

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	三宅 瑠
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Interferon-gamma and barrier function of keratinocytes mediate internalization of <i>Staphylococcus aureus</i> derived from atopic dermatitis (アトピー性皮膚炎由来黄色ブドウ球菌の取り込みはインターフェロン γ と角化細胞バリア機能により制御されている)			
論文審査担当者			
主 査	教授	坂口 剛正	印
審査委員	教授	保田 朋波流	
審査委員	教授	竹野 幸夫	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>アトピー性皮膚炎（AD）患者では表皮のバリア機能と細菌叢のホメオスタシスが破綻し、皮膚から黄色ブドウ球菌（<i>S. aureus</i>）が高率に検出されることから、その病態には <i>S. aureus</i> が深く関わっていると考えられている。我々は、これまで AD 患者皮膚から分離された <i>S. aureus</i>（AD 株）がケラチノサイト内に取り込まれ、その機序にフィブロネクチンが関与すること、また、AD 株は末梢血から分化誘導した樹状細胞とランゲルハンス細胞の反応性を Th2 にシフトさせることなどを報告してきた。近年、IL-4/IL-13 受容体阻害薬であるデュピルマブがアトピー性皮膚炎治療に用いられるようになり、良好な治療成績を示しているが、AD 株がどのようにしてケラチノサイトに取り込まれ、また IL-4、IL-13 を初めとする皮膚免疫環境の影響を受けるかということは解明されていない。そこで本研究では、ハイコンテントイメージング顕微鏡 Opera Phenix™を用いてケラチノサイト（HaCaT 細胞）への AD 株と健常人由来 <i>S. aureus</i> 株（標準株）の細胞内取り込み量を定量し、Th1/Th2 サイトカイン存在下およびバリア機能障害下での取り込み量の変化を解析した。</p> <p>HaCaT 細胞に標準株と AD 株の死菌を 15-360 分間共培養し、細胞内に菌を取り込ませた。取り込まれた菌を FITC 標識抗黄色ブドウ球菌抗体で蛍光標識し、Opera Phenix™を用いて 1 細胞あたりの取り込み数を計測した。AD 株との共培養により、細胞内への <i>S. aureus</i> 取り込み量は経時的に増加し、3 時間でプラトーに達した。一方、標準株ではほとんど取り込みは起こらなかった。次に、HaCaT 細胞を Th1 サイトカイン（IFN-γ）および Th2 サイトカイン（IL-4, IL-13）で前処理し、AD 株および標準株の取り込みに及ぼす影響を検討した。その結果、HaCaT 細胞を IFN-γで前処理すると AD 株の取り込み量が有意に低下した。また、IFN-γ前処理は <i>S. aureus</i> とケラチノサイトの結合に関与するフィブロネクチンの産生を有意に低下させた。このことから、IFN-γはフィブロネクチン産生抑制を介して AD 株取り込みを抑制していることが示唆された。</p> <p>一方、Th2 サイトカインの IL-4, IL-13 による前処理は AD 株の取り込み量とフィブロネクチン産生量には影響しなかった。Th2 サイトカイン処置で AD 株の取り込みが増加しなかった理由としては、Th2 サイトカインはケラチノサイトの <i>S. aureus</i> 取り込みには直接関与しないこと、線維芽細胞などの他の細胞を介してケラチノサイトのフィブロネクチン産生を促進する可能性が考えられる。これらを検証するためには、今後、初代培養ケラチノサイト、線維芽細胞との共培養系など、より生体に近い環境下で検討する必要がある。</p> <p>次に、ケラチノサイトの <i>S. aureus</i> 取り込みと皮膚バリア機能との関連を明らかにするため、皮膚バリア機能形成に大きな役割を担うフィラグリンの産生を特異的 siRNA を用いて低下させ、<i>S. aureus</i> の取り込みに対する影響を検討した。その結果、フィラグリン siRNA 導入細胞では、control siRNA 導入細胞に比べて AD 株の取り込み量が有意に増加した。一方、標準株では有意な増加はみられなかった。フィラグリン産生が低下している状況下で、AD 株の取り込み量に対する Th1 サイトカインおよび Th2 サイトカインの影響を検討したところ、正常状態と同様に IFN-γは取り込み量を有意に抑制したが、IL-4, IL-</p>			

13は影響を示さなかった。フィラグリン阻害が *S. aureus* 取り込み量を増加させる理由としては、フィラグリンの分解により生じ、*S. aureus* の定着を阻害する作用を持つウロカニン酸やピロリドンカルボン酸の産生量が低下することが一因と推測された。

本研究では、OperaPhenix™を用いて *S. aureus* 取り込みを形態学的かつ定量的に解析し、I型サイトカインとバリア機能が *S. aureus* の細胞内への取り込みを防ぐために重要であることが明らかとなった。今後、この実験系を用いて *S. aureus* のケラチノサイトへの結合を阻害する化合物のスクリーニングを行うことにより、*S. aureus* によるAD増悪を抑制する新たな治療薬を開発することが期待できる。

このように、本研究で開発されたケラチノサイトへの *S. aureus* 取り込みの定量的解析方法とその制御機構に関する知見は、アトピー性皮膚炎の病態理解に学術的進展をもたらした。よって審査委員会委員全員は、本論文が三宅瑠に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。