

学 位 論 文 の 要 旨

アトピー性皮膚炎に係る黄色ブドウ球菌に対する表皮ブドウ球菌併用ファージセラピー
Staphylococcal phage therapy in combination with Staphylococcus epidermidis for Staphylococcus aureus-associated atopic dermatitis.

氏 名 島 守 祐 月 印

アトピー性皮膚炎患部の皮膚細菌叢の特徴のひとつとして、健全な皮膚細菌叢では稀にしか単離されない黄色ブドウ球菌が過剰増殖して優勢となる現象がみられる。その原因の詳細は解明されていないが、アトピー性皮膚炎の重症度と黄色ブドウ球菌の定着の程度について相関があることや、黄色ブドウ球菌の産生する毒素がアトピー性皮膚炎の炎症を悪化していることが報告されている。

本研究では、ヒトの皮膚細菌叢において有益な共生細菌である表皮ブドウ球菌を併用したバクテリオファージを利用した治療（ファージセラピー）を提案した。これまで、ファージセラピーには様々な解決すべき課題があり実用化には至っていなかった。本研究では、ファージセラピーの抱える課題の解決に努めることと、表皮ブドウ球菌併用ファージセラピーのアトピー性皮膚炎に対する治療効果を評価することを目的とし、アトピー性皮膚炎における黄色ブドウ球菌感染治療法の確立を目指した。第1章では、ファージセラピーの背景などを解説した。

第2章では、ファージの単離及び特徴付けについて報告した。まず初めに、岐阜県の下水からアトピー性皮膚炎由来臨床分離株黄色ブドウ球菌に感染するファージ SaGU1 を単離した。SaGU1 は Myoviridae の溶菌ファージであり、ゲノム解析により 140,909 bp の 2 本鎖 DNA のゲノムを持つことがわかった。次に、単離した SaGU1 が表皮ブドウ球菌併用ファージセラピーに適性のあるファージであること確かめるための試験を行った。ファージセラピーに課せられた課題のうち、次の 3 つの課題に沿いながら SaGU1 の特徴付けを行った。1 つめの課題は、SaGU1 が治療薬としての安全性を持つことである。ゲノム解析における遺伝子のアノテーションにおいては、SaGU1 にコードされた遺伝子はいずれも毒性遺伝子や薬剤耐性遺伝子は該当しなかった。この結果より、SaGU1 はコードする遺伝子配列的に安全であるファージであることが確認された。2 つめの課題は、SaGU1 が適正な宿主域を持つことである。SaGU1 は宿主域試験において、アトピー性皮膚炎由来臨床分離株黄色ブドウ球菌 19 株のうち 17 株に感染し、表皮ブドウ球菌を含む他の細菌種には感染しなかった。本研究においては黄色ブドウ球菌特異的に感染し、表皮ブドウ球菌には感染しない宿主域のファージが求められるが、SaGU1 はこの条件を満たすファージであることが確認された。3 つめの課題は、SaGU1 が投与された患部において殺菌効果を維持できる

安定性を持つことである。SaGU1 は 4°C から 40°C および pH 4 から pH 10 の条件下で安定した宿主溶菌活性を示した。よって、SaGU1 はアトピー性皮膚炎の患部である表皮上で溶菌活性を保つことが出来る安定性を持つことが確認された。以上の結果より、SaGU1 がアトピー性皮膚炎に対する表皮ブドウ球菌併用ファージセラピーに適性のあるファージであると確認した。

第3章では、SaGU1 を用いて、*in vitro* 及び *in vivo* でのファージセラピー試験を行った。本章においてはファージセラピーの重要な課題の一つであるファージ耐性菌の発生に着目し、表皮ブドウ球菌 10F-1 との併用による治療効果だけでなく SaGU1 耐性黄色ブドウ球菌 24L-1 に対する抑制効果について評価した。*In vitro* 感染実験では、SaGU1 の投与量に関わらずアトピー性皮膚炎臨床分離株黄色ブドウ球菌 24L-1 株を検出限界以下まで殺菌したが、培養開始 14 時間後には SaGU1 を添加した全ての試験区において SaGU1 耐性黄色ブドウ球菌が発生した。SaGU1 は健常者由来表皮ブドウ球菌 10F-1 株の生育には影響しなかった。また黄色ブドウ球菌 24L-1 株に対して 100 倍の表皮ブドウ球菌 10F-1 株を混合培養した場合には、培養開始から 24 時間後の黄色ブドウ球菌 24L-1 株の菌数は表皮ブドウ球菌を混合培養しなかった試験区と比較して 100 分の 1 程度少なかった。この結果より、表皮ブドウ球菌が黄色ブドウ球菌の増殖を阻害したと示唆された。

黄色ブドウ球菌 24L-1 株と表皮ブドウ球菌 10F-1 株を混合培養した状態に SaGU1 を加えた場合 (SaGU1・表皮ブドウ球菌 10F-1 株併用試験) では、黄色ブドウ球菌 24L-1 株に対して MOI 1000 の SaGU1 と 100 倍の表皮ブドウ球菌 10F-1 を併用すると、培養開始 24 時間後まで SaGU1 耐性黄色ブドウ球菌 24L-1 株が検出されなかった。*In vivo* 感染実験では、DNFB 誘発アトピーモデルマウスを使った動物実験を行った。背面皮膚にアトピー性皮膚炎由来黄色ブドウ球菌臨床分離株を感染させたマウスに対して、SaGU1 と表皮ブドウ球菌 10F-1 株は、単用及び併用投与においてそれぞれ有意に黄色ブドウ球菌の菌数を抑制した。また、アトピー性皮膚炎の指標の一つである血中総 IgE 値の測定試験では、SaGU1 と表皮ブドウ球菌 10F-1 株は有意に総 IgE 値を下げ、この結果は背面表皮の肥厚観察結果と相関がみられた。*in vivo* 感染実験では SaGU1 と表皮ブドウ球菌 10F-1 株の単用投与と併用投与の結果に有意差は見られず、また併用投与による症状の悪化を初めとする悪影響も無かった。このように *in vitro* 試験において SaGU1 と表皮ブドウ球菌 10F-1 株の併用治療は、ファージ耐性黄色ブドウ球菌 24L-1 株の増殖を有意に抑制し、ファージセラピーの重要な課題の一つであるファージ耐性菌の増殖に対して有効な抑制効果を示すことが出来た。

本研究の結果より、表皮ブドウ球菌併用ファージセラピーは、ファージセラピーのアトピー性皮膚炎の治療法としての可能性を見出しただけでなく、ファージ耐性菌に対する有効な増殖抑制法の一つとなる可能性も示すことができた。

学 位 論 文 の 要 旨

アトピー性皮膚炎に係る黄色ブドウ球菌に対する表皮ブドウ球菌併用ファージセラピー
Staphylococcal phage therapy in combination with Staphylococcus epidermidis for Staphylococcus aureus-associated atopic dermatitis.

Name Yuzuki Shimamori 印

One of the characteristics of the skin bacterial microbiome in the affected area of Atopic Dermatitis (AD) is the overgrowth and predomination of *Staphylococcus aureus*, opportunistic bacteria rarely presented in healthy skin. Although the underlying mechanism remains unknown, some reports suggested a strong correlation between the severity of AD and the degree of *S. aureus* colonization, and the toxin produced by *S. aureus* exacerbates the inflammation of AD. In this study, I proposed a bacteriophage-based treatment (phage therapy) in combination with phage and *Staphylococcus epidermidis*, which is a beneficial symbiotic bacterium in the human skin flora. Up to now, phage therapy has various problems to be solved and has not been put into practical use yet in most countries. In this study, I tried to overcome a few problems of phage therapy and evaluate therapeutic potential of phage by combination with *S. epidermidis* for controlling *S. aureus* growth in AD. In Chapter 1, the background of phage therapy was described.

In Chapter 2, from the sewerage in Gifu prefecture, I isolated a novel phage, SaGU1, that infects various clinical strains of *S. aureus* found in AD patients. SaGU1 was a lytic phage belonging to the Myoviridae family with a 140,909 bp double-stranded DNA genome of which sequence was determined by next-generation sequencing. According to the genome annotation, none of the toxic or drug resistance gene was carried by SaGU1. Therefore, SaGU1 was considered safe for phage therapy. Next, the lytic properties of the phage and its host range were analyzed. SaGU1 infected 17 of the 19 *S. aureus* isolated AD patients and did not infect *S. epidermidis*. Finally, the stability of its lytic properties at administered area was examined. Since SaGU1 showed stable lytic activity under the conditions of 4°C to 40°C and pH 4 to pH 10, I concluded that SaGU1 could maintain lytic activity on the AD affected area. All of my results above suggested that SaGU1 was suitable for phage therapy for AD skin.

In Chapter 3, SaGU1 was used to perform *in vitro* and *in vivo* phage therapy trials with *S. epidermidis* 10F-1 isolated from healthy individual and AD clinical isolate, *S.*

aureus 24 L-1. Firstly, I focused on the development of SaGU1-resistant *S. aureus* during phage treatment, which is one of the most important issues in phage therapy. I discussed the therapeutic effect of SaGU1 on the combination of *S. epidermidis* 10F-1 and the inhibitory effect of *S. epidermidis* 10F-1 on SaGU1-resistant *S. aureus* 24L-1. At *in vitro* study, *S. aureus* 24L-1 was lysed to below the detection limit by any dose of SaGU1. SaGU1-resistant *S. aureus* appeared at 14 hours after the start of culture. SaGU1 did not affect the growth of *S. epidermidis* 10F-1. Under the addition of *S. epidermidis* 10F-1 with ratio of 100:1 to *S. aureus* 24L-1, the growth of *S. aureus* 24L-1 was suppressed. Fortunately, with SaGU1 (MOI=1000) under the cultivation of *S. epidermidis* 10F-1 with ratio of 100:1 to *S. aureus* 24L-1, SaGU1-resistant *S. aureus* 24L-1 was not detected until 24 hours after the start of culturing. This result indicated that *S. epidermidis* 10F-1 suppressed the development of SaGU1-resistant *S. aureus*. For *in vivo* study, animal experiments were performed using DNCB-induced AD model mice. On the dorsal skin of mice infected with AD-derived *S. aureus* 24L-1, SaGU1 and *S. epidermidis* 10F-1 significantly suppressed *S. aureus* 24L-1 in both of single-administration of SaGU1 and combination of SaGU1 and *S. epidermidis*. In addition, the total blood IgE level of SaGU1 and *S. epidermidis* 10F-1 administrated AD mice was significantly reduced. In addition, the IgE level was associated with the thickening of the dorsal skin of the AD mice. In conclusion, I found that phage therapy strategy combined with SaGU1 and *S. epidermidis* has the potential as a therapeutic method for AD.