

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06428

研究課題名(和文)アトピー性皮膚炎における皮膚細菌叢と皮膚免疫の解析

研究課題名(英文)The effect of skin microbiome from atopic dermatitis on skin immunity

研究代表者

岩本 和真(Iwamoto, Kazumasa)

広島大学・病院(医)・病院助教

研究者番号：20457237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アトピー性皮膚炎(AD)に定着する黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)が、どのような皮膚の免疫反応を誘導するのかを検討した。*S. aureus*の標準株(NCTC8325)およびAD患者の皮膚より分離したAD株(TF3378)を用いて、末梢血単核球由来のランゲルハンス細胞(MoLC)とT細胞の反応を解析した。AD株で刺激されたMoLCは、より多くのT細胞の増殖を誘導し、さらにT細胞からのTh1サイトカイン(IFN- $\gamma$ )の産生を減少させた。T細胞のmRNAではTh1/Th2比が減少していた。*S. aureus*のAD株は、標準株とは異なるLCを介した免疫反応を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The skin of patients with atopic dermatitis (AD) presents as a disbalance of the microbiome with a strong colonization by *Staphylococcus aureus*. However, the effect of colonized *S. aureus* on the skin immune system has not been fully elucidated. We explored whether *S. aureus* TF3378 isolated from AD skin was able to skew T cell responses via Langerhans cells (LC) as compared to a standard strain of *S. aureus* NCTC8325. Monocyte-derived LC (MoLC) from healthy controls and patients with AD were stimulated with *S. aureus* NCTC8325 or TF3378. *S. aureus*-stimulated MoLC were co-cultured with autologous CD4pos T cells and then T cell responses were analyzed. MoLC stimulated by *S. aureus* TF3378 induced significantly high and rapid proliferation of T cells with less Th1 cytokine (IFN- $\gamma$ ) production. The mRNA from T cells after co-culture showed imbalanced Th1/Th2 expression. These data illustrate *S. aureus* TF3378 on AD skin can skew T cell responses via LC toward imbalanced Th1 / Th2 skin immunity.

研究分野：皮膚科

キーワード：アトピー性皮膚炎 ランゲルハンス細胞 黄色ブドウ球菌

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚は体の最外層に位置し、常にさまざまな細菌や抗原に暴露されている。表皮に位置するランゲルハンス細胞 (LC) は、Toll-like receptor (TLR) などのパターン認識レセプターを発現し、外界から侵入する異物をスキャンする機能を果たしている。さらに LC は、抗原提示能を有し、IgE 抗体を介した抗原提示や T および B 細胞の制御を行い、炎症を調整する。そのため LC は皮膚免疫において、自然免疫と獲得免疫を橋渡しする重要なキープレイヤーである。

アトピー性皮膚炎 (AD) は、長期にわたり皮膚炎を繰り返す慢性疾患である。近年、皮膚表面の細菌叢は皮膚の恒常性を保つために重要な役割を果たしていることが報告され、アトピー性皮膚炎 (AD) モデルマウスの検討で黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) が皮膚炎発症に深く関わっていることが明らかにされた。これまで、AD 患者の皮膚から培養検査を行うと *S. aureus* が高率に検出されること、また AD 患者では *S. aureus* などの細菌感染症に罹患しやすいことが知られていたが、その細菌感染に対する皮膚脆弱性のメカニズムや、なぜ黄色ブドウ球菌が AD 患者の皮膚に定着しているのかについては解明されていなかった。

今回、皮膚細菌叢および皮膚に侵入する病原体を察知し、皮膚の恒常性を保つ役割を果たす LC に注目し、健常人と AD 患者での *S. aureus* に対する皮膚免疫の解析を行い、*S. aureus* と AD の病態の関連性について検討を試みた。

### 2. 研究の目的

本研究では、皮膚に常在する *S. aureus* による LC を介した皮膚免疫応答について、健常人と AD 患者、および *S. aureus* の標準株と AD 患者の皮膚由来株 (AD 株) の両側面から検討を行うため、以下の 2 つの課題を設定した。本研究における *S. aureus* に対する免疫応答については、*S. aureus* により活性化した LC を介した T 細胞応答を軸として解析した。なお、本研究は広島大学の倫理審査委員会の承認 (E-57) を得て行った。

- 1) 健常人と AD 患者における *S. aureus* に対する活性化の検討
- 2) 標準株および AD 株の *S. aureus* が誘導する免疫応答の検討

### 3. 研究の方法

#### 1) 対象

健常人 (n=23) および AD 患者 (n=13) を対象とした。患者背景を表に示す。

	健常人	AD
男性 : 女性	13 : 10	10 : 3
年齢	29 ± 2	30 ± 2
IgE (IU/ml)	140±62	13667±5105
TARC (pg/ml)	279±25	3744±1240

(mean ± SEM)

#### 2) *S. aureus* 株

*S. aureus* の標準株 (NCTC8325) および AD 株 (TF3378) を実験に供した。AD 株 (TF3378) は広島大学細菌学教室より、AD 皮膚より単離し臨床分離株として確立された株として提供を受けた。

#### 3) LC と T 細胞の作製・分離

ヒト末梢血より単球と T 細胞をそれぞれ分離し、単球は *in vitro* で LC へ分化 (MoLC ; Monocyte-derived LC) させた。

#### 4) MoLC の活性化

健常人および AD 患者の末梢血より分化させた MoLC をそれぞれの *S. aureus* 株で 24 時間刺激した。刺激後の MoLC を回収し、LC のマーカーである CD1a で MoLC をゲーティングした後に、*S. aureus* を認識する受容体である TLR2 と LC の活性化マーカーである CD83 と HLA-DR について、フローサイトメーターで発現量を解析した。

#### 5) LC を介した T 細胞応答

標準株と AD 株の *S. aureus* でそれぞれ健常人と AD 患者由来の MoLC を刺激した。刺激後の MoLC は LC のマーカーである CD1a でソートし、同一ドナー由来の T 細胞と 7 日間共培養を行った。培養後に T 細胞のみを CD4 でソートし、増殖した T 細胞数と mRNA を解析した。また培養上清中のサイトカインについても解析を行った。方法の概略図を示す (図 1)。

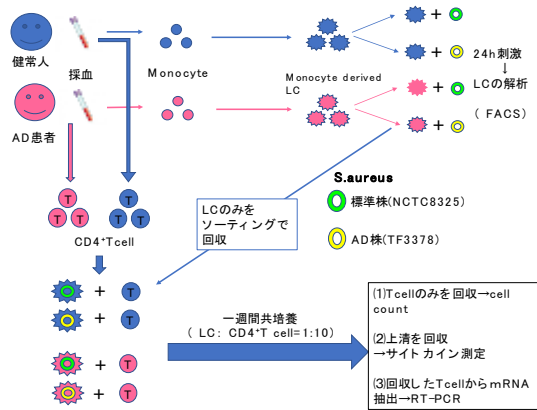


図 1

#### 4. 研究成果

1) *S. aureus* に対する MoLC 活性化の検討  
標準株と AD 株の *S. aureus* でそれぞれ健康人と AD 患者由来の MoLC を刺激した後、フローサイトメトリーで LC の活性化マーカーである CD83 と HLA-DR を測定した。*S. aureus* は標準株と AD 株ともに MoLC を活性化させたが、健康人と AD 患者の間に反応の違いは見られなかった (図 2)。なお TLR2 の発現量については、健康人および AD 患者間には優位な差はみられなかった。

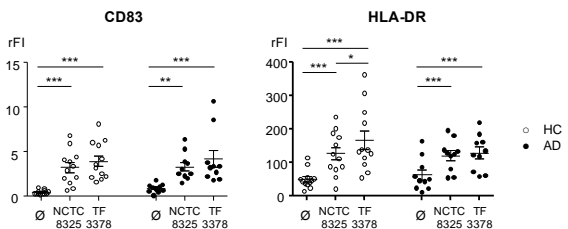


図 2

2) *S. aureus* に対する T 細胞応答の検討

それぞれの *S. aureus* 株で刺激された MoLC を同一ドナー由来の T 細胞と共培養を行い、培養後の増殖した T 細胞数を測定した。AD 株 (TF3378) で刺激された MoLC は、優位に多くの T 細胞の増殖を誘導した (図 3)。

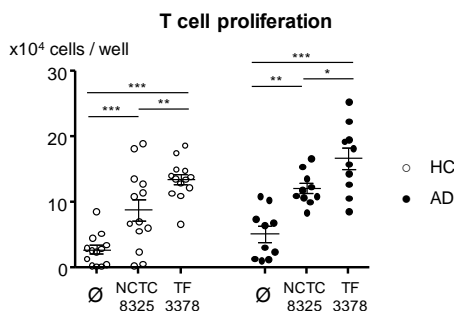


図 3

また、培養上清中のサイトカインの解析では、AD 株 (TF3378) は優位に Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  の産生を減少させ、IL-2 の産生を誘導した。一方 Th2 サイトカイン (IL-5) については差がみられなかった (図 4)。

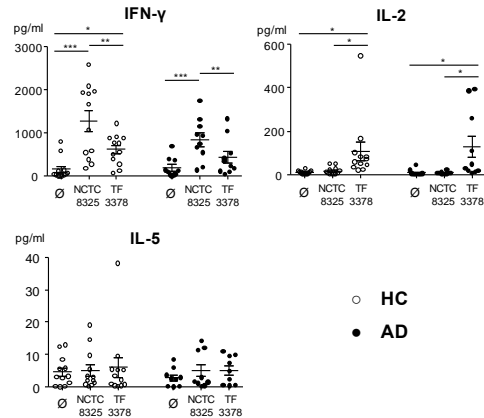


図 4

共培養後に CD4 でソートした T 細胞中の mRNA について、リアルタイム PCR を用いて解析した。それぞれ Th1 と Th2 への分化へ必須の転写因子である T-bet と Gata3 の比は、AD 株 (TF3378) では減少していた (図 5)。

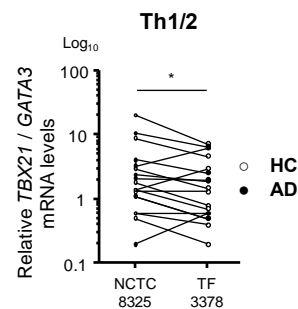


図 5

以上の結果から、*S. aureus* AD 株 (TF3378) は標準株とは異なる LC を介した免疫応答を誘導することが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- 1) Kazumasa Iwamoto, *Staphylococcus aureus* from atopic dermatitis skin alters cytokine production triggered by monocyte-derived Langerhans cell, 47<sup>th</sup> Annual ESDR Meeting, 2017 年 9 月 27-30 日、オーストリア
- 2) 岩本和真, アトピー性皮膚炎由来の黄色ブドウ球菌と皮膚免疫の解析、第 66 回

- 日本アレルギー学会学術大会、2017年6月17日、東京都
- 3) Kazumasa Iwamoto, Epidermal DC from atopic dermatitis patients lack TLR2-induced Th17 polarization capacity、第65回日本アレルギー学会学術大会(English Session)、2016年6月18日、東京都
  - 4) 岩本和真、アトピー性皮膚炎におけるランゲルハンス細胞の機能解析、第11回中国研究皮膚科セミナー、2015年11月7日、岡山市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩本 和真 (IWAMOTO KAZUMASA)  
広島大学・病院(医)・病院助教  
研究者番号：20457237