

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2015

課題番号：26713038

研究課題名(和文)黄色ブドウ球菌クオラムセンシング制御によるアトピー性皮膚炎予防法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic targets for atopic dermatitis by controlling quorum-sensing in *Staphylococcus aureus*

研究代表者

松岡 悠美 (MATSUOKA, YUMI)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10402067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：経表皮 *S. aureus* 感染マウスモデルにおいて、IL-17は有意に上昇し、IL17^{-/-}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を更に明らかにした。また、これらのサイトカインはクオラムセンシング依存性にコントロールされる特定の病原因子を欠損させた *S. aureus* を用いることにより抑制されることを見出した。黄色ブドウ球菌による皮膚炎発症のメカニズムはクオラムセンシング依存性に起こっているということを示唆し、治療ターゲットの1つとして期待できる成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found that Myd88^{-/-} mice showed no skin inflammation, whereas WT mice showed severe eczematous lesions with the similar epicutaneous colonization of *S. aureus*. K14-CreMyd88^{-/-} mice, the skin inflammation was also dramatically reduced, indicating the involvement of MyD88 in KC. We next applied *S. aureus* on Il1r^{-/-} mice. When applied on Il1r^{-/-} mice with IL-36R Ab, the inflammation was significantly reduced, showing additive IL-36 involvement. Upon the infection, little IL-17 were detected in K14-CreMyd88^{-/-}, Il1r^{-/-} with IL-36R Ab mice. In accordance with these, Il17^{-/-} mice showed significantly less skin inflammation upon the infection. We also found that an exotoxin beside secreted from *S. aureus* was essential in our epicutaneous mouse model. Similar with d-toxin, the expression of this exotoxin is also controlled by agr-quorum sensing in *S. aureus* indicates that controlling the quorum sensing in *S. aureus* may be an important therapeutic target of atopic dermatitis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 黄色ブドウ球菌 クオラムセンシング

1. 研究開始当初の背景

Th2 型の皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎 (AD) では、90%以上の患者皮膚で健常人では見られない黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*) の生着が認められると古くから報告されるが (Rudikoff, *et al. Lancet* 1998) AD の病態に *S.aureus* がどのような役割を果たしているかは明らかでなかった。我々は AD の主症状の 1 つである“かゆみ”に着目して、培養肥満細胞からの脱顆粒を誘導する *S.aureus* 由来の分子を同定した。同定された *S.aureus* 細胞外分泌毒素である δ -toxin による肥満細胞の脱顆粒反応は、IgE 存在下で抗原非特異的に増強された。さらに、皮膚に直接 *S.aureus* を外用するというマウスモデルを新規に確立した。野生型の *S.aureus* では Th2 型の皮膚炎が誘発されたのに対して、 δ -toxin 欠損株では皮疹重症度が抑制された (Nakamura, *et al. Nature* 2013)。ヒト検体において δ -toxin をコードする遺伝子 RNA の AD 病変部および正常部での発現を検討した。すると、RNA の発現は AD の皮疹部からの皮膚洗い液全例で特異的に検出され、AD と δ -toxin の発現には相関関係が確認された (Nakamura, *et al. Nature* 2013)。

2. 研究の目的

マウス *S.aureus* 経皮感染モデルを新規に確立し、*S.aureus* 感染時に細菌自身が自らの人口密度を感知し病原因子の発現を行うという“クオラムセンシング”機構により調節を受ける δ -toxin が AD の発症に重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究では、(1) *S.aureus* のクオラムセンシングによる δ -toxin 産生機構の解析 (2) 宿主側の δ -toxin レセプターの同定 (3) クオラムセンシング抑制薬剤のスクリーニング (4) 確立したマウスモデルで実際に皮疹発症を予防する事が可能か検討の以上の項目で検討を行った。本研究はアトピー性皮膚炎の新規発症予防の開発に繋がるものと考えている。

3. 研究の方法

(1) クオラムセンシング阻害法を生体内で検討するため、マウスの経皮感染モデルの免疫学的機序を遺伝子改変マウスを用いより詳細に解析する。

(2) δ -toxin の肥満細胞における受容体候補遺伝子を HEK293 細胞への遺伝子導入の系を用いてスクリーニングし、その後肥満細胞でノックダウンの系を用いて同定する。

(3) *S.aureus* における δ -toxin およびその上流の *agr*-クオラムセンシングのより詳細な調節機序の解析、抑制薬剤のスクリーニング

を行いその有用性を検討する。

4. 研究成果

(1) 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 δ -toxin の産生が関わることを新規マウスモデルを用いて明らかにしてきた。本研究により、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、*Il17*^{-/-} 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をケラチノサイト特異的 MyD88 ノックダウンマウス (*K14-CreMyD88*^{-/-})、IL-1 レセプターノックアウトマウス (*Il1r*^{-/-})、IL-36 レセプター抗体を用いることで明らかにした。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、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。また、これらのサイトカインは特定の病原因子を欠損させた *S.aureus* を用いることにより抑制されることを見出した。非常に興味深いことに、この病原因子も δ -toxin 同様、黄色ブドウ球菌のクオラムセンシングによりコントロールされているため、これらの結果は、黄色ブドウ球菌の皮膚炎発症のメカニズムはクオラムセンシング依存性に起こっているということを示唆し、臨床において治療や予防法のターゲットの 1 つとして期待できる成果であると考えられる。現在、本研究にて得られた成果を発信するため論文を投稿準備中である。一方、これらの表現形の差に宿主側の興味深いことに、*Il17*^{-/-} マウスでは野生型マウスと比較して定常状態での *Staphylococcus* の分画の増加が認められた。現在、引き続きこれらの常在細菌叢が *S.aureus* 経表皮マウス感染モデルに与える影響を解析中である。

(2) 受容体候補としては、複数の候補について、遺伝子改変マウス骨髄より肥満細胞を作成し、 δ -toxin 刺激に対する反応性を確認したが、受容体同定には至っていない。引き続き候補に関して検討を行っていく予定である。

(3) 創薬の観点からは、研究の予定通り、シンガン大学 Gabriel Nunez 教授との共同研究として、FDA 承認済みの small compound 150,000 種および 30000 種の natural product extract を保有しており、これらの compound library を用いて *S.aureus* における RNA の発現制御に有効な薬剤スクリーニングを *S.aureus* *P3_lux* 株を用いて行った。薬剤の中には、病原因子のみを強く抑制し *S.aureus* の

増殖には影響を与えない幾つかの候補が絞りこまれ、この中の候補から現在経皮的に投与可能な薬剤の *in vivo* における効果を引き続き検討しているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. Cheung GY, Yeh AJ, Kretschmer D, Duong AC, Tuffuor K, Fu CL, Joo HS, Diep BA, Li M, Nakamura Y, Nunez G, Peschel A, Otto M. Functional characteristics of the *Staphylococcus aureus* δ -toxin allelic variant G10S. *Sci Rep.* (2015) Dec 10;5:18023. DOI: 10.1038/srep18023. 査読あり
2. 松岡悠美、特集 慢性炎症と疾患「黄色ブドウ球菌とアトピー性皮膚炎」臨床免疫・アレルギー科. (2015) 63(6): 547-550.
<http://www.kahyo.com/category/A1-MA> 査読なし
3. 片山有紀、松岡悠美、「特集/アレルギー疾患の疫学」に寄せる「黄色ブドウ球菌とアトピー性皮膚炎」アレルギーの臨床. (2015) 35(11):1056-1060
<http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/allergy.html> 査読なし
4. He Y, Varadarajan S, Muñoz-Planillo R, Burberry A, Nakamura Y, Núñez G. 3,4-methylenedioxy- β -nitrostyrene inhibits NLRP3 inflammasome activation by blocking assembly of the inflammasome. *J Biol Chem.* (2014) 289: 1142-50. DOI: 10.1074/jbc.M113.515080 査読あり

[学会発表](計14件)

1. 松岡悠美 (2016) WS21「細菌病原性の分子機序研究の最前線」Understanding the link between *Staphylococcus aureus* colonization and allergic skin disease 第89回日本細菌学会総会、3月23-25、(大阪国際交流センター、大阪府大阪市)
2. Iwasawa MT, Nakamura Y, Wakabayashi S, Saijo S and Matsue H. (2015) IL-17 produced by group 3 innate lymphoid cells and T cells is pivotal for host defense against epidermal candidiasis via neutrophil activation. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Dec. 11-13 (岡山コンベンションセンター、岡山県岡山市)
3. Wakabayashi S, Nakamura Y, Matsue H. (2015) Decreased signaling of stem cell factor transforms bone marrow-derived cultured mast cells into M2

macrophage-like cells. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Dec. 11-13, (岡山コンベンションセンター、岡山県岡山市)

4. Nakagawa S, Nakamura Y, Katayama Y, Nunez G, Matsue H. (2015) Cooperation of IL-1 and IL-36 plays a pivotal role in epidermal *S. aureus*-induced skin inflammation via IL-17 production. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Dec. 11-13, (岡山コンベンションセンター、岡山県岡山市)
5. Nakamura Y, Inoue Y, Katayama Y, Nunez G, Shimojo N, Matsue H. (2015) Expression ability of *RNA* gene encoding δ -toxin in *S. aureus* isolated from infant skin is associated with atopic dermatitis. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Dec. 11-13, (岡山コンベンションセンター、岡山県岡山市)
6. Iwasawa MT, Nakamura Y, Wakabayashi S, Saijo S and Matsue H. (2015) IL-17 produced by group 3 innate lymphoid cells (ILC3) and T cells is pivotal for host defense against epidermal candidiasis via neutrophil activation. 45th Annual ESDR meeting, Sep 9-12, Rotterdam, (The Netherlands)
7. Nakamura Y, Inoue Y, Katayama Y, Nunez G, Shimojo N, Matsue H. (2015) Expression ability of *RNA* gene encoding δ -toxin in *Staphylococcus aureus* isolated from infant skin is associated with atopic dermatitis. 45th Annual ESDR meeting, Sep 9-12, Rotterdam, (The Netherlands)
8. Nakagawa S, Nakamura Y, Katayama Y, Nunez G, Matsue H. (2015) Keratinocytes play an essential role on epidermal *Staphylococcus aureus* infection through MyD88. 45th Annual ESDR meeting, Sep 9-12, Rotterdam, (The Netherlands)
9. 松岡悠美 (2015) シンポジウム2「宿主-共生体感系と疾患」アトピー性皮膚炎における黄色ブドウ球菌の炎症惹起のメカニズム解析 第36回日本炎症・再生医学会、7月21-22日、(虎ノ門ヒルズフォーラム、東京都港区)
10. Yumi Matsuoka-Nakamura. (2015) "Infection and Immunity" Understanding the link between *Staphylococcus aureus* colonization and allergic skin disease. RIKEN IMS-JSI International Symposium on Immunology 2015, June 18-19, (パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)
11. Matsuoka-Nakamura Y. (2014) Symposium 4th Allergy; understanding sequential events from allergen exposure to local

inflammation” Understanding the link between *Staphylococcus*

aureus colonization and allergic skin disease 第43回日本免疫学会総会・学術大会, 12月10-12日, (国立京都国際会場、京都府京都市)

12. 松岡悠美(2014)「皮膚常在細菌叢の変化による皮膚炎発症のメカニズム」第38回阿蘇シンポジウム-微生物と免疫系の共生-, 7月25-26日, (阿蘇リゾートグランヴィリオホテル、熊本県阿蘇市)
13. 松岡悠美(2014)シンポジウム16「自己炎症性疾患とアレルギー」自己炎症性疾患に見られる蕁麻疹様紅斑と肥満細胞 第26回日本アレルギー学会春期臨床大会, 5月9-11日, (国立京都国際会場、京都府京都市)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 悠美 (MATSUOKA, Yumi)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：10402067