慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	黄色ブドウ球菌増殖を伴う皮膚炎自然発症モデルマウスを用いた皮膚炎発症機構解明
Sub Title	Elucidation for mechanism of dermatitis with model mice which develop dermatitis spontaneously with S. aureus proliferation
Author	佐々木, 貴史(Sasaki, Takashi) 天谷, 雅行(Amagai, Masayuki) 塩濱, 愛子(Shiohama, Aiko) 松井, 毅(Matsui, Tsuyoshi)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	Tmem79-/-マウスを作成・解析した結果、Tmem79-/-マウスは3～4週に皮膚炎が悪化するがその後に皮膚炎症状が改善し、12週以降に再度皮膚炎が悪化する二相性の皮膚炎を発症することを明らかにした。抗生物質を用いた解析により二相性の皮膚炎症状が改善したことから、Tmem79-/-マウスでの皮膚炎発症には細菌叢異常が関与していることが示唆された。Tmem79-/-マウスでの皮膚細菌叢解析の結果、二相とも皮膚細菌叢異常が起きており、特に二相目は非常に多くのS.aureusが増殖していることを明らかにした。 In this study, we established and analyzed Tmem79-/- mice. As a result of Tmem79-/- mice analysis, we found Tmem79-/- mice developed dermatitis at 3~4 weeks, followed by temporal improvement of dermatitis, but finally developed again severe dermatitis. The antibiotics treatment improved the these biphasic dermatitis, suggesting that the skin microbiome abnormality would be involved in the onset of dermatitis in Tmem79-/- mice. As a result of skin microbiota analysis in Tmem79-/- mice, abnormal skin microbiota were found in biphasic dermatitis. Especially, large number of S. aureus were proliferated in later phase of Tmem79-/- mice.
Notes	研究種目：基盤研究(C)(一般) 研究期間：2016～2018 課題番号：16K10175 研究分野：ゲノム解析
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K10175seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 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：2016～2018
課題番号：１６Ｋ１０１７５

研究課題名（和文）黄色ブドウ球菌増殖を伴う皮膚炎自然発症モデルマウスを用いた皮膚炎発症機構解明

研究課題名（英文）Elucidation for mechanism of dermatitis with model mice which develop dermatitis spontaneously with S.aureus proliferation.

研究代表者
佐々木　貴史（SASAKI, TAKASHI）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：７０３０６８４３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：Tmem79-/-マウスを作成・解析した結果、Tmem79-/-マウスは3～4週に皮膚炎が悪化するがその後に皮膚炎症状が改善し、12週以降に再度皮膚炎が悪化する二相性の皮膚炎を発症することを明らかにした。抗生物質を用いた解析により二相性の皮膚炎症状が改善したことから、Tmem79-/-マウスでの皮膚炎発症には細菌叢異常が関与していることが示唆された。Tmem79-/-マウスでの皮膚細菌叢解析の結果、二相とも皮膚細菌叢異常が起きており、特に二相目は非常に多くのS.aureusが増殖していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
アトピー性皮膚炎の多くの患者の患部で黄色ブドウ球菌の異常増殖することは報告されているが、なぜ黄色ブドウ球菌が増殖するのかメカニズムは不明のままであった。本研究では、黄色ブドウ球菌の異常増殖し皮膚炎を発症するモデルマウスを樹立し、皮膚炎の主因が細菌叢異常であることを示すことができた。本研究により、アトピー性皮膚炎の患部での黄色ブドウ球菌の異常増殖の研究を行うためのモデルを構築ができた。今後はこのマウスを用いて黄色ブドウ球菌が異常繁殖する原因を明らかにすることにより、アトピー性皮膚炎での黄色ブドウ球菌繁殖機構の解明を目指す。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established and analyzed Tmem79-/- mice. As a result of Tmem79-/- mice analysis, we found Tmem79-/- mice developed dermatitis at 3~4 weeks, followed by temporal improvement of dermatitis, but finally developed again severe dermatitis. The antibiotics treatment improved the these biphasic dermatitis, suggesting that the skin microbiome abnormality would be involved in the onset of dermatitis in Tmem79-/- mice. As a result of skin microbiota analysis in Tmem79-/- mice, abnormal skin microbiota were found in biphasic dermatitis. Especially, large number of S. aureus were proliferated in later phase of Tmem79-/- mice.

研究分野：ゲノム解析

キーワード：アトピー性皮膚炎

１．研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎(AD)は、寛解・増悪を繰り返すそう痒のある湿疹を主病変とする皮膚疾患として定義される最も頻度発症の高い遺伝性皮膚疾患の一つであり、患者の多くは遺伝的アトピー素因を持つとされる(図１)。AD の皮疹部では黄色ブドウ球菌(SA)異常増殖が高頻度に検出されることが知られているが、実際に慶應義塾大学病院皮膚科に通院している AD 患者に対し皮疹部から細菌を採取・培養を行った結果、ほぼ全員の皮疹部から SA が検出された。これらの結果から、多くの AD 患者の皮疹部は黄色ブドウ球菌(SA)に易感染性を示すが、それが原因なのか結果なのかは未だ分からず、その機構も解明されていない。そこで黄色ブドウ球菌増殖と皮膚炎との関連を解明するために、野生型マウスに SA を強制塗布した感染モデル構築を試みたが、重篤な皮疹は起こらず数日後には塗布部位から SA は検出されなかった。これらのことから、健常状態のマウスには強制的に SA を塗布しても、内在性のシステムにより SA は排除されてしまうことが考えられ、AD における SA 増殖機構の解明には SA 増殖を伴う皮膚炎モデルの構築が必要であった。我々は flaky tail マウスの皮膚炎原因変異が Tmem79 ナンセンス変異であることを突き止め、Tmem79 は角層直下の生細胞層である SG1 層に特異的に発現し、角層形成に必要な細胞外分泌システムに関与していることを明らかにした(Sasaki et al. JACI 2013)。また、*Tmem79* を欠損した KO マウスを作出し解析した結果 flaky tail マウスと同様に SPF 環境下でも皮膚炎を自然発症した。皮疹の詳細な解析の結果、*Tmem79* KO マウスの皮疹部からは高頻度に SA が検出されることを見出した。病原性 SA などの特殊な SA が増殖しているか明らかにするために、*Tmem79* KO マウスで増殖する SA の遺伝型を解析した。その結果、*Tmem79* KO マウスで増殖する SA の遺伝型と野性型マウスの口腔内から採取された SA の遺伝型が一致したことから、*Tmem79* KO マウスで増殖している SA は、常在菌として存在している SA が *Tmem79* 欠損により皮疹部が易感染性をしめし増殖可能になっていると考えられた。

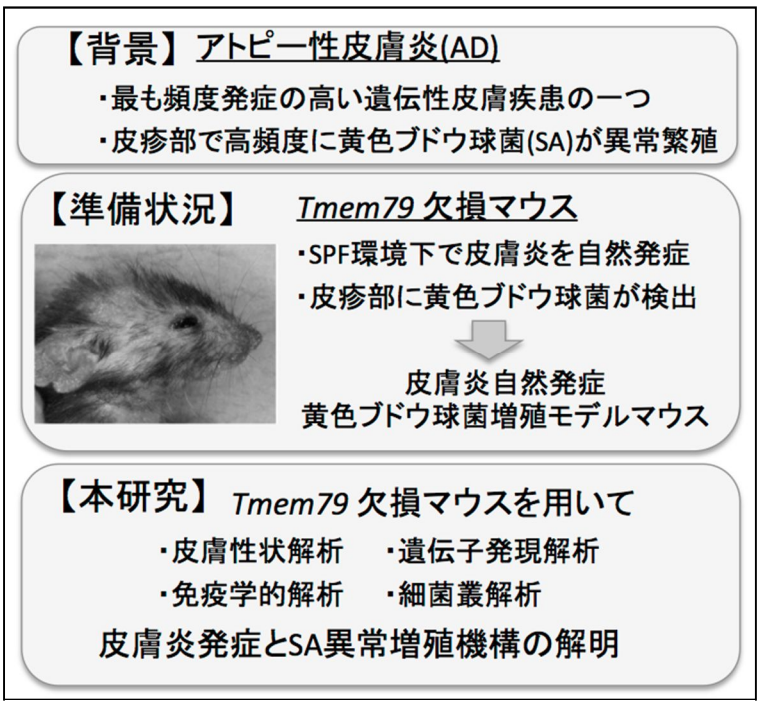

図１　本研究のながれ

２．研究の目的

アトピー性皮膚炎(AD)患者の皮疹部では黄色ブドウ球菌(SA)異常増殖が高頻度に検出されるが、増殖機構は明らかになっていない。我々が作出した Tmem79 欠損マウスは SPF 環境下でも部位特異的に皮膚炎を自然発症し、皮疹部では高頻度に SA が検出される“AD 様”の皮膚炎症状を示すことを見出した。そこで本研究では、Tmem79 欠損マウスで皮膚炎発症前から皮膚炎発症まで継時的に、１）皮膚性状解析、２）遺伝子発現解析、３）細菌叢解析を行うことにより、皮膚炎発症と細菌叢の関係を明らかとし、皮膚炎発症機序及び SA 異常増殖機構解明を試みる。また Tmem79 欠損マウスを用いて Tmem79 タンパク質の機能解析を行うことにより SA 易感染性のメカニズム解明を試み、最終的に AD 患者での皮膚抗菌性異常について解析をするための基礎データを得る。

３．研究の方法

Tmem79 欠損マウスの皮膚炎の発症経過及び皮膚細菌叢の解析を行うために、以下のステップで解析を行う。

(1)4w，8w，32w の Tmem79 欠損マウス及び C57BL/6N の皮膚炎及び皮膚細菌叢詳細解析

これまでの解析により Tmem79 欠損マウスは 4 週齢時に重度な皮膚炎を全身に生じるが、8 週齢で一度皮膚炎が軽快し、18 週齢あたりから部位特異的に重度な皮膚炎を発症する。このことから、4w，8w，32 週齢の３点について、①Skin severity score，②掻爬回数，③血中総 IgE，④体重を測定し、また６部位（首～胸、頬、耳、背部１、背部２、腹部）については、⑤細菌叢の採取、⑥H&E 染色による組織像解析、⑦浸潤細胞解析、⑧TEWL 測定を行う。細菌叢は綿棒を PBS に浸し対象部分をこする事により採取し、⑨一部を卵黄加マンニット食塩培地に播種し S.aureus を含む Staphylococcaceae 属細菌の簡易同定も行い、残った細菌叢液は、⑩16S rRNA 配列を用いた Microbiome 解析を行う。

(2) Tmem79-/-マウス及び Tmem79+/-マウスの細菌叢定量的経時変化解析
Tmem79(-/-)♂マウスと Tmem79(+/-)♀マウスを交配し、同腹兄弟で性別のそろった Tmem79(-/-)３匹及び Tmem79(+/-)３匹を同一ゲージで、1w から 24w まで上記の①～⑩に関して解析を行う。その際対象皮膚部位は、皮膚炎症状が強い首～胸と皮膚炎がほとんど見られた事がない耳に対して行う。また、侵襲的な⑥⑦は行わない。これらの解析から、皮膚炎が始まる時期を解析し、その皮膚炎発症前後を中心に細菌叢解析を行う。

(3)抗生物質投与による Tmem79 -/-マウス二相性皮膚炎症状の改善解析
増殖する細菌が皮膚炎の原因か明らかにするために、抗生物質を投与し皮膚炎及び細菌叢が改善するか解析を行った。抗生物質は飲水に添加し４週間連続投与を行った。投与中止後４週間同様に皮膚炎観察及び細菌叢解析を行った。

(4)全ゲノム配列解読による S.aureus 由来解析
S.aureus の由来を解明するために、Tmem79 -/-マウスに増殖した S.aureus を単離し、ゲノム配列とプラスミド配列を解読し、それぞれの配列を比較した。また、Tmem79 -/-マウスに増殖した S.aureus に特異的な配列があるか明らかにするために、購入した C57BL/6 マウスから採取した S.aureus も解読し、それらの比較を行った。

４．研究成果
(1)① 3.5，8，32 週齢の Tmem79 欠損マウス及び C57BL/6N の皮膚炎及び皮膚細菌叢詳細解析
これまでの解析により Tmem79 欠損マウスは経時的に皮膚炎症状の重篤度が変化することが観察されたことから、3.5，8，32 週齢での Tmem79 欠損マウスの皮膚炎症状の解析を行った。
その結果、3.5 週齢では野生型マウスと比較して皮膚炎評価である Skin severity score 及び掻爬回数ともに大きかった。８週齢で Skin severity score 及び掻爬回数とも改善が見られたが、32 週齢では悪化していた。このことから、Tmem79 欠損マウスは経時的に皮膚炎が変化することが明らかになった。

(1)② 3.5，8，32 週齢の Tmem79 欠損マウスでの皮膚細菌叢解析
Tmem79 欠損マウス 3.5 週齢での皮膚炎は、全身に皮膚炎が広がり、鱗屑が多く見られたのに対し、32 週齢での皮膚炎は顔面領域～胸部を中心に皮膚炎が見らたが鱗屑はあまり見られなかった。Tmem79 欠損マウスでは時期により皮膚炎症状に差異がみられたことから、それぞれの時期の皮膚炎領域の細菌叢を解析するために、皮膚拭い液を黄色ブドウ球菌の選択培地であるマンニット卵黄培地で培養を行った。その結果、3.5 週齢では 30 時間以降にコロニーが形成される細菌が多く見られたのに対し、32 週齢ではマンニット及び卵黄反応を示す黄色ブドウ球菌がみられた。3.5 週齢でのコロニーを単離し 16S rRNA 領域の配列を解読した結果、Corynebacterium 属であることが明らかになった。以上のことから、Tmem79 欠損マウスでは週齢に応じて皮膚炎領域に存在する細菌が異なることが明らかになった。

(2)Tmem79-/-マウス及び Tmem79+/-マウスの細菌叢定量的経時変化解析
これまでに Tmem79-/-マウス及び Tmem79+/-マウスから採取した皮膚細菌叢解析結果から、正常皮膚部位では皮膚炎部位よりも細菌数が非常に少ないことが示唆されていた。そこで、16S rRNA amplicon を対象に定量 PCR 法（qPCR 法)を用いた定量法を構築した。濃度既知の標準曲線として大腸菌ゲノム DNA から増幅した 16SrRNA PCR 産物を作成し、DNA 濃度を測定し amplicon 数既知のサンプルを検量線スタンダードとした。これらのスタンダードとサンプルを同時に解析し CT 値を比較す

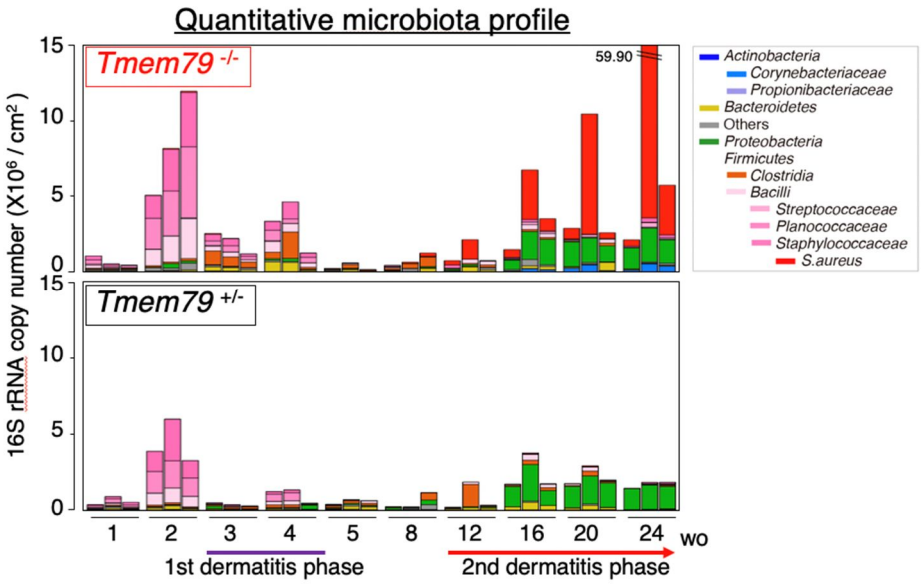

図２ 定量的細菌叢解析

ることにより、各サンプルの総 16S rRNA 数の定量を行った。その結果、Tmem79-/-マウスの二相性の皮膚炎の内、4 週齢の皮膚炎は Staphylococcus lentis などが主に増殖しており、皮膚炎が改善している時期は細菌数が非常に少なくなり、12 週以降の後半の皮膚炎では非常に多くの数の Staphylococcusaureus（S.aureus)が増殖していることが明らかになった（図２）。

(3) 抗生物質投与による Tmem79 -/-マウス二相性皮膚炎症状の改善解析
これまでの研究により Tmem79 -/-マウス二相目の皮膚炎では炎症部位で黄色ブドウ球菌が増殖していることが明らかになっている。そこで、二相の皮膚炎症状が抗生物質投与によって改善するか明らかにするために抗生物質投与を行った。その結果、一相目、二相目とも抗生物質投与により皮膚炎症状の改善が見られたことから、細菌が皮膚炎に寄与していることが明らかになった（図３）。

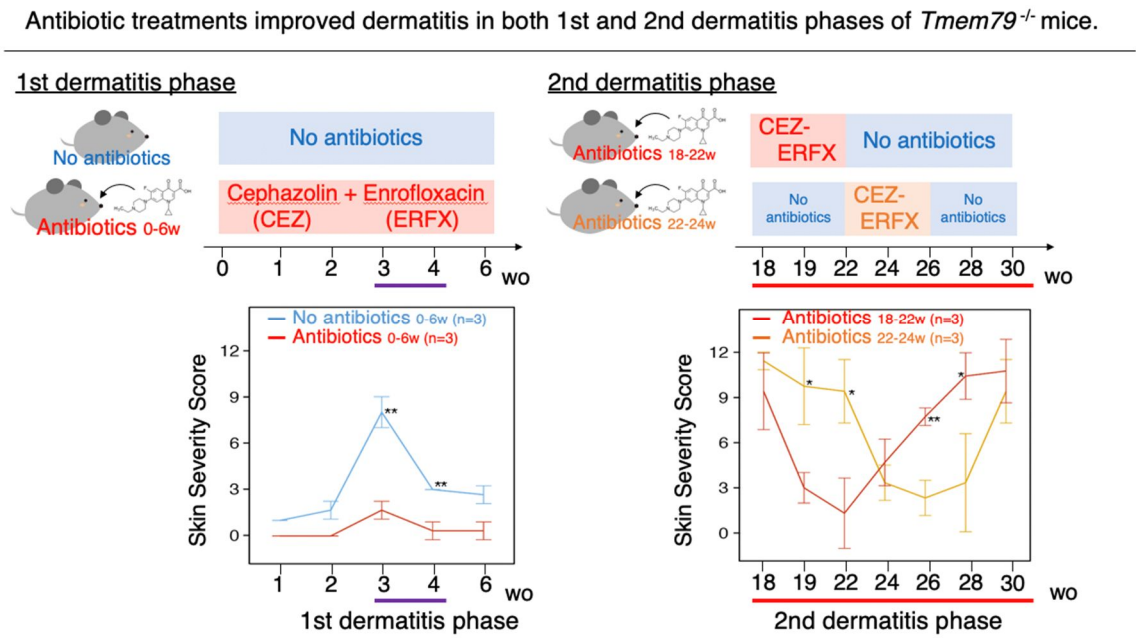

図３　抗生物質による皮膚炎の抑制

(4)全ゲノム配列解読による S.aureus 由来解析
Tmem79-/-マウスで増殖している S.aureus の由来を解析するために、異なる飼育環境下の Tmem79-/-マウスから採取した S.aureus の全ゲノム配列を解読し、比較を行った。既知の S.aureus 配列と合わせて比較を行った結果、Tmem79-/-マウスから採取された S.aureus は、既知 S.aureus と別のクラスターを形成し、また、ベンター から購入した C57BL6 マウスの口腔内から採取した S.aureus と最も高い相同性を示した。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　０件）

〔学会発表〕（計　１件）

1. T Sasaki, A Shiohama, K Matsuda, H Watanabe, T Yamada, H Kawasaki, A Kubo, M Amagai. deficient mice sequentially develop dermatitis associated with S.aureus non-dominant and dominant microbiota abnormality. International Investigative Dermatology (2018)

〔図書〕（計　０件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：

国内外の別：

○取得状況（計　0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：天谷　雅行
ローマ字氏名：AMAGAI, Masayuki
所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8 桁）：90212563

研究分担者氏名：塩濱　愛子
ローマ字氏名：SHIOHAMA, Aiko
所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号（8 桁）：40383731

(2)研究協力者
研究協力者氏名：松井　毅
ローマ字氏名：MATSUI, Tsuyoshi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。