

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 15 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590150

研究課題名（和文） 難治性皮膚疾患・尋常性乾癬の悪化因子となる皮膚常在微生物の解析に基づく疾患制御

研究課題名（英文） Disease control based on analysis of cutaneous microbiota in patients with psoriasis

研究代表者

杉田 隆 (SUGITA TAKASHI)

明治薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10312076

研究成果の概要（和文）：

尋常性乾癬は多量の鱗屑を伴う皮膚疾患である。本研究では皮膚常在微生物が本疾患の悪化因子の一つと考え、当該微生物を制御することで本疾患の制御が可能と考えた。網羅的に患者皮膚微生物叢を解析したところ、疾患固有の菌叢が形成されていた。これらの微生物は Th1 型サイトカインを誘導し、セフェム系抗生物質に高い感受性を示した。以上、これらの微生物の制御は尋常性乾癬の症状の軽減に期待できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Psoriasis vulgaris (PS) is chronic skin disease with many scales. We focused on skin microbiota of the patients with PS as one of an exacerbating factor. Comprehensive analysis of skin microbiota by pyrosequencing assay revealed that patients' microbiota was formed a specific microbiota compared with other skin diseases. The microbiota induced Th1-type cytokine and also were susceptible with cephem antibiotics. Our findings suggests that control of skin microbiota enable disease control of PS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成 23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 24 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：尋常性乾癬、増悪因子、皮膚微生物叢、疾患制御

1. 研究開始当初の背景

尋常性乾癬は多量の鱗屑を伴う自己免疫皮膚疾患である。正常な表皮細胞は約 30 日で垢となって落屑するが、乾癬患者ではこのターンオーバーが癌細胞をも上回る 10 倍の速度で亢進する。その結果、皮疹の上に厚い銀白色の鱗屑が付着する。患者は掻痒感や熱感のみならず、多量の鱗屑に自己イメージの低下や社会的孤立感に苦しむなど社会活動・人間関係にも大きな影響を及ぼすことが少なくない。ヒトには数千種もの多様な微生物が常

在している。通常は無害であるが、この常在微生物フローラのバランスが破綻すると様々な疾患に進展することがある。

現在の尋常性乾癬に対する標準的治療薬は、ケラチノサイトに直接あるいは間接的にその増殖亢進抑制を行うビタミン D3 やエトレチナートあるいは免疫抑制薬である。乾癬患者皮膚には多量の悪化因子微生物が常在しているため、それを除去することにより、ケラチノサイトへの刺激が抑制され症状の軽減が期待できる。

2. 研究の目的

上述した通り、皮膚微生物は当該疾患の悪化因子のひとつとなる可能性がある。そこでそれを明らかにするために、以下の項目について検討する。

(1) 患者皮膚微生物叢の次世代シーケンサーを用いたパイロシーケンス法による網羅的解析、(2) (1)で明らかにされた疾患特異的微生物のサイトカイン応答、(3) (1)で明らかにされた疾患特異的微生物の薬剤感受性試験以上の試験結果から、当該疾患における圧巻因子としての寄与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 患者皮膚微生物叢の網羅的解析：患者皮膚鱗屑中から微生物 DNA を抽出した。バーコード標識プライマーを用いてエマルジョン PCR を行い FLX 454 次世代シーケンサーを用いてパイロシーケンスを行なった。解析は、in house BLAST により菌種同定後、主座標分析、Shannon diversity 解析等を行った。

(2) (1)の結果から得られた疾患特異的微生物を用いてサイトカイン誘導能を調べた。ヒト表皮ケラチノサイトに当該微生物を共培養させ、その培養上清をサイトカインアレイを用いて解析した。

(3) (1)の結果から得られた疾患特異的微生物を用いて CLSI 法に準拠して薬剤感受性試験を実施した。

(4) (1)の結果から得られた疾患特異的微生物を特異的に検出するために、特異 DNA 配列を見いだすことにより real-time PCR 検出系を構築した。

4. 研究成果

(1) 患者皮膚微生物叢の網羅的解析

PS 患者 23 例および対象群としてアトピー性皮膚炎患者 10 例および健常人 6 例から採取した鱗屑を試験に供した。約 15 万リード(細菌叢)を解析した。>1,000 の OUT がえられ主座標分析したところ、3 群は有意にことなるクラスターを形成した。この結果から *Gammaproteobacteria* sp. が患者に優位に常在していることが判明した。

(2) サイトカイン産生：

表皮ケラチノサイトを培養後、*Gammaproteobacteria* sp. を用いて抗原刺激を行い、培養上清に分泌された各種サイトカインについて、サイトカイン抗体アレイを用いて一斉検出した (IL, TNF 等の約 40 種)。Th1 型サイトカインが誘導されていることが示された。

(3) 薬剤感受性試験

Gammaproteobacteria sp. は特にセフェム系抗生物質に高い感受性を示した。

(4) *Gammaproteobacteria* sp. の特異的検出診断を目的として *Gammaproteobacteria* sp.

の特異的検出を real-time PCR を用いて行なった。16S rRNA 遺伝子の配列から当該細菌に対する特異的 DNA 配列を見いだすことにより real-time PCR 検出系を構築した。その結果、患者鱗屑中から高感度に検出できることを示した。

以上の結果から、*Gammaproteobacteria* sp. は PS 患者に優位に存在する細菌であること。また、本菌は PS 患者に特徴的な病態である Th1 サイトカインを誘導する能力があること、さらに除菌という観点からは当該細菌に感受性を示す抗生物質が存在することを明らかにした。今後はこの知見をもとに臨床的な検討が実施されることを期待する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Zhang E, Tanaka T, Tajima M, Tsuboi R, Nishikawa A, Sugita T, Characterization of the skin fungal microbiota in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *Microbiol. Immunol.* **55**, 625-632, 2011. 査読あり

2. Zhang E, Sugita T, Tsuboi R, Yamazaki T, Makimura K. The opportunistic yeast pathogen *Trichosporon asahii* colonizes the skin of healthy individuals: analysis of 380 healthy individuals by age and gender using a nested polymerase chain reaction assay. *Microbiol. Immunol.* **55**, 483-488, 2011. 査読あり

3. Tomida J, Sakamoto D, Sugita T, Fujiwara N, Naka T, Hamada M, Morita Y, Kawamura Y. *Branchiibius cervicis* sp. nov., a novel species isolated from patients with atopic dermatitis. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**, 503-507, 2011. 査読あり

4. Zhang E, Tanaka T, Mami Tajima T, Tsuboi R, Kato H, Nishikawa A, Sugita T. Anti-*Malassezia*-specific IgE antibodies production in Japanese patients with head and neck atopic dermatitis: relationship between the level of specific IgE antibody and the colonization frequency of cutaneous *Malassezia* species and clinical severity. *J. Allergy* 1-5, 2011. 査読あり

5. Nagata R, Nagano H, Ogishima D, Nakamura Y, Hiruma M, Sugita T. Transmission of the major skin microbiota, *Malassezia*, from mother to neonate. *Pediatrics International* **54**, 350-355, 2012. 査読あり

6. Zhang E, Tanaka T, Tsuboi R, Makimura K, Nishikawa A, Sugita T. Characterization of *Malassezia* microbiota in the human external auditory canal and on the sole of the foot. *Microbiol. Immunol.* **56**, 238-244, 2012. 査読あり

7. Zhang E, Tajima M, Tsuboi R, Sugita T. Sequence diversity of the intergenic spacer region of the rRNA gene of *Cryptococcus albidus* isolated from the skin of patients with atopic dermatitis and healthy individuals. *Microbiol. Immunol.* 57, 74-76, 2013. 査読あり

8. 杉田隆、マラセチア属真菌と皮膚、神奈川県皮膚科医会会報, 19, 52, 2012. 査読なし

〔学会発表〕(計 46 件)

1. Zhang E, Miyamoto M, Sugita T, Nishikawa A, Tajima M, Tsuboi R, Molecular analysis of corynebacterium microbiota in tinea pedis patients: comparison with healthy subjects, 22nd World Dermatological Congress, 5/2011, Seoul, Korea

2. Sugita T, Tanaka T, Zhang E, Suzuki S, Tajima M, Tsuboi R, Nishikawa A, The cutaneous fungal microbiota of patients with atopic dermatitis, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 9/2011, Sapporo

3. Ishibashi Y, Sugawara K, Sugita T, Nishikawa A, Secretion of thymic stromal lymphopoietin from human keratiocytes in response to *Malassezia* yeasts, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 9/2011, Sapporo

4. Zhang E, Sugita T, Tajima M, Nishikawa A, Tsuboi R, Molecular detection of new *Malassezia* phylotypes from the ear canal and the sole of the foot, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 9/2011, Sapporo

5. Tanaka T, Zhang E, Tajima M, Tsuboi R, Nishikawa A, Sugita T, Comparative analysis of the skin bacterial microbiota of lesional and non-lesional sites of patients with atopic dermatitis, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 9/2011, Sapporo

6. Sugita T, Symposium: *Malassezia* community structure and its association with skin diseases, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 9/2011, Sapporo

7. Zhang E, Sugita T, Tanaka T, Nishikawa A, Tajima M, Tsuboi R, Characterization of skin fungal microbiota in patients with atopic dermatitis and in healthy subjects, 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 6/2012, Berline, Germany

8. Sugita T, Nishikawa A, Zhang E, Tajima M, Tsuboi R, *Malassezia* community structure and its association with skin diseases T, 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 6/2012, Berline, Germany

9. 杉田隆、特別講演ヒト常在真菌マラセチアと皮膚疾患、第 12 回皮膚病勉強会、2010/6、

東京

10. 張 恩実、杉田 隆、西川朱實、坪井良治、皮膚科・眼科領域真菌症研究・その up-to-date と親展開 アトピー性皮膚炎患者皮膚の真菌叢、第 31 回関東医真菌懇話会、2010/7、東京

11. 石崎純子、澤田美月、洲崎玲子、小林 憲、二宮淳也、田中 勝、原田敬之、杉田 隆、西川朱實、鼻翼周囲に観察されたマラセチアの菌糸形態と菌量および菌種の傾向第 54 回日本医真菌学会総会、2010/10、東京

12. 金井崇博、杉田 隆、比留間政太郎^a、池田玲子、西川朱實、アトピー性皮膚炎患者の重症度と *Malassezia* 定着量の相関、第 54 回日本医真菌学会総会、2010/10、東京

13. 石橋芳雄、加藤博司、杉田 隆、西川朱實、*Malassezia restricta* の Ig E 反応性抗原の解析、第 54 回日本医真菌学会総会、2010/10、東京

14. 石橋芳雄、菅原二陽、杉田 隆、西川朱實、*Malassezia* とアレルギー性炎症：ケラチノサイトの TSLP 産生誘導、第 54 回日本医真菌学会総会、2010/10、東京

15. 張 恩実、杉田 隆、宮本真由美、田嶋磨美、坪井良治、西川朱實、アトピー性皮膚炎患者皮膚の真菌叢の網羅的解析、第 54 回日本医真菌学会総会、2010/10、東京

16. Zhang E, Sugita T, Tanaka T, Nishikawa A, Miyamoto M, Tajima M, Tsuboi R, Microbial community structure in the skin of patients with atopic dermatitis, 日本研究皮膚科学会第 35 回年次学術大会・総会、2010/12、和歌山

17. 富田 純子、坂本 大、杉田 隆、藤原 永年、中 崇、浜田 盛之、森田 雄二、河村 好章、アトピー性皮膚炎患者から分離された新菌種 *Branchiibius cervicis* sp. nov. の解析、日本薬学会第 131 年会、2011/3、静岡

18. 張 恩実、田中貴文、杉田 隆、成人アトピー性皮膚炎患者皮膚真菌叢の解析-重症度と菌叢、日本薬学会第 131 年会、2011/3、静岡

19. 田中 貴文、杉田 隆、張 恩実、池田 玲子、西川朱實、次世代高速シーケンサーを用いたアトピー性皮膚炎患者皮膚細菌叢の網羅的解析、日本薬学会第 131 年会、2011/3、静岡

20. 坂本 大、杉田 隆、小山 清隆、池田 玲子、西川 朱實、富田 純子、河村 好章、アトピー性皮膚炎患者皮膚から分離された抗生物質産生菌と病態への関与、日本薬学会第 131 年会、2011/3、静岡

21. 上原 千明、諸星 優佳、田中 貴文、杉田 隆、池田 玲子、西川 朱實、日本薬学会第 131 年会、2011/3、静岡

22. 杉田隆、特別講演「マラセチアと皮膚」、神奈川県皮膚科医会第 135 回例会、2011/3、横浜

23. 杉田 隆、教育講演「基礎研究から医療現場への展開」、第 32 回関東医真菌懇話会、2011/5、東京

24. 張恩実、杉田隆、西川朱美、田嶋磨美、坪井良治、*Malassezia globosa* の二形成特異遺伝子の探索、第32回関東医真菌懇話会、2011/5、東京
25. 坂本 大、小山 清隆、杉田 隆、アトピー性皮膚炎患者皮膚から分離された抗生物質産生細菌、第55回日本薬学会関東支部総会、2011/10、千葉
26. 田中貴文、杉田 隆、次世代高速DNAシーケンサーを用いたアトピー性皮膚炎患者皮膚細菌叢の網羅的解析、第55回日本薬学会関東支部総会、2011/10、千葉
27. 杉田 隆、シンポジウム「マラセチアの菌叢解析に関する up to date」、第55回日本医真菌学会総会 2011/10 東京
28. 杉田隆、真菌関連各種皮膚疾患の治療～基礎と応用～、第55回日本医真菌学会総会 2011/10 東京
29. 張 恩実、杉田 隆、宮本真由美、田嶋磨美、西川朱實、坪井良治、外耳道と足底に形成される特異な*Malassezia*叢と新規なファイロタイプ第55回日本医真菌学会総会、2011/10、東京
30. 石橋芳雄、菅原二陽、杉田 隆、西川朱實、*Malassezia* によるLPA レセプター刺激を介したヒトケラチノサイトのTSLP産生、第55回日本医真菌学会総会、2011/10、東京
31. 田中貴文、杉田 隆、アトピー性皮膚炎患者皮膚細菌叢の次世代高速 DNA シーケンサーを用いた網羅的解析、日本薬学会第132年会、2012/3、札幌
32. 諸星優佳、田中貴文、杉田 隆、尋常性乾癬患者皮膚細菌叢の次世代高速 DNA シーケンサーを用いた網羅的解析、日本薬学会第132年会、2012/3、札幌
33. 杉田隆、特別講演「マラセチア菌に関する最近の話題」、第100回 関西真菌懇談会、2012/7、大阪
34. 諸星優佳、田中貴文、張恩実、坪井良治、杉田隆、パイロシーケンス法を用いたアトピー性皮膚炎および尋常性乾癬患者皮膚の細菌叢の網羅的解析、日本薬学会生物系薬学部会、第24回微生物シンポジウム、2012/09、大阪
35. 杉田隆、シンポジウム：ゲノム解析から見えてきたマラセチアの病原因子、第56回日本医真菌学会総会、2012/11、東京
36. 張 恩実、上原千明、坪井良治1、西川朱實、杉田 隆、健康人頭皮におけるヒト皮膚主要構成菌種*Malassezia globosa*および*M. restricta*のリパーゼ遺伝子の検出、第56回日本医真菌学会総会、2012/11、東京
37. 金子孝昌、杉田 隆、榎村浩一、*Malassezia* 属菌における培養条件の検討、第56回日本医真菌学会総会、2012/11、東京
38. 石橋芳雄、菅原二陽、杉田 隆、西川朱實、*Malassezia* のヒトケラチノサイトTSLP産

- 生誘導に関わるレセプターとリガンドの解析、第56回日本医真菌学会総会、2012/11、東京
39. 竹本朱美、諸星優佳、杉田 隆、武藤正彦、次世代DNAシーケンサーを用いた尋常性乾癬患者皮膚真菌叢の網羅的解析、第56回日本医真菌学会総会、2012/11、東京
40. 石橋芳雄、加藤博司、杉田 隆、西川朱實、アトピー性皮膚炎に関連する*Malassezia restricta*特異抗原の解析、第56回日本医真菌学会総会、2012/11、東京
- 41. 張 恩実、杉田 隆、アトピー性皮膚炎および尋常性乾癬患者皮膚細菌叢の網羅的解析、第86回日本細菌学会総会、2013/3、幕張
- 42. 杉田 隆、シンポジウム腸内・口腔・皮膚フローラ研究の新展開 ヒト皮膚常在微生物とその菌叢解析に基づく疾患制御、第86回日本細菌学会総会、2013/3、幕張
43. 杉田隆、張恩実、アトピー性皮膚炎および乾癬患者皮膚の細菌叢および真菌叢の次世代シーケンサーを用いた網羅的解析、日本薬学会第133年会、2013/3、横浜
44. 黒金里絵、渡辺愛弓、飯野裕太、張恩実、杉田隆、皮膚常在菌マラセチアのゲノム情報に基づく病原因子の検出、日本薬学会第133年会、2013/3、横浜
45. 張恩実、渡辺愛弓、黒金里絵、杉田隆、皮膚常在菌マラセチアのリパーゼ遺伝子の頭皮直接検出、日本薬学会第133年会、2013/3、横浜
46. 杉田隆、シンポジウム皮膚真菌症 Update -身近なカビとどう付き合うか-「興味のつきないマラセチア」、第29回日本臨床皮膚科医総会・臨床学術大会、2013/4、名古屋

〔図書〕(計4件)

1. Sugita T, Boekhout T, Velegaki A, Guillot J, Hadina S, Cabanes J, Chapter 3, Epidemiology of *Malassezia*-related skin disease, *In Malassezia and the Skin : Science and Clinical Practice*, edited by Boekhout T, Kelleman G, Mayser P and Velegaki A, pp. 65-119, 2010, Springer, Berlin
2. Sugita T, Tajima M, Tsubuku H, Miyamoto M, Zhang E, Tsuboi R, Takashima M, Ishibashi Y, Nishikawa A, Chapter 73 *Malassezia*, *In Molecular Detection of Human Fungal Pathogens*, edited by Liu D, pp. 631-638, 2011, CRC Press, New York
3. Sugita T, Zhang E, Tanaka T, Tajima M, Tsuboi R, Ishibashi Y, Nishikawa A, Atopic Dermatitis and Skin Fungal Microorganisms, *In Atopic Dermatitis - Disease Etiology and Clinical Management*, 123-140, 2012
4. 杉田隆、*Malassezia* 関連皮膚疾患の原因菌種、*In 診る・わかる・治す、皮膚科臨床アセット4、皮膚真菌症を究める* (総編

集：古江増隆、専門編集：望月 隆)、pp.
164-168、2011、中山書店

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 隆 (SUGITA TAKASHI)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10312076