

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08308

研究課題名(和文) ヒト皮膚微生物叢における菌株レベルでの新規機能の同定

研究課題名(英文) Identification of novel functions at the strain level in the skin microbiota

研究代表者

伊東 可寛 (ITO, Yoshihiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：70645837

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)：皮膚常在菌は外界からの病原体の侵入を防ぐバリアーとしてや、宿主の免疫応答や代謝機能を調整することで恒常性の維持に欠かせない。しかし、個々の菌と宿主の相互関係には不明点が多く残されている。本研究ではマウスやヒトから単離した皮膚常在菌を用いて、無菌マウスに接種したノトバイオームマウスをビニールアイソレーター内で作成する手技を確立した。のとバイオームマウスの皮膚の遺伝子発現解析により、菌株によって特徴的な免疫応答の誘導や代謝経路の活性化が起こることを見出した。そして投与した菌の皮膚上での遺伝子発現を解析するためのプロテオミクスや、宿主の皮膚に含まれるステロイドの定量するリピドミクスの手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚常在菌は恒常性の維持に重要で、その乱れは様々な炎症性皮膚疾患との関連が指摘されている。本研究では動物モデルと単離した菌株を用いて、宿主と特定の菌の相互作用を探るための様々な解析手法を確立した。本研究で確立した手法を用いて皮膚常在菌の機能を解析することで、皮膚の恒常性の維持や炎症性皮膚疾患における皮膚常在菌の機能や病態生理を解明する礎となると考えられる。さらに皮膚常在菌を治療標的とした、または皮膚常在菌自体を用いた治療法が今後社会実装されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The skin microbiota are essential for homeostasis by acting as a barrier against pathogen invasion from external environment and by regulating the host immune response and metabolic function. However, the interactions among the host and microorganisms remain largely unknown. In this study, we established a technique to generate gnotobiotic mice in vinyl isolators inoculated with germ-free mice using isolated skin bacteria to investigate crosstalks of the host and specific bacterial strains. We found that specific strains induced characteristic immune responses and metabolic pathways in the skin. We established a method of proteomics to analyze gene expression pattern of the inoculated bacteria on the skin. A lipidomics technique to quantify steroids in the skin of the mice inoculated with isolated skin microbiota was also demonstrated.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚マイクロバイオーーム 皮膚免疫 菌叢

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚常在菌は外界からの病原菌の侵入を防ぐバリアーとして機能することに加えて、宿主の免疫応答や代謝機能を調整することで恒常性の維持に重要な役割を担っている。また菌叢の乱れは様々な炎症性疾患の病態に関連することが明らかになっている。しかしながら、個々の菌と宿主との相互関係は多くの検討の余地が残されている。これまでの研究では病原性のある菌種に着目されることが多く、健全な状態で宿主と共生的な皮膚常在菌との相互作用は特に未解明な点が多かった。さらに、宿主と菌との相互作用は種 (species) よりも菌株 (strain) によって異なることが提唱され、皮膚疾患に対する特定の皮膚常在菌の菌株を用いた生菌製剤の開発が報告され始めていた。

菌叢解析は次世代シーケンサーの技術発展に伴って近年飛躍的に進歩した領域である。しかし、菌叢解析では病態と菌叢の相関関係が明らかになる一方で、因果関係の証明には至らない問題点がある。生菌製剤に用いる菌株を評価して選択するためには、*in vivo* で厳格に菌株-宿主の相互作用を評価する必要がある。そこで菌叢の機能および宿主との相互作用を明らかにするためには、特定の菌株と動物モデルを用いた解析手法の確立が求められる。

### 2. 研究の目的

本研究では健全皮膚の微生物叢より単離培養した菌株とノトバイオーム技術を用いて、菌株-宿主の相互作用による免疫応答や代謝機能などへの効果を *in vivo* で評価し、菌株の機能を同定することを目的とする。皮膚の常在菌による宿主への影響を各菌株レベルで紐解くことで、微生物叢-宿主皮膚の相互作用で形成される皮膚バリア機能の理解を深めるとともに、皮膚微生物叢の操作による皮膚疾患の新たな治療法に繋がる成果を目指す。

### 3. 研究の方法

皮膚微生物叢に秘められた機能を詳細に解明するためには、皮膚微生物叢を単離培養した菌株ライブラリーの作成と、無菌アイソレーター内で特定の菌叢を投与することで保持する微生物叢が全て同定された動物 (ノトバイオーム) の作成技術を併用し、一つ一つの菌株-宿主の相互作用を *in vivo* で直接的に評価する必要がある。そのため本研究課題では以下の様に取り組んだ。

#### (1) ヒト皮膚微生物叢を用いたノトバイオームマウスの作成

通常環境下と無菌環境下のマウス皮膚の遺伝子発現プロファイルと比較し、マウスのマイクロバイオームは皮膚の免疫応答の賦活化や表皮の分化を促進する (Meisel ら, Microbiome, 2018)。健康人より採取した皮膚微生物叢を菌叢解析、無菌マウスへ投与してノトバイオームマウスを作成することで、皮膚微生物と宿主の応答をより直接的にその因果関係を解析する。具体的にはマウスやヒトより採取した皮膚微生物叢や単離株を、無菌アイソレーター内で無菌マウスの皮膚へ塗布してノトバイオームマウスを作成する。菌の定着を確認した後に、ノトバイオームマウスの皮膚から免疫細胞を分離して、FACS 解析で免疫細胞の誘導の有無を解析する。また皮膚サンプルから定量 PCR や RNA-seq 解析で様々な遺伝子の発現プロファイルと比較する。

#### (2) 皮膚の環境変化と微生物叢の機能評価

野生型や皮膚炎自然発症モデルマウスを用いて、皮膚微生物叢を投与したノトバイオーム

マウスに抗生剤や高脂肪食の投与、皮膚炎を誘導する薬剤の塗布などで皮膚環境を変化させ、表現型の変化と菌叢の相関関係を解析する。

### (3) 単一菌株または複数菌株を用いたノトバイオートマウスの作成

上述の解析で特徴的な表現型と相関する単一菌株や、少数の菌株ユニットを用いてノトバイオートマウスを作成する。単離培養した菌株を用いることで、表現型との直接的な因果関係を明らかにして、菌株レベルの機能を同定する。

## 4. 研究成果

### (1) 皮膚常在菌を用いたノトバイオートマウス作成法の樹立

本研究課題を通じて、マウスやヒト皮膚からの皮膚常在菌叢を回収するための手法および単離方法を確立した。マウスの皮膚の 1.5cm 四方や、ヒトの皮膚の 2cm 四方から PBS で湿らせた綿棒で 50 回擦過して菌叢を回収し、様々な寒天培地に播種して好気および嫌気条件下で培養してコロニーを得た。得られたコロニーは 16S rRNA 領域を PCR で増幅し、サンガー法で菌種を同定した。実施期間中に約 250 の菌株を取得した。

得られた *Staphylococcus* 属は、Brain heart infusion (BHI) (BD) 培養液で、好氣的条件下、37 °C で一晩培養し、約  $2.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^7$  CFU に調整した。細菌懸濁液 (マウス 1 匹あたり 500mL) を綿棒でこすりつけて無菌マウスに局所投与して、それぞれの菌株ごとに独立したビニールアイソレーター内で一定期間飼育した。投与した菌の定着はマウス皮膚のスワブを採取して確認した。

### (2) 単離株を用いたノトバイオートマウス解析を通じた機能同定

無菌マウスに単離した菌株を塗布して接種し、皮膚における免疫細胞を分離して FACS 解析を行った。野生型マウスにマウス由来やヒト由来の黄色ブドウ球菌を単独定着させることで、皮膚炎は発症しないが、皮膚および皮膚所属リンパ節において IL-17A 産生の  $\alpha\beta$  T 細胞および  $\gamma\delta$  T 細胞の増加を認めた。また表皮ブドウ球菌の一部の株では、マウス皮膚に定着することで Treg 細胞の増加がみられた。

皮膚炎モデルマウスである *Tmem79*<sup>-/-</sup> マウスは無菌下では皮膚炎を発症せず、黄色ブドウ球菌を単独定着させることで IL-17A 産生 T 細胞依存性に皮膚炎を発症する。この無菌 *Tmem79*<sup>-/-</sup> マウスに黄色ブドウ球菌を定着させる前に、表皮ブドウ球菌または *Staphylococcus cohnii* を事前に接種することで、黄色ブドウ球菌による皮膚炎の発症を予防することを見出した。黄色ブドウ球菌の皮膚への定着菌量は、表皮ブドウ球菌の事前接種によって有意に減少する一方、*S. cohnii* は黄色ブドウ球菌の菌量は減少させずに皮膚炎を抑制した。In vitro で黄色ブドウ球菌との共培養でも、表皮ブドウ球菌は黄色ブドウ球菌の増殖を抑制する一方で、*S. cohnii* は黄色ブドウ球菌の増殖抑制能はみられなかった。これらの結果から、表皮ブドウ球菌は黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用と Treg 細胞誘導による炎症抑制効果によって皮膚炎発症を抑制していることが考えられた。一方で *S. cohnii* は黄色ブドウ球菌に対する効果ではなく、宿主に直接抗炎症作用を発揮して皮膚炎を抑制している可能性が考えられた。

*S. cohnii* の宿主との相互作用を明らかにするべく、*S. cohnii* の単独定着したマウスの皮膚の遺伝子発現解析を行った。その結果、抗炎症作用を有する *S. cohnii* 株を定着させたマウス皮膚では、ステロイドに関連する遺伝子発現およびパスウェイが亢進していることを見出した。さらに LC-MS/MS で *S. cohnii* の単独定着したマウスの皮膚における各種ステロイドホ

ルモンの含有量を計測する系を構築して解析したところ、*S. cohnii* 株を定着させることで皮膚における糖質コルチコイド(コルチコステロン)が特異的に高値となっていた。一方で血清では明らかな糖質コルチコイド値の上昇はみられなかった。これらの結果から、*S. cohnii* 株を定着させることで皮膚局所で糖質コルチコイドの産生が亢進し、抗炎症作用を發揮すると考えられた (**Cell Rep.** **35**, 109052, 2021)。

本研究課題ではこれらの結果を通じて、皮膚常在菌の単離株に対して機能同定を進める基盤技術を構築した。そして得られた菌株を用いて解析を進めることで、菌株特有の宿主-菌の相互作用を明らかにした。抗炎症作用などの特徴的な宿主-菌の相互作用を応用することで、生菌を用いた製剤での炎症性皮膚疾患への応用が考えられる (**Inflamm Regener.** **42**, 26, 2022; **Curr Opin Microbiol.** **74**, 102311, 2023)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 Ito Yoshihiro, Amagai Masayuki	4. 巻 42
2. 論文標題 Controlling skin microbiome as a new bacteriotherapy for inflammatory skin diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-022-00212-y	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 伊東可寛	4. 巻 2
2. 論文標題 皮膚科学研究に応用できる最新テクニックとアプローチ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 皮膚科	6. 最初と最後の頁 445-451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 伊東 可寛, 海老原 全	4. 巻 327
2. 論文標題 【アトピー性皮膚炎診療の最前線-新規治療をどう取り入れ,既存治療を使いこなすか-】新規治療薬・病勢マーカーを使いこなす 皮膚常在微生物叢に基づいたアトピー性皮膚炎の治療法	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Derma	6. 最初と最後の頁 61-67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Ito Y, Sasaki T, Li Y, Tanoue T, Sugiura Y, Skelly AN, Suda W, Kawashima Y, Okahashi N, Watanabe E, Horikawa H, Shiohama A, Kurokawa R, Kawakami E, Iseki H, Kawasaki H, Iwakura Y, Shiota A, Yu L, Hisatsune J, Koseki H, Sugai M, Arita M, Ohara O, Matsui T, Suematsu M, Hattori M, Atarashi K, Amagai M, Honda K	4. 巻 35
2. 論文標題 Staphylococcus cohnii is a potentially biotherapeutic skin commensal alleviating skin inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109052 ~ 109052
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109052	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 Ito Yoshihiro, Amagai Masayuki	4. 巻 74
2. 論文標題 Dissecting skin microbiota and microenvironment for the development of therapeutic strategies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Opinion in Microbiology	6. 最初と最後の頁 102311 ~ 102311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mib.2023.102311	査読の有無 無
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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Ito Y et al.
2. 発表標題 Staphylococcus cohnii can alleviate diverse skin inflammation
3. 学会等名 第50回日本免疫学会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ito Y et al.
2. 発表標題 Staphylococcus cohnii can alleviate diverse skin inflammation
3. 学会等名 50th Annual European Society for Dermatological Research Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021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

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