

令和元年5月21日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06252

研究課題名(和文)皮膚疾患克服のための「超個体」理解に基づいた皮膚微生物-宿主免疫解析法の確立

研究課題名(英文) Establishment of skin microbe-host immunity analysis method based on understanding the concept of "superorganism"

研究代表者

松岡 悠美 (Matsuoka, Yuumi)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：10402067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：先行する研究において皮膚病原細菌*S. aureus*による、経表皮のマウス感染症モデルを樹立し免疫反応を明らかにしてきた。この系を発展させ、細菌・真菌を含めた“超個体”の理解に基づく解析を行うことで、皮膚微生物-宿主免疫解析法の確立を目指す。これまでに、我々の経表皮黄色ブドウ球菌感染モデルにおけるIL-17の産生細胞を明らかにした。また、MyD88、IL-36、IL-1に焦点を当て、表現系を得ることに成功した。また、*C. albicans*や*M. furfur*などの病原真菌における皮膚炎発症モデルを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原微生物による皮膚炎発症のメカニズムについてはこれまで良い動物モデルがなく、詳細は明らかではなかった。我々が先行研究で確立した経表皮の黄色ブドウ球菌感染マウスモデルを用いて皮膚の最外層における病原微生物に対する宿主応答を検討することで、新たな病原微生物による皮膚炎発症のメカニズムを明らかにできたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Microbiome analysis is widely performed in recent years in the intestinal tract, skin, etc., and the contribution of microbiome to the diseases is becoming clearer. When we analysis the microbe-immune response in the skin, we have to analyze not only the host immune responses and bacterial community, but also fungal and viral community. However, there was no good model for microbial immune response analysis targeting whole symbiotic microorganisms. Therefore, we aim to establish a new model for analyzing the microbe-immune response in the skin. In this study, we found that IL-17-producing cells in our *S. aureus* infection model were ILC3 and gdT cells. In addition, a phenotypic differences were obvious in keratinocyte-specific MyD88knockout and IL-1/36 deficient mice. We also established a new inflammatory skin model with pathogenic fungi such as *C. albicans* and *M. furfur*.

研究分野：皮膚細菌学、免疫学

キーワード：皮膚細菌叢 免疫応答 超個体 黄色ブドウ球菌 カンジタ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は近年、新規に *S. aureus* 経表皮感染マウスモデルを確立し、*S. aureus* の産生する外毒素 α -toxin が肥満細胞を刺激し、Th2 型の皮膚反応を惹起するが、菌体は排除しない事を明らかにした (Nakamura, et al. Nature 2013)。この系は長い間不明であったアトピー性皮膚炎 (AD) の 1 つの機序を病原微生物の側面から解明したが、一つの必要条件を示したに過ぎず、AD における複雑な皮膚反応を説明できるものではない。特に、近年、アレルギー疾患である AD や喘息において Th2 のみならず、IL-17 産生細胞の関与を示唆する報告が散見される。そこで、我々の経表皮 *S. aureus* 感染マウスモデルにおいて IL-17 サイトカインの産生を検討したところ、IL-17 は有意に上昇し、IL-17^{-/-} マウスでは炎症反応は劇的に抑制された。この IL-17 依存性の皮膚炎症はケラチノサイト由来の IL-1, IL-36 サイトカインが MyD88 シグナルを介して誘導されていることが更に明らかにした (未発表データ)。ごく最近の AD 患者検体を用いた次世代 RNA-seq の結果では患者の皮膚で IL-1, IL-36 関連遺伝子群の発現上昇が報告され (Suárez-Fariñas, et al. Clin Immunol 2015)、我々のマウスモデルのデータを支持するものとして非常に興味深い。更に我々は、同様の経表皮感染モデルを代表的な皮膚真菌症である *C. albicans* を用いて検討した。興味深いことに *S. aureus* とは異なり、野生型マウスでは *S. aureus* と同様の表面マーカーを発現する IL-17 産生細胞が局所に誘導されるが、菌体は排除される。更に、この反応は MyD88-IL-1, IL-36 の経路には依存しない (未発表データ)。

千葉大学小児科と共同で、乳児皮膚における *S. aureus* の定着とその後の AD の発症に関するコホート研究で得られた菌株の全ゲノムシーケンスを行い、AD 発症における *S. aureus* 病原因子の解析を行ったが、興味深いことに通常健康成人皮膚からは検出されない *S. aureus* が半数近くの 6 ヶ月乳児皮膚から検出される。また、その定着はその後の AD 発症と相関関係にあることがわかった (未発表データ)。ヒトは胎内という無菌の環境下から、出生後外界の様々な刺激に暴露されるようになるが、この過程で正常細菌叢・真菌叢が構築されていき、その破綻が「疾患」を招くと捉えることが出来る。近年、その破綻を招く原因として、「バクテリオファージが環境ストレスにより優良な常在細菌内でより溶菌サイクルを引き起こし、病原性偏利共生菌が有利になるという Dysbiosis サイクル」をバクテリオファージによる “Community Shuffling (群集改造)” という概念として提唱された (Mills, Gut Microbes 2013)。そこで、我々はこうした「疾患」と「治療」を考えるうえで、我々ヒト “個体” を、共生微生物との集合体すなわち “超個体 (Superorganism)” として捉え、関係を統合的に理解することが必須である。申請者らはこれまでに、病原微生物と常在細菌について先進的な研究を行ってきたが、“超個体” という概念を当てはめた場合、現在広く解析が行われている細菌叢解析に留まらず、細菌叢をコントロールしているファージ、真菌叢解析を包括的に行うことでのみ、宿主免疫-共生・病原微生物のより複雑な恒常性制御機構を明らかにし、様々な皮膚疾患克服への正しい理解を得られると考え、本研究を提案した。

2. 研究の目的

常在細菌叢解析は腸管や皮膚などで、近年広く行われ、疾患への寄与が次々と明らかになりつつある。一方、近年、バクテリオファージウイルスによる細菌叢の “群集改造理論” の概念提唱や、真菌叢解析の報告などが報告されるようになった。このような観点から皮膚における、微生物-免疫応答の解析において、細菌叢のみの解析では、対微生物免疫応答の一面しか見られていない可能性がある。しかしながら、依然、共生微生物全体を対象とした微生物免疫応答解析モデルは確立していない。これまで申請者らは、先行する研究において皮膚病原細菌 *S. aureus* や皮膚病原真菌 *C. albicans* における、他に類のない経表皮のマウス感染症モデルを樹立し、免疫反応を明らかにしてきた。この系を発展させ、細菌・真菌・ファージを含めた “超個体 (Superorganism)” の統合的理解に基づく解析を行うことで、より本質的な恒常性の理解による皮膚微生物-宿主免疫解析法の確立を目指す。

3. 研究の方法

これまでの研究成果として、AD の発症に *S. aureus* のクオラムセンシングにより調節を受ける α -toxin の産生が関わること (Nakamura, et al. Nature 2013) を新規マウスモデルを用いて明らかにした。また、その後の研究により、皮膚における IL-17 産生性細胞の表面マーカーはある程度共通ではあるものの、暴露される病原微生物により誘導機序が異なる事が判明した (未発表データ)。着実に成果に繋がりがつつあるこれらの先行研究を元に、

(1) 細胞内染色法や IL-17aEGFP マウスを用いた flow cytometry の解析では、経表皮感染応答時の IL-17 産生細胞は、T 細胞と Lin(-)CD90(+) の ILC3 であり、これらの細胞の *S. aureus* 感染時と、*C. albicans* 感染時における性格性の違いがあるのかサイトカインの産生など解析する。

(2) 我々の研究グループではマウス腸管および皮膚の細菌叢の解析体制をすでに確立している。そこで、これまでの先行研究で得られたサイトカインシグナルや新規に関与が考えられる宿主分子の各種遺伝子改変動物の細菌叢を野生型と比較解析する。

(3) 次に細菌叢解析で得られてきた遺伝子改変動物における細菌叢の異差に関わる細菌の全ゲノム解析を行い、特徴的なファージ感染形態などにスポットを当て細菌叢のコントロールをより上位からとらえる。

(4) マウス皮膚における真菌叢の解析法は確立していないのでその安定した解析法の樹立を目指す。

(5) *S. aureus* および、*C. albicans* の炎症惹起や、*C. albicans* による菌体排除が IL-17 依存性であることは明らかとなったが、微生物側の病原因子や、宿主の認識機構に関しては不明である。そこで、病原微生物と宿主を包括して“超個体”として捉え、これまでに行ってきた生化学的手法、遺伝子改変微生物利用、遺伝子改変マウスモデルを“超個体”上で解析することで既知のレセプターノックアウトマウスなどで得られなかった詳細な病原微生物排除機構を明らかにする。

4. 研究成果

これまでに、我々の経表皮黄色ブドウ球菌感染モデルにおける IL-17 の産生細胞を明らかにした。また、MyD88、IL-36、IL-1 に焦点を当て、表現系を得ることに成功した。また、*C. albicans* や *M. furfur* などの病原真菌における皮膚炎発症モデルを確立した(成果未発表)。病原微生物による皮膚炎発症のメカニズムについてはこれまで良い動物モデルがなく、詳細は明らかではなかった。我々が先行研究で確立した経表皮黄色ブドウ球菌感染マウスモデルを用いて皮膚の最外層における病原微生物に対する宿主応答を検討することで、新たな病原微生物による皮膚炎発症のメカニズムを明らかにできたと考えている。

論文として報告した内容を以下に記述する。

我々は表皮ケラチノサイトに着目した。Myd88 はケラチノサイトのアラミンである IL-1 ファミリーの受容体や、TLR のシグナル伝達に必須のアダプタータンパクであり、*Myd88* 欠損マウスでは、IL-1 ファミリーのシグナルと TLR のシグナルが欠如する。*S. aureus* 経表皮感染 7 日後、野生型と異なり *Myd88* 欠損マウスでは、皮膚表面に感染した *S. aureus* の菌数は維持されるもののほとんど皮膚炎は起こらなかった。この結果は、ケラチノサイトを介さない皮下 *S. aureus* 感染モデルにおいて、*Myd88* 欠損マウスが野生型マウスに比べて重篤な皮膚潰瘍および膿瘍形成を呈し、より多くの *S. aureus* が感染部位に見られる結果と相反するものであった。この違いが表皮ケラチノサイトを介した現象であるのかを確認するため、表皮特異的 *Myd88* 欠損マウスを用いて、同様の実験を行った。注目すべきことに、7 日間の *S. aureus* 表皮感染にて表皮特異的 *Myd88* 欠損マウスも、全身の *Myd88* 欠損マウスと同様に、皮膚炎が抑制された。これらの結果から、*S. aureus* 表皮感染モデルにおいて、特にケラチノサイトにおける *Myd88* を介したシグナルが、皮膚炎の惹起に重要であることが示された。前述したように、*Myd88* は TLR/IL-1 ファミリー受容体などの複数の受容体を介した炎症性シグナルの伝達に必須なタンパクである。

次に我々は、*Myd88* の上流においてどの受容体が重要かを明らかにするために、TLR2/4 二重欠損マウスおよび IL-18 欠損マウスの表皮に *S. aureus* を感染させたが、野生型マウスと同様の重篤な皮膚炎を示した。一方、IL-1 受容体欠損マウスでは皮膚炎が中等度抑制され、IL-1 受容体欠損マウスに IL-36 受容体中和抗体を投与し IL-1 と IL-36 の両方を阻害したところ、野生型マウスに比べて劇的に皮膚炎が抑制された。これらの結果から、IL-1 受容体と IL-36 受容体を介したシグナルの両方が皮膚表面の *S. aureus* 感染における皮膚炎の誘導に重要であることが明らかになった。IL-1 受容体シグナルは、Th17 細胞の誘導に重要なサイトカインである。実際に、*S. aureus* 表皮感染マウスの皮膚病変部から細胞を回収し、フローサイトメトリーを使用して解析すると、*S. aureus* 感染させた野生型マウスの皮膚では、IL-17A の産生細胞数が劇的に増加しており、IL-17F および IL-22 の産生細胞数も増加していた。さらに、皮膚炎局所の IL-17A および IL-17F の産生をタンパクレベルで確認したところ、*S. aureus* を表皮に感染させた野生型マウスと比較して、表皮特異的 *Myd88* 欠損マウス、IL-36 受容体中和抗体を投与した IL-1 受容体欠損マウスにおいて IL-17A および IL-17F が有意に減少していた。また、IL-17A/F 二重欠損マウスでは皮膚炎、組織への好中球浸潤が有意に抑制された。これらの結果から、表皮に感染した *S. aureus* は主にケラチノサイトの *Myd88* シグナルを介した IL-1 ファミリーサイトカインを誘導し、下流で IL-17 の産生を促して、皮膚炎惹起に関与していることが示された。皮膚炎が起きている皮膚組

織を、フローサイトメトリーで解析したところ、CD45 陽性細胞中の、真皮 $\gamma\delta$ T 細胞と、3 型自然リンパ球が IL-17A を産生していることがわかった。また、 $\gamma\delta$ T 細胞欠損マウスでは野生型マウスと同等の皮膚炎を呈した。一方、 $\gamma\delta$ T 細胞欠損マウスに抗 CD90 抗体を投与して、 $\gamma\delta$ T 細胞だけでなく 3 型自然リンパ球も欠損させたマウスでは、野生型マウスに比べて有意に皮膚炎が抑制された。以上の結果から、 $\gamma\delta$ T 細胞および 3 型自然リンパ球の両者から産生される IL-17 が、*S. aureus* 表皮感染モデルにおいて重要な役割を果たしていることがわかった。

更に我々は、*S. aureus* からの PSM α による初代培養ケラチノサイト刺激が、アラミンである IL-1 α と IL-36 α の放出を促していることを突き止めた。また、*in vivo* で、PSM α 欠損株を感染させた群では、皮膚炎が劇的に抑制されることがわかった。以上の結果から、*S. aureus* 由来の PSM α が、ケラチノサイトからのアラミン放出を誘導し、皮膚炎を惹起するのに重要な病原因子であることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Sumitomo T, Mori Y, Nakamura Y, Ogawa MH, Nakagawa S, Yamaguchi M, Matsue H, Terao Y, Nakata M, Kawabata S. Streptococcal Cysteine Protease-Mediated Cleavage of Desmogleins Is Involved in the Pathogenesis of Cutaneous Infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 査読あり 8:10. 2018
2. Baldry M, Nakamura Y, Nakagawa S, Frees D, Matsue H, Núñez G, Ingmer H. Application of an agr-specific anti-virulence Compound as Therapy for Staphylococcus Aureus-induced Inflammatory Skin Disease. *J Infect Dis.* 査読あり 218(6):1009-1013. 2018
3. Nakagawa S, Matsumoto M, Katayama Y, Oguma R, Wakabayashi S, Nygaard T, Saijo S, Inohara N, Otto M, Matsue H, Núñez G, Nakamura Y. Staphylococcus aureus Virulent PSM Peptides Induce Keratinocyte Alarmin Release to Orchestrate IL-17-Dependent Skin Inflammation. *Cell Host Microbe.* 査読あり 22(5):667-77. 2017

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Yuumi Matsuoka-Nakamura. Cutaneous retention of Staphylococcus agr virulence promotes atopic dermatitis development (The 2nd Chiba University-UC San Diego Symposium "Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine") 2018
2. Yuumi Nakamura "S4. Pathogen infection and host responses" Understanding the link between Staphylococcus aureus colonization and skin disease. (第 46 回日本免疫学会学術集会) 2017
3. Yumi Matsuoka-Nakamura Cutaneous acquisition of Staphylococcus quorum-sensing agr mutations protects against atopic dermatitis development. (The 6th Global Network Forum on Infection and Immunity) 2017
4. Nakagawa S, Nakamura Y, Matsumoto M, Nunez G, Matsue H. Staphylococcus aureus PSMA peptides induce keratinocyte IL-1 and IL-36 release to orchestrate IL-17 dependent skin inflammation. (第 46 回日本免疫学会学術集会) 2017
5. Wakabayashi S, Nakamura Y, Matsue H, Nunez G. Homeostasis of peripheral macrophages are controlled by mast cells via newly identified c-Kit+CD11b+ tissue-resident macrophage progenitor cells. (第 46 回日本免疫学会学術集会) 2017
6. Wakabayashi S, Nakamura Y, Matsue H, Nunez G. Mast cells control CD11b+ tissue-resident macrophage progenitor cells and regulate the number of macrophages in local tissues. (第 42 回日本研究皮膚科学会) 2017
7. Nakagawa S, Nakamura Y, Matsumoto M, Katayama Y, Oguma R, Nunez G, Matsue H. Staphylococcus aureus PSMA peptides induce keratinocyte alarmin release to orchestrate IL-17 dependent skin inflammation. (第 42 回日本研究皮膚科学会) 2017
8. Nakamura Y, Takahashi H, Takaya A, Inoue Y, Katayama Y, Kusuya Y, Oguma R, Yamade F, Shimojo N, Nunez G, Matsue H. Protection against atopic dermatitis through acquisition of Staphylococcus quorum-sensing agr mutations in the skin. (第 42 回日本研究皮膚科学会) 2017
9. Nakamura Y, Takahashi H, Takaya A, Inoue Y, Katayama Y, Kusuya Y, Oguma R, Yamade F, Shimojo N, Nunez G, Matsue H. Cutaneous acquisition of Staphylococcus-sensing agr mutations protects against atopic dermatitis. International Eczema Council at SID

- meeting. (76th SID Annual Meeting) 2017
10. Nakagawa S, Nakamura Y, Nunez G, Matsue H. PSMs as a key virulence in Staphylococcus aureus-induced skin inflammation through IL-36 and IL-1 release from keratinocyte. (76th SID Annual Meeting) 2017
 11. Wakabayashi S, Nakamura Y, Nunez G, Matsue H. Tissue-resident macrophages are controlled by mast cells via a newly identified c-Kit+CD11b+ progenitor cell. (76th SID Annual Meeting) 2017
 12. Nakamura Y, Takahashi H, Takaya A, Inoue Y, Yamade Y, Oguma R, Katayama Y, Kusuya Y, Shimojo N, Nunez G, Matsue H. Evolutionary risk management of agr locus is important for S. aureus adaptation in the skin of atopic dermatitis. (The 41st Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology.) 2016 Nakagawa S, Nakamura Y, Oguma R, Katayama Y, Matsumoto M, Nunez G, Matsue H. (2016)
 13. Staphylococcus PSM induces IL-17-dependent skin inflammation through IL-36 and IL-1 secretion from keratinocyte. (The 41st Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology.)2016
 14. Wakabayashi S, Nakamura Y, Matsue H. Homeostasis of peripheral macrophages are tuned by c-Kit+CD11b+ multipotent progenitor-like cells derived from mast cells. Oral presentation (The 41st Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology.) 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。