

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03701

研究課題名（和文）新規皮膚メタトランスクリプトーム解析手法による疾患発症予測因子の探索

研究課題名（英文）Novel method of skin metatranscriptome analysis for predicting the onset of skin disease

研究代表者

松岡 悠美（MATSUOKA, YUMI）

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・教授

研究者番号：10402067

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトアトピー性皮膚炎の非侵襲的スワブサンプリングから増幅したRNAよりメタトランスクリプトーム解析を行った。またアトピー性皮膚炎自然発症モデルマウス未病期皮膚遺伝子発現データを既存データベースから取得し、ヒトデータの整合性を確認した。サンプリングの解析成果として、生後3日目の新生児皮膚細菌叢が1歳時のアトピー性皮膚炎の発症に関連することを見出したので、新生児期のトランスクリプトームに焦点を当て解析を行った。アトピー性皮膚炎発症群と非発症群で有意差を持って発現が異なる新生児期の遺伝子の多くは、マウスの遺伝子発現パターンと一致した。疾患予防の新規ターゲット遺伝子X（未公開）を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の確立した系では、皮膚生検などの侵襲的な処置を必要としないため、同一部位から経時的に繰り返し、サンプリングを行うことができる。こういった背景を鑑みると、我々が確立した宿主・菌叢メタトランスクリプトームはまさに発症前の皮膚疾患を解析するのに最適な解析法と考えている。本解析法を用い、ADの発症予防のためのバイオマーカーを探索できたことそのものも学術的に非常に意義深いと考えているが、今後疾患での予防効果などを具体的に示すことができれば、治療法の創出にもつながると考えている。

研究成果の概要（英文）：We performed a metatranscriptomic analysis using amplified RNA from non-invasive swab sampling of human atopic dermatitis, complemented by gene expression data from pre-disease skin in a naturally occurring mouse model of atopic dermatitis obtained from existing databases. This confirmed the alignment between human and mouse transcriptomic data. Building on previous research that linked the skin microbiota of neonates at three days old to the development of atopic dermatitis by age one, we focused on analyzing the neonatal transcriptome. We found many genes significantly differentially expressed between the groups with and without atopic dermatitis onset, which mirrored the expression patterns in disease and healthy groups during the mouse pre-disease stage. Furthermore, we successfully identified a novel target gene X (unpublished) as a potential intervention point in the pre-disease stage for effective disease prevention.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 トランスクリプトーム 発症前

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アレルギーの発症を予防することは、現代医学における最も重要な課題の一つである。我々は先行研究において、皮膚における非侵襲的メタトランスクリプトーム解析法を確立した。この手法によって、同一個体・同一部位から経時的に RNA サンプルを回収することができ、我々宿主および、皮膚常在微生物叢の遺伝子発現を網羅的に解析することができる。アトピー性皮膚炎は幼小児期におけるアレルギーマーチの最もはじめの起点になると考えられている。アトピー性皮膚炎およびその動物モデルのデータから、数理モデルなどの手法を用いて、発症前のバイオマーカー探索を行う。発症前のバイオマーカーはアレルギー疾患を予防するための早期介入指標となりうるため、臨床の場で正しい介入時期、介入手法を確立するための足がかりとなりうる。また、そのバイオマーカーが疾患においてどのような役割を果たしているのかを培養系および動物モデルなどを用いて解析することで、免疫系と微生物叢の皮膚における相互関係を探索する。

2. 研究の目的

平成17年の厚生労働省の報告によると、日本人の3人に1人は何らかのアレルギー疾患に罹患しているとされ、その対策、予防法の開発は医学的・社会的側面から見ても急務である。皮膚アレルギー疾患であるアトピー性皮膚炎 (Atopic dermatitis, 以下 AD) は開発途上国では民族的背景が似ていても罹患率は低く、このことは何らかの環境要因をコントロールすることで、アレルギー疾患を予防することが可能であることを示している。これらの環境因子の一つとして、ADにおける黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の生着が健常人に比較して高いことが影響している可能性があるため、我々これまで *S. aureus* の AD における役割を解析してきた。まず、我々は、新規に *S. aureus* 経表皮感染マウスモデルを確立し、*S. aureus* の産生する外毒素 δ -toxin が肥満細胞を刺激し、Th2 型の皮膚反応を惹起するが、菌体は排除しない事を明らかにした。また、近年の研究成果により、アレルギー疾患である AD や喘息において Th2 のみならず、IL-17 産生細胞の関与を示唆されるが、我々のモデルを用いた検討においても、*S. aureus* からの外分泌毒素である PSM α が、ケラチノサイト由来の IL-1, IL-36 サイトカインが、IL-17 依存性の皮膚炎を惹起することを見出した。これらの研究成果は長い間不明であった AD の環境因子依存の炎症惹起の機序を病原微生物の側面から解明したが、一つの必要条件を示したに過ぎず、AD における複雑な皮膚反応を説明できるものではない。そこで、これまでに、千葉大学小児科と共同研究で乳児の出生コホートにて採取された *S. aureus* の全ゲノム解析を行い、なぜ、*S. aureus* が AD 患者皮膚に特異的に生着し、健常皮膚からは排除されるのかについて検討を行い、健常皮膚では *S. aureus* の *agr* 遺伝子領域に機能喪失型の変異が蓄積することで排除につながっている可能性が示された。

そこで、皮膚のどのような因子が *S. aureus* ゲノムに変異を誘導するのかを探索するため、皮膚からスワブで非侵襲的に採取したサンプルから RNA を採取し、宿主および、細菌、真菌、ウイルスのトランスクリプトームを網羅的に解析する新規のメタトランスクリプトーム手法を確立した。本研究では、この全く新しいメタトランスクリプトーム手法を用いて、集団全体から経時的に、サンプルを解析する。経時的に得られた、健常個体および AD 個体のメタトランスクリプトームを比較することで、疾患発症前のどのような因子が最も早期に変化するのかそのバイオマーカーとなりうる因子を同定する。また、これらの早期のバイオマーカーが起点となり、どのような宿主-微生物叢の相互作用を引き起こし AD 発症につながっていくのかを動物モデルを用いて解析する。

3. 研究の方法

発症を予測するバイオマーカーを探索するために、動物モデル、乳児皮膚サンプルデータをそれぞれ解析する。得られた複雑なデータからそれぞれのマーカーの相互関係を予測する。その後、検出されたバイオマーカーがどのような順で疾患発症につながっていくのかを、動物モデルを用いて検証することで、疾患予防のための介入ターゲットを明らかにする。

4. 研究成果

ヒトアトピー性皮膚炎の非侵襲的スワブサンプリングにより取得したサンプルは、全時点データが揃ったものがおよそ130人分、生後3日目、1ヶ月目、3ヶ月目、6ヶ月目の全4時点になり、1歳時のアトピー性皮膚炎、食物アレルギーの発症の有無に紐づけされていた。アトピー性皮膚炎の発症人数は13名、その他は非発症であった。メタトランスクリプトームサンプルの解析は研究費の費用的な制限があるため、まず安価に行える細菌叢解析を全時点で行った。細菌叢解析結果により、1歳時にアトピー性皮膚炎を発症する乳児においては健常であった乳児と比較して、生後3日目にすでに皮膚の細菌叢が異なっていることが明らかとなった (引用文献1)。また、この細菌叢の変化は、生後3日目で最も顕著で月齢が上がると検出されないことからメタトランスクリプトームデータの取得は生後3日目のサンプルで行い、アトピー性皮膚炎

発症群とほぼ同数のサンプルを健常群からランダムに抽出した。増幅取得した amplified RNA よりメタトランスクリプトーム解析を行い、ヒト側のデータと細菌叢側のデータを振り分けた。またアトピー性皮膚炎自然発症モデルマウス未病期皮膚遺伝子発現データを既存データベースから取得し、ヒトメタトランスクリプトームデータの整合性を確認した。先行研究で得られていたサンプリングの解析成果として、生後3日目の新生児皮膚細菌叢が1歳時のアトピー性皮膚炎の発症に関連することを見出したので、新生児期のトランスクリプトームに焦点を当て解析を行った。FDR<0.05以下のサンプルの内、SNRで順位付けを行い解析したところ、アトピー性皮膚炎発症群で特異的に上昇する遺伝子、もしくは低下する遺伝子がそれぞれ同定され、多くは想定通り表皮角化細胞の分化等に関連する因子であったが、アトピー性皮膚炎群で最も上昇する遺伝子は、Th2やTh17の分化に関わる遺伝子X(未公開)であった。

計画上では次に、これらアトピー性皮膚炎発症群と非発症群で有意差のある遺伝子発現が、偶発的に見られた現象でないかどうかを確認するために、自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデルであるK5Stat3f/fマウスより発症前に皮膚からサンプリングを行い検討する予定であった。このマウスにおいては同一遺伝型であるにも関わらず、約半数は10週齢くらいまでに非常に激しい、IL-4R依存性、Rag依存性の皮疹と、高IgE血症を呈する一方で、半数は未発症で経過するという形質を示す。また、細菌叢が存在しないGerm Freeの条件下では劇的に発症が抑制されることから、臨床にかなり即したモデルであると考えられることができる。本実験でもK5Stat3f/fマウス導入を行い、これらの形質が既報通り再現されることを確認した。サンプリングを行う予定のところではあったが、すでに公開データベース上にK5Stat3f/fマウスの発症前に発症群、非発症群で経時的にサンプルが行われたトランスクリプトームデータが存在していたため、この公開データを用いて発症群、非発症群で再解析を行い、ヒトで得られたデータと同様の傾向を、発症前に示すのか検討を行った。すると、このアトピー性皮膚炎発症群と非発症群で有意差を持って発現が異なる新生児期の遺伝子の多くは、マウスの未病期に得られた疾患群と健常群の遺伝子発現パターンと一致した。この結果より、ヒト乳児皮膚より非侵襲的にスワブ法で得られたデータから、疾患の未病期に発症を予測する新規パラメータとして有用であると考えられる新規バイオマーカーを得ることができたと考えた。

さらに、特に我々は、Th2、Th17の誘導に関わる遺伝子Xに着目し、その有用性を確実にするため、研究で得られた100以上の臨床パラメータと遺伝子Xについて相関解析を行った。その結果、遺伝子Xと有意に相関していた臨床スコアとして、SCWC(Stratum Corneum Water Content, 角質水分量)が負の相関、母体血IgEが正の相関をしていることが明らかとなった。近年、マウスモデルにおいては母体血に含まれるIgEが胎児皮膚に移行することが報告されているが、IgEはヒト胎盤通過性を有しないため、母体血IgEそのものというよりは、IgEにより母体血中に誘導される何らかの因子が胎生期に移行することにより、新生児皮膚のgeneXの発現が誘導されTh2, Th17側に免疫系が誘導されることが、将来のアトピー性皮膚炎発症に繋がる可能性が見出された。

(引用文献)

1. Aoyama R, Nakagawa S, Ichikawa Y, Inohara N, Yamazaki Y, Ito T, Sugihira T, Kono M, Akiyama M, Takahashi H, Takaya A, Ichikawa F, Nakano T, Tanaka S, Koyano Y, Fujimoto M, Núñez G, Shimojo N, Nakamura Y. Neonatal skin dysbiosis to infantile atopic dermatitis: Mitigating effects of skin care. *Allergy*. 2024 Mar 9. doi: 10.1111/all.16095.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsuji Ryohei, Yazawa Kamiyu, Kokubo Takeshi, Nakamura Yuumi, Kanauchi Osamu	4. 巻 9
2. 論文標題 The Effects of Dietary Supplementation of Lactococcus lactis Strain Plasma on Skin Microbiome and Skin Conditions in Healthy Subjects?A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 563 ~ 563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms9030563	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 Miyachi Hideaki, Wakabayashi Seiichiro, Sugihira Takashi, Aoyama Reika, Saijo Shinobu, Koguchi-Yoshioka Hanako, Fujimoto Manabu, Nunez Gabriel, Matsue Hiroyuki, Nakamura Yuumi	4. 巻 223
2. 論文標題 Keratinocyte IL-36 Receptor/MyD88 Signaling Mediates Malassezia-Induced IL-17 Dependent Skin Inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1753 ~ 1765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiab194	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 該当する
1. 著者名 Matsumoto Masanori, Nakagawa Seitaro, Zhang Lingzhi, Nakamura Yuumi, Villaruz Amer E., Otto Michael, Wolz Christiane, Inohara Naohiro, Nunez Gabriel	4. 巻 29
2. 論文標題 Interaction between Staphylococcus Agr virulence and neutrophils regulates pathogen expansion in the skin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Host & Microbe	6. 最初と最後の頁 930 ~ 940.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chom.2021.03.007	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 該当する
1. 著者名 Nakamura Y, Takahashi H, Takaya A, Inoue Y, Katayama Y, Kusuya Y, Shoji T, Takada S, Nakagawa S, Oguma R, Saito N, Ozawa N, Nakano T, Yamaide F, Dissanayake E, Suzuki S, Villaruz A, Varadarajan S, Matsumoto M, Kobayashi T, Kono M, Sato Y, Akiyama M, Otto M, Matsue H, Nunez G, Shimojo N.	4. 巻 12(551)
2. 論文標題 Staphylococcus Agr virulence is critical for epidermal colonization and associates with atopic dermatitis development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science translational medicine.	6. 最初と最後の頁 eaay4068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.aay4068	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 該当する

1. 著者名 Tamai Masakazu, Yamazaki Yuriko, Ito Tomoka, Nakagawa Seitaro, Nakamura Yuumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Pathogenic role of the staphylococcal accessory gene regulator quorum sensing system in atopic dermatitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 1178650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2023.1178650	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 Yamazaki Yuriko, Ito Tomoka, Tamai Masakazu, Nakagawa Seitaro, Nakamura Yuumi	4. 巻 44
2. 論文標題 The role of Staphylococcus aureus quorum sensing in cutaneous and systemic infections	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-024-00323-8	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 Aoyama Reika, Nakagawa Seitaro, Ichikawa Yoko, Inohara Naohiro, Yamazaki Yuriko, Ito Tomoka, Sugihira Takashi, Kono Michihiro, Akiyama Masashi, Takahashi Hiroki, Takaya Akiko, Ichikawa Fumitaka, Nakano Taiji, Tanaka Seiko, Koyano Yutaka, Fujimoto Manabu, N?ez Gabriel, Shimojo Naoki, Nakamura Yuumi	4. 巻 na
2. 論文標題 Neonatal skin dysbiosis to infantile atopic dermatitis: Mitigating effects of skin care	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 na
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.16095	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0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------