

I. 基本情報

事業名： (日本語) 免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 (免疫アレルギー疾患実用化研究分野)
(英語) Practical Research Project for Allergic Diseases and Immunology (Research on Allergic Diseases and Immunology)

研究開発課題名： (日本語) 皮膚・腸内微生物叢解析によるアトピー性皮膚炎発症機序の解明
(英語) Clarification of pathogenic mechanisms in atopic dermatitis by analyzing skin and gut microbiome

研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学医学部皮膚科 教授 天谷雅行
所属 役職 氏名： (英語) Masayuki Amagai, Professor and Chair, Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語)

- ① 正常人及び炎症性皮膚疾患患者からの臨床検体収集・管理
- ② アトピー性皮膚炎特異的微生物叢の解明研究の統括
- ③ ノトバイオートマウスモデル研究の統括

開発課題名： (英語)

- ① Collection and management of clinical samples from healthy subjects and patients with inflammatory skin disorder
- ② Integral management of research on clarification of atopic dermatitis specific microbiota
- ③ Integral management of gnotobiotic mouse model research

研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学医学部皮膚科 教授 天谷雅行
所属 役職 氏名： (英語) Masayuki Amagai, Professor, Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

分担研究 (日本語)

- ① アトピー性皮膚炎患者からの臨床検体収集・管理
- ② アトピー性皮膚炎患者に対する Bleach bath 療法 (静菌治療) の有効性評価と皮膚微生物叢との相関解析
- ③ アトピー性皮膚炎外用治療が皮膚微生物叢に与える影響の解明

開発課題名: (英語)

- ① Collection and management of clinical samples from atopic dermatitis patients
- ② Correlation analysis between effectiveness evaluation of bleach bath treatment for atopic dermatitis patients and skin microbiome
- ③ Clarification of impact of topical treatments for atopic dermatitis on skin microbiota

研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学医学部皮膚科 准教授 海老原 全

所属 役職 氏名: (英語) Tamotsu Ebihara, Associate Professor, Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

分担研究 (日本語)

- ① アトピー性皮膚炎患者皮膚微生物叢の時空間的網羅的解析の統括
- ② 皮膚細菌叢のクラスター解析
- ③ 角層バリア機能関連遺伝子異常患者の皮膚微生物叢の解析

開発課題名: (英語)

- ① Management of spatiotemporal, comprehensive data analysis of skin microbiome in atopic dermatitis patients
- ② Cluster analysis of skin microbiome data
- ③ Skin microbiome analysis for patients with gene mutation associated with skin barrier function

研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学医学部皮膚科 共同研究員 川崎 洋

所属 役職 氏名: (英語) Hiroshi Kawasaki, Researcher, Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

分担研究 (日本語)

- ① 細菌および真菌叢解析の統括
- ② ウイルス叢解析手法開発の統括
- ③ ノトバイオートマウスモデル研究の実験協力

開発課題名: (英語)

- ① Design and supervise the analysis of skin microbiome and fungiome
- ② Design and supervise the analysis of skin virome
- ③ Support the research using gnotobiotic mouse models

研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学 教授 本田賢也

所属 役職 氏名: (英語) Kenya Honda, Professor, Microbiology and Immunology, Keio University
School of Medicine

分担研究 (日本語)

- ① 皮膚および便検体の細菌叢解析の実施
- ② アトピー性皮膚炎に関与する菌種のゲノム解析
- ③ 皮膚および便検体を用いたウイルス叢解析の検討

開発課題名: (英語)

- ① Analysis of skin and fecal microbiome
- ② Analysis of bacterial genomes related to atopic dermatitis
- ③ Development of the analytical method for skin and fecal virome

研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学 専任講師 須田 亙

所属 役職 氏名: (英語) Wataru Suda, Assistant Professor, Microbiology and Immunology, Keio
University School of Medicine

分担研究 (日本語)

- ① 細菌叢解析
- ② 真菌叢解析法の確立と解析
- ③ ウイルス叢解析法の確立と解析

開発課題名: (英語)

- ① Analysis of skin microbiome
- ② Establishment of analytical method for fungiome and analysis of fungiome
- ③ Establishment of analytical method for virome and analysis of virome

研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学医学部百寿総合センター 専任講師 佐々木貴史

所属 役職 氏名: (英語) Takashi Sasaki, Assistant Professor, Center for Supercentenarian
Medical Research, Keio University School of Medicine

分担研究 (日本語)

- ① 一般小児からの臨床検体収集・管理
- ② 生後からの皮膚・腸内微生物叢変化に関する長期コホート研究用検体収集

開発課題名: (英語)

- ① Management of clinical sample collection from healthy children
- ② Sample collection from participants in the birth cohort study to examine the trajectory of skin and gut microbiome.

研究開発分担者 (日本語) 国立成育医療研究センター研究所・副所長 斎藤博久
所属 役職 氏名: (英語) Hirohisa Saito, Deputy Director, National Research Institute for Child Health & Development

分担研究 (日本語) 乳幼児期の微生物叢の推移とアトピー性皮膚炎の発症予後との関連の
解明

開発課題名: (英語)
Clinical study to explore the association between the onset of atopic dermatitis and trajectory
of microbial flora in infants and children

研究開発分担者 (日本語) 成育医療研究センター生体防御系内科部アレルギー科・医長 大矢幸弘
所属 役職 氏名: (英語) Yukihiro Ohya, Chief, Division of Allergy, Department of Medical
Subspecialties, National Center for Child Health and Development

分担研究 (日本語)

- ① 臨床分離された黄色ブドウ球菌株のゲノム配列解読
- ② データベースを用いた各疾患由来株の比較ゲノムによる系統解析

開発課題名: (英語)
① Genome sequence of clinically isolated *Staphylococcus aureus*
② Phylogenetic comparative analysis of various clinically isolated *Staphylococcus aureus*
strains using genome database

研究開発分担者 (日本語) 広島大学大学院・医歯薬保健学研究院・教授 菅井基行
所属 役職 氏名: (英語) Motoyuki Sugai, Professor, Department of Bacteriology,
Hiroshima University Graduate School of Biomedical & Health Sciences

分担研究 (日本語)

- ① 正常人皮膚微生物叢の時空間的網羅的解析の統括
- ② 角層バリア機能や皮膚微小環境変化と皮膚微生物叢の相関解析

開発課題名: (英語)
① Management of spatiotemporal, comprehensive data analysis of skin microbiome in healthy
subjects
② Correlation analysis between skin microbiome and stratum corneum barrier function and skin
microenvironmental change

研究開発分担者 (日本語) 理化学研究所・統合生命医科学研究センター・皮膚恒常性研究チーム・
上級研究員 松井 毅

所属 役職 氏名: (英語) Takeshi Matsui, Deputy Team Leader, Laboratory for Skin Homeostasis,
RIKEN Center for Integrative Medical Sciences(IMS)

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

和文

アトピー性皮膚炎（AD）の病態に、皮膚・腸内の微生物叢が関わっている可能性が示唆されている。本研究は、AD で特徴的に認められる微生物グループを同定し、AD 治療・予防への応用を目指すとともに、患者由来細菌を用いてノトバイオートマウスを作成し、AD 発症に関与する細菌群の同定、および発症機序の解明を進め、新規治療の創出に向けた基盤を確立することを目的としている。

平成 28 年度は、研究班全体で本研究の根幹となる臨床検体を収集し解析するための倫理面・体制面の整備と解析プラットフォームの構築を進めた。検体収集は、サンプリング法を米国 NIH 皮膚細菌叢研究コンソーシアムの提案する国際基準に準拠させ、採取部位を含めた手法を研究班全体で統一した。

天谷、海老原、川崎のグループ（慶應義塾大学皮膚科）は、主に成人を対象とした縦断的、横断的研究側面を持つ AD 特異的微生物叢パターンの解明を目指した研究を進めている。また、菌を標的とした bleach bath 療法等の皮膚外用治療が皮膚微生物叢に与える影響の解明も進めている。平成 29 年 3 月末までに 62 人 1161 検体のヒト由来微生物叢解析用サンプルの収集を実施した。

斎藤、大矢のグループ（成育医療研究センターアレルギー科）は、出生児からの皮膚・腸内微生物叢の推移と AD 発症の関与を解析するコホート研究を進めている。平成 28 年度は、過去の健診実施時（データ・検体取得予定）の皮疹出現パターンを検討し、同グループでは研究班全体で統一する眉間、前腕、肘窩、上背部に加え、頬部、膝窩部を基本検体収集部位として定めることとした。また、小児に加え、生後 6 ヶ月までに関しては母からの微生物叢解析用検体採取を基本とするなど、細かなプロトコール修正を図り、今年度から本格的に研究（データ・サンプル収集）を開始する予定である。平成 29 年 3 月末までに 6 人よりヒト由来微生物叢解析用サンプルの収集を実施した。

松井、川崎のグループ（理化学研究所皮膚恒常性研究チーム、慶應義塾大学皮膚科）は、平成 28 年度は皮膚の時空間的網羅的解析に関する予備検討を実施した。海外からの既報告の通り、皮膚細菌叢は部位特異性を強く認めるとともに、アトピー性皮膚炎の皮膚細菌叢は個人差が強い可能性が示唆された。今後は短期間隔・多部位での検体収集（健康人・アトピー性皮膚炎患者）を進め、皮膚微生物叢に関する基盤データの獲得を目指す。

本田、須田（慶應義塾大学微生物学・免疫学）、佐々木（慶應義塾大学百寿総合研究センター）による微生物叢の網羅的遺伝子解析グループは、本研究班の解析の基軸となるメタ 16S 解析を実施するとともに、新たな微生物叢解析手法の開発に取り組んでいる。平成 28 年度は、皮膚（1141 検体）・便（69 検体）に関して次世代シーケンサーによる網羅的 16S rDNA シーケンシングを実施した。また、定量 PCR を用いた細菌量の定量評価法を確立し、研究班内の皮膚細菌叢のルーチン解析項目に加えた。

菅井（広島大学細菌学研究室）は、本研究班内における黄色ブドウ球菌の菌株レベルの解析に関わる手法を検討した。平成 28 年度は、皮膚スワブサンプルから黄色ブドウ球菌を単離し、菌株レベルでショットガンゲノム配列解読を実施し、系統解析による黄色ブドウ球菌分離株のゲノタイプ確定までのパイプラインを確立した。

天谷、本田は、アトピー性皮膚炎患者の皮膚から細菌叢を採取し無菌マウスへ接種することで、安定してノトバイオートマウスを作成するための手法確立を目指した。平成 28 年度までに、ヒトの

皮膚細菌叢からノトバイオトマウスを作成できる可能性を確認した。現在、安定してヒトからマウスへ菌を移植するための検討を実施している。

英文

It has been suggested that the skin and gut microbiota are involved in the pathogenesis of atopic dermatitis (AD). The purpose of this study is to identify AD specific microbial community and to apply the treatment and preventive medicine for AD. Furthermore, we aim to identify skin microbes related to the development of AD and to elucidate the pathogenesis by using gnotobiotic mice inoculated with the entire skin bacterial flora derived from AD patients, and then establish the base for the development of the new treatment.

In the first year, we have built a platform for the collection of clinical samples, their analyses, and data sharing among the research team. The method for sample collection is in compliance with the international standards proposed by NIH skin microbiome consortium.

Amagai, Ebihara and Kawasaki conducted the research for adult AD to explore AD specific microbiotic composition pattern, by using longitudinal and cross-sectional skin microbiome data. In addition, the group performed the research for the impact of topical treatment such as bleach bath therapy on the skin microbiota. For these analyses, 1161 skin samples from 62 participants were collected until March 31, 2017.

Saito and Ohya conducted the research for the birth cohort study to understand the trajectory of skin and gut microbial flora and to analyze the association of microbial flora to the development of AD. Six body sites, such as glabella, cheek, forearm, cubital fossa, upper back and popliteal fossa, were chosen for basic skin sample collection sites, based on the previous findings in health checkup of infants. The cohort study protocol was modified that the mothers of baby were also subjected to skin microbiome analyses until 6 months after birth. Six babies were enrolled and their skin and fecal samples were collected until March 31, 2017 and the cohort study was started at a full scale from this year.

Matsui and Kawasaki performed preliminary investigation about spatiotemporal, comprehensive data analysis for skin microbiome. The skin microbiome clearly showed site specificity as previously reported from abroad and also suggested strong variations among individuals. In the following years the research group attempts to collect the skin samples at short-term interval as well as from multiple sites of healthy subjects and AD patients.

Microbiome genetic analysis group composed by Honda, Suda and Sasaki performed the meta16S sequencing analyses and established the new analytical methods. In total, 1141 skin samples and 69 fecal samples were analyzed for meta16S rDNA sequencing by using next-generation sequencer. Quantitative evaluation of bacterial load was established by using quantitative PCR and now routinely analyzed in this research group.

Sugai established the methods to analyze hospital-isolated strains of *Staphylococcus aureus*. Clinical *S.aureus* isolates were obtained from skin swab samples from various skin diseases including atopic dermatitis. Shotgun genome sequencing for the isolates was performed and the analytic pipeline to characterize genotypes of clinically isolated *S.aureus* strains was established

by phylogenetic analysis.

Amagai and Honda aimed for the establishment of technique to develop gnotobiotic mice stably by applying skin bacterial flora derived from AD patients. They confirmed the possibility for developing gnotobiotic mice with human bacterial flora and conducted a pilot study on immunological effects by human skin bacterial flora on mouse skin.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 4件、国際誌 7件)

1. Kakihana K, Fujioka Y, Suda W, Najima Y, Kuwata G, Sasajima S, Mimura I, Morita H, Sugiyama D, Nishikawa H, Hattori M, Hino Y, Ikegawa S, Yamamoto K, Toya T, Doki N, Koizumi K, Honda K, Ohashi K. Fecal microbiota transplantation for patients with steroid-resistant acute graft-versus-host disease of the gut. **Blood**. 2016, 128(16):2083-2088.
2. Mathewson ND, Jenq R, Mathew AV, Koenigsnecht M, Hanash A, Toubai T, Oravec-Wilson K, Wu SR, Sun Y, Rossi C, Fujiwara H, Byun J, Shono Y, Lindemans C, Calafiore M, Schmidt TC, Honda K, Young VB, Pennathur S, van den Brink M, Reddy P. Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. **Nat Immunol**. 2016, 17(10):1235.
3. Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. **Nature**. 2016, 535(7610):75-84
4. Saito T, Nishikawa H, Wada H, Nagano Y, Sugiyama D, Atarashi K, Maeda Y, Hamaguchi M, Ohkura N, Sato E, Nagase H, Nishimura J, Yamamoto H, Takiguchi S, Tanoue T, Suda W, Morita H, Hattori M, Honda K, Mori M, Doki Y, Sakaguchi S. Two FOXP3(+)CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. **Nat Med**. 2016, 22(6):679-84.
5. Tanoue T, Atarashi K, Honda K. Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. **Nat Rev Immunol**. 2016, 16(5):295-309.
6. Ramanan D, Bowcutt R, Lee SC, Tang MS, Kurtz ZD, Ding Y, Honda K, Gause WC, Blaser MJ, Bonneau RA, Lim YA, Loke P, Cadwell K. Helminth infection promotes colonization resistance via type 2 immunity. **Science**. 2016 29:352(6285):608-12.
7. Yokouchi M, Atsugi T, Logtestijn MV, Tanaka RJ, Kajimura M, Suematsu M, Furuse M, Amagai M, Kubo A: Epidermal cell turnover across tight junctions based on Kelvin's tetrakaidecahedron cell shape. **eLife**, 5 e19593, (doi: 10.7554/eLife.19593),2016.
8. 横内麻里子, 久保亮治, 天谷雅行: 皮膚バリアの破綻とアトピー性皮膚炎. **Medical Science Digest**, 42 (6), 268-271, 2016.
9. 海老原全 アトピー性皮膚炎の全身療法 医学のあゆみ. 256(1), 96-100, 2016.
10. 川崎洋, 海老原全. 皮膚疾患の病態 マイクロバイオーム. 臨床皮膚科 70(5), 47-52, 2016.
11. 川崎洋, 川上英良, 天谷雅行, 古関明彦: アトピー性皮膚炎のリバーストランスレーショナルリサーチ. **実験医学**, 35 (1), 33-39, 2017.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Amagai M: Skin barrier homeostasis and its failure in atopic disorders. **31st Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum**, Charleston, South Carolina, USA, 2016. 4. 3-8. (国外、口頭)
2. 厚木徹, 横内麻里子, 平林愛, 大山学, 天谷雅行, 久保亮治: Claudin-1 欠損マウスを用いた脂腺タイトジャンクションバリアの解析. **第 23 回分子皮膚科学フォーラム**, 大阪, 2016. 4. 15-16. (国内、口頭)
3. Amagai M: Skin Barrier function and dysfunction in atopic diseases. **4th Taiwan Dermatology Aesthetic Conference/2016 Taiwanese Dermatological Association Spring Meeting**, Taiwan, 2016. 4. 30- 5. 1. (国外、口頭)
4. Ruebsam M, Mertz A, Goranci G, Horsley V, Dufresne E, Ziegler W, Kubo A, Amagai M, Niessen CM: Tissue polarization of mechano-adhesive signals, cytoskeleton and EGFR signaling controls skin barrier formation. **The 75th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology**, Scottsdale, Arizona, USA, 2016. 5. 11-14. (国外、ポスター)
5. Yokouchi M, Atsugi T, Kajimura M, Suematsu M, Furuse M, Amagai M, Kubo A: Cell shape determines the regulatory mechanisms for maintaining tight junction barrier homeostasis in epidermal turnover. **The 75th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology**, Scottsdale, Arizona, USA, 2016. 5. 11-14. (国外、口頭およびポスター)
6. Honda K: Regulation of T Cells by the Gut Microbiota. **Gordon Research Conference (GRC) in Immunochemistry and Immunobiology**, Lucca (Barga), Italy, 2016. 6. 19-24. (国外、口頭)
7. Rübsam M, Mertz A, Kubo A, Dufresne ER, Horsley V, Ziegler W, Wickström SA, Amagai M, Niessen AC: E-cadherin intergrates EGFR signaling and mechanotransduction to control tissue polarization and barrier formation. **46th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research**, Munich, Germany, 2016. 9. 7- 10. (国外、口頭およびポスター)
8. Amagai M: Skin barrier homeostasis and its failure in atopic dermatitis. **25th European Academy of Dermatology and Venereology Congress**, Vienna, Austria, 2016. 9. 28- 10. 2. (国外、口頭)
9. Honda K: T cell stimulatory bacteria colonizing in the human oral cavity. **CSH ASIA: Frontiers of Immunology in Health & Disease**, Awaji, JAPAN, 2016. 10. 3-6. (国外、口頭)
10. 天谷雅行: アトピー性皮膚炎と皮膚バリア障害. **第 53 回日本小児アレルギー学会**, 群馬, 2016. 10. 8-9. (国内、口頭)
11. Honda K: Gut microbiota in immune activation. **4th Annual meeting of the International Cytokine and Interferon Society**, San Francisco, USA, 2016. 10. 16-19. (国外、口頭)
12. Amagai M: The skin as a barrier in a dirty world. **136th Annual Meeting of American Dermatological Association**, Santa Barbara, CA, USA, 2016. 10. 19-23. (国外、口頭)
13. 久恒順三, 増田加奈子, 佐藤祐介, 小野久弥, 胡東良, 中根明夫, 萩谷英大, 水谷哲, 原田和俊, 本多皓, 伊勢美咲, 舩越建, 天谷雅行, 大毛宏喜, 菅井基行: 侵襲性感染症由来 Staphylococcus aureus が保有する表皮細胞分化抑制因子 EDINA-エンテロトキシン SEZ プラスミドの解析. **第 65 回日本感染症学会東日本地方会学術集会/第 63 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学**

- 会, 新潟, 2016. 10. 26-28. (国内、口頭)
14. 天谷雅行: 皮膚バリア恒常性機構とその破綻. **第 68 回日本皮膚科学会西部支部学術大会**, 米子, 2016. 11. 19- 20. (国内、口頭)
 15. 松井毅, 白井景子, 葛野菜々子, 古市祐樹, 平林愛, 天谷雅行: 皮膚表皮顆粒層細胞動態から明らかにする陸上脊椎動物の気相環境への適応進化機構. **第 39 回日本分子生物学会**, 横浜, 2016. 11. 30- 12. 2. (国内、口頭)
 16. Amagai M: Atopic diseases as a result of skin barrier failure. **41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Sendai, Japan, 2016. 12. 9-11. (国内、口頭)
 17. Furuichi Y, Matsui T, Amagai M: Real time 3D in vivo pH imaging of stratum corneum revealed complex morphology-based in mice. **41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Sendai, Japan, 2016. 12. 9-11. (国内、口頭およびポスター)
 18. Kawasaki H, Kasai H, Endo TA, Ashizaki K, Yasuda F, Amagai M, Ebihara T: The classification of atopic dermatitis patients using machine learning method, based on the therapeutic outcome for the proactive treatment. **41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Sendai, Japan, 2016. 12. 9-11. (国内、口頭およびポスター)
 19. 川崎洋: アトピー性皮膚炎と皮膚バリア. **第 80 回日本皮膚科学会東京支部学術大会**, 横浜, 2017. 2. 11. (国内、口頭)
 20. Amagai M: Skin barrier homeostasis and its failure. **2017 NHRI / IBMS Joint International Conference on Inflammation & Disease**, Taiwan, 2017. 2. 16-17. (国外、口頭)
 21. Amagai M: Mechanisms of Skin Barrier Homeostasis. **RIKEN IMS Retreat 2016**, Hayama, Kanagawa, Japan, 2017. 2. 20-21. (国外、口頭)
 22. Amagai M, Furuichi Y, Matsui T: 3D in vivo pH imaging analysis of stratum corneum. **The 27th Annual Meeting of the Korean Society for Investigative Dermatology**, Seoul, Korea, 2017. 3. 24-25. (国外、口頭)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 「AI 医療 初の統合解析 創薬・ケアまで一体で」記事関係者：川崎洋、天谷雅行. 日本産経新聞 2017 年 1 月 3 日朝刊 1 面、国内.
2. 「がんや認知症、アトピーに人工知能を活用 創薬・ケアまで初の統合解析 理研が 4 月から大規模実験」記事関係者：川崎洋、天谷雅行. 産経ニュース（ネット） 2017 年 1 月 3 日 09:08、国内.

(4) 特許出願

なし