

アトピー性皮膚炎発症者に高度に定着する黄色ブドウ球菌と健常者皮膚細菌の菌種間干渉の解析

静岡県立大学食品栄養科学部

島村 裕子

Staphylococcus aureus has been reported to overgrow in the skin of patients with atopic dermatitis. It has been reported that some bacteria in normal human skin have the ability to suppress the growth of *S. aureus* and contribute to the barrier function of the skin. However, the effect of *Corynebacterium* spp., which has a high occupancy in the human skin flora, on the growth and expression of virulence factors of *S. aureus* are unclear. In this study, the effects of *Corynebacterium* spp. on the growth and expression of virulence factors of *S. aureus* were examined. Furthermore, the inhibitory effect of cell free culture medium (CFCM) of *Corynebacterium* spp. on *S. aureus*-induced inflammation was evaluated.

CFCM of *Corynebacterium* isolates ⑥-3 (Cory ⑥-3) significantly suppressed the growth of *S. aureus* in the early stage of culture and the expression of virulence factors RNIII, *hla* and *spa*. When *S. aureus* MVs were added to RBL-2H3 cells, the release rate of β -hexosaminidase was significantly increased. On the other hand, CFCM of Cory ⑥-3 significantly reduced the release of β -hexosaminidase induced by *S. aureus* MVs. *S. aureus* MVs enhanced the expression of normal human epidermal keratinocytes (NHEK) inflammation-inducing genes, and Cory ⑥-3 CFCM significantly suppressed the expression of these genes. Our studies are the first to demonstrate the effect of *Corynebacterium* isolates on the inflammatory responses induced by *S. aureus* MVs in cultured keratinocytes.

1. 緒言

アトピー性皮膚炎 (AD) 患者の皮膚では、常在菌の種類が著しく減り、その過半数を黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) が占める異常な状態が起きていることが報告されている¹⁾。また、*S. aureus* が産生するメンブランベシクル (membrane vesicle; MVs) は、20~400nmの球状構造体であり、ADを悪化させることが知られている^{2,3)}。一方、正常なヒトの皮膚細菌叢は、多様性に富んでいることから、皮膚細菌叢の正常なバランスを維持することがADの予防、悪化防止につながると考えられる。これまでに、ADのモデルマウスでは、*S. aureus* と *Corynebacterium bovis* が皮膚細菌叢の多くを占めていることが報告されている⁴⁾。一方、我々は、成人皮膚常在細菌叢から分離した *Corynebacterium* 属菌の中に、*S. aureus* の増殖を抑制するものが存在することを見出している。しかし、*Corynebacterium* 属菌による *S. aureus* の増殖抑制メカニズムについては明らかになっていない。

そこで、本研究では、AD発症者の皮膚細菌叢について、16Sメタゲノム解析を用いて調査し、皮膚細菌叢の動態および各細菌群の病態への関与を解析した。次いで、AD発症者から得られた *S. aureus* と、健常者の皮膚から分離した *Corynebacterium* 属菌を共培養して、*S. aureus* の増

殖および病原因子の発現の抑制効果について解析した。また、RBL-2H3細胞の β -hexosaminidase放出率を測定することで、*S. aureus*由来分子を含むMVsおよび *Corynebacterium* 属菌の培養液から菌体を除去した cell free condition medium (CFCM) が、I型アレルギー反応である脱顆粒に及ぼす影響を調べた。さらに、マイクロアレイ解析を用いて、表皮角化細胞 (NHEK) の免疫関連遺伝子の発現に対する *S. aureus* MVs および CFCM の影響を網羅的に解析した。将来的には、正常皮膚細菌叢由来の菌体外成分を利用したADに対する新規スキンケア方法の開発を目指す。

2. 方法

2.1. AD発症者の皮膚細菌叢

20代のAD発症者8名(男性2名および女性6名)と、20代の皮膚炎症のない健常者9名(男2名、女7名)の前額より皮膚細菌叢を採取した。Biostic[®] Bacteremia DNA Isolation Kit (MO BIO) を用いてDNAを抽出し、PCRによる16S rRNA遺伝子の増幅を行った。その後、アガロースゲルからのライブラリを調製し、The Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit (Life Technologies) を用いて、Ion PGM[®] sequencer (Life Technologies) で塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、QIIMEを用いて解析した。なお、本研究は、本学研究倫理審査委員会の承認(承認番号29-21)を得て実施した。

2.2. *S. aureus*の増殖および病原因子発現に及ぼす *Corynebacterium*分離株の影響

得られた皮膚細菌叢より、*S. aureus* および *Corynebacterium* 属菌を分離した。*Corynebacterium* 属菌よりCFCMを調製し、AD発症者から分離した *S. aureus* の増殖および病原因子



Interference between *Staphylococcus aureus* showing skin colonization in atopic dermatitis patients and healthy skin bacteria

Yuko Shimamura

School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka

の発現に与える影響を調べた。病原因子は、*S. aureus*のagr制御系によって発現が調節されているRNAIII、*hla* (α毒素)、および*spa* (protein A) 遺伝子を標的とした。

2. 3. *S. aureus*由来MVsの調製

AD発症者から分離した*S. aureus* ①-1をBHI培地に接種し、37℃、110rpmで一晩振とう培養した。菌液を3,000g、15分間で遠心分離後、菌体ペレットを除去した。上清を0.2μmフィルターでろ過後、限外ろ過して、100 kDaで濃縮し、さらに、超遠心機を用いて150,000g、3時間、4℃で超遠心分離し、上清を除去した。PBS 50μLでMVsを懸濁し、タンパク質量を測定後、使用時まで-20℃で保存した。

2. 4. RBL-2H3を用いた脱顆粒試験

24well plateに、RBL-2H3細胞を 2.0×10^5 cells/400 μL/wellとなるように播種し、24時間培養した。培地を除去し、細胞をPBS 500μL/wellで2回洗浄した後、releasing mixture 160μL/well + *S. aureus*由来MVs(0.05μg/μL protein) 20μL/well、または、releasing mixture 160μL/well + *S. aureus*由来MVs (0.1μg/μL protein) 10μL/well + CFCM (0, 0.03, 0.04, 0.05, 0.07, 0.1, 0.2, 0.4 および1.0mg/μL) 10μL/wellを添加し、37℃で10分間インキュベートした。さらに、A23187を終濃度5μMとなるように20μL/wellずつ添加し、37℃で30分間インキュベートした後、10分間氷冷して反応を停止した。培養上清50μLを96well plateに移し、5mM substrate solutionを50μL/wellずつ添加し、37℃で30分間インキュベートした。Stop bufferを200μL/wellずつ添加し、マイクロプレートリーダーにて405nmにおける吸光度を測定した。

2. 5. 正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK) の炎症惹起に対するCFCMの抑制作用

S. aureus MVs (3.5μg/μL protein) およびCFCM (5μg/μL) を添加して培養したNHEKからtotal RNAを抽出した。Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Inc., cat.# 5067-1151) およびAgilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.) を用いてTotal RNAの品質を確認した。NHEKから回収したTotal RNAを用いて、GeneChip™ Scanner 30007G (Thermo Fisher) によるDNAマイクロアレイ (Clariom™ S Assay, human) 解析を行った。

2. 6. CFCM中の脂肪酸のGC分析

約200mgのCFCMの凍結乾燥物または標品として29.85 mgのtuberculostearic acid (終濃度100ppm) に、0.5 M NaOH-CH₃OH溶液1.5mLと、ラウリン酸(内部標準物質) 2mgを加え、100℃のドライブロックバスにて、9分間加

熱した。加熱後、三フッ化ホウ素メタノール錯体メタノール溶液2mLを加え、再びドライブロックバスを用いて100℃で7分間加熱した。冷却後、ジクロロメタン2mLを加え、30秒間攪拌抽出を行った後、3分間超音波で混和した。混和後、飽和食塩水5mLを加えて、軽く振とうし、1,500rpm、10分間で遠心分離した。ジクロロメタン層(下層)を褐色バイアル瓶に採取し、GC-FID測定用試料とした。

3. 結果

3. 1. AD発症者の皮膚細菌叢

16Sメタゲノム解析の結果を、Fig. 1に示した。被験者より採取した前額(Fig. 1(A))と右頬(Fig. 1(B))の皮膚細菌叢では、多くのサンプルで*Propionibacterium*属菌が大部分を占めていた。*S. aureus*を含む*Staphylococcus*属菌は、被験者ごとに占有率が大きく異なった。*Corynebacterium*属菌は、被験者ごとに占有率が大きく異なっていたが、17名中15名の皮膚に存在が確認された。

3. 2. *S. aureus*の増殖および病原因子発現に及ぼす*Corynebacterium*分離株の影響

*Corynebacterium*属菌のCFCM (Cory ①-4, Cory ⑤-1, Cory ⑥-3, Cory ⑦-4, Cory 6-2, Cory 6-5 およびCory 18-4) を添加して培養を行ったところ、*S. aureus*の増殖は有意に抑制された(Fig. 2)。これら7つの菌株は、*rpoB*遺伝子に基づいて作成した*Corynebacterium*分離株の系統樹において、同様のクラスターに含まれていた。また、熱処理した*Corynebacterium*分離株CFCMを*S. aureus*に添加した場合においても、同様の結果が得られた。

そこで、*S. aureus*の増殖を最も抑制したCory ⑥-3 CFCMを添加して、*S. aureus*の病原因子発現に及ぼす影響について調べた。その結果、Cory ⑥-3 CFCMは、*S. aureus*の病原因子であるRNAIII、*hla*および*spa*の遺伝子発現量を有意に抑制した(Fig. 3)。

3. 3. RBL-2H3を用いた脱顆粒試験

A23187を添加し、calcium ionophores刺激により細胞内のCa²⁺を増大させたRBL-2H3細胞の脱顆粒に対する*Corynebacterium*属菌のCFCMおよび*S. aureus* MVsの影響を検討した。その結果、9株の*Corynebacterium*属菌のCFCMの添加によりβ-hexosaminidaseの放出率が有意に減少した(Fig. 4(A))。また、*S. aureus* MVs (Fig. 4(B))の添加によりβ-hexosaminidaseの放出率が有意に増加した(Fig. 4(C))。さらに、*S. aureus* MVsとCory ⑥-3 CFCMを同時に添加したところ、*S. aureus* MVsとPBSを添加した場合と比較して、β-hexosaminidaseの放出率が有意に減少した(Fig. 4(C))。そこで、*S. aureus* MVsによるRBL-2H3細胞の脱顆粒を最も抑制するCory ⑥-3

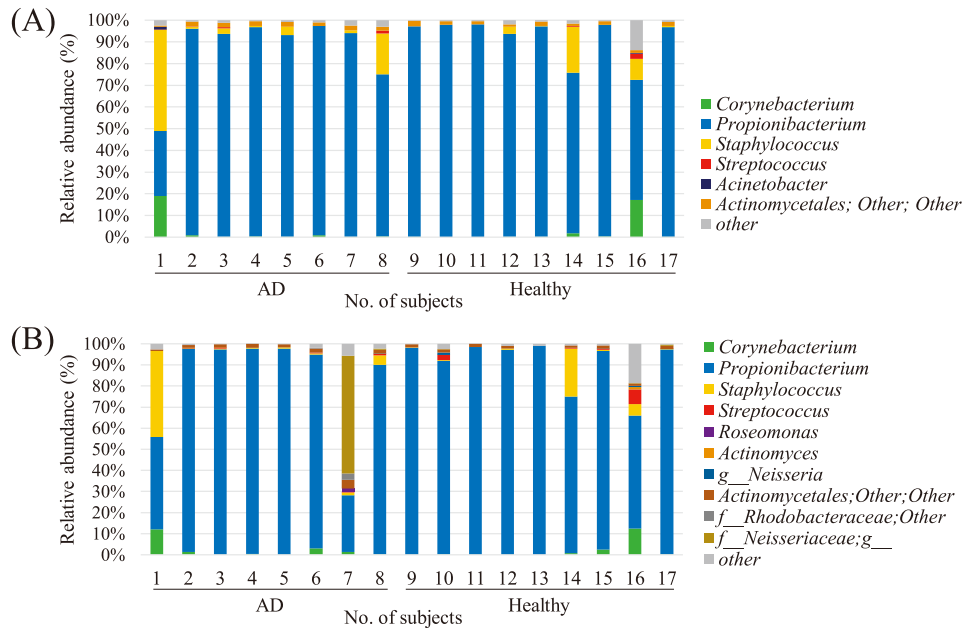


Fig. 1: The skin microbiome composition of patients with atopic dermatitis (AD) and healthy subjects at the genus level. (A) The skin microbiome composition of human forehead. (B) The skin microbiome composition of human cheek. AD: patients with atopic dermatitis, Healthy: healthy subjects.

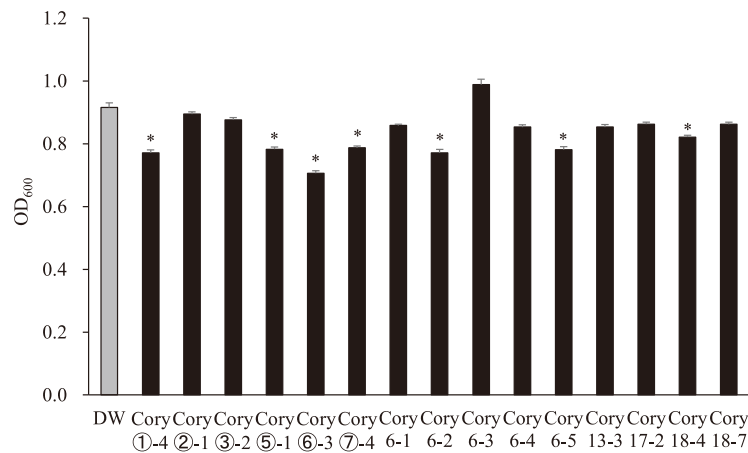


Fig. 2 Effect of *Corynebacterium* CFCM on the growth of *S. aureus*.

The cell concentration was measured by the optical density at 600 nm (OD₆₀₀). Error bars represent SE. Distilled water (DW) was used as a negative control. * represents $p < 0.01$ compared to the DW.

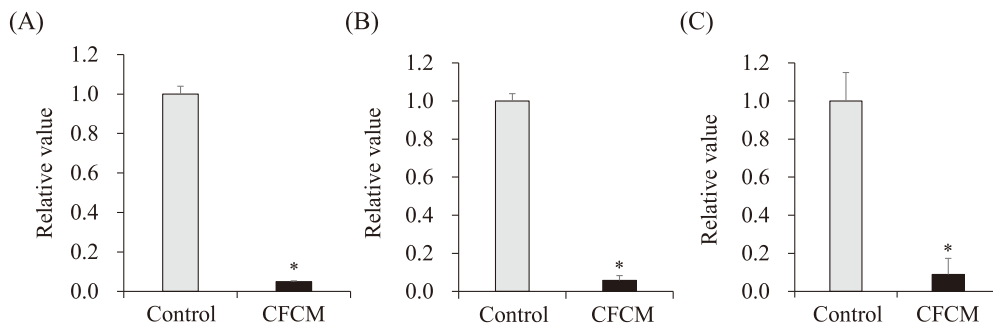


Fig. 3 Effect of *Corynebacterium* CFCM on virulence gene expression.

S. aureus were cultured for 5h with CFCM isolated from *Corynebacterium* spp. Gene expression of RNAIII (A), *hla* (B) and *spa* (C) mRNA was determined by real-time RT-PCR. Distilled water (DW) was used as a negative control. Error bars represent SE. * represents $p < 0.05$ compared to the DW, ** $p < 0.01$ compared to the DW.

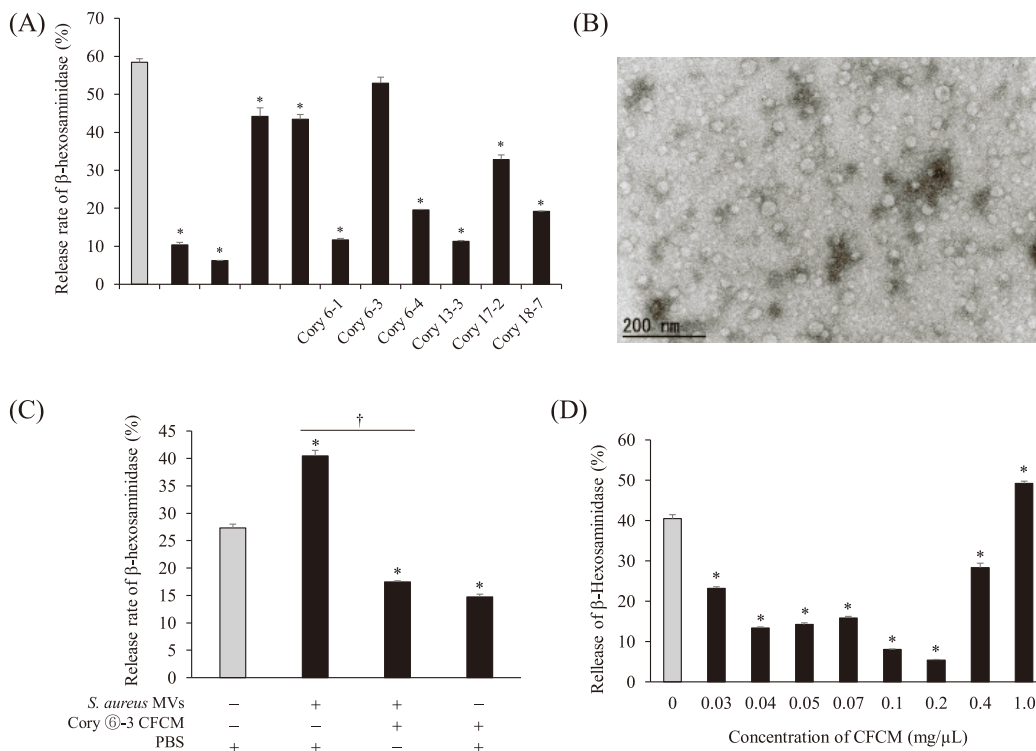


Fig. 4 Inhibitory effect of *Corynebacterium* CFCM on β -hexosaminidase release from RBL-2H3 cells. (A) Inhibitory effect of *Corynebacterium* CFCM on β -hexosaminidase release from A23187-stimulated RBL-2H3 cells. (B) Transmission electron microscopic analysis of *S. aureus* membrane vesicles (MVs). (C) Inhibitory effect of Cory ⑥-3 CFCM on β -hexosaminidase release from *S. aureus* MVs. (D) Concentration dependence of *Corynebacterium* CFCM on inhibition of β -hexosaminidase release from *S. aureus* MVs. *represents $p < 0.01$ compared to the control. † $p < 0.01$; unpaired, two-tailed student's t -test.

CFCMの濃度を検討した。*S. aureus* MVsと共に、0、0.03、0.04、0.05、0.07、0.1、0.2、0.4および1.0mg/ μ LのCory ⑥-3 CFCM凍結乾燥物のPBS溶解液をRBL-2H3細胞に添加し、 β -hexosaminidaseの放出率を測定した。その結果、*S. aureus* MVsと0.2mg/ μ LのCory ⑥-3 CFCM凍結乾燥物のPBS溶解液をRBL-2H3細胞に添加した際に、 β -hexosaminidaseの放出率が最も減少した(Fig. 4(D))。一方、1.0 mg/ μ LのPBS溶解液をRBL-2H3細胞に添加したところ、 β -hexosaminidaseの放出率が増加した(Fig. 4(D))ことから、CFCMの脱顆粒抑制には、最適な濃度が存在すると考えられた。

3. 4. 正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK) の炎症惹起に対するCFCMの抑制作用

S. aureus MVsおよびCory ⑥-3 CFCMがNHEKの免疫関連遺伝子に対して与える影響を網羅的に解析するため、マイクロアレイ解析を行った。各群のサンプルデータにおいて、ratio (= fold-change) > 1.7 および ratio < -0.6 で発現が変動した遺伝子を抽出し、DAVIDのpathway解析に

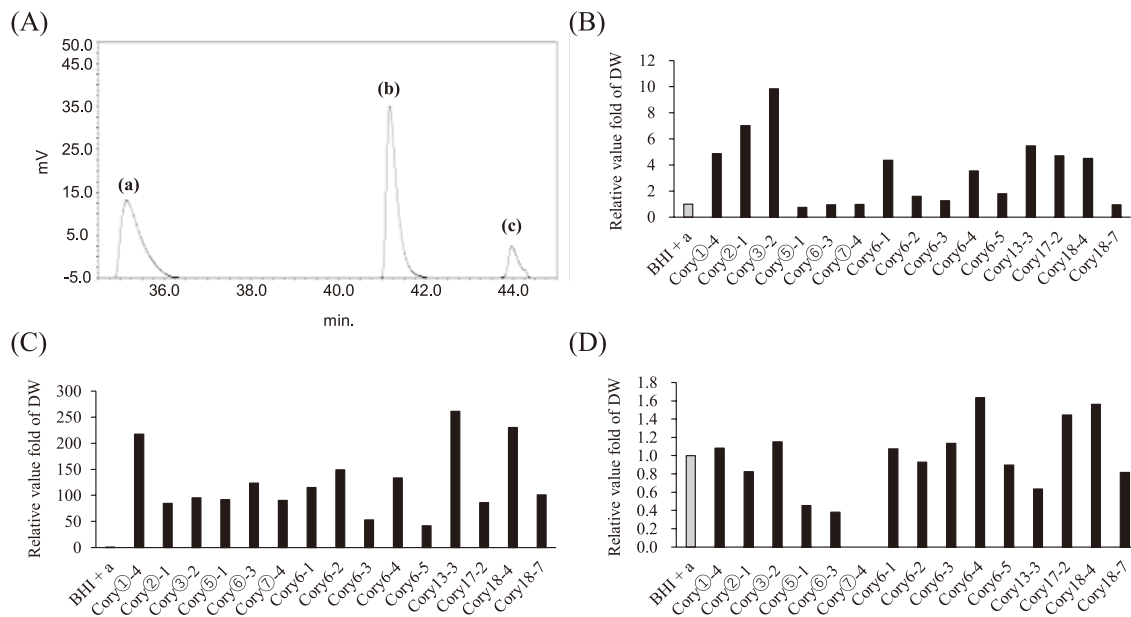
供し、有意な変動が認められる免疫応答系シグナル経路を探索したところ、TNF signaling pathwayおよびCytokine-cytokine receptor interactionが抽出された。*S. aureus* MVs添加群、*S. aureus* MVs + Cory ⑥-3 CFCM添加群およびCory ⑥-3 CFCM添加群のpathway解析結果におけるシグナル経路に含まれる遺伝子のratio (=fold-change)をTable 1に示した。CXCL1、BCL3、IL1B、TNFAIP3、IL22RA1、TNFSF10およびCD40 遺伝子の発現は、*S. aureus* MVs添加群で増加し、NF κ B Inhibitor Alpha) 遺伝子を除き、*S. aureus* MVs + Cory ⑥-3 CFCM添加群で減少した(Table 1)。

3. 5. CFCM中の脂肪酸のGC分析

15菌株の*Corynebacterium*分離株CFCM中に含まれる脂肪酸をGC-FIDによって分析したところ、全てのサンプルにおいて、標準物質溶液(ジクロロメタン)と内部標準物質(ラウリン酸メチル)以外に、3つのピークが検出された(Fig. 5(A))。Tuberculostearic acidの保持時間は44.7分であったが、サンプル由来の検出ピーク中に同一の保持時

Table 1 Summary of differential gene expression in normal human epidermal keratinocytes.

Gene Accession	EntrezGene ID	Gene Symbol	<i>S. aureus</i> MVs	<i>S. aureus</i> MVs + CFCM	CFCM
NM_001511	2919	CXCL1	2.81	2.62	1.57
NM_021258	58985	IL22RA1	2.28	1.81	1.50
NM_005178	602	BCL3	1.91	1.40	1.14
NM_000576	3553	IL1B	1.88	1.63	1.40
NM_001270507	7128	TNFAIP3	1.74	1.51	0.97
NM_020529	4792	NFKBIA	1.71	1.88	1.16
NM_001250	958	CD40	1.71	1.66	1.45

Fig. 5: GC analysis of fatty acids in CFCM from *Corynebacterium* isolate.

(A) GC-FID chromatogram of fatty acid from *Corynebacterium* CFCM (Cory ⑥-3). (a) A peak at retention time (RT) 35.0 min. (b) RT 41.1 min. (c) RT 43.9 min. (B) Comparison of relative abundances of fatty acid from *Corynebacterium* CFCM of the peak at RT 35.0 min, (C) RT 41.1 min, and (D) RT 43.9 min. Relative abundances were calculated from peak areas in gas chromatograms (n = 2).

間のものは存在しなかったことから、*Corynebacterium* 分離株CFCM中に含まれる脂肪酸の中には、tuberculostearic acidは存在しないことが示唆された。

得られた3つのピークの脂肪酸について、凍結乾燥物の質量と内部標準物質のクロマトグラムによって面積値の補正を行い、BHI+α培地中に含まれる脂肪酸量を1として、*Corynebacterium* 分離株CFCM中に含まれる脂肪酸量を相対比較した。各種*Corynebacterium* 分離株CFCM中に含まれる脂肪酸量を相対比較したところ、菌種による差は認められなかった(Fig. 5 (B) - (D))。

4. 考察

*S. aureus*は、AD発症者の皮膚で異常増殖することが報告されており¹⁾、菌体自体やその産生物がADを悪化させることが示唆されている^{2,3)}。これまでに、一部の正常ヒト皮膚常在細菌は、*S. aureus*の増殖抑制能を有し、皮膚のバリア機能に寄与することが報告されているが、ヒト皮膚細菌叢における占有率が高い*Corynebacterium*属菌⁵⁾が*S. aureus*に与える影響については明らかになっていない。そこで、本研究では、*Corynebacterium*属菌が*S. aureus*の増殖および病原因子の発現に与える影響、さらに*S.*

aureus 誘導性ADに対する作用について調べた。

Corynebacterium 分離株由来CFCMを *S. aureus* に添加して培養したところ、*Corynebacterium* 分離株⑥-3 (Cory ⑥-3) のCFCMにおいて、*S. aureus* の培養初期段階における増殖および病原因子であるRNAIII、その下流遺伝子である *hla* および *spa* の発現を有意に抑制した。RNAIII 遺伝子は、*agr* 制御系遺伝子群の発現を調節している⁶⁾ ことから、Cory ⑥-3 の菌体外成分がquorum sensing機構を阻害している可能性が考えられた。また、calcium ionophores で前処理したRBL-2H3細胞に *S. aureus* MVs を添加したところ、β-hexosaminidase の放出率が有意に増加し、脱顆粒を誘導した。一方、Cory ⑥-3 のCFCMは、*S. aureus* MVs が誘導したβ-hexosaminidase の放出を有意に減少させ、脱顆粒反応を抑制した。マイクロアレイ解析の結果、*S. aureus* MVs は、NHEKの炎症誘導関連遺伝子の発現を亢進させ、Cory ⑥-3 CFCMは、これら遺伝子の発現を有意に抑制した。これらの結果より、*S. aureus* MVs は、NHEKの炎症誘導に関連する遺伝子を増大させ、それに対して、Cory ⑥-3 の菌体外成分は、*S. aureus* MVs 自体に作用することで、炎症反応の増悪を抑制している可能性が示唆された。15菌株の *Corynebacterium* 分離株CFCM中に含まれる脂肪酸をGC-FIDによって分析したところ、菌種による差は見られなかったことから、*S. aureus* の増殖および病原因子の発現抑制には、脂肪酸以外の物質が関与している可能性が考えられた。

5. 総括

本研究の成果より、ヒト皮膚常在細菌である *Corynebacterium* 属菌の菌体外成分は、*S. aureus* の増殖および病原因子の発現を抑制することを明らかにした。さらに、*Corynebacterium* 属菌の菌体外成分は、*S. aureus* MVs による脱顆粒およびAD様皮膚病変の誘発を抑制することが示唆された。今後、

Corynebacterium 属菌の菌体外成分を明らかにすることにより、*S. aureus* 誘導性ADに対する正常ヒト皮膚常在細菌を利用した新規スキンケア方法の開発が望まれる。

(引用文献)

- 1) Kong, H., Oh, J., Deming, C., Conlan, S., Grice, E., Beatson, M., Nomicos, E., Polley, E., Komarow, H., Murray, P., Turner, M., Segre, J.: Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res.*, **22**: 850-859 (2012).
- 2) Wang, X., Thompson, C., Weidenmaier, C., Lee J.: Release of *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles and their application as a vaccine platform. *Nature Commun.*, **9**: 1-13 (2018).
- 3) Gurung, M., Moon, D., Choi, C., Lee, J., Bae, Y., Kim, J., Lee, Y., Seol, S., Cho, D., Kim, S., Lee, J.: *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death. *PLoS ONE*, **6**: 1-8 (2011).
- 4) Kobayashi, T., Glatz, M., Amagai, A., Nagao, K.: Dysbiosis and *Staphylococcus aureus* colonization drives inflammation in atopic dermatitis. *Immunity*, **42**: 756-766 (2015).
- 5) Grice, E., Segre, J.: The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**: 244-253 (2011).
- 6) Vuong, C., Saenz, L., Götz, F., Otto, M.: Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Dis.*, **182**: 1688-1693 (2000).