

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2019～2022

課題番号：19KK0243

研究課題名（和文）HIV感染による皮膚粘膜細菌叢変化と皮膚粘膜感染症の関連性と緩和ケアへの応用

研究課題名（英文）Relationship between microbiota changes on the epithelium and onset of epithelial infectious diseases caused by HIV infection, and application to palliative care against the diseases

研究代表者

岡本 成史（Okamoto, Shigefumi）

金沢大学・新学術創成研究機構・教授

研究者番号：50311759

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,100,000円

研究成果の概要（和文）：我々はカメルーン、アメリカとの共同研究で、カメルーンにおけるHIV感染と皮膚細菌叢の構成変化との関連性について検討を行った。まず、カメルーン人の皮膚細菌叢の構成の特徴を把握するために日本人の皮膚細菌叢の構成との比較検討を行い、両者の間で構成が大きく異なることを明らかにした。次にカメルーン人において健常人とHIV感染者、AIDS患者との間での皮膚細菌叢の構成について検討した。HIVに感染したカメルーン人では皮膚マイクロバイオームのアルファ多様性が高く、ベータ多様性が大きく変化し、HIV感染者では、ミクロコッカスやコクリア属などの存在比率が増大し、クチバクテリウム属の存在比率が大幅に減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、HIVに感染したカメルーン人において、一部の細菌の相対数が増加し、一部の細菌が減少していることを示し、皮膚細菌叢のアルファ多様性がより大きく、ベータ多様性が健康な対応物とは異なることを明らかにした。これらの発見は総合し、HIV感染がヒトの皮膚マイクロバイオームに影響を与えることを示唆した。この研究は、HIV感染の影響下での皮膚症状と、皮膚マイクロバイオームを介した皮膚と身体間のクロストークをよりよく理解するための基本的な情報を提供する可能性を示すものであり、HIV感染による様々な皮膚における日和見感染症の発症原因を検討する新たな検討事項になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In collaboration with Cameroon and the United States, we investigated the relationship between HIV infection and changes in skin microbiota composition in Cameroon. In order to understand the characteristics of the composition of Cameroonian skin microflora, a comparative study was conducted with that of Japanese skin microbiota. As a result, it became clear that the composition differs greatly between the two. Next, we examined the composition of the skin microflora in Cameroonians between healthy, HIV-infected, and AIDS patients. HIV-infected Cameroonians had higher skin microbiome alpha diversity and significantly altered beta diversity. In addition, HIV-infected individuals had increased prevalence of Micrococcus and Kocuria, and significantly decreased prevalence of Cutibacterium.

研究分野：病原微生物学

キーワード：皮膚 HIV マイクロバイオーム ディスバイオーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) はヒト CD4+ T 細胞に感染し、死滅させることにより後天性免疫不全症候群 (AIDS) を発症させ、各種日和見感染症や悪性腫瘍などにより感染者を死に至らしめる。2016 年現在、世界中で HIV 感染者はおよそ 3,670 万人、年間 180 万人の新規感染者と 100 万人の AIDS による死亡者が発生している (国立感染症研究所ウェブサイト <https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/400-aids-intro.html>)。

HIV 感染から AIDS 発症までの過程は大きく 3 つに分かれる。HIV 感染から 2~3 週間後にインフルエンザと似たような急性症状を数日から 10 週間程度呈する感染初期 (急性期) を経て、数年から 10 年にも及ぶ無症候期に移行する。無症候期は、ウイルス数、CD4+ T 細胞数とも定常状態になり、無症状の状態が続く。その後、ウイルス RNA 量の増加と CD4+ T 細胞の減少が開始し始める無症候期の末期に移行すると、皮膚や口腔粘膜などに難治性真菌症 (口腔カンジダ症、白癬、脂漏性皮膚炎など) 帯状疱疹などの皮膚粘膜感染症を頻発し、生活の質 (QOL) の重大な低下などをもたらす。そして、AIDS 発症期へと移行し、更なる重篤な日和見感染症やカポジ肉腫などの悪性腫瘍などを併発し死に至る。

HIV 感染による皮膚粘膜感染症の原因となるカンジダ菌、白癬菌、マラセチアなど病原真菌、帯状疱疹の原因となる水痘帯状疱疹ウイルスなどは、宿主内に生息することが多い常在性の病原体であり、HIV 感染は免疫担当細胞による免疫力の低下を引き起こすことで同微生物が活性化し発症に至る。一方、皮膚・粘膜表層には常在微生物叢が存在し、多種類の無毒・弱毒性の微生物が共生状態で皮膚、粘膜組織を正常状態に維持したまま覆い、病原体の皮膚粘膜部分への感染・活性化を阻止するバリア機能を担っている。そのため、皮膚粘膜感染症の発症には、免疫担当細胞による免疫力の低下のみならず、同免疫能の低下を原因とする常在微生物叢の変化とそれに伴う皮膚粘膜組織の変性などによる病原体に対するバリア機能の低下への関与も考えられる。しかし、HIV 感染者の各時期における常在微生物叢の変化と皮膚、粘膜における皮膚粘膜感染症の発症との関連性は未だ明らかにされていない。

我々は、寝たきり高齢者、健常高齢者ならびに、健常若年者と比較しての皮膚常在細菌叢の相違と、寝たきり高齢者に多くみられる各種皮膚感染症、褥瘡後感染症との関連性について研究を進めてきた。そのなかで、健常人の間では加齢による皮膚常在細菌叢に大きな違いが認められない一方、寝たきり高齢者が健常人と大きく異なる皮膚細菌叢を保有し、それが褥瘡ならびに褥瘡後感染症に関与する可能性を示唆している。寝たきり高齢者は、健常高齢者と比べて衰弱傾向にあり、免疫機能が低下しているため、皮膚常在細菌叢の変化を誘導し、皮膚における各種感染症の発症リスクを増強させる可能性が考えられ、現在その可能性の可否を明らかにすべく解析を進めている。

2. 研究の目的

アフリカ中西部に位置するカメルーンは世界で最も HIV 感染者ならびに AIDS 発症者数が多い国のひとつであり、HIV 研究に関する今後の国際共同研究の基盤として最適な地域である。そこで我々は、日本、カメルーン、アメリカの微生物学、免疫学、皮膚科学、HIV 感染症学の専門家を結集させ、カメルーンを研究拠点に置いた学際的融合研究を通じて、「HIV 感染による皮膚・粘膜常在微生物叢の変化と皮膚粘膜感染症との関連」を明らかにし、HIV 感染による皮膚粘膜感染症・カポジ肉腫の発症メカニズムを免疫学的アプローチと微生物学 (マイクロバイオーム) 学的アプローチの両面から明らかにする。

本研究は、金沢大学 (研究代表者: 岡本成史、研究分担者: 倉石貴透、大貝和裕、須釜淳子、他協力研究者 5 名)、カメルーン・ヤウンデ第 1 大学/バイオテクノロジーセンター (研究協力者: Gabriel Loni Ekali はじめ 5 人)、アメリカ・ハワイ大学モアナ校 (研究協力者: Vivek R. Nerurkar, Yukie M. Lloyd、Ivo N. SahBandar) と共同研究チームを結成し、カメルーン・ヤウンデ市内の研究協力医療機関に入院、通院している各 HIV 感染者および、同世代の健常者を対象に、以上の目的を達成するために以下に記す研究を行い、結果を得たので報告する。

3. 研究の方法

1) 採取時期、場所、被験者の設定、ならびに倫理的配慮

2018 年 6 月から 10 月までカメルーンのヤウンデにあるエフウラン地区病院の HIV クリニックにおいてサンプル採取を行った。サンプル採取までに以下に記載する準備を行った。まず、研究デザインを検討した後、21~65 歳を対象基準とし、その中で HIV 感染者と健常人を対象に被験者候補者のリストを作成した。その後被験者候補者に面会し、以下の説明を行い、研究への参加の是非について伺った。説明内容は、研究内容の説明ならびに研究時にお願いする事項 (サンプリング日の深夜以降、(1) 入浴またはシャワーを浴びない、または (2) サンプリング部位に皮膚軟化剤/クリームを使用しないこと)、研究における倫理的配慮に関すること、その他候補者からの質問などであった。そのうえで、妊婦、明らかな皮膚疾患 (例: アトピー性皮膚炎、乾癬、カポジ肉腫) またはその他の全身性疾患 (例: HIV 感染症) の罹患者、研究に同意されない方、求められた指示に従わなかった方 研究者を除外した上で、研究に同意した候補者を被験者とし、

後述の方法でサンプル採取を行った。

この研究はカメルーン国家倫理委員会（承認番号 2018/06-1045/CE/CNERSH/SP）並びに次世代シーケンス解析（NGS）が実施された金沢大学医学倫理委員会によって承認された。また、実施前にはすべての被験者に対し、研究内容ならびに倫理的配慮より説明すべき事項について書面で通知し、すべての被験者から書面によるインフォームドコンセントを得た。この研究はヒト臨床研究のガイドラインを厳守して実施され、すべてのデータは匿名化の下でまとめられた。

2) サンプル採取

皮膚細菌叢の採取は、Puritan HydraFlock 滅菌植毛綿棒 (25-3306-H, Puritan Medical Products Company, メイン州, 米国) を使用しての皮膚部分へのスワブにより行った。スワブする前に、1.5 mL 微量遠心管に 0.1% Tween 20 (28353-14; Nacalai Tesque Inc., 京都, 日本) を含む滅菌 0.9% 塩化ナトリウム溶液 (S5815; Teknova, カリフォルニア州, 米国) 100 μ L にてスワブヘッドを浸し、その後、指定された皮膚部位の 5 \times 5 cm の正方形でスワブを行った。カボジ肉腫患者ではさらに病変部位においてもスワブを行い、皮膚細菌叢を回収した。スワブ後、各スワブヘッドをチューブに保管の上、クーラーボックスに保管し、その後研究室にて DNA 抽出を行った。

DNA 抽出は、カネカ Easy DNA 抽出キット バージョン 2 (KN-T110005; 株式会社カネカ, 東京, 日本) を用いて行った。また、細菌 DNA が正常に取得されたかを確認するために 16S リボソーム RNA (rRNA) をコードする遺伝子について後述の定量的リアルタイム PCR (qPCR) による増幅を行い、その存在を確認した。その後 PCR 阻害の可能性を排除するために、NucleoSpin gDNA Clean-up キット (740230, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, デューレン, ドイツ) を使用して DNA サンプルを洗浄した。

3) 定量的 PCR ならびに次世代シーケンス解析 (NGS)

qPCR は、DNA サンプルを Thunderbird Probe qPCR Mix (東洋紡株式会社, 大阪, 日本) を用いて 16S ユニバーサル プライマー ペア (F: 5'-ACTGAGAYACGGYCCA-3', R: 5'-CTGCTGGCACGDTAGCC-3') および、16S ユニバーサル プロブ (5'-VIC-ACTGCTGCCTCCCGTA-NFQ-MGB-3') で増幅させることにより行った。標準曲線は、既知量の 16S rRNA 遺伝子から描画した。すべての反応は、LightCycle 480 システム (F. Hoffmann-La Roche, Ltd., バーゼル, スイス) を使用して行った。

NGS については、以下の通り行った。DNA サンプルの品質チェックによる正規化のために、16SrRNA 遺伝子のコピー数を定量し、各サンプルからの同量の 16S rRNA 遺伝子を使用して、V3-V4 超可変領域を増幅した。その後、Nextera XT Index Kit バージョン 2 を使用してポリメラーゼ連鎖反応のインデックスを作成した後、得られたライブラリーを MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle) および 15% PhiX Control v3 スパイクインを使用して MiSeq システムにローディングさせた。Fastq 形式については、品質フィルター処理ならびに、キメラ除去させた上で、高品質でキメラフリーの配列を Qiime ソフトウェア バージョン 1.9.154 にて解析した。OTU の計算には、97% のしきい値を用い、分類学的割り当てを Silva データベース 55 バージョン 132 を用いて行った。ベータ多様性については重み付けされない UniFrac 距離に基づいて計算し、その後主座標分析を行った。アルファ多様性指数 [Chao1, 観察された OTU, Faith の系統的多様性、および Shannon 指数] は、Qiime1 の「alpha_rarefaction.py」コマンドによって計算し、解析した。

4) 統計分析

データは、必要に応じて、平均値 \pm 標準偏差、中央値 [四分位範囲 (IQR)], または n (%) として表した。箱ひげ図は、25 パーセンタイル - 1.5 \times IQR から 75 パーセンタイル + 1.5 \times IQR のひげを持つ 25、50、および 75 パーセンタイルのボックスを示した。カテゴリ変数をフィッシャーの直接確率検定を用いて表した。

連続変数の場合、必要に応じてウェルチの *t* 検定またはマン・ホイットニーの *U* 検定を用いて 2 グループの比較について統計解析を行った。また、効果量の部分 η^2 値による二元配置分散分析を使用して、相対的な存在量における性別と国の違いの 2 つの要因を考慮した。細菌存在量の多重比較には、Benjamini-Hochberg の誤検出率制御を用いた。補正された *p* 値は、*q* 値として示したうえで、*p* 値または *q* 値 < 0.05 は統計的に有意であるとみなした。以上すべての統計分析は、R 統計ソフトウェア 56 バージョン 3.9.2 により行った。

4. 研究成果

1) カメルーンでの皮膚からの微生物サンプル採取の実現可能性

2018 年 6 月から 10 月までカメルーンのヤウンデにあるエフウラン地区病院の HIV クリニックにおいて、HIV 陰性の健康な 26 名 (男性: 7 名, 女性: 19 名, 年齢 21 ~ 51 歳, 中央値 27 名) と HIV 陽性者 25 名 (男性: 5 人, 女性: 20 人, 年齢 22 ~ 61 歳, 中央値 39 歳) から額、左右の前腕、背中 of 皮膚スワブサンプルを 0.1% Tween 20 含有滅菌 0.9% 塩化ナトリウム溶液に湿らせた綿棒により採取した。全 HIV 陽性患者のうち、2 人の患者がカボジ肉腫を患ってお

り、肉腫病変からの綿棒もそれらの患者からも同様の方法によりサンプルを採取した。サンプルから DNA を抽出、洗浄し、16SrRNA の V3-V4 領域を qPCR により増幅したところ、すべてのサンプルで増幅部位の存在が確認された (図 1)。また、各サンプル中の細菌の 16SrRNA 遺伝子のコピー数を定量したところ、採取した個体や部位によって若干異なること、額ならびにカポジ肉腫の病変部位において遺伝子のコピー数が著しく高いことを見出した (図 2)。

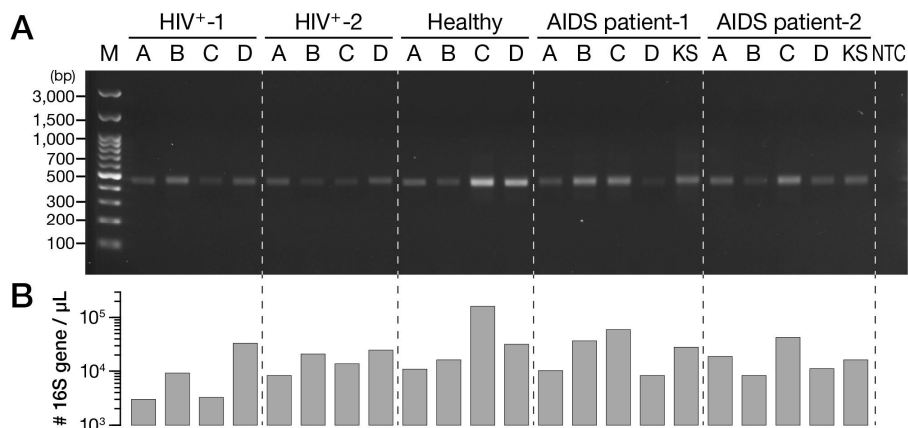


図 1. エフラン地区病院でカメルーン人から採取した皮膚ぬぐい液からの細菌 16S rRNA 遺伝子の増幅。(A) HIV 陽性患者 2 名、健康な個人 1 名、および AIDS 患者 2 名に由来する 16S rRNA 遺伝子の代表的なアンプリコン (V3-V4 領域をカバー、予想サイズ ~ 460 bp) を電気泳動して視覚化した。(B) 各サンプル中の 16S rRNA 遺伝子の数。各個人は、額 (A)、右前腕 (B)、左前腕 (C)、および背中の中央上部 (D) の 4 つの対象領域からサンプリングされた。エイズ患者のカポジ肉腫病変の皮膚スワブも分析し、視覚化した (KS)。M: 100 bp マーカー、NTC: テンプレート コントロールなし。

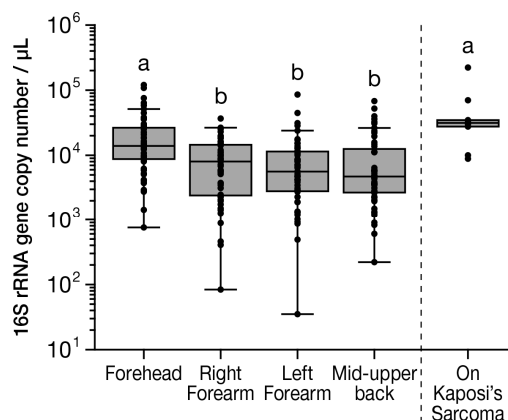


図 2. 得られた細菌 16S rRNA 遺伝子のコピー数。16S rRNA 遺伝子の量は参加者や採取場所によってばらつきがあったが、十分な量の 16S rRNA 遺伝子を取得することに成功した。同じ文字は有意差がないことを示すが、異なる文字はグループ間の有意差 ($p < 0.05$) を示す。

2) カメルーン人と日本人の皮膚細菌叢の構成の相違

ヒトの皮膚細菌叢の動的な変動は、宿主要因 (年齢、食事、体の部位、性別など) や環境条件 (地理的位置や気候など) と関連していることが示唆されている。そこで我々は、カメルーン ($n = 27$) と日本 ($n = 21$) の健常被験者から採取した皮膚スワブ中の微生物の相対的な存在量と構成の相違について検討した。図 3 にその結果を示す。カメルーン人と日本人の皮膚サンプルのマイクロバイオームは、放線菌、プロテオバクテリア、ファーミクテスという 3 つの門に大部分が属していた 20 以上の属に割り当てることができた。属レベルでは、最も得られた配列はクチバクテリウム、スタフィロコッカス (ブドウ球菌属)、ミクロコッカス、コリネバクテリウム、コクリアであり、程度は低いですがジャニバクターおよびストレプトコッカス (レンサ球菌属) も検出できた。

特に、ブドウ球菌属はカメルーン人と日本人の身体の 3 つの部位すべてで主に検出されたが、日本人参加者の背中のブドウ球菌の相対量はこの研究で調べた他の皮膚部位よりも低く、日本人の 3 つの皮膚部位すべてでクチバクテリウムの数がカメルーン人よりも多いのが特徴的で

あった。また、ベータ解析により、日本人とカメルーン人のそれぞれの部位における細菌叢構成に相似性が乏しいことを見出し（図4）、2つの民族間で細菌叢の構成がかなり異なることを示した。

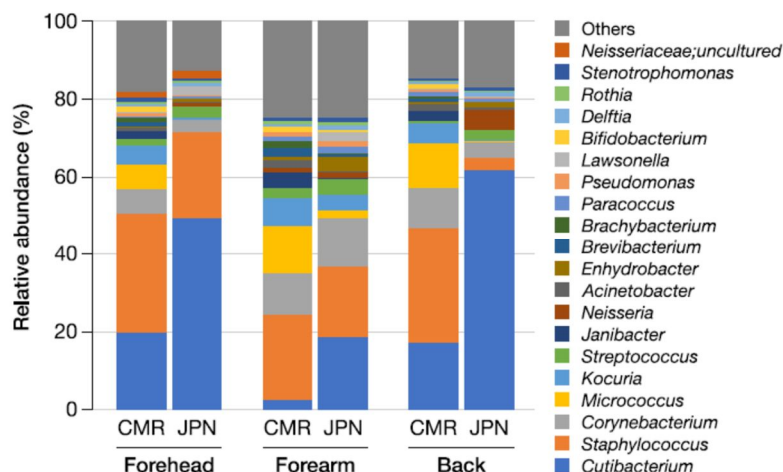


図3. 日本人、カメルーン人の額、前腕、背中の皮膚細菌叢の構成

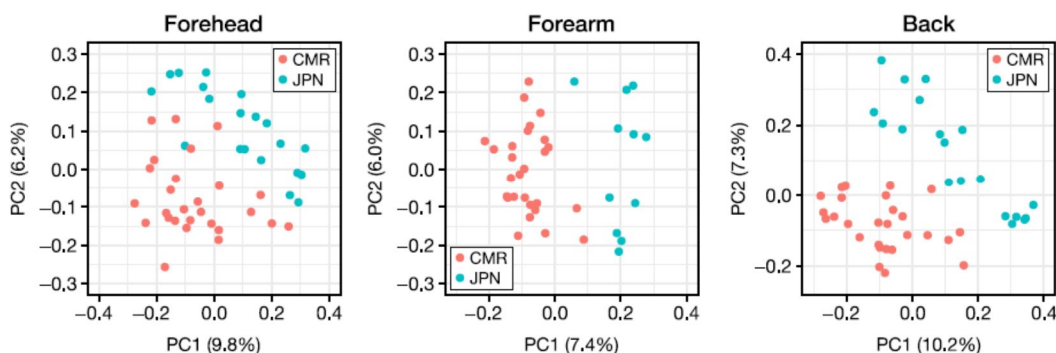


図4. 日本人とカメルーン人の額、前腕、背中の皮膚細菌叢のベータ多様性の比較

3) HIV 感染ないし AIDS 発症のカメルーン人における皮膚細菌叢構成のプロファイル
 病原体の存在や病気、特に皮膚疾患の状態は、ヒトの皮膚マイクロバイオームの構成を変化させる可能性が考えられる。HIV 感染は腸内微生物叢を損ない、深刻な結果を招くことが報告されている。しかし、日和見病原体により生命を脅かす可能性のある皮膚症状については、HIV 感染が皮膚マイクロバイオームに影響を与え、皮膚の恒常性に影響を与えるか否か明らかにされていない。そこで我々は、健康なカメルーン人の3つの異なる皮膚部位における皮膚マイクロバイオームのプロファイルをカタログ化し、それらを HIV 感染者と比較した。健康なカメルーン人および HIV 感染者（健康人（n = 26）と HIV 感染者（n = 43））から採取した皮膚細菌叢を構成する細菌の相対的な存在量を分析した。その結果、HIV に感染したカメルーン人では健康な人よりも皮膚マイクロバイオームのアルファ多様性が高く、ベータ多様性が大きく変化していることを明らかにした（現在論文投稿中のため、データを示さず）。HIV 感染者では、*Micrococcus* や *Kocuria* 種などの皮膚微生物の相対的な存在量が高く、*Cutibacterium* 種の割合が大幅に減少した。これは、HIV 感染に反応してヒトの皮膚細菌叢の変化があったことを示唆するものである。この変化は CD4⁺ T 細胞数とは関連しなかったが（現在論文投稿中のため、データを示さず）、その原因は未だに不明である。

以上より、これらのデータは、皮膚疾患状態の決定および微生物関連の皮膚疾患を治療するための安全な薬理的製剤の発見における皮膚マイクロバイオームの役割について重要な手がかりを提供する可能性を示唆すると考えられた。

5. 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 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ogai Kazuhiro, Nana Benderli Christine, Lloyd Yukie Michelle, Arios John Paul, Jiyarom Boonyanudh, Awanakam Honore, Esemu Livo Forgu, Hori Aki, Matsuoka Ayaka, Nainu Firzan, Megnekou Rosette, Leke Rose Gana Fomban, Ekali Gabriel Loni, Okamoto Shigefumi, Kuraishi Takayuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Skin microbiome profile of healthy Cameroonians and Japanese	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-05244-5	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 該当する

1. 著者名 Benderli Nana C., Ogai Kazuhiro, Lloyd Yukie M., Arios John Paul, Jiyarom Boonyanudh, Awanakam A. Honore, Esemu Livo Forgu, Hori Aki, Megnekou Rosette, Leke Rose G.F., Kuraishi Takayuki, Okamoto Shigefumi, Ekali Gabriel Loni	4. 巻 13
2. 論文標題 Feasibility of microbial sample collection on the skin from people in Yaound?, Cameroon	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 360 ~ 364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2019.01075	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 該当する

1. 著者名 Nagase Satoshi, Ogai Kazuhiro, Urai Tamae, Shibata Kana, Matsubara Emi, Mukai Kanae, Matsue Miki, Mori Yumiko, Aoki Miku, Arisandi Defa, Sugama Junko, Okamoto Shigefumi	4. 巻 7
2. 論文標題 Distinct Skin Microbiome and Skin Physiological Functions Between Bedridden Older Patients and Healthy People: A Single-Center Study in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2020.00101	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松岡礼華, 大貝和裕, 倉石貴透, 岡本成史
2. 発表標題 A new measuring method for antimicrobial activity of lauric acid against various human gut microbes
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長瀬賢史, 大貝和裕, 浦井珠恵, 柴田佳奈, 向井加奈恵, 松榮美希, 青木未来, Defa Alsandi, 須釜淳子, 岡本成史
2. 発表標題 寝たきり高齢者における皮膚細菌叢の変化と褥瘡後感染の発症への影響
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松榮美希, 森裕美子, 長瀬賢史, 小倉康平, 大貝和裕, 杉山友太, 平野里佳, 栗原 新, 岡本成史
2. 発表標題 A new measuring method for antimicrobial activity of lauric acid against various human gut microbes.
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原春香, 小倉康平, 彼谷裕康, 中村雅彦, 秋山徹, 岡本成史.
2. 発表標題 富山県立中央病院において分離されたLancefield A群 Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis のゲノム解析.
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	倉石 貴透 (Kuraishi Takayuki) (90613167)	金沢大学・薬学系・准教授 (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	大貝 和裕 (Ogai Kazuhiro) (40706983)	金沢大学・A I ホスpital・マクロシグナルダイナミクス研究開発センター（保）・准教授 (13301)	
研究分担者	須釜 淳子 (Sugama Junko) (00203307)	藤田医科大学・保健衛生学部・教授 (33916)	

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