の多様性を示したが、中等症群には軽症例と重症例よりも多様性が低い傾向がみられた。しかし、群間の統計学的な有意差は検出されなかった。アトピー性皮膚炎患者においては4名とも、最も高頻度に見られたのがBacteroides属であり、細菌叢全体の27.3%～35.4%と30%前後を占めていた。汎発性膿疱性乾癬の1例においては、Ruminococcus属(18.2%)、Lachnospiracea属(11.0%)、Gemiger属(10.0%)が上位3属であり、他疾患ではみられないパターンを示していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現時点では少数例の検討にとどまっているが、蕁麻疹患者、アトピー性皮膚炎患者、乾癬患者ではそれぞれの疾患ごとに異なる腸内細菌叢の特徴(あるいは異常)を有することが今回の結果から示唆される。特に、慢性蕁麻疹患者においては、疾患の重症度ごとに腸内細菌叢プロファイルが異なっている可能性があり、難治性慢性蕁麻疹の病態の解明への重要な手がかりとなる可能性がある。このような解析をさらに発展させることは、乾癬・蕁麻疹・アトピー性皮膚炎における腸内細菌叢をターゲットとした新規治療戦略を開発する場合に極めて重要となり、新規治療により現在の治療法では難治な患者に恩恵をもたらす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In 20 patients with chronic spontaneous urticarial, -diversity analysis showed comparable intestinal microbiota diversity between mild group and severe group. On the other hand, there was a trend that moderate group patients had lower intestinal microbiota diversity compared to mild and sever patients, though it was not statistically significant difference. In four patients with atopic dermatitis, most frequently observed bacterial genus was Bacteroides, which accounted for 27.3%-35.4% of intestinal bacterial components. In a patient with generalized pustular psoriasis, top three intestinal bacterial genus components were Ruminococcus (18.2%), Lachnospiracea (11.0%), and Gemiger (10.0%). This was a unique bacterial pattern that was not observed in patients with other skin diseases.

研究分野：皮膚免疫

キーワード：腸内細菌叢 乾癬 アトピー性皮膚炎 慢性蕁麻疹

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢は宿主と共生しながら、エネルギー産生、物質代謝の調節、感染症防御、免疫活性化などに深く関わるが、近年、炎症性腸疾患、肥満、糖尿病、動脈硬化、アトピー性皮膚炎などの様々な疾患の病態にも関与することがわかってきた。さらに、人為的に腸内細菌叢を調整することがそれらの疾患の予防や治療につながる可能性も示唆されている。皮膚においては、アトピー性皮膚炎でプロバイオティクスを用いた予防や治療が試みられており、その有効性が報告されている。しかし、他の皮膚疾患では腸内細菌叢はほとんど研究されていなかった。

2. 研究の目的

乾癬・アトピー性皮膚炎・蕁麻疹における腸内細菌叢組成の特徴を解明することである。また、各疾患を重症度ごとに層別化し、重症度による腸内細菌叢の違いを明らかにすることである。

3. 研究の方法

<対象>

日本大学医学部附属板橋病院皮膚科を受診した、乾癬（尋常性乾癬、関節症性乾癬、乾癬性紅皮症、膿疱性乾癬）・アトピー性皮膚炎・慢性蕁麻疹を有する患者のうち、研究内容および目的について十分な説明を行い、文書による同意が得られた患者を対象とした。

<糞便の採取方法>

可能な限り外来受診時（あるいは入院中）に採便を行った。採便には市販の腸内細菌叢解析用採便キット（テクノスルガ・ラボ、静岡市）を用いた。受診時に採便できない患者には採便キットを渡し、自宅にて採便をしていただき、受診時に持参していただいた。また、乾癬患者において新規に治療を始める場合は、治療開始時、治療開始1か月後、治療開始6か月の合計3回採便を行い、経時的変化を観察した。回収した便は保存容器中にて1か月間室温で保存できるため、DNAの精製を行うまで室温で保存した。

<疾患重症度の評価>

採便時には各患者の疾患重症度を記録した。その際、乾癬患者はPsoriasis Area and Severity Index (PASI)を、アトピー性皮膚炎患者はSeverity Scoring of Atopic Dermatitis (SCORAD)およびEczema Area and Severity Index (EASI)、慢性蕁麻疹患者はUrticaria Activity Score 7 (UAS7)を用いて重症度を評価した。

<糞便サンプルからのDNA抽出>

DNAの抽出はTakahashiらが発表した方法(PLoS One 2014; 9: e105592.)に準拠した。

<PCR>

使用プライマー: Pro341-Pro805R (細菌・アーキア 16SrDNA 約430bp) (Takahashi S, et al: PLoS One 2014; 9: e105592.), Dual-index (8-bp barcode) (Hisada T, et al: Arch Microbiol 2015; 197: 919-934.)

PCR条件: Takahashiらが発表した方法(PLoS One 2014; 9: e105592.)に準拠した。

<次世代シーケンス・アンプリコン解析>

次世代シーケンス解析による配列決定は、装置付属のプロトコルに従った。

次世代シーケンス装置: MiSeq™ (Illumina, USA) プライマー配列を除く配列(約430bp)を決定した。

シーケンシングKit: MiSeq Reagent Kit v3 (600サイクル) (Illumina)

ペアエンドの連結: fastq-join (デフォルトの条件) (Erik A: <http://code.google.com/p/ea-utils/>)

クオリティーフィルタリング: 配列の99%以上がQV (Quality Value) 20以上を満たす配列 (Takahashi S, et al: PLoS One 2014; 9: e105592.)

キメラチェック: usearch 6.1.544_i8 (Edgar R, et al: Bioinformatics 2011; 27: 2194-2200.) により検出されたキメラ配列を除去

<データベースによる検索>

次世代シーケンスにより決定した配列をもとにデータベース検索を行った。また、各データベースの結果をもとに検体間の比較解析を行った。

Ribosomal Database Project (RDP)による検索

データベース: RDP MultiClassifier ver.2.11 (16S rDNA) (Wang Q, et al: Appl Environ Microbiol 2007; 73: 5261-5267.) Cut Off: Phylum: 0.8, 出力される分類群(界~属)

ソフトウェア: Metagenome@KIN (World Fusion, Japan)

微生物同定データベースによる検索

データベース: 微生物同定データベース (Hisada T, et al: Arch Microbiol 2015; 197: 919-934, Kasai C, et al: BMC Gastroenterol 2015; 15: 100.) DB-BA10.0 (TechnoSuruga Laboratory, Japan), 相同率: 97%, 出力される分類群(界~種)

ソフトウェア: Metagenome@KIN (World Fusion, Japan)

検体間の比較解析(解析および解析)

ソフトウェア：Metagenome@KIN (World Fusion, Japan)

解析手法：主成分分析およびクラスター解析(クラスタリング解析手法：群平均法, 距離関数, ピアソンの相関係数)

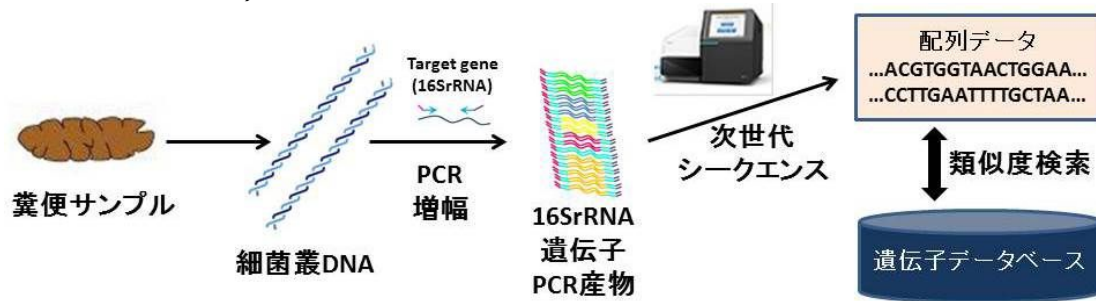


図1. 研究の流れのまとめ

4. 研究成果

<サンプルの収集>

平成31年3月末までに慢性蕁麻疹患者33名、アトピー性皮膚炎患者4名、汎発性膿疱性乾癬患者1名からの糞便サンプルが得られた。

<慢性蕁麻疹患者における解析>

糞便中細菌叢DNA解析が終了している20例につき解析および解析を行った。患者背景は以下の通りである。

患者：20名（男性3名、女性17名）

重症度：軽症5名、中等症8名、重症6名(同意取得時のUCTで判定。重症<8, 中等症8~11, 軽症12)

治療内容：全例が第二世代抗ヒスタミン薬内服(14例がH2プロテクター併用, 15例がLTC4阻害薬併用, 1例がシクロスポリン併用, 8例が抗IgE抗体併用)

20例の多様性解析結果を図2に示す。

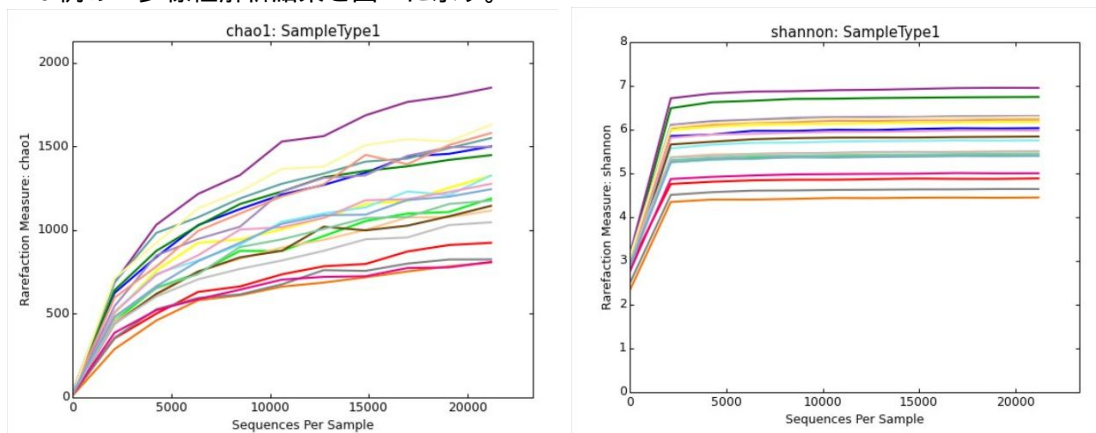


図2. 慢性蕁麻疹患者20例の多様性(Chao1およびshannon指数)

Urticaria Control Test (UCT) のスコアが、1-7点を重症、8-11点を中等症、12点以上を軽症と定義して、重症度別の群間比較を行った。この3群間における多様性解析を行ったところ、腸内細菌叢は軽症例と重症例でほぼ同様の多様性を示したが、中等症群には軽症例と重症例よりも多様性が低い傾向がみられた(図3)。しかし、多様性解析のデータの平均値に関して一元配置分散分析を用いて検定を行ったところ、群間の統計学的な有意差は検出されなかった。

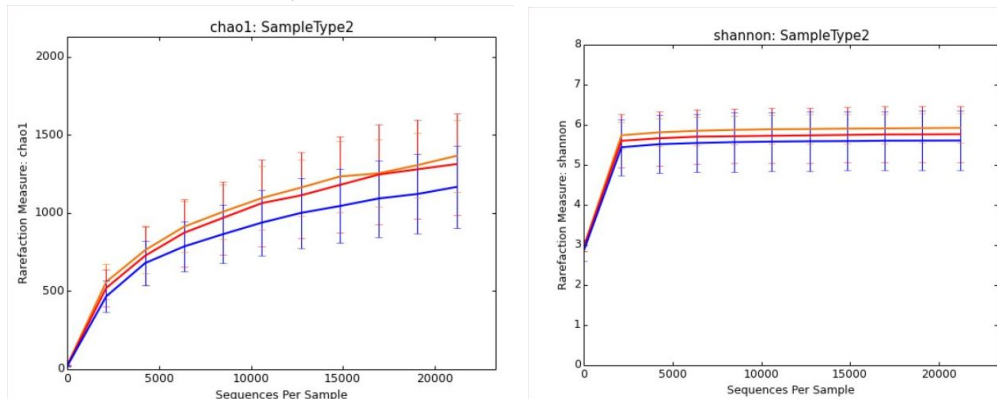


図3. 多様性の群間比較(赤色線：軽症、青色線：中等症、橙色線：重症)

次に 解析にて、軽症、中等症、重症の群間の細菌叢の相違の程度を解析したが、各群間に明確な相違はみられなかった（図4）。

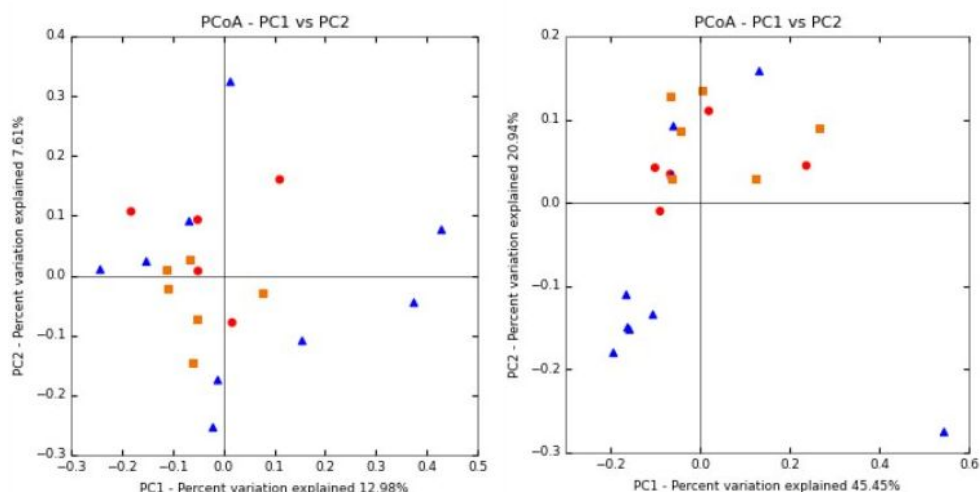


図4. 慢性蕁麻疹患者20例の多様性（左：unweighted_unifrac（母数にリード数を考慮しない、生データのまま距離変換して解析）、右：weighted_unifrac（母数にリード数を考慮させ、一定リード条件化で距離変換して解析））

<アトピー性皮膚炎患者における解析>

アトピー性皮膚炎患者においてはサンプルが4例のみであったため、解析および解析は行えなかった。各患者の細菌叢データを参照すると、最も高頻度に見られたのが Bacteroides 属であり、Bacteroides 属は4名のアトピー性皮膚炎患者の細菌叢全体の27.3%~35.4%と30%前後を占めていた。二番目に高頻度に見られたのは4名中3例で Blautia 属であり、残りの1名でも Blautia 属は3番目の頻度であった。また、Bacteroides 属と Blautia 属を合計すると、細菌叢全体の37.8%~63.6%を占めていた。しかし、アトピー性皮膚炎患者においては、Bacteroides 属と Blautia 属が特に高頻度であること以外には、明らかな共通点はみられなかった。

<汎発性膿疱性乾癬患者における解析>

汎発性膿疱性乾癬の1例においては、Ruminococcus 属（18.2%）Lachnospiraceae 属（11.0%）Geminger 属（10.0%）が上位3属であり、他疾患ではみられないパターンを示していた。

5. 主な発表論文等

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
 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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：照井 正

ローマ字氏名：TERUI Tadashi

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：30172109

研究分担者氏名：葉山 惟大

ローマ字氏名：HAYAMA Koremasa

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：40647187

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等に