

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670275

研究課題名（和文）アレルギー性疾患の先制医療を目指して：アトピー性皮膚炎における鼻腔常在菌叢の意義

研究課題名（英文）Preemptive medicine for allergic disorders: Significance of bacterial flora on the nasal cavity in atopic dermatitis

研究代表者

前川 真人 (MAEKAWA, MASATO)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：20190291

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000 円

研究成果の概要（和文）：25人のアトピー性皮膚炎患者の皮膚病変と鼻から綿棒で2本を採取した。1本は16S rRNA解析を行い、門レベルでは鼻腔でActinobacteria, Firmicutes、皮膚ではFirmicutes, Proteobacteriaが多かった。もう1本は細菌培養し、ブドウ球菌を3コロニー純培養してPOT (PCR based-open reading frame typing) 法で株レベルを解析した。同一患者で鼻腔と皮膚では同じPOT型を示す株の組合せが多く認められた。以上から、環境からでなく本人の鼻などの定着菌がリクルートされ、皮膚炎の悪化と連関していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Two specimens were picked up from diseased skin and nasal cavity of 25 patients with atopic dermatitis. 16S rRNA analysis showed the preponderance of Actinobacteria and Firmicutes on nasal cavity and Firmicutes and Proteobacteria on skin at the Phylum level. Three colonies of Staphylococcus were cultured and analyzed by POT (PCR based-open reading frame typing). The same POT type strains tended to be confirmed in both skin and nasal cavity of each patient. The colonized bacteria are recruited from the nasal cavity of the patients, not environment, and are related to the deterioration of dermatitis.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：アトピー性皮膚炎 計
ブドウ球菌 皮膚常在菌 鼻腔常在菌 16S rRNA解析 菌株解析 POT法 質量分析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、アレルギー性疾患は増加の一途をたどり、かつ重症化も目立っている。最近の生活環境では微生物の多様性が乏しくなっており、そのため我々の免疫系に偏りが生じるために種々のアレルギー疾患や慢性炎症性疾患になりやすい母地となっていると考えられ(Hanski et al. PNAS 2012)、Biodiversity hypothesis と呼ばれる。

皮膚は外敵から身を守るためのバリアで、かつ免疫組織である。そして、その免疫組織は皮膚常在菌から影響を受けていることがわかってきた。表皮ブドウ球菌は表皮角化細胞に作用し、抗菌ペプチドの産生、IL-17 などのサイトカイン産生を介して宿主の免疫系を賦活し、有害な病原微生物の定着を阻害する。一方、アトピー性皮膚炎などでは皮膚常在菌の種類が少なく、黄色ブドウ球菌が90%以上を占め、黄色ブドウ球菌の病理学的意義が考えられる (Boguniewicz et al, Immunol Rev 2011)。また、アトピー性皮膚炎の病状悪化と黄色ブドウ球菌感染には関連性があるとされる。この皮膚の黄色ブドウ球菌はどこから来るのか。患者自身の他部位、特に鼻腔からの可能性があるが、鼻腔の黄色ブドウ球菌がアトピー性皮膚炎の皮膚に定着・感染し、病状悪化に至っている証拠は明らかではない。そこで、アトピー性皮膚炎患者の皮膚に定着する黄色ブドウ球菌は、環境ではなく、患者自身の鼻腔からくるという仮説を実証する。

2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎患者の症状悪化に関係する黄色ブドウ球菌は、自身の鼻腔からくると仮説する。すなわち、鼻腔にまず黄色ブドウ球菌を有しており、それが皮膚の症状悪化の前にあることを証明する、またその黄色ブドウ球菌の菌株が同一であることを証明する。以上の証拠を得ることによって、アトピー性皮膚炎患者の症状悪化のルーツと感染経路を知り、発症予防や悪化の防止につなげる。他の皮膚疾患の病状にも反映できる可能性を秘めており、これからの医療分野として重要な先制医療の成果となると期待する。

3. 研究の方法

(1) 対象

本学附属病院の皮膚科を受診している患者のうち、同意取得時の年齢が18歳以上でアトピー性皮膚炎と診断された25名を対象とした。除外基準として、3ヶ月間は抗生剤を使用していない患者とした。

(2) 皮膚、鼻腔のマイクロバイオーーム解析の

検体採取

浜松医科大学の倫理委員会で承認を受けた後、対象となる被験者に対して十分に研究内容を説明し、研究への参加について被験者本人の自由意志による同意を文書にて取得した。アトピー性皮膚炎の好発部位である肘窩を検体採取部位として、皮疹の増悪前、増悪後、治療後の時点で、皮膚から検体を採取した。また、同時に鼻腔の常在菌も綿棒によって採取した。

(3) マイクロバイオーーム解析

スワブ、綿棒から定法によりDNAを抽出し、16SリボソームRNA (rRNA) 遺伝子の配列多型を用いて解析した。すなわち、16S rRNA 遺伝子の超可変領域 (V3-V4) をシーケンスするために、イルミナ社の16S Metagenomic Sequencing Library Preparationのマニュアルに従って行った。該当の16S V3-V4領域由来のアンプリコンを精製し、MiSeq システムで解析した。得られたシーケンスデータは、16SrRNA 菌叢解析ソフトウェア QIIME で、シーケンスデータのクオリティフィルタリング、キメラ配列の除去、OUTの取得、菌種の分類と、各種二次解析を行った。

(4) 細菌培養・同定・感受性試験

皮膚、鼻腔のスワブ、綿棒を通常の血液寒天培地、BTB 培地、黄色ブドウ球菌選択培地で塗抹・培養し、通常の微生物検査と同じ流れで、微生物検査学的に各細菌の同定を行った。

(5) 黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、

プロピオニバクテリウムの遺伝型の判定

分離培養された黄色ブドウ球菌のコロニー各3個を増菌培養し、異なった菌株としてDNAを抽出、株レベルでの解析を、シカジーニウス分子疫学解析 POT キット (黄色ブドウ球菌用) (関東化学) を使用して POT (PCR based-open reading frame typing)

同様に、純培養後の菌株各3個からタンパク質を抽出し、VITEK MS Plus (バイオメリュエ社)、およびMALDI Biotyper (ブルーカ社) にて、タンパク質レベルの相同性を調べた。

4. 研究成果

(1) 試料の採取

最終的に23人のアトピー性皮膚炎患者から同意の元で、皮膚（肘窩、背中など皮膚病変の強い部位）と鼻から綿棒で擦って細菌培養用とDNA回収用の2本を採取した。鼻腔からの試料は23人全例から行うことができたが、皮膚は、9人が肘窩から、8人が背中から、3人が腹部から、2人が前腕から、1人が頸部からの試料となった。これは、皮疹が比較的強い場所として選ばれたためである。

(2) 16S rRNA のマイクロバイーム解析

16S rRNA 解析の結果、門レベルでは鼻腔で Actinobacteria, Firmicutes が比較的多く、一部の患者では Proteobacteria のみが突出していた。一方皮膚では、鼻腔で多かった Actinobacteria が少なく、Firmicutes と Proteobacteria が多かった。また、属レベルでは、鼻腔では Corynebacterium, Staphylococcus が、皮膚では Corynebacterium よりも Staphylococcus や Propionibacterium が増えていた。これは、アトピー性皮膚炎としては納得できるデータであると考ええる。図1、2には、それぞれ門レベルと属レベルでの検出菌の割合を示した。年齢、性別、環境、部位などで異なると考えられるが、症例数の関係で、シャノンの多様性指数を調べたが、鼻腔よりも皮膚ではおよそ 1.5 倍高かったが、今回の検討ではそれ以上は考察できなかった。

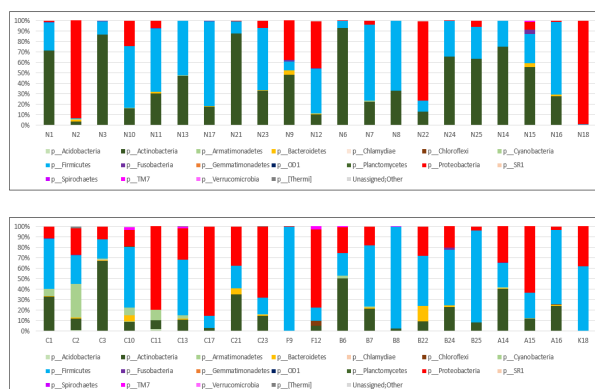
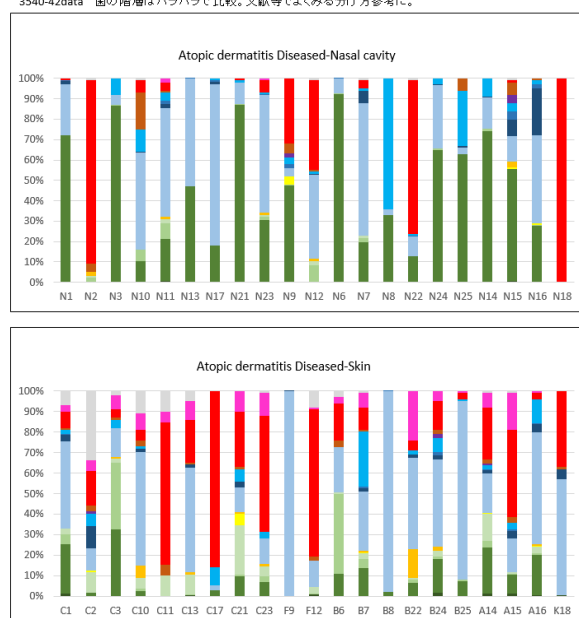


図1. 門レベルでの検出菌の割合
(上段は鼻腔、下段は皮膚)

3540-42data 菌の階層はバラバラで比較。文献等できくみる分け方参考に。



	p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Actinomycetaceae
	p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Corynebacteriaceae
	p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Propionibacteriaceae
	p_Actinobacteria(other)
	p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Prevotellaceae
	p_Bacteroidetes(other)
	p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Staphylococcaceae
	p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Streptococcaceae
	p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae
	p_Firmicutes(other)
	p_Fusobacteria
	p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria
	p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria
	p_Proteobacteria(other)
	Other

図2. 属レベルでの検出菌の割合
(上段は鼻腔、中段は皮膚、下段は菌種の説明)

(3) POT 法による株レベルでの解析

病変部位の皮膚にいる *Staphylococcus* の特徴を調べるために株レベルでの解析を POT 法で行った。最終的に鼻腔と皮膚からの *Staphylococcus* が複数そろった症例が 12 あった。そのうち、各患者

から得られた3株の *Staphylococcus* が完全に一致したのが6例、2種類の POT 型を有していてもほぼ一致したのが5例、全く一致しなかったのが1例あった。代表的な電気泳動図を図3に示した。サンプル 21 は鼻腔と皮膚から培養したそれぞれ3つの菌株が同一であったのに対し、サンプル 20 は鼻腔からの菌株 (42,43,44) と皮膚からの菌株 (94,95,96) とで、それぞれ2種類ずつあり共通していた。一方、患者間では異なる POT 型を示しており、症例数は少ないが、自身の有する *Staphylococcus* を鼻腔にも皮膚にも有していると考えられた。

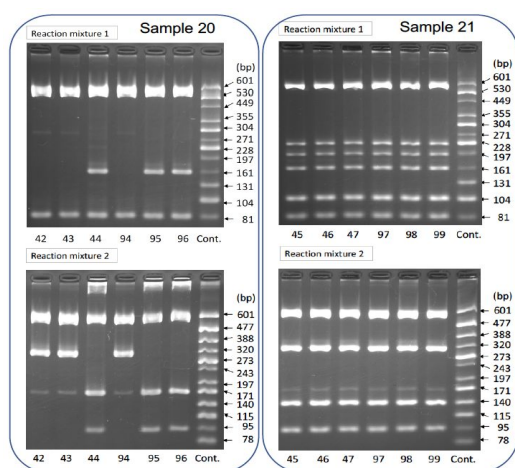


図3. POT 法の電気泳動図

(4) 質量分析計による解析

さらに、*Staphylococcus* の株レベルの解析を細菌同定用の医療機器である質量分析計2種類 MALDI Biotyper と VITEK MS で解析した。クラスター解析で同一患者の同じ箇所からの *Staphylococcus* は近い位置に分布している傾向があったが、POT 法のようにはっきりしなかった。*Staphylococcus* の株レベルでの違いを分別するには、培養の僅かな状況の違いも含めたタンパク質レベルの解析では難しいものと考えられた。

(5) 結論

以上から、当初の仮説通り、アトピー性皮膚炎患者の皮膚には、環境からよりも本人の鼻などに常在している菌がリクルートされ、皮膚炎の悪化に伴い表皮のバリアが剥がれ、湿度を失った皮膚には定着している場合が多いと考えられた。

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 18 件)

- Oishi T, Iino K, Okawa Y, Kakizawa K, Matsunari S, Yamashita M, Taniguchi T, Maekawa M, Suda T, Oki Y : DNA methylation analysis in malignant pheochromocytoma and paraganglioma. J Clin Transl Endocr 7, 12-20, 2017. DOI:10.1016/j.jcte.2016.12.004 査読有
- Kono M, Nakamura Y, Yoshimura K, Enomoto Y, Oyama Y, Hozumi H, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Hamada E, Colby TV, Maekawa M, Suda T: Nonspecific interstitial pneumonia preceding diagnosis of collagen vascular disease. Respir Med 117, 40-47, 2016. DOI: 10.1016/j.rmed.2016.05.030. 査読有
- Payne DA, Baluchova K, Peoc'h KH, van Schaik RH, Chan KC, Maekawa M, Mamotte C, Russomando G, Rousseau F, Ahmad-Nejad P; IFCC Committee for Molecular Diagnostics (C-MD): Pre-examination factors affecting molecular diagnostic test results and interpretation: A case-based approach. Clin Chim Acta pii: S0009-8981(16), 30263-30267, 2016. DOI: 10.1016/j.cca.2016.06.018. 査読有
- Zhan F, Watanabe Y, Shimoda A, Hamada E, Kobayashi Y, Maekawa M: Evaluation of serum bone alkaline phosphatase activity in patients with liver disease: Comparison between electrophoresis and chemiluminescent enzyme immunoassay. Clin Chim Acta 460, 40-45, 2016. DOI: 10.1016/j.cca.2016.06.008. 査読有
- Kono M, Nakamura Y, Oyama Y, Mori K, Hozumi H, Karayama M, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Yamada M, Hamada E, Colby TV, Maekawa M, Suda T: Increased levels of serum Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein in idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Med 115, 46-52, 2016. DOI: 10.1016/j.rmed.2016.04.013. 査読有
- Sato R, Tsuchiya KJ, Matsuzaki H, Takei N, Itoh

- H, Kanayama N, Suda T, Watanabe H, Ohashi T, Tanaka M, Nishimura S, Maekawa M, HBC study group: Fetal Environment and Glycosylation Status in Neonatal Cord Blood: A Comprehensive Mass Spectrometry-based Glycosylation Analysis. *Medicine (Baltimore)* 95, e3219, 2016.
DOI:10.1097/MD.0000000000003219 査読有
7. Sato R, Shirai K, Maekawa M, Genma R, Ohki S, Morita H, Suda T, Watanabe H: Glycaemia and autistic traits in very low birth weight infants in adulthood. *Diabetes Metab* 42, 285-286, 2016.
DOI: 10.1016/j.diabet.2016.02.005. 査読有
 8. Kotani K, Tashiro J, Yamazaki K, Nakamura Y, Miyazaki A, Bujo H, Saito Y, Kanno T, Maekawa M: Investigation of MDA-LDL (malondialdehyde-modified low-density lipoprotein) as a prognostic marker for coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta.* 450, 145-150, 2015.
DOI: 10.1016/j.cca.2015.08.003. 査読有
 9. Mori K, Fujisawa T, Kusagaya H, Yamanaka K, Hashimoto D, Enomoto N, Inui N, Nakamura Y, Maekawa M, Suda T: Synergistic Proinflammatory Responses by IL-17A and Toll-Like Receptor 3 in Human Airway Epithelial Cells. *PLoS One.* 10, e0139491, 2015.
DOI: 10.1371/journal.pone.0139491. 査読有
 10. Ito T, Aoshima M, Sugiura K, Fujiyama T, Ito N, Sakabe JI, Akiyama M, Maekawa M, Tokura Y: Pustular psoriasis-like lesions associated with hereditary lactate dehydrogenase M subunit deficiency without interleukin-36 receptor antagonist mutation: long-term follow-up of two cases. *Br J Dermatol.* 172(6), 1674-1676, 2015. DOI: 10.1111/bjd.13590. 査読有
 11. Ikeda K, Ichikawa K, Hashiguchi T, Hidaka Y, Kang D, Maekawa M, Matsumoto H, Matsushita K, Okubo S, Tsuchiya T, Furuta K: Evaluation of the short-term stability of specimens for clinical laboratory testing. *Biopreserv Biobank* 13(2), 135-143, 2015.
DOI: 10.1089/bio.2014.0072. 査読有
 12. Ihara H, Hirota K, Watanabe T, Totani M, Hashizume N, Aoki Y, Nagashima Y, Kamioka K, Onda K, Sunahara S, Suzuki T, Itabashi M, Ishibashi M, Ito S, Ohashi K, Ohta Y, Nobori T, Fujishiro K, Maekawa M, Miura M, Miyano H, Ando T, Nishimura K: Recommended use of Cut-off Folate Concentration in Serum and Erythrocyte(Red Blood Cell) as Expressed by Folic Acid Equivalent for the Diagnosis of Deficiency in Deliberating the Creation on Dietary Reference Intakes. *Austin J Nutri Food Sci* 3, 1055-1056, 2015.
<http://austinpublishinggroup.com/nutrition-food-sciences/fulltext/ajns-v3-id1055.php>
査読有
 13. Watanabe Y, Shibata K, Maekawa M: Cell line differences in replication timing of human glutamate receptor genes and other large genes associated with neural disease. *Epigenetics* 9, 1350-1359, 2014.
DOI: 10.4161/15592294.2014.967585 査読有
 14. Kato M, Fujisawa T, Hashimoto D, Kono M, Enomoto N, Nakamura Y, Inui N, Hamada E, Miyazaki O, Kurashita S, Maekawa M, Suda T: Plasma connective tissue growth factor levels as potential biomarkers of airway obstruction in patients with asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 113, 295-300, 2014.
DOI: 10.1016/j.anai.2014.05.026. 査読有
 15. Kono M, Nakamura Y, Enomoto N, Hashimoto D, Fujisawa T, Inui N, Maekawa M, Suda T, Colby TV, Chida K: Usual interstitial pneumonia preceding collagen vascular disease: a retrospective case control study of patients initially diagnosed with idiopathic pulmonary fibrosis. *PLOS ONE.* 9; e94775, 2014.
DOI: 10.1371/journal.pone.0094775. 査読有
 16. Ito T, Aoshima M, Sugiura K, Fujiyama T, Ito N, Sakabe JI, Akiyama M, Maekawa M, Tokura Y: Pustular psoriasis-like lesions associated

with hereditary lactate dehydrogenase M subunit deficiency without interleukin-36 receptor antagonist mutation: long-term follow-up of two cases. *Br J Dermatol.* 172, 1674-1676, 2015.

DOI: 10.1111/bjd.13590. 査読有

17. Sato R, Maekawa M, Genma R, Shirai K, Ohki S, Morita H, Suda T, Watanabe H: Final height and cardiometabolic outcomes in young adults with very low birth weight (< 1500 g). *PLOS ONE* 9, 1-9, 2014.

DOI: 10.1371/journal.pone.0112286. 査読有

18. Kusagaya H, Fujisawa T, Yamanaka K, Mori K, Hashimoto D, Enomoto N, Inui N, Nakamura Y, Wu R, Maekawa M, Suda T, Chida K: Toll-like receptor-mediated airway IL-17C enhances epithelial host defense in an autocrine/paracrine manner. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 50(1), 30-39, 2014.

DOI: 10.1165/rcmb.2013-0130OC. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. Hamada E, Kondo T, Maekawa M: Trend of Turnaround Time in Our Laboratory. 14th Asia-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Congress. November 27, 2016, Taipei
2. Hamada E, Maekawa M: Basic Evaluation of a novel Glycohemoglobin Analyzer RC20 for POCT. 68th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo. August 3, 2016, Philadelphia
3. Yamadate S, Yamazaki H, Matsusita M, Hoshino T, Ueda S, Maekawa M, Nakayama T: Study of reference materials suitable for the IFCC method of ALP measurement. 68th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo August 3, 2016, Philadelphia
4. Hamada E, Maekawa M. Evaluation of “HISCL-TARC”, a Biomarker for Atopic Dermatitis, by Automated Immunoassay System “HISCL 5000”. 2015 IFCC. June, 2015, Paris
5. Kono M, Nakamura Y, Oyama Y, Hironao H,

Karayama M, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Maekawa M, Suda T: Mac-2 binding protein glycosylation isomer (M2BPGi) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). American Thoracic Society International Conference. May, 2015, Denver

6. Hamada E, Maekawa M: Analytical evaluation of third-generation allergen-specific IgE assay “3gAllergy™” Measurement by Automated Immunoassay System “IMMULITE 2000XPi”. AACC 2014 Annual Meeting & Clinical Lab Expo. July 27-31, 2014, Chicago

7. Hamada E, Maekawa M: Analytical evaluation of soluble IL-Receptor, ACTH, GH Measurement by Automated Immunoassay System “IMMULITE 2000XPi”. The 9th Cherry Blossom Symposium. April 17-19, 2014, Yokohama

6. 研究組織

(1)研究代表者

前川 真人 (MAEKAWA MASATO)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20190291

(2)研究分担者

戸倉 新樹 (TOKURA YOSHIKI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00172156