

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08669

研究課題名(和文)皮膚微小環境において極小マイクロバイームが果たす役割の解明

研究課題名(英文)Elucidating the role of the microbiome in the skin microenvironment

研究代表者

中島 沙恵子(Nakajima, Saeko)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：70574408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚外科手術の腫瘍部分以外の余剰正常皮膚を用いて正常皮膚パラフィン包埋ブロックを作成し、LCM搭載光学顕微鏡を用いて表皮、毛包、汗腺、脂腺、皮下組織、陰性コントロールを採取し、DNA抽出を行なった。本来細菌由来DNAが検出されないはずである陰性コントロールからも一定量の細菌由来DNAが検出されたため、16srRNAシーケンスを行い、皮膚サンプルとの差異を確認したが、皮膚サンプルと陰性コントロールとを完全に区別することが困難であった。現在、パラフィン包埋の際に使用する試薬や光学顕微鏡システム由来の細菌コンタミネーションを考え、これを除外した実験系の最適化を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、皮膚マイクロバイームを皮膚付属器レベルまで細分化し理解しようとする試みであり、さらには極小皮膚マイクロバイームと微小環境のクロストークの詳細を正常皮膚と疾患病変部を対比して解析することで、炎症性皮膚疾患の病態メカニズムの解明と新たな治療ターゲットの創出への展開を目指す、学術的・社会的に重要な試みである。

研究成果の概要(英文)：A paraffin-embedded block of normal skin was prepared using surplus normal skin other than the tumor area from dermatologic surgery, and epidermis, hair follicles, sweat glands, sebaceous glands, subcutaneous tissue, and negative controls were collected and DNA extraction was performed using an optical microscope with LCM. Since a certain amount of bacterial DNA was detected even in the negative control, which should not contain bacterial DNA, 16srRNA sequencing was performed to confirm the difference from the skin sample, but it was difficult to completely distinguish between the skin sample and the negative control. We are currently considering bacterial contamination from the reagents used during paraffin embedding and from the optical microscope system, and are looking into optimizing the experimental system to exclude this contamination.

研究分野：皮膚科学

キーワード：マイクロバイーム 皮膚 付属器 炎症性皮膚疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚表面には多数の細菌、真菌、ウイルスなどの微生物が共生し、皮膚特有の集団を構成しており、これらは皮膚マイクロバイオームと呼ばれている。皮膚マイクロバイオームの中でも、特に細菌叢は身体部位に特異的な構成を有することが知られている。例えば、背部や前胸部などの脂漏部位にはキュティバクテリウム属やコリネバクテリウム属などが大勢を占め、一方、肘関節屈側や膝関節屈側などの湿潤部位ではブドウ球菌属が大勢を占めることが報告されている。しかしながら、これまでの解析は皮膚全体としての解像度で得られた結果であり、皮膚における汗腺や毛包、脂腺といった付属器レベルごとの極小マイクロバイオームの詳細については未だ明らかになっていない。微小構造特異的な極小マイクロバイオームは、微小環境を規定する水分量、温度、pH、抗菌ペプチド、脂質などの様々な因子により影響を受けることが予測されるが、実際に皮膚微小環境が付属器周辺の極小マイクロバイオームに与える影響や逆に極小マイクロバイオームが付属器の機能に何らかの影響を与えうるのか、炎症性皮膚疾患の病態に何らかの影響を与えうるのか、についての詳細は不明である。

2. 研究の目的

本申請研究の目標は、これまで皮膚という臓器全体として解析されてきた皮膚マイクロバイオームを皮膚の微小構造物ごとに細分化し理解することである。すなわち、汗腺や脂腺、毛包といった皮膚付属器周辺の極小皮膚マイクロバイオームの詳細を明らかにし、さらにこの極小皮膚マイクロバイオームが皮膚付属器をはじめとする微小環境に与える影響を解明することを目標とする。

研究期間中に、具体的に以下の項目の達成を目標とする。

- (1) Laser capture microdissection (LCM)を用いた皮膚極小マイクロバイオーム解析(令和2年度～3年度)
- (2) 炎症性皮膚疾患病変部における極小マイクロバイオームの特徴の理解(令和3年度～4年度)
- (3) 疾患特異的極小マイクロバイオーム由来微生物株の抽出と動物モデルを用いた検討(令和4年度以降)

3. 研究の方法

まず健常皮膚を用いて、皮膚付属器ごとの極小皮膚マイクロバイオームについての詳細な解析を行う。次に、健常皮膚と比較して、アトピー性皮膚炎をはじめとする炎症性皮膚疾患の病変部において極小皮膚マイクロバイオームがどのように変化し、病態に関与しうるかを、極小皮膚マイクロバイオーム由来微生物株と動物モデルを用いて詳細に解析することで、最終的には、極小皮膚マイクロバイオーム理解に基づいた新たな治療ターゲットの創出を目指す。

- (1) Laser capture microdissection (LCM) 法は、光学顕微鏡観察下で組織切片から目的とする少数の細胞集団や領域を単離する技術である。本研究では、京都大学医学部附属病院位の倫理委員会で承認された臨床研究に基づき同意を得た患者からの外科的切除手術における余剰皮膚を正常皮膚として回収し、使用する。サンプル採取後可及的速やか

にホルマリン固定後パラフィンブロックとして保存されたものか、OCT コンパウンドに凍結皮膚切片として保存されたものを用いる。皮膚ブロックを薄切し LCM 用スライドグラスに貼付し、組織構築を確認するための染色を行い、十分に風乾させたのち試料として用いる。学内の協力研究室が保有している Leica 社 LCM 設備搭載光学顕微鏡を用い、皮膚付属器と周辺の微生物叢を含めて LCM 法にて採取し、DNA 抽出を行う。微生物由来 DNA の増幅を行い、シーケンス解析に向けたサンプル調整を行い、シーケンス、結果を解析し極小マイクロバイオームの詳細を明らかにする。

- (2) (1)と同様の方法を用い、京都大学医学部附属病院皮膚科を受診し、アトピー性皮膚炎と診断された成人患者の病変部より診断のために採取した生検サンプルの余剰分を用い、疾患特異的な極小マイクロバイオームについて詳細な解析を行う。
- (3) (2)と同一患者の病変部から保存してあるスワブサンプルから培養法を用いて、極小マイクロバイオーム由来の微生物株を樹立する。樹立した疾患由来株をアトピー性皮膚炎動物モデルに適用し、アトピー性皮膚炎の病態にどのような影響を与えるかについて、詳細な解析を行う。

4 . 研究成果

皮膚外科手術の腫瘍部分以外の余剰正常皮膚を用いて正常皮膚パラフィン包埋ブロックを作成した。LCM 用スライドグラスに貼付し、LCM 搭載光学顕微鏡を用いて表皮、毛包、汗腺、脂腺、皮下組織、陰性コントロールを採取し、DNA 抽出を行なった。

それぞれのサンプリング部位から一定量の細菌由来 DNA を抽出することに成功したが、本来細菌由来 DNA が検出されないはずである陰性コントロールからも一定量の細菌由来 DNA が検出されたため、16srRNA シーケンスを行い、皮膚サンプルとの差異を確認した。菌叢解析の結果、皮膚サンプルと陰性コントロールとを完全に区別することが困難であった。

現在、パラフィン包埋の際に使用する試薬や光学顕微鏡システム由来の細菌コンタミネーションを考え、これを除外した実験系の最適化を検討している。

研究期間中にサンプリングを行なった炎症性皮膚疾患患者由来の皮膚細菌については、培養法を用いて収集・菌株採取を行っているため、今後皮膚付属器特異的と考えられる細菌が同定されれば、該当する菌株をマウスアトピー性皮膚炎モデルに適用し、病態への影響を vivo で確認していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	中川 一路 (Nakagawa Ichiro) (70294113)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	

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