

学 位 論 文

**Interferon-gamma and barrier function of keratinocytes
mediate internalization of *Staphylococcus aureus*
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)

三宅 瑠

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

博士課程 医歯薬学専攻

2020 年度

主指導教員：酒井 規雄 教授

(医系科学研究科 神経薬理学)

目 次

英語要約	4
序論	8
方法	12
結果	19
考察	39
参考文献	46
謝辞	54

略語一覽

AD, Atopic dermatitis

CC, Clonal complex

FLG, Filaggrin

Fn, Fibronectin

FnBP, Fibronectin binding protein

Hsp60, Heat shock protein 60

IFN- γ , Interferon-gamma

IL, Interleukin

FITC, Fluorescein isothiocyanate

S. aureus, *Staphylococcus aureus*

S. epidermidis, *Staphylococcus epidermidis*

TLR, Toll-like receptor

UCA, urocanic acid

PCA, pyrrolidone carboxylic acid

qRT-PCR, quantitative real-time PCR

RNA-seq, RNA sequencing

DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium

Summary

In patients with atopic dermatitis (AD), the epidermal bacterial flora is disrupted, and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is frequently detected in the skin. Bacterial flora in the skin plays an important role in skin homeostasis. It has been shown that changes in the flora lead to changes in skin cytokine environment and that loss of flora diversity leads to AD-like dermatitis. *S. aureus* is rarely detected in healthy individuals. It has been reported that *S. aureus* further increases its proportion of the bacterial flora during dermatitis exacerbations in AD patients, suggesting that *S. aureus* is deeply involved in the pathogenesis of the disease. We have previously reported that *S. aureus* (AD strain) isolated from the skin of AD patients was incorporated into keratinocytes, shifted the reactivity of dendritic cells and Langerhans cells differentiated from peripheral blood in response to T helper (Th) 2 cytokines, and caused the production of the pro-inflammatory cytokine Interleukin (IL)-1 α . The reaction could be inhibited by removing the surface proteins of the AD strain, suggesting that the surface proteins of *S. aureus* are largely responsible for the phenomenon of its internalization into keratinocytes. Immune abnormalities, such as elevated Th2 and Th22 cytokines in the lesions of AD patients, are also targets for AD therapy. In recent years, Dupilumab, an IL-4/IL-13 inhibitor, has become popular as a biological agent for AD, showing good therapeutic results, altering the composition of the skin flora, and reducing *S. aureus* colonization. However, how AD strains internalize into keratinocytes and how the skin immune environment regulates this phenomenon remains to be elucidated. In this study, we quantified the intracellular internalization of AD strains and standard strains into

keratinocytes (HaCaT cells) using Opera Phenix™ and analyzed the changes in internalization under Th1/Th2 cytokine treatment and barrier dysfunction.

First, we examined the temporal changes in *S. aureus* internalization into HaCaT cells; in the AD strain, *S. aureus* bound to and infiltrated cells as early as 15 minutes after stimulation, and the amount of uptake increased over time, reaching a plateau at 3 hours, indicating that *S. aureus* migrated to the vicinity of the cell nucleus. On the other hand, the number of internalized standard strain was significantly lower than that of the AD strain. Next, the effect of cytokines on *S. aureus* internalization into HaCaT cells was examined using Th1 cytokines (IFN- γ : 10 ng/ml) and Th2 cytokines (IL-4, IL-13: 100 ng/ml). The results showed that IFN- γ stimulation significantly decreased AD strains' internalization into HaCaT cells compared to phosphate-buffered saline (PBS) stimulation. IFN- γ stimulation also significantly decreased the production of fibronectin, which is required for *S. aureus* to bind to keratinocytes. Furthermore, knockdown of fibronectin with a specific siRNA also reduced *S. aureus* internalization into HaCaT cells. These findings suggest that IFN- γ can regulate the internalization of AD strains by reducing the production of fibronectin. Besides, Th2 cytokines, IL-4, and IL-13 treatment did not affect the internalization of AD strains or the production of fibronectin. It has been reported that Th2 cytokines increase the production of fibronectin in experiments using mouse skin. Also, in experiments using primary human fibroblasts, it is known that IL-4 stimulation increases the production of fibronectin. It may be the reason why Th2 cytokine stimulation did not increase AD strains' internalization. Th2 cytokines do not directly increase AD strains' internalization into HaCaT cells, but rather Th2

cytokines act on other cells other than keratinocytes (such as fibroblasts) to promote *S. aureus* internalization. In the future, it will be necessary to examine the effect of Th2 cytokines on *S. aureus* internalization using primary cultured keratinocytes and co-culture systems with fibroblasts in an environment closer to the living body.

Next, since filaggrin (FLG) production is decreased and *S. aureus* colonization is increased in some AD patients, we used specific siRNA to decrease FLG production and examine its effect on *S. aureus* internalization. As a result, the amount of internalization was significantly increased in both AD and standard strains. It has been reported that Th2 cytokines decrease the production of FLG not only in human skin but also in primary human normal keratinocytes. Therefore, we hypothesized that Th2 cytokines might increase the internalization of *S. aureus* under conditions of reduced FLG production. Therefore, we examined the internalization of *S. aureus* under the treatment with Th1 and Th2 cytokine using FLG siRNA-transfected. As seen in siRNA-non-transfected cells, IFN- γ significantly inhibited the internalization of *S. aureus*, while IL-4 and IL-13 did not affect it. The reason for the increase in *S. aureus* internalization when FLG expression was inhibited may be due to the decrease in the amount of urocanic acid and pyrrolidone carboxylic acid, degradation products of FLG, which is known to act as moisturizing factors and inhibit *S. aureus* colonization. The main pathway for the internalization into keratinocytes is thought to be the fibronectin binding protein (FnBP, *S. aureus* surface protein)-fibronectin-integrin α 5 β 1 pathway. In this study, the production of fibronectin was also decreased by FLG siRNA transduction. This finding suggests that the increased internalization of *S. aureus* due to decreased FLG expression may

involve a mechanism other than FnBP-Fn-integrin α 5 β 1 system.

Through this study, morphological and quantitative analysis of *S. aureus* internalization using OperaPhenix™ revealed that cytokines and barrier function are important for *S. aureus* internalization into HaCaT cells. Recent studies have shown that there is a close relationship between the skin's immune system and the skin's bacterial flora. Antibiotics have long been used to treat atopic dermatitis. While they may provide temporary relief, they have the risk to increase the number of harmful bacteria in its long-term treatment. It is important to maintain normal bacterial flora for maintaining healthy skin. Modulation of the cutaneous immune system, including dupilumab treatment, to prevent the colonization of pathogenic bacteria is one possible therapeutic approach. It is known that IFN- γ production in response to *S. aureus* is significantly reduced in peripheral blood mononuclear cells derived from AD patients compared to healthy subjects. In light of this study, IFN- γ may contribute to the treatment of AD because IFN- γ inhibits *S. aureus* AD strains' internalization. It may also be possible to use antibodies that specifically bind to the FnBP of *S. aureus* to prevent the internalization of *S. aureus* from colonizing the skin. The skin is the interface that separate inside of the body form the outside world. Maintaining its homeostasis is essential for controlling skin diseases. Therefore, it is suggested that regulation of Staphylococcus aureus colonization of the epidermis and its internalization into keratinocytes may control the pathogenesis of AD.

序論

アトピー性皮膚炎 (AD) は、かゆみを伴う慢性の湿疹であり、有病率は 12 歳以下の小児で 20%、成人では 7~10% と高いと報告されている (Deckers et al. 2012; Weidinger et al. 2018)。AD の主な病態形成因子としては、①皮膚バリア機能障害、② II 型ヘルパー T (Th2) 関連の皮膚免疫異常、③皮膚の微生物叢の 3 つが重要と考えられている。1 点目の皮膚バリア機能には様々な天然保湿因子が関与するが、その中でも特に皮膚の角化細胞が産生するフィラグリン (FLG) がプロテアーゼによって切断されて生じるペプチドが大きな役割を果たすと考えられる。AD では FLG の機能が低下し、AD 患者の 10~40% ではフィラグリンの遺伝子に異常が認められる (Irvine, McLean, and Leung 2011; Van Den Oord and Sheikh 2009; Palmer et al. 2006; Rodríguez et al. 2009; Weidinger et al. 2006)。

2 点目の皮膚免疫については、AD 病変部で Th2 および Th22 サイトカインが増加していることが報告されている。Th2 サイトカインは、AD のほか喘息やアレルギー性鼻炎など幅広くアレルギー疾患に関与する (Gittler et al. 2012) が、中でも IL-4 および IL-13 はフィラグリンの発現を抑制し、アトピー性皮膚炎におけるバリア機能障害の背景を構成する (Amano et al. 2015)。近年、IL-4 および IL-13 受容体を遮断する抗体製剤 (デュピルマブ) が登場し、中等症~重症の AD の症状を広く改善することが証明されている (Beck et al. 2014)。

3点目の皮膚の微生物叢については、近年皮膚の細菌叢が皮膚の恒常性維持に重要であることが明らかになりつつある(McCoy, Ignacio, and Geuking 2018)。健康な皮膚では、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) はほとんど検出されない(Guzik et al. 2005)が、AD患者では患部の70%、非患部の39%の皮膚で検出される(Totté et al. 2016)。さらに、AD患者では健常人に比べて黄色ブドウ球菌が引き起こす伝染性膿痂疹の合併率が有意に高く(Hayashida et al. 2010)、黄色ブドウ球菌がADの病態に深く関与していることが推測されている。そのメカニズムは長く不明のままであったが、近年、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析が進み、AD患者皮膚では細菌叢の多様性が低下し、皮膚炎が増悪すると黄色ブドウ球菌の占める割合が増加することが明らかになった(Kong et al. 2012; Nakatsuji et al. 2017; Belkaid et al. 2017)。また、フィラグリン異常を有するAD患者の鼻や病巣皮膚では高頻度に黄色ブドウ球菌が検出されている(Clausen et al. 2017)。さらに、マウス皮膚を用いた実験で、皮膚の細菌叢が変化すると皮下の免疫環境(サイトカイン産生)が影響を受け(Naik et al. 2013)、細菌叢の多様性が失われるとAD様の皮膚炎が引き起こされることも証明されている(Kobayashi et al. 2015)。以上より、皮膚の恒常性には皮膚細菌叢の構成内容が大きく関与し、非特異的な殺菌治療による無菌化よりもむしろ皮膚細菌叢を正常化することが重要と考えられる。

黄色ブドウ球菌は、その遺伝子配列に基づき様々な型に分類される。一般的には7つの遺伝子領域の対立遺伝子の組み合わせにより ST 型が決定され、その遺伝子情報の近縁性に基づく clonal complex (CC)により分類されている。

これまでの研究で、AD 皮膚には CC1 や CC5、CC8 などの特定の黄色ブドウ球菌が存在することが明らかになってきた(Clausen et al. 2017; Fleury et al. 2017; Harkins et al. 2018; Rojo et al. 2014; Yeung et al. 2011)。CC1 は、特に FLG 遺伝子変異のある AD 患者皮膚から頻繁に検出される傾向がある(Clausen et al. 2017)。

我々は、これまでに黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌 (*S. epidermidis*) の違いだけでなく(Laborel-Préneron et al. 2015; Volz et al. 2018)、黄色ブドウ球菌の中でも菌株の違いにより異なる免疫反応が生じ得ることを報告してきた(Iwamoto et al. 2017; Moriwaki et al. 2019)。黄色ブドウ球菌標準株と表皮ブドウ球菌 は、*in vitro*でのヒトランゲルハンス細胞および末梢血リンパ球の Th1/Th2 サイトカインバランスを Th1 にシフトさせたが、AD 患者から分離された黄色ブドウ球菌株 (AD 株)はその反応を Th2 にシフトさせた(Iwamoto et al. 2017)。さらに AD 株は、受動的に角化細胞内に取り込まれ、Toll 様受容体 (TLR) 9 を介して炎症性サイトカインの産生を促進することを明らかにした(Moriwaki et al. 2019)。これらの反応は黄色ブドウ球菌標準株および表皮ブドウ球菌では見られず、AD 株の表面タンパク質を除去することによって阻害できる。さらに、IL-4/IL-13 受容体を標的としたデュピルマブで治療すると皮膚細菌叢における

黄色ブドウ球菌のコロニー化が減少し(Callewaert et al. 2019)、AD の症状が改善する(Beck et al. 2014)。以上より、AD における黄色ブドウ球菌の皮膚への定着と角化細胞への取り込みは皮膚炎の増悪に関与することが示唆されるが、角化細胞による AD 株の取り込みがどのようにサイトカインの影響を受け、またバリア機能による影響を受けるかということは解明されていない。

本研究では、AD の病態に関わるサイトカイン環境が皮膚細菌叢に与える影響を明らかにするため、不死化ヒト角化細胞株である HaCaT 細胞の膜タンパク質と AD 株の取り込みに及ぼすサイトカイン環境とフィラグリン発現の影響を検討した。

方法

ブドウ球菌

本実験には 7 種の黄色ブドウ球菌株 (TF3378、TF2962、TF2886、TF2868、NCTC8325、Mu50、FDA209P) と 1 種の表皮ブドウ球菌株 (ATCC12228) を用いた。黄色ブドウ球菌株 TF3378、TF2962、TF2886、および TF2868 は、異なる AD 患者の病変皮膚表面から臨床的に分離された。対照として胸部切開部の膿瘍から分離された Mu50、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) 株の FDA209P、および黄色ブドウ球菌の標準株である NCTC8325 を用いた。それぞれの株の遺伝的な詳細 (ST) については表 1 に記載した。

黄色ブドウ球菌及び表皮ブドウ球菌は、tryptic soy broth (TSB) (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) 中で 37°C で 24 時間振盪培養し、8000 rpm で 2 分間遠心し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄した。細菌刺激の菌量は、そのコロニー形成単位 (CFU) の計算に基づいて吸光度を測定し、660 nm の波長で光学密度 (OD) = 1.0 になるように調整した(Fig.S1)。

各実験には、57°C で 1 時間インキュベートすることにより熱殺菌した黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌を用いた。黄色ブドウ球菌の表面タンパク質の除去には、過去の報告に記載された方法に従い AD 株 (TF3378) を 37°C で 45 分間プロテアーゼ K 処置

し、8000 rpm で2分間で遠心してPBSで2回洗浄して調整した(Iwamoto et al. 2017)。

Strain	88Character	Sequence Type
NCTC8325	Laboratory strain MSSA*	ST8
FDA209P	FDA standard strain MSSA*	ST464
Mu50	Laboratory strain MRSA**、VISA***	ST5
ATCC12228	<i>S. epidermidis</i> standard strain	
TF3378	MSSA* isolate from AD skin	ST59
TF2962	MSSA* isolate from AD skin	ST59
TF2868	MSSA* isolate from AD skin	ST121
TF2886	MSSA* isolate from AD skin	ST188

* Methicillin-susceptible *S. aureus*

** Methicillin-resistant *S. aureus*

*** Vancomycin-intermediated *S. aureus*

表 1：本研究で使用した黄色ブドウ球菌並び表皮ブドウ球菌

細胞培養

HaCaT 細胞は、10%のウシ胎児血清と抗生物質（100 U/mL ペニシリン、10 mg/mL ストレプトマイシン）を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)中で、37°C、5%CO₂のインキュベーター内で培養した。細胞を 96 ウェルプレート（CellCarrier-96 Ultra、PerkinElmer、Waltham、MA、USA）に 1x10⁴細胞/ウェルで播種し、一晩培養した。黄色ブドウ球菌の取り込

みの時系列の観察では、HaCaT細胞に熱殺菌処理した黄色ブドウ球菌を添加し、15分から360分間後に細胞内に取り込まれた菌対数を計測した。黄色ブドウ球菌の取り込みに対するサイトカインの効果の検討では、HaCaT細胞に黄色ブドウ球菌を添加する24時間前にHaCaT細胞の培養系に組換えヒトIFN- γ (100 ng/ml, 300-02, PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)、IL-4 (10 ng/ml, 200-04, PeproTech)、IL-13 (10 ng/ml, 200-13, PeproTech)、IL-10 (10 ng/ml, 200-10, PeproTech)、IL-17A (10 ng/ml, 200-17, PeproTech) またはPBSを添加した。

蛍光免疫染色と細胞イメージングシステム (OperaPhenix™) を用いた HaCaT 細胞内の黄色ブドウ球菌の計測

細胞は4%パラホルムアルデヒドで固定し、1%ヤギ血清でブロッキングし、1:5000希釈のDAPI (Sigma, St. Louis, MO, USA)、1:8000希釈のHCS CellMask™ Orange Stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を加えて4°Cで一晩静置した。フィラグリン染色では、これに加え1:500希釈の抗FLG一次抗体 (sc-66192, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)を添加し、PBSで洗浄後に1:500希釈の緑色蛍光標識抗マウスIgG、Alexa Fluor488 (A-11029, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を加え、4°Cで1時間静置した。黄色ブドウ球菌は1:100希釈したFluorescein isothiocyanate (FITC)-標識抗黄色ブドウ球菌抗体 (PA1-73172、

Thermo Fisher Scientific) を添加し、30 分間、遮光状況下にて室温でインキュベートし、HaCaT 細胞に添加した。菌の取り込み画像はハイスループットスクリーニングレーザー顕微鏡 Opera Phenix™ (PerkinElmer) を用いて取得し、Opera Phenix™ に付随する Harmony™ ソフトウェアを用いて解析した。HaCaT 細胞に内在する黄色ブドウ球菌の量を定量には、まず HaCaT 細胞の核を全蛍光画像の中で同定し、次に CellMask™ で染色した細胞質に基づき核を保持している HaCaT 細胞をマーキングした。最後に各細胞の細胞質内に FITC 標識された黄色ブドウ球菌を抽出してその数を計測した。(Fig.1a)

cDNA の作成とリアルタイム PCR による mRNA 発現量の定量

遺伝子発現の解析は以下のように行った。RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて RNA を抽出し、それを鋳型に QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いて cDNA を調製した。mRNA の発現量の定量は、SYBR Green 法による定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR) を Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (ABI, Foster City, CA, USA) を用いて行った。サイクリング条件は、95°C で 15 秒、62°C で 1 分、40 サイクルとした。以下のプライマーをタカラバイオ (滋賀県草津市、日本) から購入した；フィラグリン (FLG; HA280240)、フィブロネクチン 1 (FN1; HA267259)、および β -アクチン (ACTB; HA067803)。結果は ACTB

で正規化し、ExpressionSuite ソフトウェア (ABI) を用いて相対的な mRNA 発現レベルを計測した。

RNA-sequencing

HaCaT 細胞に NCTC8325 または TF3378 を添加し、それぞれの細胞から mRNA を調製した。また、TF3378 刺激では 24 時間前に HaCaT 細胞を IFN- γ (100 ng/ml)、IL-4 (10 ng/ml) または PBS とともに培養した。

ライブラリは、SureSelect Strand Specific RNA Reagent Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) を用いて調製した。シーケンスには Illumina HiSeq2500 (Illumina, San Diego, CA, USA; 82 cycles, single-read sequencing) を用い、シングルリードクラスター増幅キットバージョン 2 を使用して 3 億 3000 万の生のリードを得た。ヒートマップは Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>) を用いて作成した。

small interfering RNA (siRNA) によるフィブロネクチンとフィラグリンのノックダウンアッセイ

フィブロネクチン (Fn) およびフィラグリンの一過性ノックダウンのために、各々 3 種類の異なる siRNA デュプレックス (three different siRNA duplexes) (Hs_FN1_3291_s, Hs_FN1_3291_as, Hs_FN1_3292_s, Hs_FN1_3292_as,

Hs_FN1_3045_s, Hs_FN1_3045_as) (Hs_FLG_3017_s, Hs_FLG_3017_as, Hs_FLG_3018_s, Hs_FLG_3018_as, Hs_FLG_1313_s, Hs_FLG_1313_as) (Stealth™ siRNA system; Sigma)を用いた。対照として、ヒト遺伝子を認識しない siRNA (MISSION siRNA Universal Negative Control #1, Sigma)を用いた。これらの siRNA は、siRNA デュプレックス製造元の推奨するプロトコールに従って、Lipofectamine™ RNAiMAX 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を用いて HaCaT 細胞にトランスフェクションした。細胞は、トランスフェクションの 72 時間後に実験に使用した。

ELISA

様々なサイトカインで刺激した HaCaT 細胞の培養上清中の Fn 濃度を、DuoSet® ELISA (DY1918-05, R&D, Minneapolis, MN, USA) を用いて製造元の推奨するプロトコールに従って測定した。

統計解析

統計解析は、GraphPad Prism ver.8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った。Fn および FLG mRNA 発現は、対応のある *t* 検定を用いて解析した。黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌のスポット数および ELISA で測定した Fn 量は Mann Whitney 検定または Kruskal-Wallis 検定を用いて解析した。0.05 未満の *p* 値を有意であると考えた。RNA シーケンシングリードを hg19 に合わせ、Strand NGS

(Agilent Technologies, CA, USA) を用いて処理した。遺伝子アノテーションには RefSeq Genes (2015.10.05) を用い、カウントは DEseq アルゴリズムで正規化した。グループ間の遺伝子発現量の差は、Benjamini-Hochbergand 補正と 0.05 または $0.01 > p$ 値カットオフを用いた一方向 ANOVA で比較し、その後ポストホック検定として Tukey HSD を行った。

結果

HaCaT 細胞への黄色ブドウ球菌の取り込みの定量化

熱殺菌した黄色ブドウ球菌標準株 (NCTC8325) と AD 株 (TF3378) を 3 時間インキュベートした HaCaT 細胞のデジタル画像を撮影し、Opera Phenix™を用いて解析した。その結果、100 細胞あたりの AD 株の取り込みスポット数 (2968 ± 872 スポット/100 細胞) は、標準株 (219.9 ± 49.4 スポット/100 細胞) に比べて有意に多かった (** $p < 0.01$) (Fig.1)。また、取り込み数の経時的変化を観察したところ、15 分後には標準株 (40.2 ± 16.5 スポット/100 細胞) に比べて AD 株の取り込み数 (491.8 ± 138.0 スポット/100 細胞) が有意に多かった (Fig.2a)。AD 株のスポットはその後時間の経過とともに増加し、3 時間後にはプラトーに達し、リソソームに内包された。一方、標準株は 3 時間後も細胞膜近傍に留まっていた (Fig.2b)。同様に、他の AD 株 (TF2868、TF2886、TF2962) も HaCaT 細胞内へ取り込まれたのに対し、非 AD 患者由来の黄色ブドウ球菌株 (Mu50、FDA209P) と表皮ブドウ球菌株 (ATCC12228) ではほとんど取り込みが見られなかった (Fig.S2, S3)。これらの結果を踏まえ、以下の実験では、黄色ブドウ球菌の刺激時間を 3 時間とした。

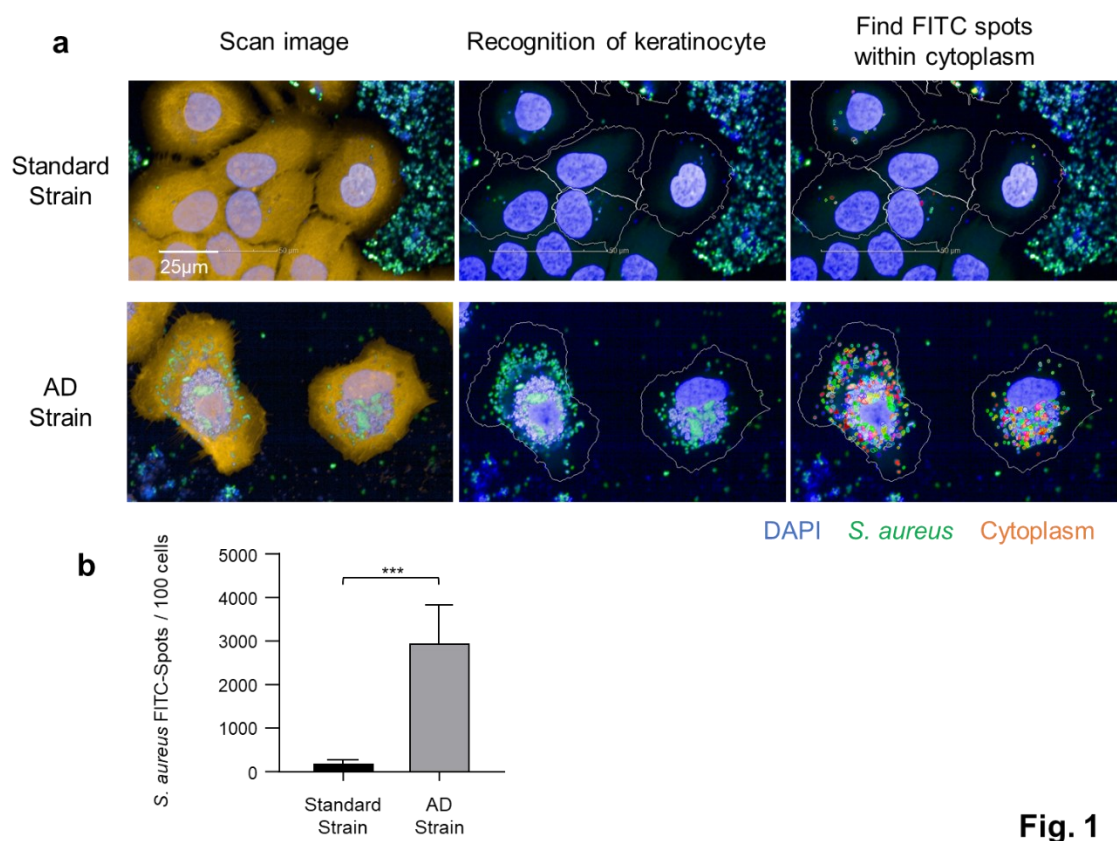


Fig. 1

Fig.1. Opera Phenix™による HaCaT 細胞内の黄色ブドウ球菌の検出

HaCaT 細胞を黄色ブドウ球菌標準株 (NCTC8325) または AD 株 (TF3378) で 3 時間処理した。(a) 黄色ブドウ球菌 (緑)、DAPI (青)、細胞質 (オレンジ) の免疫蛍光染色。細胞は、Opera Phenix™顕微鏡に関連付けられた Harmony ソフトウェアを用いて分析した。スケールバー: 25 µm。すべての画像は Opera Phenix™顕微鏡を用いて取得した。(b) 100 細胞あたりの黄色ブドウ球菌スポット数。標準株と比較して、AD 株は有意に取り込み数が多かった。(Student's *t*-test, ** $p < 0.001$ 、平均±SD、 $n = 18$)。

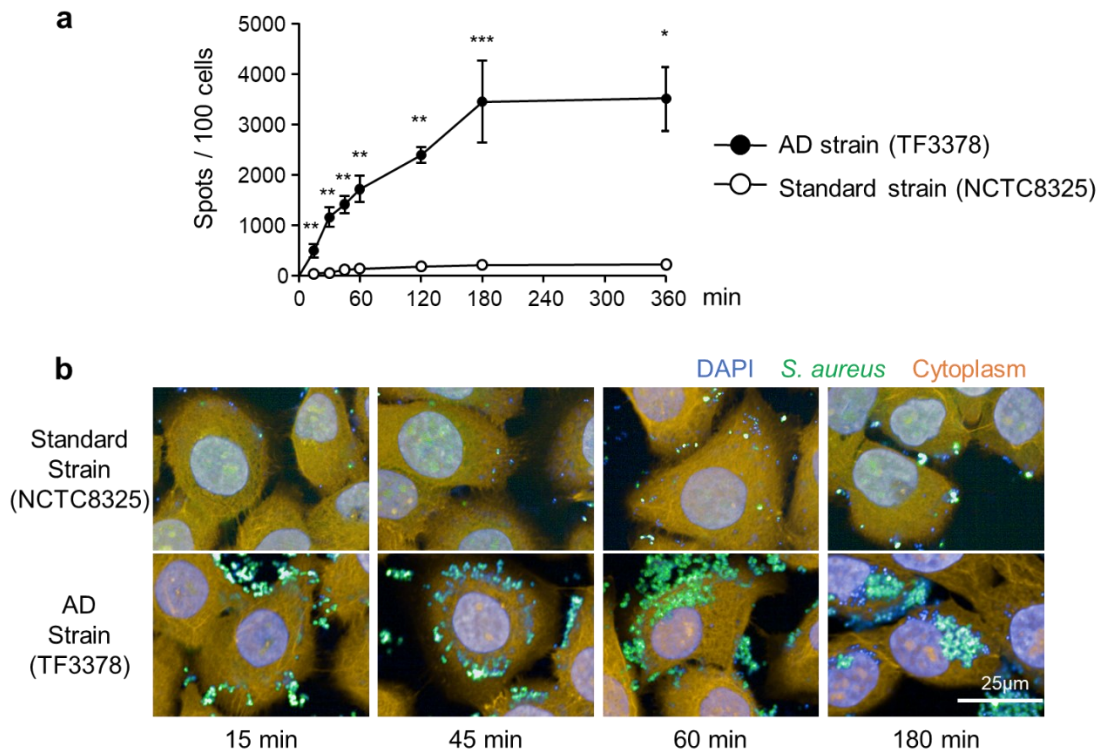


Fig. 2

Fig.2 HaCaT 細胞への黄色ブドウ球菌の取り込みの時間経過

HaCaT 細胞を黄色ブドウ球菌標準株 (NCTC8325) または AD 株 (TF3378) で 0~360 分間処理した。(a) HaCaT 細胞が内包した黄色ブドウ球菌の数を Harmony™ を用いて解析した。AD 株処理では標準株処理と比較して有意に多く菌の取り込みが観察された。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 、平均±SD、n = 4-10)。b) 黄色ブドウ球菌 (緑)、DAPI (青)、細胞質 (オレンジ) の免疫蛍光染色。スケールバー: 25 μm 。すべての画像は Opera Phenix™ 顕微鏡を使用して取得した。

黄色ブドウ球菌の HaCaT 細胞への取り込みに及ぼすサイトカインの影響

黄色ブドウ球菌の取り込みにおける HaCaT 細胞へのサイトカイン環境の役割を探るために、黄色ブドウ球菌の HaCaT 細胞への取り込みに影響を及ぼすと予想されるサイトカインの影響を検討した。その結果、HaCaT 細胞を Th1 サイトカインである IFN-

γ , 100 ng/ml で 24 時間処理すると、HaCaT 細胞に取り込まれる黄色ブドウ球菌 AD 株 (TF3378) の数が大幅に減少した。一方、HaCaT 細胞を 10 ng/ml の IL-4 および IL-13 で前処置した場合には明らかな効果は見られなかった。10 ng/ml の IL-10 または IL-17A で前処置した HaCaT 細胞への黄色ブドウ球菌 AD 株の取り込み数は、PBS で前処理した場合に比べてやや少なかったが、その差は統計的に有意ではなかった。また、黄色ブドウ球菌標準株の HaCaT 細胞への取り込みはもともとの絶対数が少ないが、HaCaT 細胞をサイトカインで前処理すると、AD 株の取り込みに対する効果と同様の抑制効果があった (Fig.3)。INF- γ の効果は 1 ng/ml から 100 ng/ml の範囲で濃度依存的であったが、IL-4 の効果は認められなかった (Fig.S4)。他の標準株 (Mu50、FDA209P)、3 つの AD 株 (TF2868、TF2886、TF2962)、および表皮ブドウ球菌でも同様の結果であった (Fig.S5、S6)。

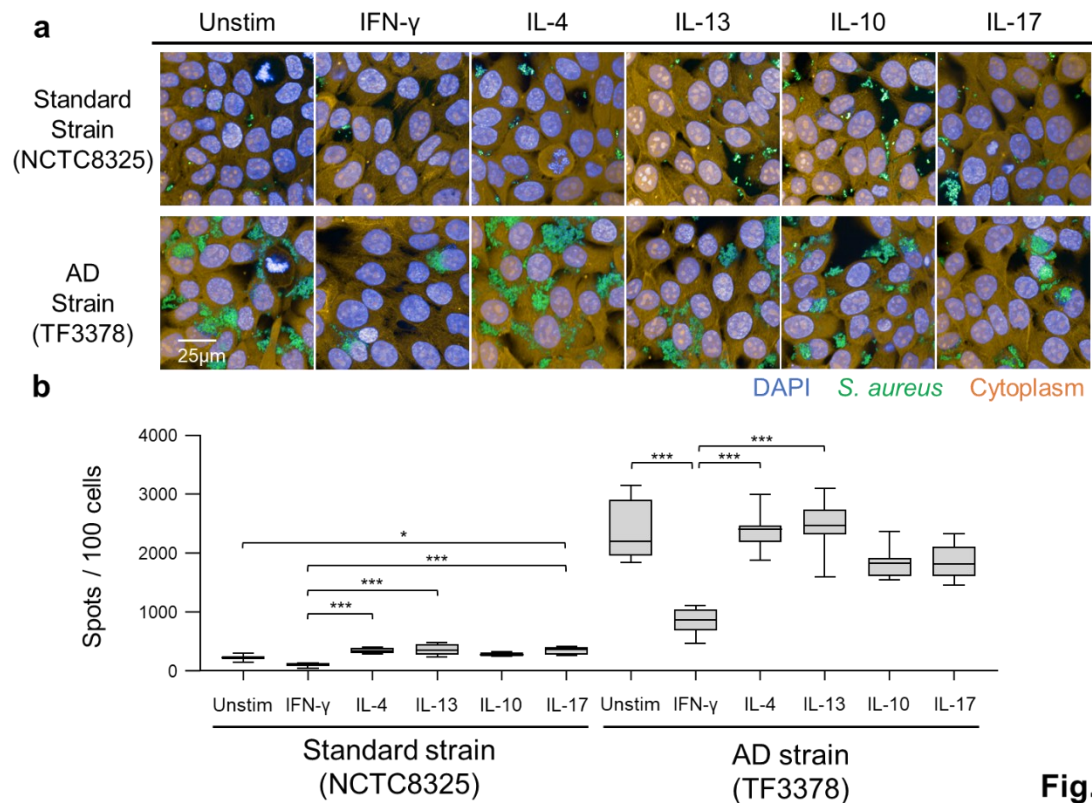


Fig. 3

Fig.3 黄色ブドウ球菌の取り込みに及ぼすサイトカインの影響

HaCaT 細胞を PBS (unstim) またはサイトカイン (IFN- γ , 100 ng/ml ; IL-4, IL-13, IL-10 および IL-17, 10 ng/ml) で 24 時間インキュベートした後、黄色ブドウ球菌標準株 (NCTC8325) または AD 株 (TF3378) で 3 時間刺激し、それらの取り込みを観察した。(a)黄色ブドウ球菌 (緑)、DAPI (青)、および細胞質 (オレンジ) の免疫蛍光染色。スケールバー: 25 μ m。すべての画像は Opera Phenix™顕微鏡を使用して取得した。(b) HaCaT 細胞に取り込まれた黄色ブドウ球菌の数を Harmony™で解析した。Kruskal-Wallis 検定により、unstim 群と比較した各群間の有意差が示された。(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ および*** $p < 0.001$ 、平均 \pm SD、n = 8)。

黄色ブドウ球菌の取り込みに対する Fn の関与

我々の先行研究と同様に、AD 株 (TF3378) をプロテアーゼ K で処理すると、AD 株の取り込みは 2636.3 ± 268.2 スポット/100 細胞から 9.3 ± 1.2 スポット/100 細胞に顕著

に減少した (* $p < 0.05$ 、平均 \pm SD、 $n=4$ 、Fig.S7)。AD 株の取り込みにおける角化細胞表面タンパク質の役割を探るために、角化細胞細胞膜上のインテグリン $\alpha 5\beta 1$ を介して様々な物質との結合を橋渡しする Fn の発現を、siRNA を用いて減少させた (Fig.S8)。Fn siRNA を遺伝子導入した HaCaT 細胞が取り込んだ AD 株のスポット数は、control siRNA を導入した HaCaT 細胞が取り込んだスポット数よりも有意に少なかった (2757.3 ± 1408.9 スポット/100 細胞 vs 1138.7 ± 144.5 スポット/100 細胞、*** $p < 0.001$ 、平均 \pm SD、 $n=4-8$ 、Fig.4a, 4b)。黄色ブドウ球菌の内在化に対する IFN- γ の効果と一致するように HaCaT 細胞を IFN- γ で処置すると、Fn の発現は 508.0 ± 129.5 pg/ml から 317.9 ± 89.4 pg/ml へと有意に減少した (Fig.4c)。一方、IL-4、IL-13 処理は Fn の発現に影響を与えなかった。

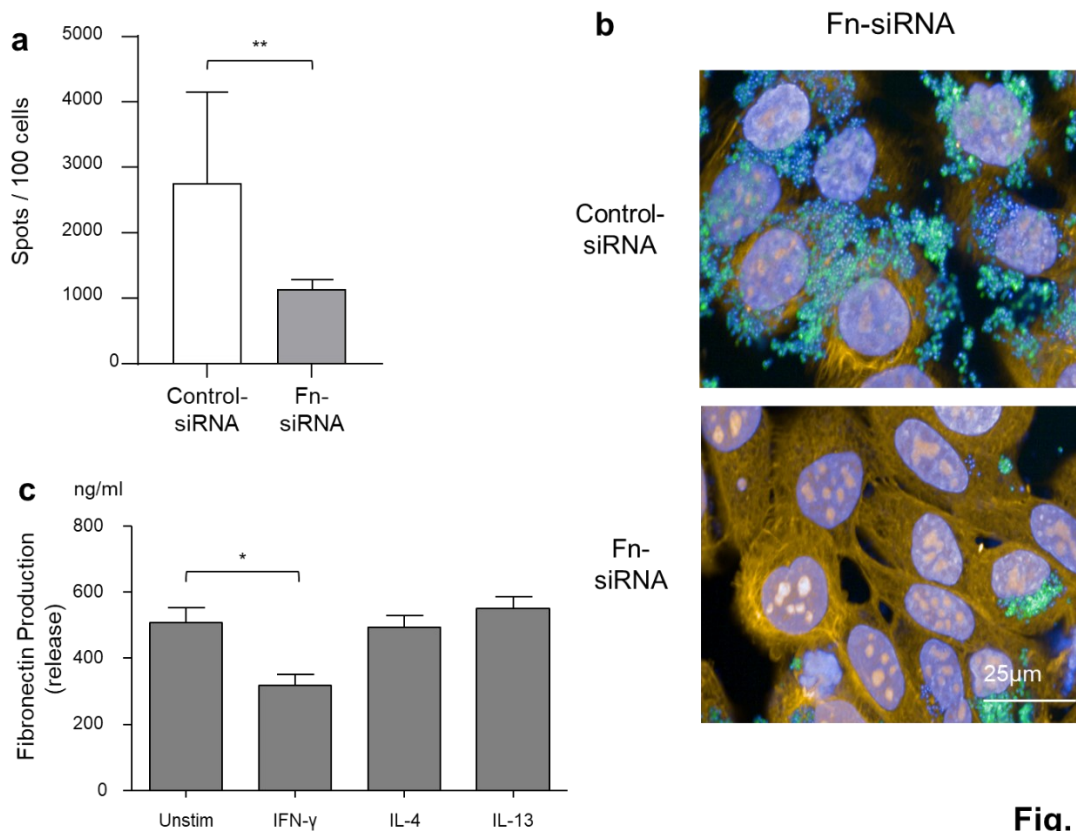


Fig. 4

Fig.4 フィブロネクチンの発現減少が HaCaT 細胞の黄色ブドウ球菌の取り込みに及ぼす影響とサイトカインがフィブロネクチン産生量に与える影響

(a)黄色ブドウ球菌 AD 株 (TF3378) による刺激 72 時間前に Fn siRNA (灰色) と対照 siRNA (白) を HaCaT 細胞にリポフェクションした際の 100 細胞あたりのスポット数 (** $p < 0.01$ 、平均±SD、 $n = 4-8$)。 (b) 黄色ブドウ球菌 (緑)、DAPI (青)、細胞質 (橙) の免疫蛍光染色。スケールバー: 25 μm。すべての画像は Opera PhenixTM顕微鏡を使用して取得した。 (c) HaCaT 細胞をサイトカイン (IFN-γ、IL-4、および IL-13) または PBS (Unstim) で 24 時間インキュベートした。培養上清中の Fn 量を ELISA キットで測定した (* $p < 0.05$ 、平均±SD、 $n = 8$)。

フィラグリンの発現が Fn 産生と黄色ブドウ球菌の HaCaT 細胞への取り込みに及ぼす影響

フィラグリンは、その前駆体であるプロフィラグリン、表皮の顆粒層にあるケラトヒアリン顆粒の主成分として合成される(Driscoll and Irvine 2020; Pendaries et al. 2014)。プロフィラグリンは抗 FLG 抗体で角化細胞の顆粒として同定されることから(Gutowska-Owsiak et al. 2018)、OperaPhenix™システムを用いて抗 FLG 抗体で染色された顆粒数 (FLG スポット数) を計測した。HaCaT 細胞に FLG-siRNA を導入すると、FLG mRNA レベルは有意に低下した (Fig.5a、** $p < 0.01$)。次に FLG スポット数を測定したところ、FLG-siRNA 導入細胞 (42 ± 10 スポット/100 細胞) は control-siRNA 導入細胞 (133 ± 39 スポット/100 細胞) と比較して有意にスポット数が減少したことが示された (Fig.5b, S9、* $p < 0.05$)。次にフィラグリンの減少による HaCaT 細胞への黄色ブドウ球菌の取り込みへの影響を解析した。FLG-siRNA を導入した HaCaT 細胞では、control-siRNA 導入細胞と比較して、標準株、AD 株ともに有意に黄色ブドウ球菌の取り込みが増加した (Fig.5d)。

HaCaT 細胞を IFN- γ 刺激すると Fn 産生が抑制され、その結果として HaCaT 細胞への黄色ブドウ球菌の取り込みが抑制されたと考えられる (Fig. 4) ことから、フィラグリン発現抑制による黄色ブドウ球菌の取り込み亢進においては、Fn の産生亢進が関与する可能性を考え、FLG-siRNA を導入した HaCaT 細胞における Fn 産生量を測定し

た。その結果、Fn 産生量は FLG-siRNA 導入細胞で 351.9 ± 26.5 pg/ml、control siRNA 導入細胞で 523.4 ± 56.1 pg/ml となり、FLG-siRNA 導入によるフィラグリンの減少は予想に反して Fn 産生量を有意に減少させた (Fig.5c)。そこで、さらに FLG 遺伝子異常が HaCaT 細胞への黄色ブドウ球菌の取り込みに対するサイトカインの効果に及ぼす影響を検討した。Fig.3 の実験で用いたサイトカインでフィラグリン・ノックダウン細胞を処置し、取り込み数の変化を対照の細胞と比較したところ、取り込み数に対するサイトカインの影響は、フィラグリン・ノックダウン細胞、対照細胞ともに同様の傾向であった (Fig.5e)。

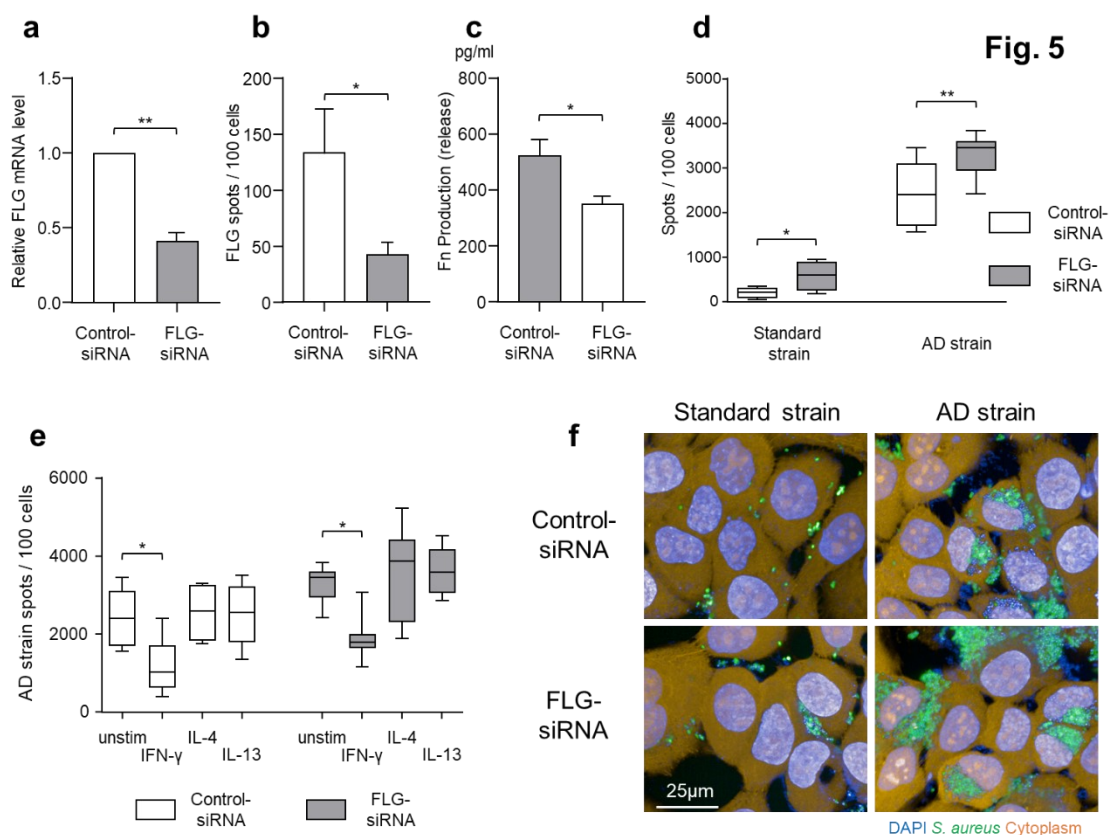


Fig.5 黄色ブドウ球菌 の HaCaT 細胞への取り込みに対するフィラグリンのノックダウンの影響

HaCaT 細胞を、黄色ブドウ球菌 AD 株 (TF3378) で処理する 72 時間前に、FLG-siRNA (灰色) または、対照 siRNA (白) を導入した。(a) siRNA 導入 HaCaT 細胞のフィラグリン mRNA の発現を qRT-PCR で解析した (** $p < 0.01$ 、平均±SD、 $n = 7$)。各遺伝子の発現量は ACTB を用いて正規化した。(b)黄色ブドウ球菌スポットと同様に Harmony を用いて siRNA 導入 HaCaT 細胞のフィラグリンスポットを解析した (* $P < 0.05$ 、平均±SD、 $n = 4$)。(c) siRNA 導入 HaCaT 細胞を PBS で 24 時間培養した後、培養上清中の Fn 産生量を ELISA キットで測定した (* $p < 0.05$ 、平均±SD、 $n = 4$)。(d) siRNA 導入 HaCaT 細胞を黄色ブドウ球菌 標準株 (NCTC8325) または AD 株 (TF3378) とともに 3 時間インキュベートした際の 100 細胞あたりの黄色ブドウ菌スポット数 (* $p < 0.05$ および ** $p < 0.01$ 、平均±SD、 $n = 4-8$)。(e) siRNA 導入 HaCaT 細胞をサイトカイン (IFN- γ 、IL-4、および IL-13) または PBS (unstim) と 24 時間インキュベートした後、黄色ブドウ球菌 AD 株 (TF3378) と 3 時間インキュベートした。その際の細胞 100 個当たりのスポット数 (* $p < 0.05$ 、平均±SD、 $n = 8$)。(f) siRNA 導入 HaCaT 細胞への黄色ブドウ球菌の取り込み像。黄色ブドウ球菌 (緑)、DAPI (青)、および細胞質 (オレンジ) の免疫蛍光染色。スケールバー: 25 μm 。すべての画像は Opera PhenixTM顕微鏡を使用して取得した。

サイトカインと黄色ブドウ球菌が HaCaT 細胞の遺伝子発現に及ぼす影響の検討

サイトカインと黄色ブドウ球菌が HaCaT 細胞の遺伝子発現に及ぼす影響を検討するため、RNA-シーケンシング (RNA-seq) を用いて HaCaT 細胞の mRNA の主成分分析を行った。試料は Fig.3 の実験で用いた条件から対照 (赤)、AD 株刺激 (青)、AD 株刺激 + IFN- γ 処理 (茶色)、AD 株刺激 + IL-4 処理 (灰色) および標準株刺激 (緑) の 5 つを選んで解析した ($n = 3$)。HaCaT 細胞のサイトカイン処理は黄色ブドウ球菌刺激の 24 時間前より行った。HaCaT 細胞の遺伝子プロファイルは黄色ブドウ球菌刺激によって変化するが、そのプロファイルは HaCaT 細胞を事前にサイトカイン処理することに

より影響された (Fig.6a)。次にそこから AD の発症や自然免疫との関与が報告されている遺伝子を抽出し、サイトカインや黄色ブドウ球菌を添加した HaCaT 細胞と添加しなかった HaCaT 細胞での発現の違いを検討した。主成分分析において、HaCaT 細胞の遺伝子発現は、黄色ブドウ球菌刺激によって変化することが分かり、サイトカインによってさらに変化することも明らかになった。黄色ブドウ球菌で刺激した細胞では、対照と比較して IL1 α 、IL8R1、TLR1、TLR6、FN1、FLG、TSLP の発現が増加した。AD 株 (TF3378) で刺激した細胞では、標準株刺激細胞と比較して IL1 β 、IL6 および ITG α 5 の発現が増加した。IFN- γ は IL12、IL8R1、ITG α 5 の発現を上昇させたが、IL13RA2、FN1、FLG の発現を抑制した。IFN- γ による FN1 の発現抑制は Fig.4c で見られた結果と一致していた。一方、IL-4 刺激は IL13RA2、FLG および TSLP の発現を増加させ、FN1 および IL33 の発現を減少させた (Fig.6b)。

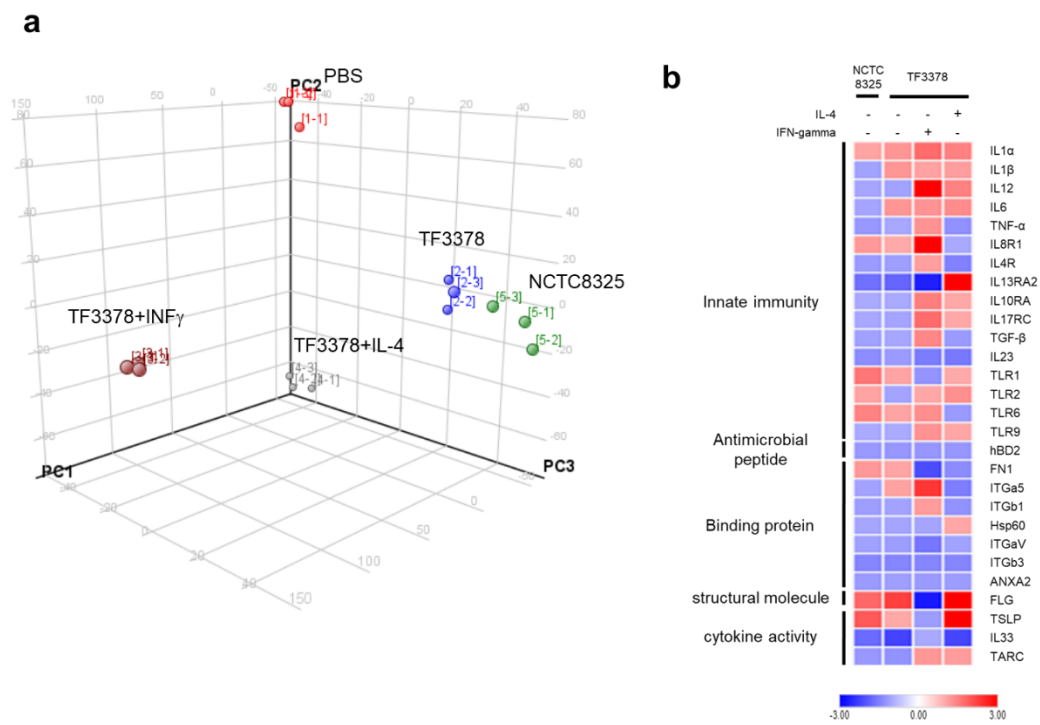


Fig. 6

Fig.6 サイトカインと黄色ブドウ球菌が HaCaT 細胞の遺伝子発現に及ぼす影響の検討

(a) PBS (対照、赤)、AD 株 (TF3378) (青)、AD 株+IFN- γ (茶色)、AD 株+IL-4 (灰色) または標準株 (NCTC8325) (緑) とインキュベートした HaCaT 細胞の mRNA 発現量の主成分分析。X、Y、Z 軸は成分 1 (36.85%、PC1)、成分 2 (13.22%、PC2)、成分 3 (8.46%、PC3) を示す。(b) Morpheus を用いた対照サンプルに対する遺伝子のフォールド変化のヒートマップ。

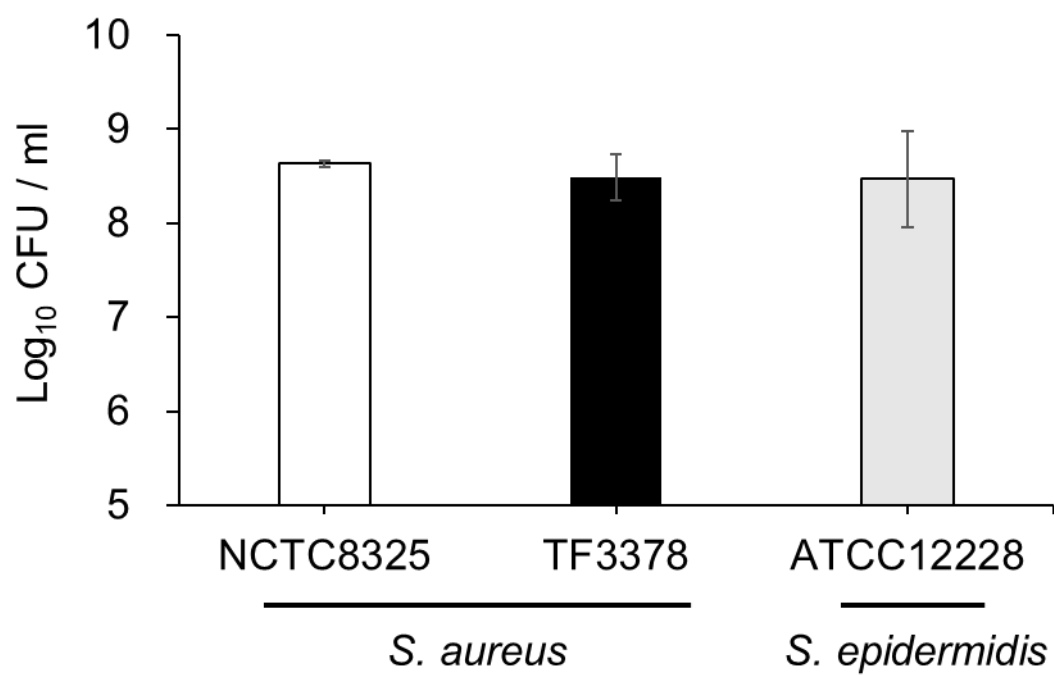


Fig.S1

Fig.S1 24 時間培養後の細菌数(CFU/ml)(OD=1)

吸光度計で 660nm の波長において OD=1 の時の細菌数(CFU)。黄色ブドウ球菌 NCTC8325(白)、TF3378(黒)、表皮ブドウ球菌 ATCC12228(グレー)。

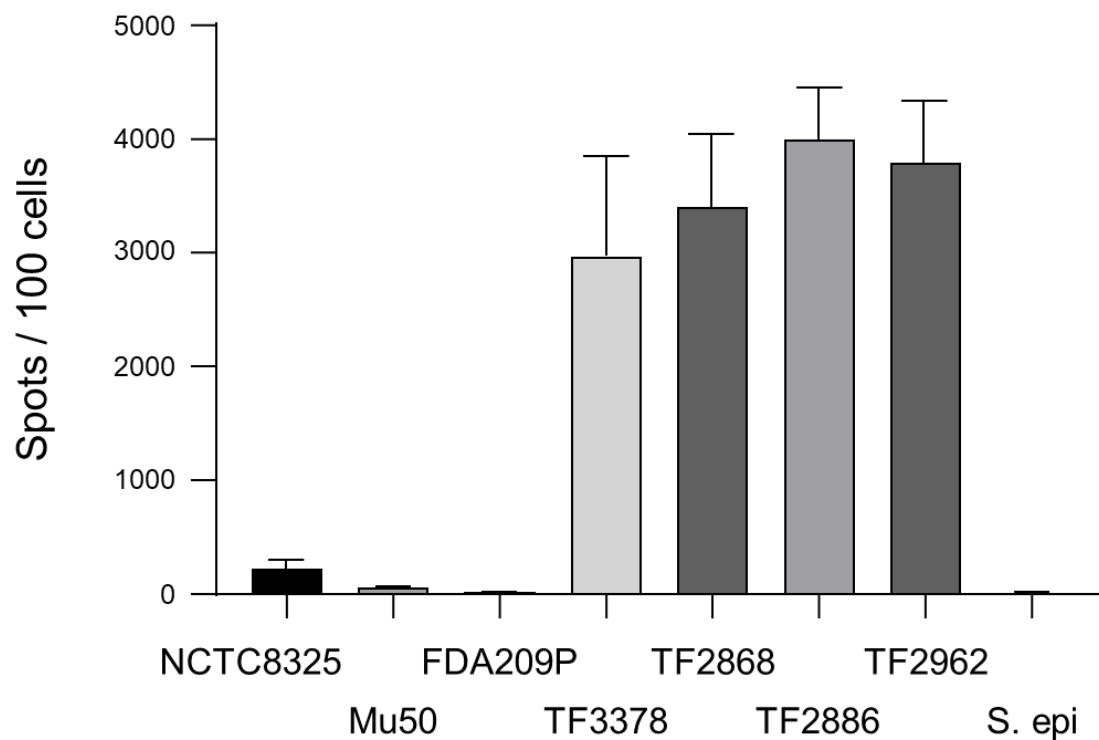


Fig. S2

Fig.S2 黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌の HaCaT 細胞への取り込み
 HaCaT 細胞を PBS で 24 時間インキュベートした後、黄色ブドウ球菌標準株 (NCTC8325、Mu50 および FDA209P)、AD 株 (TF3378、TF2868、TF2886 および TF2962) または表皮ブドウ球菌 (ATCC12228) を用いて 3 時間インキュベートした際の 100 細胞あたりの取り込み数 (平均±SD、n = 6-18)。

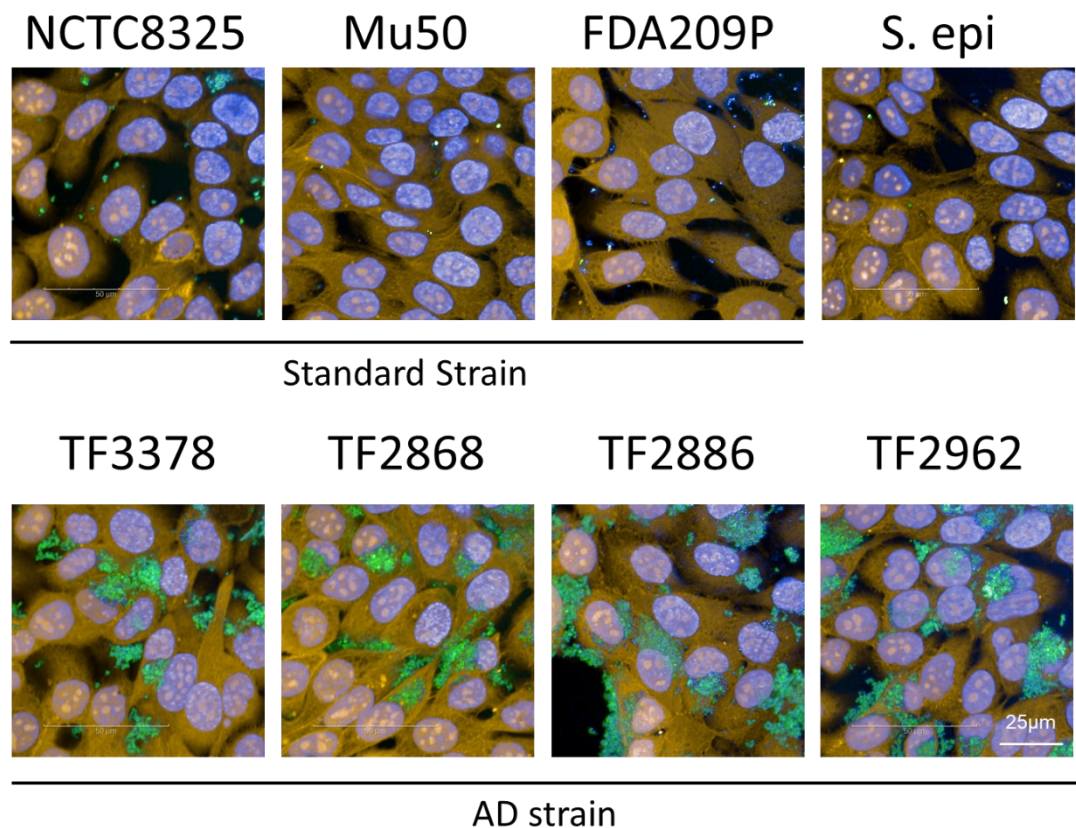


Fig. S3

Fig.S3 HaCaT 細胞における黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌の取り込みの画像

HaCaT 細胞を PBS で 24 時間インキュベートした後、黄色ブドウ球菌標準株 (NCTC8325、Mu50 および FDA209P)、AD 株 (TF3378、TF2868、TF2886 および TF2962)、または表皮ブドウ球菌 (ATCC12228) を加えて 3 時間インキュベートした。 *S. aureus* および *S. epidermidis* の免疫蛍光染色 (緑)、DAPI (青)、および細胞質 (オレンジ)。スケールバー: 25 μm。すべての画像は Opera Phenix™ 顕微鏡を使用して取得した。

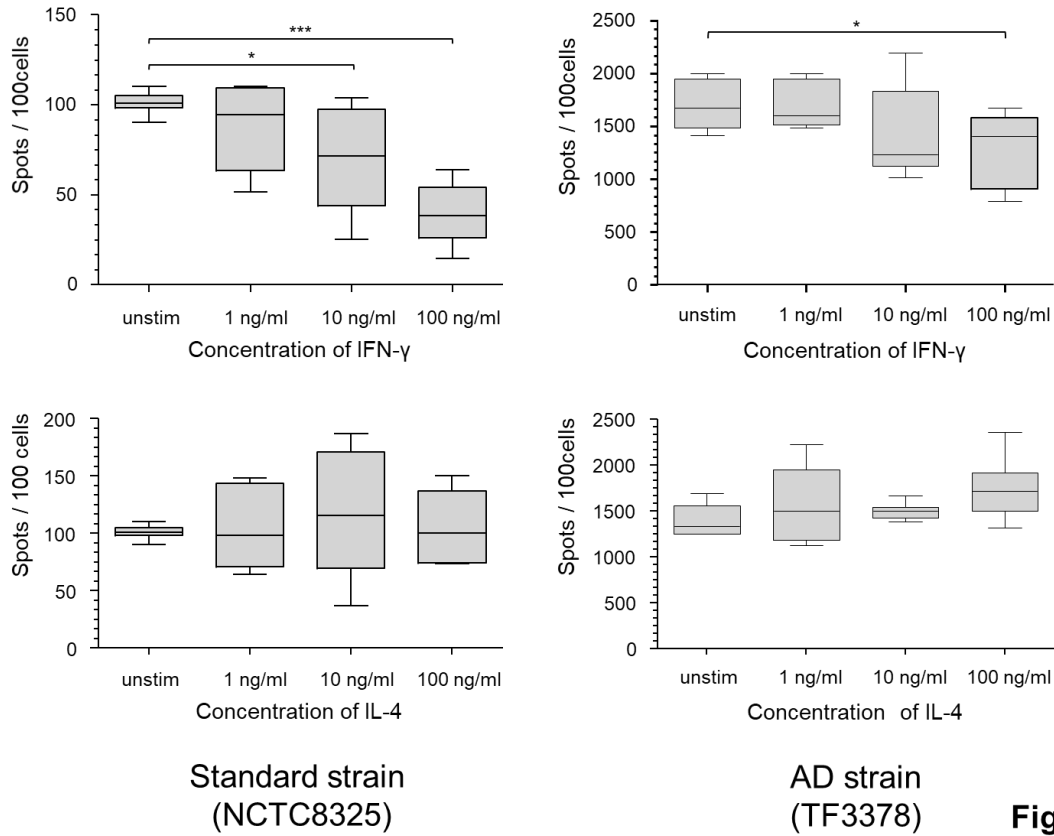


Fig. S4

Fig.S4 IFN- γ および IL-4 の黄色ブドウ球菌の取り込みに対する濃度依存性効果
 HaCaT 細胞を 1 ng/ml、10 ng/ml または 100 ng/ml の IFN- γ 、IL-4 または PBS で 24 時間インキュベートした後、*S. aureus* 標準株 (NCTC8325) または AD 株 (TF3378) に 3 時間曝露して得られた 100HaCaT 細胞あたりの黄色ブドウ球菌取り込み数 (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ 、平均 \pm SD、n = 6-12)。

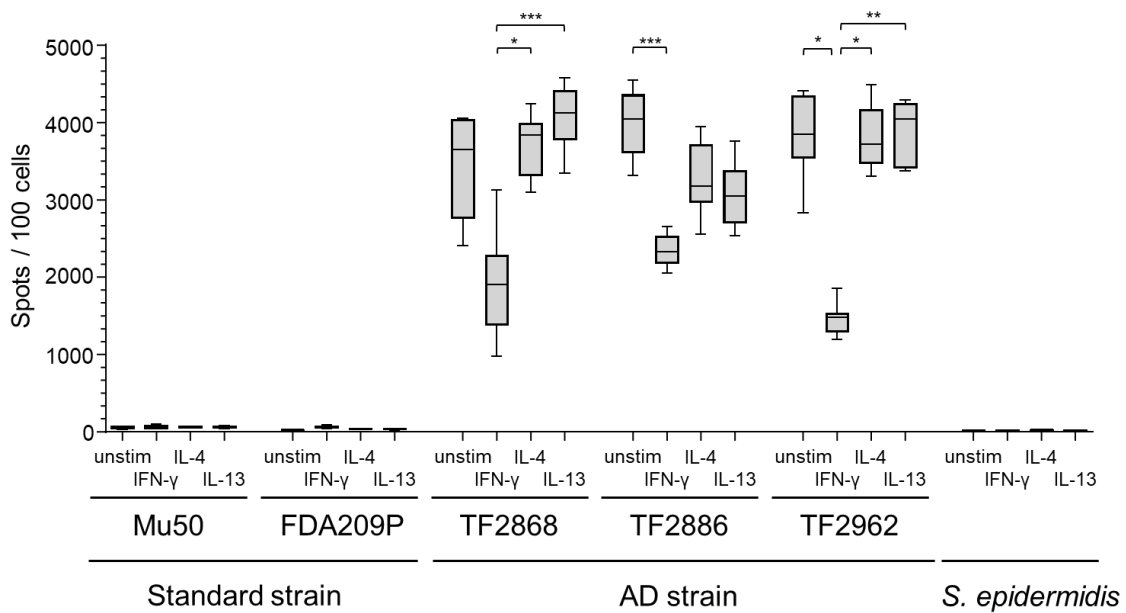


Fig. S5

Fig.S5 黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌の取り込みに及ぼすサイトカインの影響

HaCaT 細胞を PBS (unstim)、IFN-γ(100 ng/ml) , IL-4 (10 ng/ml),または IL-13 (10 ng/ml) で 24 時間インキュベートした後、黄色ブドウ球菌標準株 (Mu50, FDA209P)、AD 株 (TF2868, TF2886, TF2962) または表皮ブドウ球菌株に 3 時間曝露で得られた 100HaCaT 細胞あたりの黄色ブドウ球菌取り込み数。(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、平均±SD、n=6-15)。

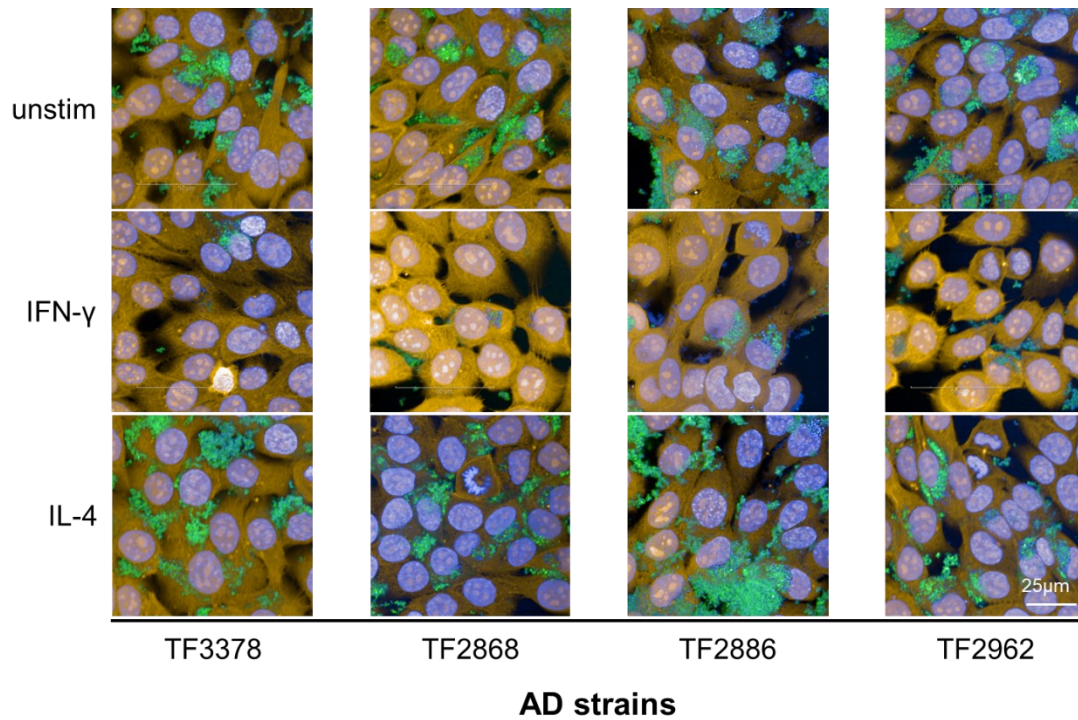


Fig. S6

Fig.S6 黄色ブドウ球菌 AD 株の細胞内取り込みに対するサイトカインの影響

HaCaT 細胞を PBS (unstim)、IFN- γ または IL-4 で 24 時間インキュベートした後、黄色ブドウ球菌 AD 株 (TF3378、TF2868、TF2886、および TF2962) に 3 時間曝露した。黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌の免疫蛍光染色 (緑)、DAPI (青)、および細胞質 (オレンジ)。スケールバー: 25 μ m。すべての画像は Opera Phenix™ 顕微鏡を使用して取得した。

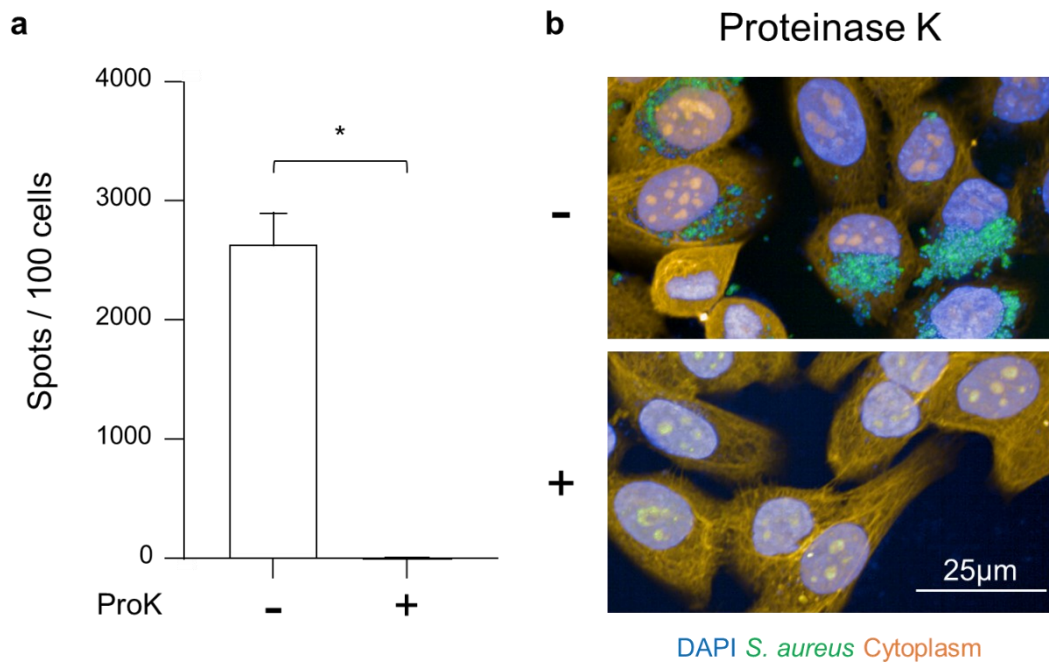


Fig. S7

Fig.S7 HaCaT 細胞の細菌表面タンパク質の除去が黄色ブドウ球菌の取り込みに及ぼす影響

(a)プロテアーゼ K (-, グレー) または PBS (+, ホワイト) で処理した *S. aureus* AD 株 (TF3378) の HaCaT 細胞による取り込みのスポット数 (* $p < 0.05$ 、平均±SD、 $n = 4$)。 (b) HaCaT 細胞を、プロテアーゼ K(ProK)処理、または無処理の黄色ブドウ球菌に曝露した際の菌体取り込み像。黄色ブドウ球菌 (緑)、DAPI (青)、および細胞質 (オレンジ) の免疫蛍光染色。スケールバー: 25 μm。すべての画像は Opera Phenix[™]顕微鏡を使用して取得した。

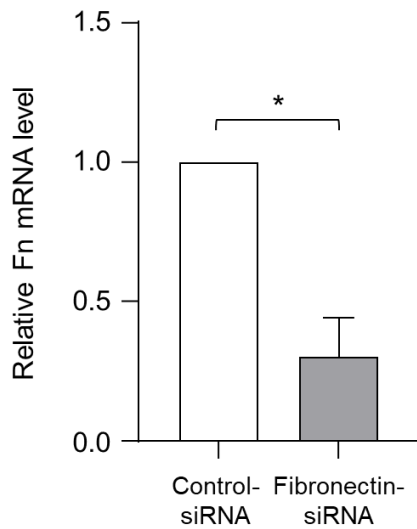


Fig. S8

Fig.S8 特異的フィブロネクチン siRNA 導入によるフィブロネクチン mRNA の減少
 フィブロネクチン siRNA 導入細胞と control-siRNA 導入細胞のフィブロネクチンの発現を qRT-PCR で解析した (* $p < 0.05$ 、平均 \pm SD、 $n = 3$)。各遺伝子の発現量は ACTB を用いて正規化した。

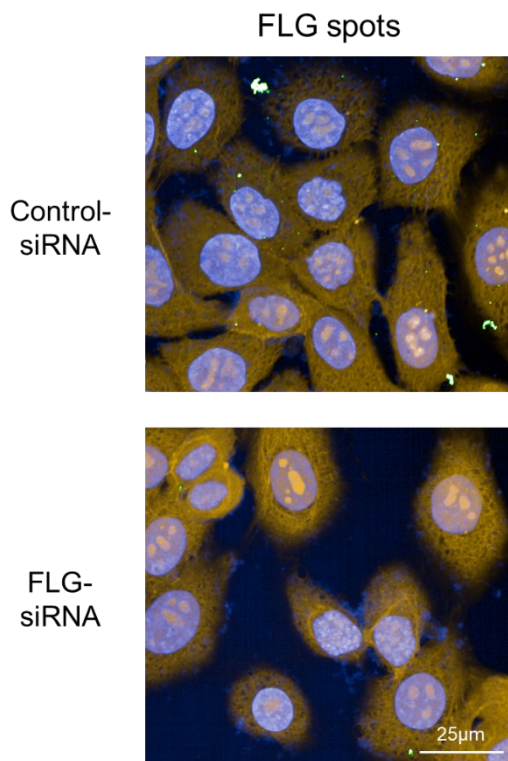


Fig.S9 HaCaT 細胞における FLG スポット

control-siRNA と FLG-siRNA を導入した HaCaT 細胞への黄色ブドウ球菌取り込み像。FLG (緑色)、DAPI (青色)、細胞質 (橙色) の免疫蛍光染色。スケールバー: 25 μm 。すべての画像は Opera Phenix™顕微鏡を使用して取得した。

Fig. S9

考察

本研究では、角化細胞による黄色ブドウ球菌の取り込みがサイトカインとバリア障害により受ける影響について、セルイメージングシステムを用いて定量的に検討した。標準株の HaCaT 細胞への取り込み数は 219.9 ± 49.4 スポット/100 細胞であったのに対し、AD 株はその 10 倍を超える 2968 ± 872 スポット/100 細胞が取り込まれた。また、AD 株の取り込みは HaCaT 細胞へ曝露 15 分後から有意に増加し、3 時間後まで取り込み量が増大した。この取り込みは、Th2 サイトカインである IL-4 および IL-13 で HaCaT を処理しても明らかな影響を受けなかったが、HaCaT 細胞を Th1 サイトカインである IFN- γ で前処理、または siRNA により Fn の発現を抑制すると抑制された。さらに、IFN- γ は HaCaT 細胞の Fn 産生を抑制したことから、Th1 優位な免疫環境は Fn 産生抑制を介して黄色ブドウ球菌の角化細胞侵入を抑制することが示唆された。また、角化細胞により産生され、皮膚バリア機能において主要な働きをするフィラグリンを siRNA によりロックダウンすると、HaCaT 細胞内への黄色ブドウ球菌の取り込みが増加することが確認された。

AD 患者の皮膚では、黄色ブドウ球菌を主体とした細菌叢が形成され、皮膚のバリア機能の異常や Th2 にシフトした免疫異常が AD の増悪をもたらすと考えられている (Callewaert et al. 2019; Miajlovic et al. 2010)。また、ヒト細胞内に黄色ブドウ球菌が

取り込まれることが報告されており、その機序として FnBP-Fn インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ 経路、クランピングファクターA 経路などが報告されている(Sinha et al. 1999; Fowler et al. 2000; Josse, Laurent, and Diot 2017; Iwamoto et al. 2019)。我々は、これまで AD 株が、皮膚の免疫を司るランゲルハンス細胞を介してヒトリンパ球の Th1/Th2 サイトカインプロファイルを Th2 にシフトさせること、その作用はブドウ球菌の表面タンパク依存性であること、また、AD 株の HaCaT 細胞への取り込みが Fn 特異的抗体により部分的に阻害されることを報告してきた(Iwamoto et al. 2017, 2019; Moriwaki et al. 2019)。しかし、黄色ブドウ球菌の角化細胞への取り込み機序の詳細と皮膚のサイトカイン環境がもたらす影響については明らかにされていなかった。

本研究では、まず HaCaT 細胞を IFN- γ で前処理すると HaCaT 細胞内に取り込まれる黄色ブドウ球菌の数が減少することを証明し、次に IFN- γ 刺激が HaCaT 細胞の Fn 産生に及ぼす影響を検討した。その結果、IFN- γ は予想通り HaCaT 細胞からの Fn 遊離量を減少させ、IFN- γ 処理による HaCaT 細胞の Fn 産生抑制は RNA-seq による解析でも確認された。一方、IFN- γ 刺激した HaCaT 細胞の RNA-seq 解析では、HaCaT 細胞の Fn を介した黄色ブドウ球菌結合に関与する ITGa5 および ITGb1 の mRNA の発現は増加することが示された。これが黄色ブドウ球菌の取り込みにどのように影響するかはさらなる検討が必要である。このほか、これまでに黄色ブドウ球菌との結合または

取り込みに関与することが知られている他の分子については、IFN- γ 、IL-4 のいずれの刺激でも大きな発現量の変化は見られなかった。

Th2 サイトカインが皮膚細菌叢に及ぼす影響については、これまでにマウスの皮膚で Th2 サイトカインが Fn の産生を増加させること(Cho et al. 2001)、ヒト AD では IL-4/IL-13 受容体に結合して Th2 シグナル伝達を阻害するデュピルマブを使用すると皮膚細菌叢が変化し、黄色ブドウ球菌の定着が減少することが報告されている(Callewaert et al. 2019)。しかし、デュピルマブの効果が Th2 サイトカインの黄色ブドウ球菌に対する直接的なものか、間接的なものかは明らかにされていない。これまで、ヒト初代角化細胞を IL-4 刺激すると Fn の産生が抑制されると報告されている(Serezani et al. 2017)が、本研究で HaCaT 細胞を Th2 サイトカインで刺激すると、Fn mRNA 発現はわずかに低下したものの、培養上清への Fn 遊離量には変化が見られなかった。また、黄色ブドウ球菌の HaCaT 細胞への取り込みに対する影響も確認できなかった。一方、ヒト初代線維芽細胞を IL-4 刺激すると Fn の産生が増加するという報告がある(Fujitsu et al. 2003; Postlethwaite et al. 1992)。これらの知見から、Th2 サイトカインは角化細胞ではなく、線維芽細胞などの他の細胞に作用して間接的に角化細胞へ黄色ブドウ球菌取り込みを促進させている可能性はある。

皮膚バリア機能と黄色ブドウ球菌の関係では、FLG 特異的 siRNA を用いてフィラグリンの発現を低下させると、HaCaT 細胞への黄色ブドウ球菌の取り込みが有意に増加した。しかし、フィラグリンの発現を低下させると Fn の産生は低下した。そのため、フィラグリンの発現低下による黄色ブドウ球菌の取り込み増加は、Fn インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ 経路以外のメカニズムによると考えられる。実際、フィラグリンの発現を低下させると皮膚における黄色ブドウ球菌の定着が増加し (Clausen et al. 2017; van Drongelen et al. 2014)、その機序としてフィラグリンの分解により生じて黄色ブドウ球菌の定着を阻害するウロカン酸 (UCA) およびピロリドンカルボン酸 (PCA) の生成が減少することが考えられている (Miajlovic et al. 2010)。また、黄色ブドウ球菌の取り込みに対するバリア機能低下とサイトカイン刺激の影響の大きさについて検討したところ、IFN- γ は siRNA によりフィラグリン発現を低下させた HaCaT 細胞に対しても黄色ブドウ球菌の取り込みを抑制したことから、遺伝的背景によりフィラグリンが低下した状態であっても、サイトカイン環境の変化は黄色ブドウ球菌の取り込みを制御できることが示唆された。

角化細胞は皮膚のバリアとして働き、黄色ブドウ球菌などの病原体などに対し、皮膚の免疫細胞を活性化してそれらを排除するために細胞質に貯蓄してきた IL-1 α や抗生物質ペプチドなどを放出する (L. S. Miller and Cho 2011; Olaru and Jensen 2010)。ま

た、その産生はフィラグリン遺伝子異常を持つ AD 患者では健常人と比較して増加している(Kezic et al. 2012)。しかし、マウスにおける IL-1 α の過剰発現は AD 様の皮膚炎を惹起すると報告されており(Groves et al. 1995)、IL-1 α が AD の病態に深く関わっていることが推測される。我々は、黄色ブドウ球菌 AD 株の角化細胞の取り込みが IL-1 α の放出を増加させ、また、その取り込みを低下させると IL-1 α の産生も低下することを確認した(Moriwaki et al. 2019)。角化細胞内に取り込まれた黄色ブドウ球菌は抗菌薬の作用を回避し、細胞内で生存する(Al Kindi et al. 2019)。さらに黄色ブドウ球菌は初感染から 6 か月以内に 50%以上の患者において再発感染することが報告されている(L. G. Miller et al. 2015)。これらのことから、黄色ブドウ球菌の取り込みは皮膚炎の増悪や再燃に関与し、その阻害は AD の治療に有用と考えられる。

一般に、AD 患者では黄色ブドウ球菌が定着しているが、健常者では表皮ブドウ球菌が多く検出され、その細菌叢も多様である(Higaki et al. 1999; Kong et al. 2012)。本研究において、AD 株は HaCaT 細胞に取り込まれたが、表皮ブドウ球菌の取り込みは確認できなかった。これまで、皮膚に定着する細菌の種類によって免疫反応が変化すること(Belkaid et al. 2017; Naik et al. 2013)、また黄色ブドウ球菌は AD 様皮膚炎の原因となることが指摘されている(Kobayashi et al. 2015)。一方、表皮ブドウ球菌と *Staphylococcus hominis* は、コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (CoNS) と呼ばれ、抗菌ペ

プチド (AMP) を産生する。CoNS は、AD における黄色ブドウ球菌のコロニーを減少させることが報告され(Gallo and Nakatsuji 2011; Nakatsuji et al. 2017; Parlet, Brown, and Horswill 2019)、さらに *Roseomonas mucosa* を AD 患者の細菌叢に移植し、AD の症状が改善したことも報告されている(Welch et al. 2018)。よって、今後 AD 患者の病変部に表皮ブドウ球菌を移植する、あるいは表皮ブドウ球菌の生着を増加することにより AD を治療する道も考えられる。

最近の研究では、皮膚の免疫システムと皮膚の細菌叢の間には密接な関係があることが示されている。また、アトピー性皮膚炎の治療では古くから抗生物質が使用されているが、それらの治療が長期に及ぶと有害な細菌を増やすリスクがある。健康な皮膚を維持するためには、正常な細菌叢を維持することが重要であり、そのためにはいくつかのアプローチが考えられる。1 つはデュピルマブをはじめとする皮膚免疫系を調整し、病原菌のコロニー化を防ぐ方法である。AD 患者由来の末梢血単核球では、健常者に比べて黄色ブドウ球菌に応答した IFN- γ 産生が有意に低いことが知られている(Campbell and Kemp 1997)。本研究の結果では、IFN- γ は黄色ブドウ球菌の取り込みを抑制するので、IFN- γ は AD の治療に貢献する可能性がある。2 つ目は細菌叢の移植である。バクテリア AMP は皮膚病原体に対しては抗菌活性を発揮するが、常在菌に対しては抗菌活性を発揮しないので(Nakatsuji et al. 2017)、細菌叢の移植は安全な AD 治療になる可

能性がある。また、黄色ブドウ球菌の FnBP に特異的に結合する抗体、あるいは Fn 断片の外用は黄色ブドウ球菌に選択的に働いてそれらの皮膚表面でのコロニー化を防ぐことが考えられる。皮膚は外界との境界であり、その恒常性を維持することは皮膚疾患に限らず全身的な免疫バランスを正常に保つためにも重要と考えられる。本研究の知見を元に、黄色ブドウ球菌の表皮への定着や角化細胞への取り込みを制御するより生理的な AD の治療法が開発されることを期待したい。

参考文献

- Amano, Wataru et al. 2015. “The Janus Kinase Inhibitor JTE-052 Improves Skin Barrier Function through Suppressing Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Signaling.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136(3): 667-677.e7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.051>.
- Beck, Lisa A. et al. 2014. “Dupilumab Treatment in Adults with Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis.” *New England Journal of Medicine* 371(2): 130–39.
- Belkaid, Yasmine et al. 2017. “Staphylococcus Aureus and Staphylococcus Epidermidis Strain Diversity Underlying Pediatric Atopic Dermatitis .” *Science Translational Medicine* 9(397): eaal4651.
- Callewaert, Chris et al. 2019. “IL-4Ra Blockade by Dupilumab Decreases Staphylococcus Aureus Colonization and Increases Microbial Diversity in Atopic Dermatitis.” *Journal of Investigative Dermatology*.
<https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.05.024>.
- Campbell, D. E., and A. S. Kemp. 1997. “Proliferation and Production of Interferon-Gamma (IFN- γ) and IL-4 in Response to Staphylococcus Aureus and Staphylococcal Superantigen in Childhood Atopic Dermatitis.” *Clinical and Experimental Immunology* 107(2): 392–97.
- Cho, Sang Hyun et al. 2001. “Preferential Binding of Staphylococcus Aureus to Skin Sites of Th2-Mediated Inflammation in a Murine Model.” *Journal of Investigative Dermatology* 116(5): 658–63. <http://dx.doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01331.x>.
- Clausen, M. L. et al. 2017. “Staphylococcus Aureus Colonization in Atopic Eczema

- and Its Association with Filaggrin Gene Mutations.” *British Journal of Dermatology* 177(5): 1394–1400.
- Deckers, Ivette A.G. et al. 2012. “Investigating International Time Trends in the Incidence and Prevalence of Atopic Eczema 1990-2010: A Systematic Review of Epidemiological Studies.” *PLoS ONE* 7(7).
- Drislane, Catherine, and Alan D. Irvine. 2020. “The Role of Filaggrin in Atopic Dermatitis and Allergic Disease.” *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 124(1): 36–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anai.2019.10.008>.
- van Drongelen, V. et al. 2014. “Reduced Filaggrin Expression Is Accompanied by Increased Staphylococcus Aureus Colonization of Epidermal Skin Models.” *Clinical and Experimental Allergy* 44(12): 1515–24.
- Fleury, Orla M et al. 2017. “Clumping Factor B Promotes Adherence of Staphylococcus Aureus to Corneocytes in Atopic Dermatitis.” 85(6): 1–12.
- Fowler, Trent et al. 2000. “Cellular Invasion by Staphylococcus Aureus Involves a Fibronectin Bridge between the Bacterial Fibronectin-Binding MSCRAMMs and Host Cell B1 Integrins.” *European Journal of Cell Biology* 79(10): 672–79.
- Fujitsu, Youichiro, Ken Fukuda, Naoki Kumagai, and Teruo Nishida. 2003. “IL-4-Induced Cell Proliferation and Production of Extracellular Matrix Proteins in Human Conjunctival Fibroblasts.” *Experimental Eye Research* 76(1): 107–14.
- Furue, Masutaka. 2020. “Regulation of Filaggrin, Loricrin, and Involucrin by IL-4, IL-13, IL-17A, IL-22, AHR, and NRF2: Pathogenic Implications in Atopic Dermatitis.” *International Journal of Molecular Sciences* 21(15): 1–25.
- Gallo, Richard L., and Teruaki Nakatsuji. 2011. “Microbial Symbiosis with the Innate Immune Defense System of the Skin.” *Journal of Investigative*

- Dermatology* 131(10): 1974–80. <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2011.182>.
- Gittler, Julia K. et al. 2012. “Progressive Activation of TH2/TH22 Cytokines and Selective Epidermal Proteins Characterizes Acute and Chronic Atopic Dermatitis.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130(6): 1344–54.
- Groves, Richard W., Hitoshi Mizutani, J. David Kieffer, and Thomas S. Kupper. 1995. “Inflammatory Skin Disease in Transgenic Mice That Express High Levels of Interleukin 1 α in Basal Epidermis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(25): 11874–78.
- Gutowska-Owsiak, Danuta et al. 2018. “Orchestrated Control of Filaggrin-Actin Scaffolds Underpins Cornification.” *Cell Death and Disease* 9(4).
<http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0407-2>.
- Guzik, Tomasz J. et al. 2005. “Persistent Skin Colonization with *Staphylococcus Aureus* in Atopic Dermatitis: Relationship to Clinical and Immunological Parameters.” *Clinical and Experimental Allergy* 35(4): 448–55.
- Harkins, Catriona P. et al. 2018. “The Microevolution and Epidemiology of *Staphylococcus Aureus* Colonization during Atopic Eczema Disease Flare.” *Journal of Investigative Dermatology* 138(2): 336–43.
- Hayashida, Sayaka et al. 2010. “Are Lifetime Prevalence of Impetigo, Molluscum and Herpes Infection Really Increased in Children Having Atopic Dermatitis?” *Journal of Dermatological Science* 60(3): 173–78.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.09.003>.
- Higaki, Shuichi, Masaaki Morohashi, Takayoshi Yamagishi, and Yoshinori Hasegawa. 1999. “Comparative Study of *Staphylococci* from the Skin of Atopic Dermatitis Patients and from Healthy Subjects.” *International Journal of*

- Dermatology* 38(4): 265–69.
- Howell, Michael D. et al. 2009. “Cytokine Modulation of Atopic Dermatitis Filaggrin Skin Expression.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124(3 SUPPL. 2): 7–12.
- Irvine, Alan D., W. H. Irwin McLean, and Donald Y.M. Leung. 2011. “Filaggrin Mutations Associated with Skin and Allergic Diseases.” *New England Journal of Medicine* 365(14): 1315–27.
- Iwamoto, Kazumasa et al. 2017. “Staphylococcus Aureus from Atopic Dermatitis Skin Alters Cytokine Production Triggered by Monocyte-Derived Langerhans Cell.” *Journal of Dermatological Science* 88(3): 271–79.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.08.001>.
- Iwamoto, Kazumasa, Masaya Moriwaki, Ryu Miyake, and Michihiro Hide. 2019. “Staphylococcus Aureus in Atopic Dermatitis: Strain-Specific Cell Wall Proteins and Skin Immunity.” *Allergology International* 68(3): 309–15.
<https://doi.org/10.1016/j.alit.2019.02.006>.
- Josse, Jérôme, Frédéric Laurent, and Alan Diot. 2017. “Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms.” *Frontiers in Microbiology* 8(DEC): 1–8.
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02433/full>.
- Kezic, Sanja et al. 2012. “Filaggrin Loss-of-Function Mutations Are Associated with Enhanced Expression of IL-1 Cytokines in the Stratum Corneum of Patients with Atopic Dermatitis and in a Murine Model of Filaggrin Deficiency.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129(4): 1031–40.
- Al Kindi, Arwa et al. 2019. “Staphylococcus Aureus Internalized by Skin

- Keratinocytes Evade Antibiotic Killing.” *Frontiers in Microbiology* 10(SEP): 1–10.
- Kobayashi, Tetsuro et al. 2015. “Dysbiosis and Staphylococcus Aureus Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis.” *Immunity* 42(4): 756–66.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.03.014>.
- Kong, Heidi H. et al. 2012. “Temporal Shifts in the Skin Microbiome Associated with Disease Flares and Treatment in Children with Atopic Dermatitis.” *Genome Research* 22(5): 850–59.
- Laborel-Préneron, Emeline et al. 2015. “Effects of the Staphylococcus Aureus and Staphylococcus Epidermidis Secretomes Isolated from the Skin Microbiota of Atopic Children on CD4+ T Cell Activation.” *PLoS ONE* 10(10).
- McCoy, Kathy D., Aline Ignacio, and Markus B. Geuking. 2018. “Microbiota and Type 2 Immune Responses.” *Current Opinion in Immunology* 54: 20–27.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.05.009>.
- Miajlovic, Helen, Padraic G. Fallon, Alan D. Irvine, and Timothy J. Foster. 2010. “Effect of Filaggrin Breakdown Products on Growth of and Protein Expression by Staphylococcus Aureus.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126(6): 1184-1190.e3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2010.09.015>.
- Miller, Lloyd S., and John S. Cho. 2011. “Immunity against Staphylococcus Aureus Cutaneous Infections.” *Nature Reviews Immunology* 11(8): 505–18.
- Miller, Loren G. et al. 2015. “Staphylococcus Aureus Skin Infection Recurrences among Household Members: An Examination of Host, Behavioral, and Pathogen-Level Predictors.” *Clinical Infectious Diseases* 60(5): 753–63.
- Moriwaki, Masaya et al. 2019. “Staphylococcus Aureus from Atopic Dermatitis

- Skin Accumulates in the Lysosomes of Keratinocytes with Induction of IL-1 α Secretion via TLR9." *Allergy* 74(3): 560–71.
<http://doi.wiley.com/10.1111/all.13622>.
- Naik, Shruti et al. 2013. "Compartmentalized Control of Skin Immunity by Resident Commensals." 337(6098): 1115–19.
- Nakatsuji, Teruaki et al. 2017. "Antimicrobials from Human Skin Commensal Bacteria Protect against Staphylococcus Aureus and Are Deficient in Atopic Dermatitis." *Science Translational Medicine* 9(378): 1–12.
- Olaru, Florina, and Liselotte E. Jensen. 2010. "Staphylococcus Aureus Stimulates Neutrophil Targeting Chemokine Expression in Keratinocytes through an Autocrine IL-1 α Signaling Loop." *Journal of Investigative Dermatology* 130(7): 1866–76. <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2010.37>.
- Van Den Oord, Rosanne A.H.M., and Aziz Sheikh. 2009. "Filaggrin Gene Defects and Risk of Developing Allergic Sensitisation and Allergic Disorders: Systematic Review and Meta-Analysis." *BMJ (Online)* 339(7712): 86–88.
- Palmer, Colin N.A. et al. 2006. "Common Loss-of-Function Variants of the Epidermal Barrier Protein Filaggrin Are a Major Predisposing Factor for Atopic Dermatitis." *Nature Genetics* 38(4): 441–46.
- Parlet, Corey P., Morgan M. Brown, and Alexander R. Horswill. 2019. "Commensal Staphylococci Influence Staphylococcus Aureus Skin Colonization and Disease." *Trends in Microbiology* 27(6): 497–507.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.01.008>.
- Pendaries, Valérie et al. 2014. "Knockdown of Filaggrin in a Three-Dimensional Reconstructed Human Epidermis Impairs Keratinocyte Differentiation."

Journal of Investigative Dermatology 134(12): 2938–46.

- Postlethwaite, Arnold E., Maureen A. Holness, Hitoshi Katai, and Rajendra Raghoebar. 1992. "Human Fibroblasts Synthesize Elevated Levels of Extracellular Matrix Proteins in Response to Interleukin 4." *Journal of Clinical Investigation* 90(4): 1479–85.
- Rodríguez, Elke et al. 2009. "Meta-Analysis of Filaggrin Polymorphisms in Eczema and Asthma: Robust Risk Factors in Atopic Disease." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123(6).
- Rojo, A. et al. 2014. "Staphylococcus Aureus Genomic Pattern and Atopic Dermatitis: May Factors Other than Superantigens Be Involved?" *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 33(4): 651–58.
- Seo, Min Duk et al. 2012. "HaCa T Keratinocytes and Primary Epidermal Keratinocytes Have Different Transcriptional Profiles of Cornified Envelope-Associated Genes to T Helper Cell Cytokines." *Biomolecules and Therapeutics* 20(2): 171–76.
- Serezani, Ana P.M. et al. 2017. "IL-4 Impairs Wound Healing Potential in the Skin by Repressing Fibronectin Expression." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139(1): 142-151.e5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.07.012>.
- Sinha, Bhanu et al. 1999. "Fibronectin-Binding Protein Acts as Staphylococcus Aureus Invasin via Fibronectin Bridging to Integrin A5B1." *Cellular Microbiology* 1(2): 101–17.
- Totté, J. E.E. et al. 2016. "Prevalence and Odds of Staphylococcus Aureus Carriage in Atopic Dermatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis." *British Journal of Dermatology* 175(4): 687–95.

- Volz, Thomas et al. 2018. “Induction of IL-10-Balanced Immune Profiles Following Exposure to LTA from Staphylococcus Epidermidis.” *Experimental Dermatology* 27(4): 318–26.
- Weidinger, Stephan et al. 2006. “Loss-of-Function Variations within the Filaggrin Gene Predispose for Atopic Dermatitis with Allergic Sensitizations.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118(1): 214–19.
- . 2018. “Atopic Dermatitis.” *Nature Reviews Disease Primers* 4(1): 1.
<http://www.nature.com/articles/s41572-018-0001-z>.
- Welch, Pamela A. et al. 2018. “First-in-Human Topical Microbiome Transplantation with Roseomonas Mucosa for Atopic Dermatitis.” *JCI Insight* 3(9).
- Yeung, Melinda et al. 2011. “Identification of Major Clonal Complexes and Toxin Producing Strains among Staphylococcus Aureus Associated with Atopic Dermatitis.” *Microbes and Infection* 13(2): 189–97.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2010.10.023>.

謝辞

本研究は、主指導教員の酒井規雄教授、副指導教員の秀道広教授、田中茂講師、ならびに共同研究者である岩本和真先生、菅井基行先生、田中暁生准教授の御指導の下に行われました。先生方の丁寧かつ熱心な御指導に心より深く感謝申し上げます。また、セミナーや実験手法等で貴重なご意見、ご協力を頂いた神経薬理学教室、皮膚科学教室の皆様にも御礼申し上げます。