

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	森脇 昌哉
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ① 2 項該当		
論文題目			
<p><i>Staphylococcus aureus</i> from atopic dermatitis skin accumulates in the lysosomes of keratinocytes with induction of IL-1<math>\alpha</math> secretion via TLR9</p> <p>（アトピー性皮膚炎患者由来黄色ブドウ球菌は表皮角化細胞のリソソームに蓄積し、Toll 様受容体 9 を介してインターロイキン 1-<math>\alpha</math> の産生を促進する）</p>			
論文審査担当者			
主 査	教授 坂口 剛正	印	
審査委員	教授 志馬 伸朗		
審査委員	准教授 鎌田 英明		
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>アトピー性皮膚炎（AD）は皮膚炎の増悪と寛解を繰り返す慢性疾患で、病態の全容は依然解明されておらず、根治方法も確立していない。AD 患者の皮膚には黄色ブドウ球菌が常在していることが知られており、皮膚細菌叢の解析により AD の病勢と黄色ブドウ球菌の占有率に関連があることが報告されている。そのため、黄色ブドウ球菌の AD の病態への関与が疑われるが、その機序は解明されていない。これまで申請者らは、ヒトランゲルハンス細胞に与える影響に関して AD 患者の皮膚由来の黄色ブドウ球菌株（AD 株）が黄色ブドウ球菌の標準株とは異なることを報告しており、今回はヒト表皮角化細胞である HaCaT 細胞を用いて黄色ブドウ球菌の AD 株と標準株の性質の違いについて検討した。</p> <p>本実験では、死菌処理した黄色ブドウ球菌株と表皮ブドウ球菌で HaCaT 細胞を刺激し、ELISA 法でサイトカイン産生を解析した。また蛍光免疫染色法を用いて形態学的な解析を施行した。AD 株で刺激すると、標準株や表皮ブドウ球菌で刺激した場合と比較して有意に多くの IL-1<math>\alpha</math> 産生が誘導された。また、HaCaT 細胞の蛍光免疫染色による形態学的観察では、AD 株は細胞内に多く取り込まれ、リソソームに蓄積していた。一方、標準株ではこのような現象は認められなかった。以上より、黄色ブドウ球菌 AD 株は HaCaT 細胞のリソソーム内に蓄積し、IL-1<math>\alpha</math> の産生を誘導する特徴を有することが明らかとなった。リソソーム内には Toll-like receptor 9 (TLR9) が発現しており、TLR9 は黄色ブドウ球菌の CpG DNA を認識する。そこで、次に IL-1<math>\alpha</math> 産生と TLR9 の関連について解析した。TLR9 の阻害剤である inhibitory ODN 及び TLR9 の siRNA を用いて TLR9 を阻害すると、AD 株により誘導される IL-1<math>\alpha</math> の産生が有意に減少した。以上よりリソソーム内に蓄積した黄色ブドウ球菌の AD 株は TLR9 を介して IL-1<math>\alpha</math> の産生を惹起することが明らかとなった。また本実験では死菌化した黄色ブドウ球菌を用いており、これらの AD 株の免</p>			

疫応答は AD 株に特異的な表面構造に起因することが予測された。そこで、AD 株をプロテイナーゼ K で処理して表面蛋白を除去すると、リソソームへの蓄積と IL-1 $\alpha$  産生を誘導する特性が消失した。黄色ブドウ球菌は食作用により細胞内に取り込まれることが知られており、この経路には菌表面のタンパク質が関与している。黄色ブドウ球菌株の表面タンパク質を用いてウエスタンブロット法で fibronectin binding protein (FnBP) の発現量を解析すると、AD 株は多くの FnBP を発現していた。また、抗 fibronectin 抗体を用いて fibronectin を阻害するとブドウ球菌の取り込みが抑制された。

IL-1 $\alpha$  は炎症性サイトカインであり、種々の免疫反応を賦活化する作用をもつ。マウスモデルでは、表皮に IL-1 $\alpha$  を過剰発現させると AD 様の皮膚炎を起こすことが知られている。また、一部の AD 患者の皮膚では健常人と比較して多くの IL-1 $\alpha$  が発現していることが報告されており、過剰な IL-1 $\alpha$  が皮膚炎を惹起・増悪すると考えられる。今回の結果からは、特定の黄色ブドウ球菌 (AD 株) が定着することで IL-1 $\alpha$  の誘導を介して AD の発症・増悪に関与する可能性が示唆された。また、表皮角化細胞は TLR 等のパターン認識レセプターを介して黄色ブドウ球菌をはじめとする病原体を認識する。黄色ブドウ球菌は主に細胞表面に発現する TLR2 で認識されるが、黄色ブドウ球菌の CpG-DNA はエンドソームやリソソームに発現する TLR9 にも認識されることが知られており、樹状細胞のリソソーム内の黄色ブドウ球菌は TLR9 を介してサイトカイン産生を誘導することが示されている。今回申請者は AD 患者皮膚由来の黄色ブドウ球菌株が表皮角化細胞のリソソームに蓄積し、TLR9 を介して IL-1 $\alpha$  の産生を誘導することを示した。また、AD 株の表層タンパク質を除去することでこれらの特性が失われたことから、AD 株の特性は表層タンパク質の違いに由来することが明らかとなった。黄色ブドウ球菌の表面には、皮膚への接着等に関与する種々のタンパク質が発現している。なかでも FnBP は皮膚への接着および、fibronectin を介して細胞の食作用を誘導することが知られている。黄色ブドウ球菌 AD 株は標準株と比較して多くの FnBP を発現し、fibronectin を阻害することで黄色ブドウ球菌 AD 株の取り込みが一部阻害されたことから、FnBP の発現が多いことが黄色ブドウ球菌 AD 株の特性に寄与していると考えられる。しかし、fibronectin 阻害の効果は限定的であり、他の表層タンパク質も関与しているものと考えられた。今回の結果からは特定の性質を持つ黄色ブドウ球菌が皮膚に定着することで AD が発症・増悪する可能性が示唆された。

以上より、本研究は、今後のアトピー性皮膚炎の研究・診療に資すること大である。よって、審査委員会全員は、本論文が申請者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	森脇 昌哉
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
<p><i>Staphylococcus aureus</i> from atopic dermatitis skin accumulates in the lysosomes of keratinocytes with induction of IL-1<math>\alpha</math> secretion via TLR9                  （アトピー性皮膚炎患者由来黄色ブドウ球菌は表皮角化細胞のリソソームに蓄積し、Toll様受容体9を介してインターロイキン1-<math>\alpha</math>の産生を促進する）</p>			
<p>最終試験担当者</p> <p>主査 教授 坂口 剛正 印</p> <p>審査委員 教授 志馬 伸朗</p> <p>審査委員 准教授 鎌田 英明</p>			
<p>〔最終試験の結果の要旨〕</p> <p style="text-align: center;">判定合格</p> <p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年11月1日の第76回広島大学研究科発表会（医学）及び平成30年11月5日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 本研究で証明された黄色ブドウ球菌株特性の実臨床における普遍性</li> <li>2 黄色ブドウ球菌の角化細胞内への侵入能とアトピー性皮膚炎の臨床像の関係</li> <li>3 アトピー性皮膚炎患者由来菌株がフィブロネクチンを高発現する分子機構</li> <li>4 TLR9刺激によるIL-1<math>\alpha</math>産生誘導の分子機構と特異性</li> <li>5 アトピー性皮膚炎由来黄色ブドウ球菌の持つ他の細菌学的特性</li> <li>6 黄色ブドウ球菌が角化細胞のIL-1<math>\alpha</math>産生を促すために必要な細胞内小器官</li> </ol> <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			