

# 修 士 論 文

## 皮膚常在菌が分泌する膜小胞の 皮膚恒常性機構への影響

令和3年3月

三重大学大学院 生物資源学研究科

生物圏生命科学専攻 海洋生命分子化学講座

水圏材料分子化学研究室

大野 勇樹

# 目 次

## 略語一覧

緒 論	1
第 1 章 皮膚常在菌由来膜小胞の回収と膜小胞の形態観察	6
1.1. 実験材料と実験方法	7
1.2. 結 果	10
1.3. 考 察	16
第 2 章 <i>St. epidermidis</i> 由来膜小胞の細胞内吸収と表皮細胞への影響	19
2.1. 実験材料と実験方法	20
2.2. 結 果	24
2.3. 考 察	33
第 3 章 皮膚常在菌由来膜小胞の免疫細胞への影響	37
3.1. 実験材料と実験方法	38
3.2. 結 果	41
3.3. 考 察	43
総 括	48
参考文献	51
謝辞	60

## 略 語 一 覽

American Type Culture Collection: ATCC

*C. acnes*-derived MVs: CA-MVs

Caspase 14: CASP14

Claudin 1: CLDN1

Cornified cell envelope: CE

*Cutibacterium acnes*: *C. acnes*

Dendritic cell: DC

Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM

Enhanced chemiluminescence: ECL

Extracellular vesicles: EVs

Filaggrin: FLG

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: GAPDH

Human adult Ca<sup>2+</sup> Temperature: HaCaT

Human Cell Line Activation Test: h-CLAT

Human  $\beta$ -defensin: hBD

Hyaluronan synthase 2: HAS2

Interleukin: IL

Involcurin: IVL

Keratin: KRT

Loricrin: LOR

Membrane vesicles: MVs

Nanoparticle tracking analysis: NTA

Natural moisturizing factor: NMF

Nitric oxide: NO

Occludin: OCLN

Phosphate-buffered saline: PBS

PKH67 Green Fluorescent Cell Linker: PKH67

Polyvinylidene difluoride: PVDF

Scanning electron microscope: SEM

Sodium dodecyl sulfate: SDS

SDS-Poly Acrylamide gel Electrophoresis: SDS-PAGE

*Staphylococcus epidermidis*: *St. epidermidis*

*St. epidermidis*-derived MVs: SE-MVs

*Staphylococcus aureus*: *S. aureus*

Tight junction protein 1: TJP1

Toll-like receptor: TLR

Transglutaminase 1: TGM1

Transmission electron microscope: TEM

## 緒 論

真核生物，古細菌，細菌，ウイルスを含む多くの微生物がヒトの体内および体表面にてマイクロバイオータ（微生物叢）と呼ばれる集団を形成し，互いにバランスを保ちながら生息している<sup>1)</sup>。これらヒトの微生物叢は，宿主の健康状態および病態に深く関与していることから，微生物叢のゲノムや微生物叢とヒトの相互作用を意味するマイクロバイオーームが近年大きな注目を浴びている<sup>2-4)</sup>。代表的な一例として，腸内における細菌叢の変化が，宿主の消化管疾患，自己免疫疾患，代謝疾患，神経疾患発症を惹起することが報告されている<sup>5)</sup>。このような各種疾患の発症を防ぐため，整腸作用<sup>6)</sup>，免疫機能調節<sup>7)</sup>，心疾患予防作用<sup>8)</sup>など様々な機能を示す乳酸菌を用いたプロバイオティクスが適用され，ヒトの健康維持における共生微生物の重要度が高くなっている<sup>9)</sup>。

ヒトの最大の臓器ともいわれる皮膚にも腸管と同様に多くの微生物が存在し，叢を形成している。ヒトの皮膚は成人で 1.6~1.8 m<sup>2</sup> であり，一見，平滑に見えるが無数の細かい皮溝が存在し，汗腺，脂腺，毛包などの付属器を備えて微生物の住処を生み出している (Fig. 1)<sup>10)</sup>。皮膚表面構造や各付属器の密度は，頭部から足先に至るまで大きく異なり，紫外線，気温，湿度といった外的要因によって皮膚の pH や皮脂量といった微小環境に変化が生じ，皮膚常在菌（以下，常在菌）の構成に大きな影響を及ぼしている<sup>10)</sup>。ヒトの皮膚には 10<sup>6</sup>~10<sup>9</sup>/cm<sup>2</sup> もの常在菌が存在しており，健康体の 20~65 歳では常在菌は少なくとも 19 門から構成されている。その構成は，放射菌門 (*Actinobacteria*, 51.8%)，フィルミクテス門 (*Firmicutes*, 24.4%)，プロテオバクテリア門 (*Proteobacteria*, 16.5%)，バクテロイデス門 (*Bacteroidetes*, 6.3%) が主となっている (Fig. 2)<sup>11,12)</sup>。さらに，各門には様々な菌種が存在しており，ニキビの原因菌として知られる

*Cutibacterium acnes* (以下, *C. acnes*) は放射菌門に属し (Fig. 2), 世間一般では悪玉菌として捉えられている。ホルモン分泌の乱れといった何らかの要因によって皮脂分泌が過剰になると毛穴が塞がり, これに伴う嫌気的環境が生じることで *C. acnes* は過剰に増殖する。これにより, *C. acnes* からのヒアルロニダーゼやリパーゼ, プロテアーゼといった各酵素群の作用が高まることでニキビの悪化を加速させる<sup>11)</sup>。しかし普段は, 皮脂腺から分泌される皮脂を代謝することでグリセリンやオレイン酸, リノール酸, リノレン酸といった不飽和脂肪酸を主とした遊離脂肪酸を産生することで皮膚の保湿や弱酸性環境を保ち, ヒトの皮膚恒常性に必須な存在である<sup>13)</sup>。フィルミクテス門には, *Staphylococcus epidermidis* (以下, *St. epidermidis*) および *Staphylococcus aureus* (以下, *S. aureus*) が属する (Fig. 2)。*St. epidermidis* は美肌菌として知られており, *C. acnes* と同様に, 皮脂腺から分泌される皮脂を代謝することで皮膚環境の安定に寄与している。皮膚環境の安定には免疫機能が大きく関与しており, 有害微生物といった病原体を排除する際には Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) を介した自然免疫反応が働く。ヒトでは 10 種類もの TLR が存在し, その中でも, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 および TLR6 は細胞表面において微生物由来の糖, 脂質, タンパク質をそれぞれ認識し, 侵入微生物に対する免疫応答シグナルの伝達を行う<sup>9,14)</sup>。*St. epidermidis* が持つリポタイコ酸は, TLR2 を介して TLR 炎症シグナルの抑制因子として働く腫瘍壊死因子受容体関連因子 1 の発現を増加させ, TLR3 を介して引き起こされる過剰な炎症を適度に抑え, 傷の治癒に寄与する<sup>15)</sup>。また, *St. epidermidis* が分泌する 10 kDa 以下のリポタンパク質が, TLR2 を介して抗菌ペプチドであるヒト  $\beta$ -ディフェンシン 2 (human  $\beta$ -defensin 2, hBD2) および hBD3 の分泌や, 細胞溶解能力を高めることで微生物に対する抗菌能力を増強する<sup>16)</sup>。しかし, *St. epidermidis* はコアグララーゼやエンテロトキシンといった毒素分泌が

比較的少なく、病原性は低いとされているが、自己溶菌酵素、フィブリノーゲン結合タンパク質によって組織やカテーテルなどの人工物表面に定着し、院内感染の原因となるネガティブな一面も持っている<sup>17)</sup>。*S. aureus* は食中毒の原因菌として有名であるが、アトピー性皮膚炎患者の皮膚表面に多く存在し、菌膜表面に発現するリポタイコ酸や毒素の一つであるエンテロトキシンの過剰分泌がアトピー症状の重症化を誘導している<sup>18)</sup>。この他にも、表皮細胞からのインターロイキン-5 (interleukin-5, IL-5), IL-6, IL-8, IL-10 の分泌を刺激し、中でも IL-6 は角化細胞の分化に関与するケラチン 1 (keratin1, KRT1), KRT10, ロリクリン (loricrin, LOR) およびフィラグリン (filaggrin, FLG) の発現を抑制することで表皮のバリア機能を崩壊させる<sup>19)</sup>。

このように常在菌は、生息地である皮膚の環境を制御する。さらにこれら常在菌は、生息地を共有にする自らとは異なる菌種に対しても様々な影響を及ぼす。前述した *C. acnes* は、皮脂に富んだ嫌気条件下において過剰に増殖しニキビ悪化を引き起こすが、それを抑えるかのように *St. epidermidis* は皮脂を代謝することで有機酸のひとつであるコハク酸を産生し、*C. acnes* のさらなる増殖を阻害する<sup>20)</sup>。また、細胞外セリンプロテアーゼを分泌することで黄色ブドウ球菌のバイオフィルムやコロニーの形成を阻害する<sup>21)</sup>。この他にも、細菌から分泌される細胞外小胞 (extracellular vesicles, EVs) の一つである膜小胞 (membrane vesicles, MVs) も細菌同士の相互作用分子として機能している<sup>22)</sup>。細菌から分泌される MVs の大きさは、おおよそ 20~400 nm であり、DNA, RNA といった核酸物質やタンパク質などを内包している。細菌由来の MVs は 50 年以上も前から研究されており、内包物輸送による細菌間コミュニケーションや、自身の増殖および生存維持に関与していることが報告されている<sup>23)</sup>。ヒトにも、細菌由来の MVs とよく似た EVs の一つであるエクソソームと呼ばれる膜小胞が存在し (Fig. 3),

細胞間コミュニケーションツールとして機能しており, 細胞の増殖<sup>24)</sup>, 分化<sup>25)</sup>, ガン化<sup>26)</sup>など様々な生命現象に関与している<sup>27,28)</sup>。近年, 黄色ブドウ球菌が分泌する EVs がアトピーのような皮膚炎症を引き起こすという報告がされ<sup>18)</sup>, EVs によるヒト-細菌間の相互作用が確認されている。そこで本研究では, 有用皮膚常在菌が分泌する MVs は皮膚機能の恒常性に寄与するのではないのかと作業仮説をたて, 美肌菌である表皮ブドウ球菌が分泌する MVs の特徴とその皮膚恒常性機能への影響について検討した。

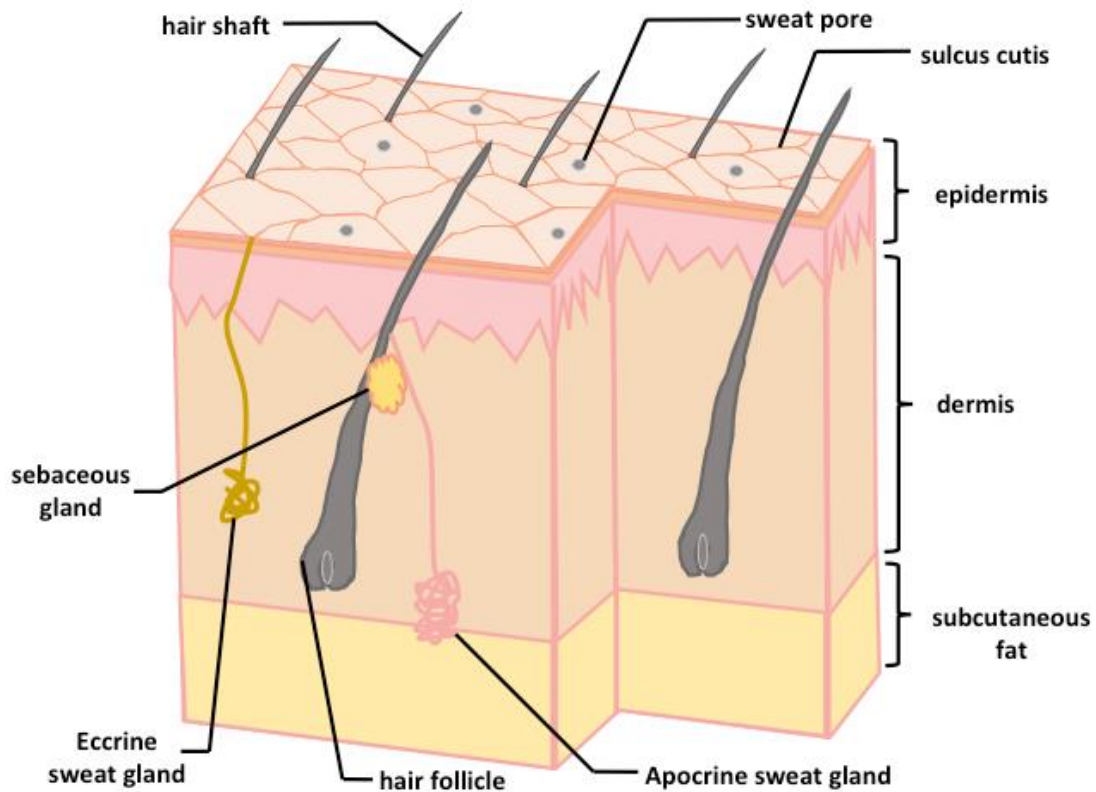


Figure 1. Structure and layers of the human skin.<sup>10)</sup>



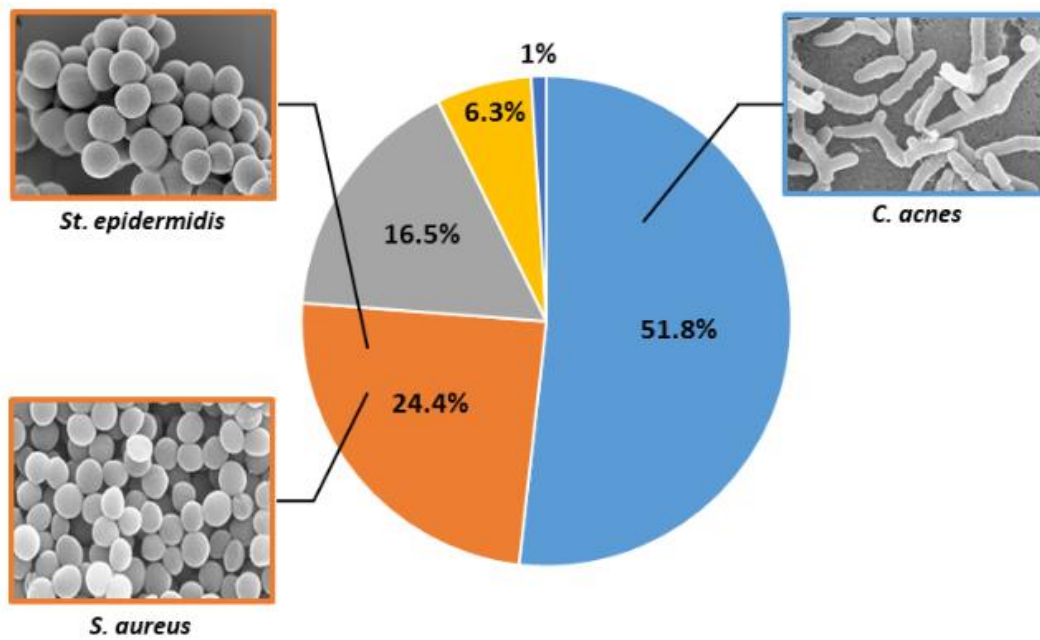


Figure 2. Composition of skin microbes.<sup>11,12)</sup>

■ Actinobacteria ■ Firmicutes ■ Proteobacteria ■ Bacteroidetes ■ others

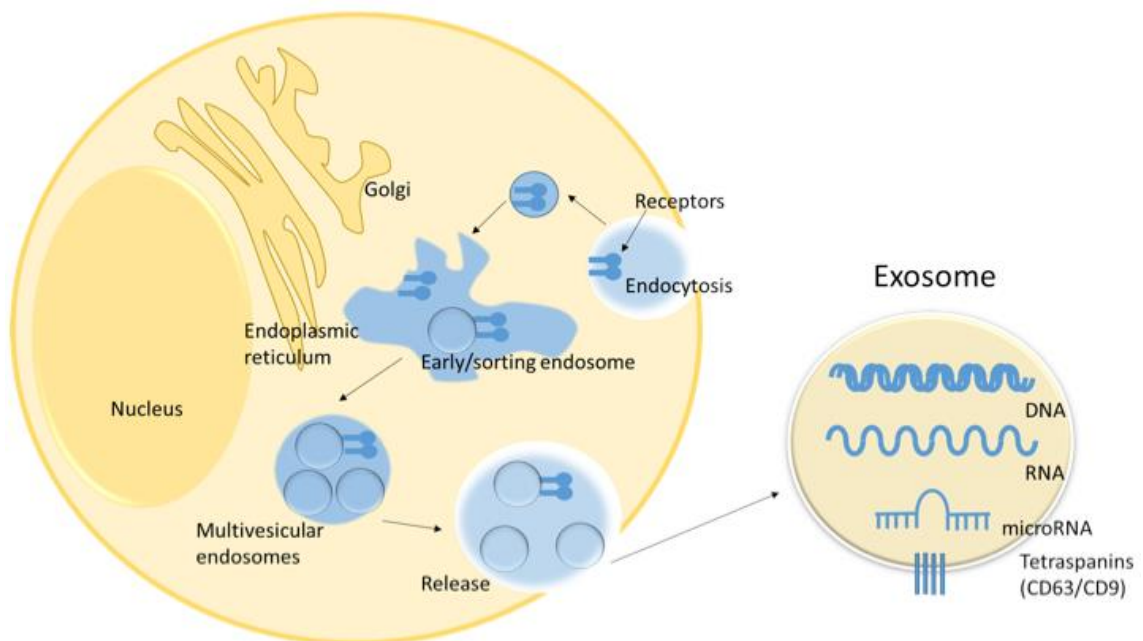


Figure 3. Secretory pathway of exosomes.<sup>27)</sup>

## 第1章 皮膚常在菌由来膜小胞の形態学的特徴

細菌は、海、土壌、動植物を含む自然環境の至るところに生育し<sup>29)</sup>、高温（122°C）環境<sup>30)</sup>や低 pH（pH 0.06）環境<sup>31)</sup>といった逸脱した環境に順応する種が存在する<sup>32)</sup>。また、細菌の中には宿主細胞に対する接着分子を増強することで感染能を高め、宿主細胞への毒素輸送を亢進することで病巣を拡大するなど、多細胞生物とは大きく異なった生存戦略を保持している<sup>29)</sup>。しかし興味深いことに、細菌は自らの生存維持のために多細胞生物が分泌するエクソソームと非常によく似た膜小胞（membrane vesicles, MVs）を分泌していることが知られている<sup>33)</sup>。細菌由来の MVs は、細胞膜成分に覆われた大きさ約 400 nm 以下の球状粒子であり<sup>23)</sup>、細菌間で小胞内に含まれる核酸やタンパク質などを送達する役割を持ち、クオラムセンシング<sup>22)</sup>といった相互作用に寄与している<sup>23)</sup>。近年、皮膚常在菌である黄色ブドウ球菌が EVs を分泌し、テープストリッピングによって剥離されたマウス皮膚細胞に対してアトピーのような皮膚炎症を誘発するという報告から<sup>18)</sup>、細菌由来の分泌小胞が宿主細胞に対して影響を及ぼすことが明らかになった。

そこで我々は、*Staphylococcus epidermidis*（以下、*St. epidermidis*）や *Cutibacterium acnes*（以下、*C. acnes*）といった皮膚常在菌が、皮膚環境の安定をもたらす作用機序の一つとして、これら細菌が分泌する MVs が皮膚細胞の恒常性を保つ機構に影響を及ぼしているのではないかと推察した。本章では、*St. epidermidis* および *C. acnes* の分泌状況を透過型および走査型電子顕微鏡で観察し、MVs の粒子径およびゼータ電位を測定することで形態学的特徴を調べた。

## 1.1. 実験材料および実験方法

### 1.1.1. *St. epidermidis* および *C. acnes* の培養

本研究で使用した *St. epidermidis* 菌株 (NBRC 12993) および *C. acnes* 菌株 (NBRC 107605) は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (木更津市, 千葉県) より入手した。121°Cで滅菌処理をした Tryptic Soy 液体培地 (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) に *St. epidermidis* を接菌し, 30°Cの好気条件下で振盪培養した。*C. acnes* は GAM 液体培地 (日水製薬株式会社, 東京都) に接菌し, アネロパック・CO<sub>2</sub> (三菱ガス化学株式会社, 東京都) を用いた 37°Cの嫌気条件下で振盪培養した。

### 1.1.2. *St. epidermidis* および *C. acnes* が分泌する膜小胞 (microvesicles, MVs) の調製

各培養菌液を 5,000 × g, 4 °C, 10 分間の条件で高速冷却遠心分離機 (CR22G III, 工機ホールディングス株式会社, 東京都) に供し, 菌体を除去した。上清回収後, 100,000 × g, 4°C, 60 分間の条件で超遠心分離機 (Optima™ TLX Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Atlanta, GA, USA) に供し, 各菌の MVs を得た。その後, 回収した MVs は 200 μL のリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS (-), pH 7.4) で溶解し, 0.45 μm DISMIC® Filter (Advantec®, アドバンテック東洋株式会社, 東京都) を用いて精製した。MVs のタンパク質濃度は, ウシ血清アルブミン (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を標準物質として, DC Protein Assay キット (Bio-Rad) を用いて測定した。

### 1.1.3. 菌体 (*St. epidermidis*, *C. acnes*) および回収 MVs の形態学的観察

#### 1.1.3.1. 透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscope, TEM) 試料の作製

菌体を 2.5% グルタルアルデヒド (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪府) にて 4°C で 24 時間前固定した。試料を 0.1 M PBS (-) で洗浄後, 遠心にてペレットを作製し, 1% 四酸化オスミニウムにて室温で 2 時間後固定した。試料を 0.1 M PBS (-) で洗浄後, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% および無水の各エタノール溶液を用いて 20 分間ずつ室温にて脱水した。次にプロピレンオキサイドで 30 分間置換後, 50% Epon mixture (エポキシ樹脂) に一昼夜浸漬, 引き続いて 100% エポキシ樹脂に 2 時間浸漬後, 包埋し, 60°C で 72 時間重合した。60~70 nm の超薄切片を作製, 酢酸ウラニール・鉛の二重電子染色を施し, 透過型電子顕微鏡 (Hitachi-7650, 株式会社日立ハイテク, 東京都) にて観察した。

#### 1.1.3.2. 走査型電子顕微鏡 (Scanning electron microscope, SEM) 試料の作製

TEM 観察と同様に 2.5% グルタルアルデヒドで固定した菌体をポリ-L-リジンでコートしたカバーガラス上に滴下し, 後固定, 脱水は透過型電子顕微鏡試料作製法と同様に行った。乾燥した試料を真空下, プラチナ-パラジウム (Pt-PD) で 3 nm のコートを試行後, 走査型電子顕微鏡 (Hitachi-S-5000, 株式会社日立ハイテク) にて観察した。

#### 1.1.3.3. 菌体から回収した MVs の走査型電子顕微鏡試料の作製

培養上清から超遠心分離法で回収した MVs は、TEM 観察と同様に 2.5% グルタルアルデヒドで固定した。次にポリ-L-リジンでコートした径 3  $\mu\text{m}$  のポリエチレンビーズ上に滴下した。以後は、1.1.3.2 項に準じて処理し観察を行った。

#### 1.1.4. *St. epidermidis* および *C. acnes* が分泌した MVs の粒子径測定

超遠心分離法にて回収した MVs サンプルを 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈し、MVs のブラウン運動を Nanosight NS300 (NanoSight, Amesbury, UK) で観察、録画した。解析は、その動画により Nanoparticle tracking analysis (NTA, Version 2.3, Build 0034, NanoSight) を用いて溶液中に含まれる粒子の大きさ、濃度を算出した。

#### 1.1.5. *St. epidermidis* および *C. acnes* が分泌した MVs のゼータ電位測定

可変型ナノポア NP200 (85~500 nm) (Fig. 1-1) を qNano (メイワフォーシス株式会社, 東京) に装着し、キャリブレーションサンプル CPC200 (メイワフォーシス) を用いてゼータ電位の校正を行った。その後、超遠心分離法にて回収した MVs を PBS (-) にて懸濁後 qNano に供し、ゼータ電位の測定を行った。

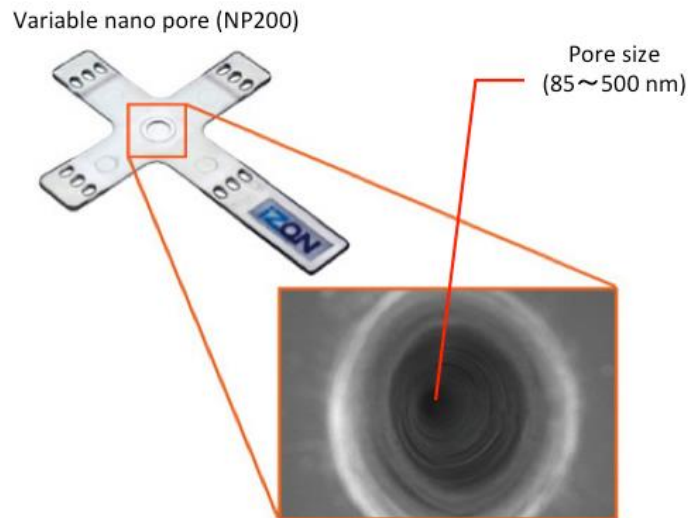


Figure 1-1. Structure of variable nano pore.<sup>34)</sup>

## 1.2. 結 果

### 1.2.1. 菌体 (*St. epidermidis*, *C. acnes*) および回収 MVs の形態学的観察

培養した *St. epidermidis* および *C. acnes* からの MVs 分泌を TEM にて観察した。その結果、菌体の核様態、リボソーム、貯蔵顆粒の存在および細胞壁からの MVs の分泌を確認した (Figs. 1-2, 1-3)。次に、両菌体からの MVs 分泌および超遠心分離法により回収した MVs の形態を SEM にて観察した。SEM 観察の結果、TEM 観察の結果と同様、両菌体の細胞壁からの MVs の分泌を確認した (Fig. 1-4A)。回収した *C. acnes* 由来の MVs (*C. acnes*-derived MVs, 以下, CA-MVs) は大きさにばらつきがある像であったが、*St. epidermidis* 由来の MVs (*St. epidermidis*-derived MVs, 以下, SE-MVs) は CA-MVs と比較して大きさが均一であった (Fig. 1-4B)。

### 1.2.2. *St. epidermidis* および *C. acnes* が分泌した MVs の粒子径測定

回収した各細菌由来 MVs の SEM 観察において、菌体の由来によって粒子サイズの違いが確認されたため、Nanosight NS300 を用いて粒子径測定を行った。SE-MVs は 80 nm をピークとし、平均粒子径が 101 nm であった (Fig. 1-5)。一方、CA-MVs は 76, 135, 184 nm の 3 点にピークを持つ平均粒子径が 166 nm の MVs であった。SE-MVs と比較すると、平均粒子径では 1.5 倍ほどの違いがあった (Fig. 1-5)。

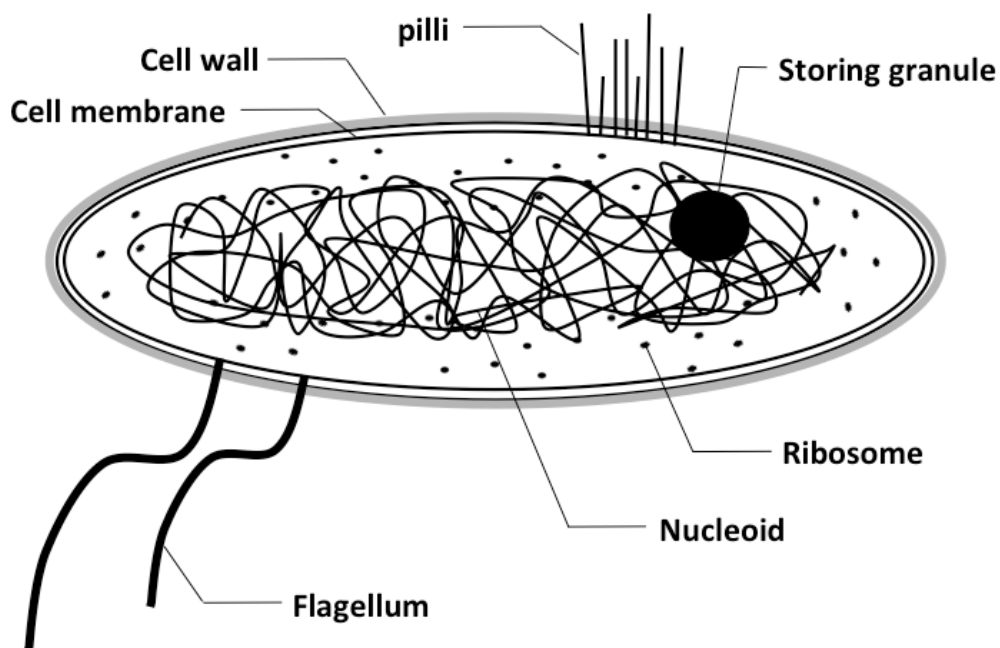
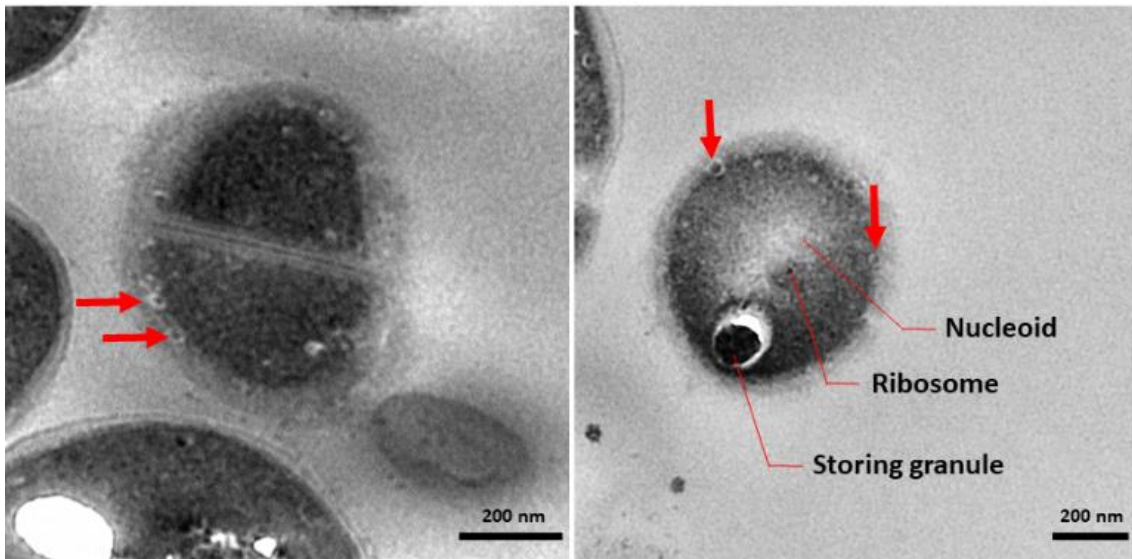


Figure 1-2. Structure of bacterial cell.<sup>35)</sup> In the bacterial cell, the chromosomal DNA exist as the nucleoid unlike eukaryotic cells. Other organelle such as ribosome and storing granule are surrounded by cell membrane and cell wall which acts as barrier to protect them.

***St. epidermidis***



***C. acnes***

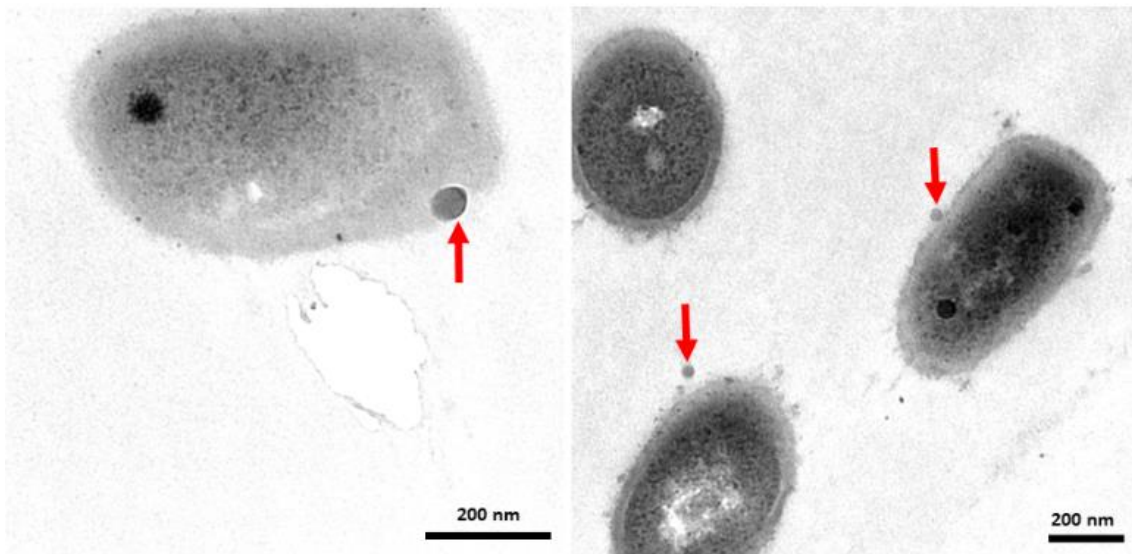
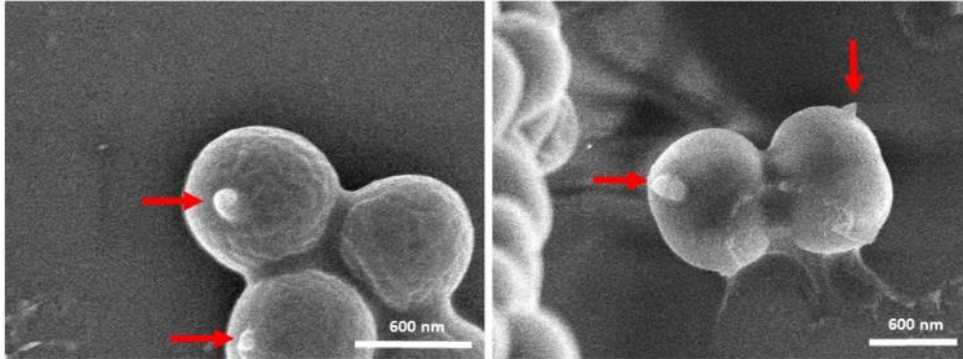


Figure 1-3. Membrane vesicle secretion from *St. epidermidis* and *C. acnes* was respectively observed using transmission electron microscope. Scale bar, 200nm. Arrow: MV.

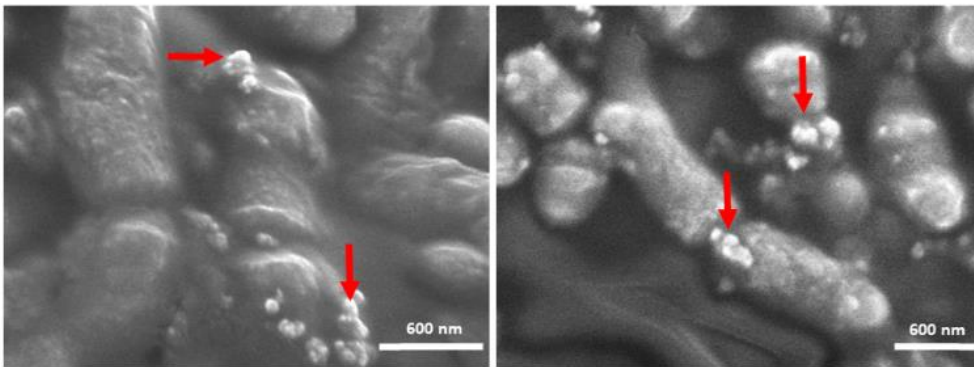


**(A) Bacterial cells**

*St. epidermidis*



*C. acnes*



**(B) Secreted-MVs**

*St. epidermidis*

*C. acnes*

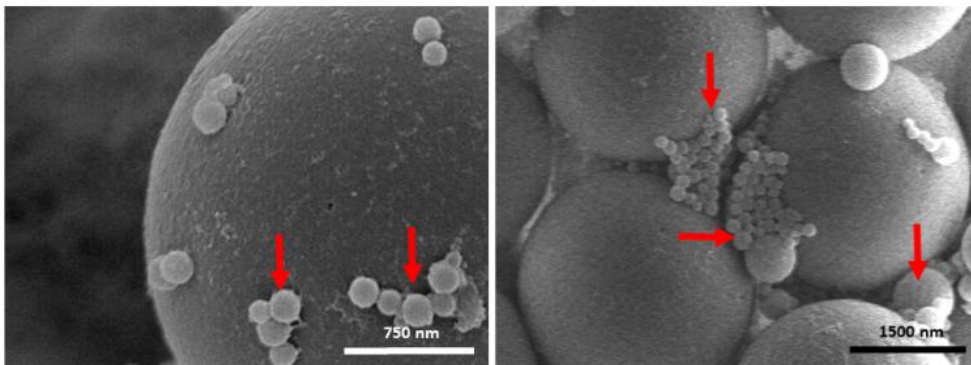


Figure 1-4. Scanning electron microscope observation of bacterial cells and secreted-MVs. (A) Secretion of MVs from *St. epidermidis* and *C. acnes*. Scale bar: 600 nm. (B) Secreted-MVs derived from *St. epidermidis* and *C. acnes*. MVs were attached to 3  $\mu\text{m}$  polyethylene beads. Arrow: MV.

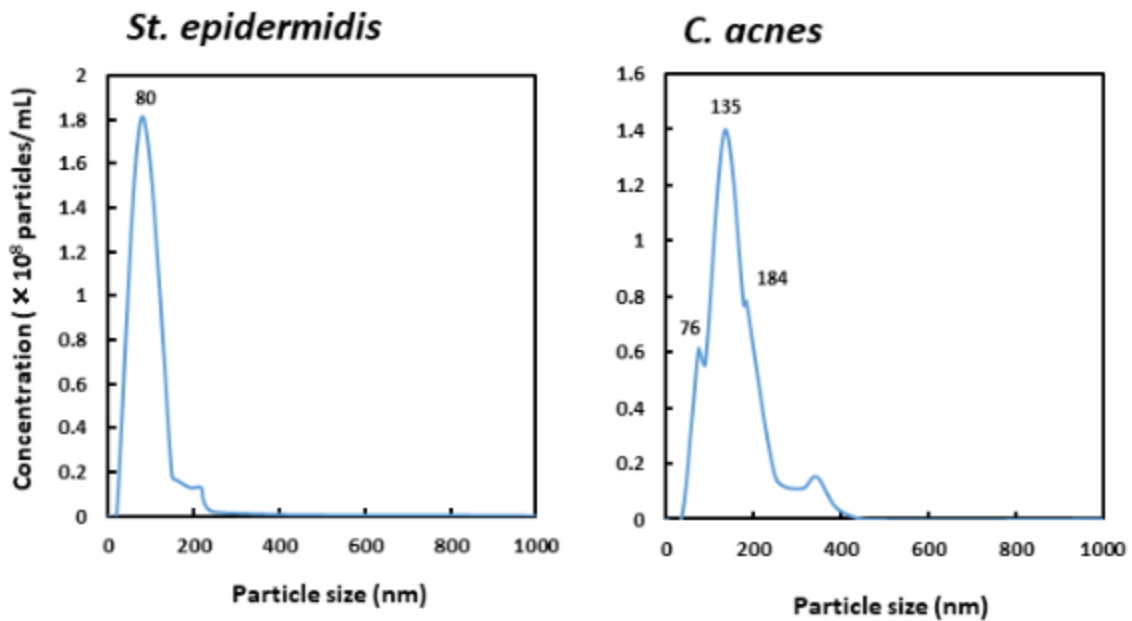


Figure 1-5. The size profiles of MVs isolated from *St. epidermidis* and *C. acnes*. Particle size distribution was analyzed using Nanosight NS300 (NanoSight, Amesbury, UK). Then, the record was analyzed using nanoparticle tracking analysis (NTA, Version 2.3, Build 0034, NanoSight) to calculate size distribution and vesicle concentration.

### 1. 2. 3. *St. epidermidis* および *C. acnes* が分泌した MVs のゼータ電位測定

超遠心分離法により調製した MVs 溶液の分散安定性を確認するために、qNano を用いて測定を行った。SE-MVs は平均粒子径が 106 nm で、平均ゼータ電位が -12 mV であった。一方、CA-MVs は平均粒子径が 129 nm で平均ゼータ電位が -7.3 mV であった (Fig. 1-6)。平均粒子径が 1. 2. 2 項の Nanosight による測定と同様に、SE-MVs よりも CA-MVs のほうが大きかった。また、両 MVs の間で平均ゼータ電位に差があり、SE-MVs のゼータ電位の絶対値は CA-MVs と比較して大きかった (Fig. 1-6)。

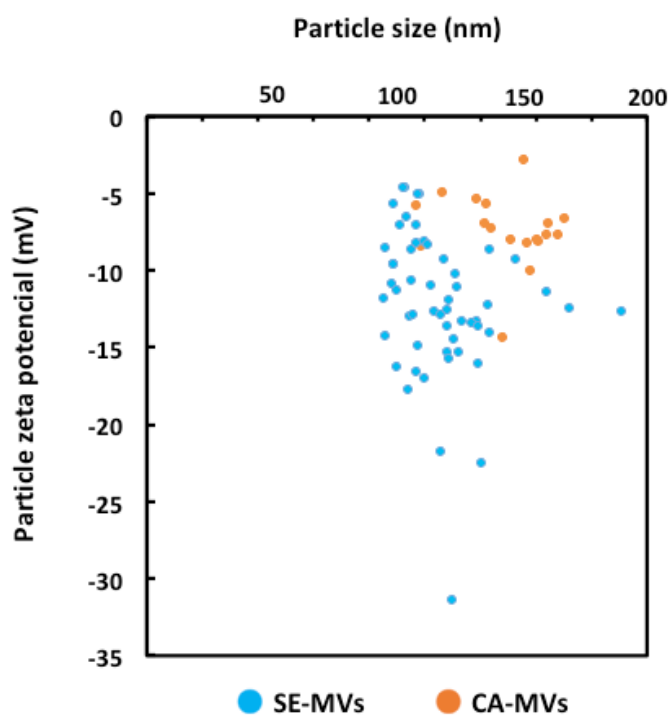


Figure 1-6. Zeta potential and particle size of MVs isolated from *St. epidermidis* and *C. acnes*. qNano equipped with NP200 was calibrated using CPC200. Then, electrical potential at the slipping plane and particle size of MVs were analyzed using qNano (pH 6.8).

### 1.3. 考 察

皮膚常在菌である *St. epidermidis* および *C. acnes* の MVs 分泌を確認するため、両菌体を TEM および SEM にて観察を行った。その結果、*St. epidermidis* および *C. acnes* とともに、細胞壁から出芽するように MVs を形成していることが確認され、*C. acnes* から分泌が観察された MVs は大きさが異なった (Figs. 1-3, 1-4A)。また、*St. epidermidis* は一点から一つの MVs を分泌するのに対し、*C. acnes* は一点から複数の MVs を分泌していることが明らかとなった (Fig. 1-4A)。グラム陽性菌は、細胞壁に分厚いペプチドグリカン層を有している (Fig. 1-7)。Fig. 1-3A において、*St. epidermidis* は細胞壁が湾曲するように MVs を形成しているように見えるが、三次元の強固な構造をもったペプチドグリカンが湾曲するとは考えにくい。豊福らは Cryo-TEM 観察により、グラム陽性菌である枯草菌 (*Bacillus subtilis*) が細胞内で産生されたエンドリシンにより細胞壁のペプチドグリカン層に穴を開け、その穴を通じて MVs が形成されることを報告している<sup>36)</sup>。枯草菌と同様なメカニズムによって *St. epidermidis* および *C. acnes* も MVs を形成し、分泌しているのではないかと考えられ、今後 Cryo-TEM などによってより詳細に分泌形態について検証する必要がある。

豊福らは、細菌由来の MVs は大きさが約 400 nm 以下の球状粒子であるということを示している<sup>23)</sup>。*St. epidermidis* および *C. acnes* の TEM と SEM 観察にて、SE-MVs と CA-MVs の粒径サイズに違いがあったため (Fig. 1-4B)、ナノ粒子解析システムを用いて MVs の粒子径を測定した。その結果、SE-MVs は 80 nm をピークとし、平均粒子径が 101 nm の均一な小胞であった。一方、CA-MVs は 76, 135, 184 nm の 3 点にピークを持つ平均粒子径が 166 nm の多様な小胞の集団であり、MVs の SEM 観察の像と一致した (Figs. 1-4B, 1-5)。

菌体の SEM および TEM 観察にて、MVs が細胞膜と細胞壁を經由して形成されることを確認したため、MVs 膜表面には多数の糖鎖が結合した複合糖質が存在すると推測された (Fig. 1-7)。それら複合糖質は MVs 膜表面の電荷に大きく関与するため、Zetasizer Nano を用いて調製した MVs のゼータ電位を測定した。その結果、SE-MVs と CA-MVs の間でゼータ電位に差があり、SE-MVs のゼータ電位の絶対値のほうが大きかった (Fig. 1-6)。ゼータ電位の絶対値が増加すると、粒子同士の反発が強くなり粒子の安定性も高くなるため、CA-MVs よりも SE-MVs のほうが分散度の高い安定した粒子であると考えられた。

本章の実験で、皮膚常在菌である *St. epidermidis* および *C. acnes* が、200 nm 以下の MVs を分泌していることや粒子径およびゼータ電位の違いを確認した。ゼータ電位測定の結果から、SE-MVs と CA-MVs の膜に含まれる複合糖質の種類や量が異なると考えられたため、今後プロテオーム解析や糖鎖解析によってより詳細な MVs の特徴をさらに解析する必要がある。

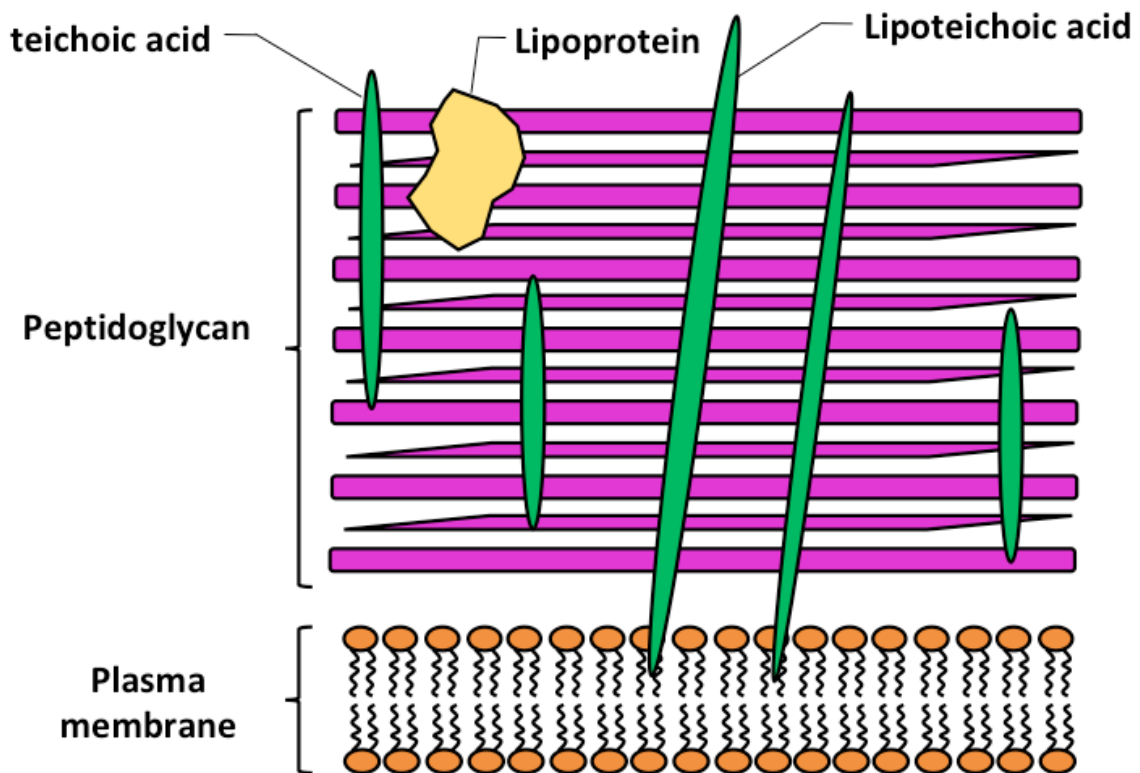


Figure 1-7. Structure of cell wall and plasma membrane of gram-positive bacteria.<sup>37)</sup>

The gram-positive bacterial cell wall is composed of thick peptidoglycan layer, lipoteichoic acid, teichoic acid and lipoprotein complex.

## 第2章 *St. epidermidis* 由来 MVs の細胞内吸収と表皮細胞への影響

ヒトの最大の臓器とも呼ばれる皮膚上には、 $10^6 \sim 10^9/\text{cm}^2$ もの常在菌が叢をなして存在している<sup>11)</sup>。代表的な皮膚常在菌である *St. epidermidis* および *C. acnes* は、皮脂腺から分泌される皮脂を資することでグリセリンやオレイン酸、リノール酸、リノレン酸を主とした遊離脂肪酸を産生し、皮膚の保湿や弱酸性環境を保つためヒトの皮膚恒常性に必須な存在である<sup>13)</sup>。しかし、皮膚常在菌の中には、正常表皮ヒト角化細胞において皮膚バリア機能分子であるフィラグリン (*filaggrin, FLG*)、ケラチン1 (*keratin1, KRT1*)、*KRT10*、ロリクリン (*loricrin, LOR*) の発現を抑制し、表皮バリアを破壊する黄色ブドウ球菌のような病原菌が存在する<sup>19)</sup>。この黄色ブドウ球菌が分泌する細胞外小胞 (extracellular vesicles, EVs) が、マウス皮膚細胞においてアトピーのような皮膚炎を誘発することが Hong らにより示され<sup>18)</sup>、常在菌の MVs がヒトの皮膚バリア機構の制御に関わっていることが注目されている。

本章では、皮膚の保湿および弱酸性環境をもたらす、美肌菌として知られる *St. epidermidis* が分泌する MVs は、表皮バリア機能を強化するような作用を示すのではないかと作業仮説を立て、SE-MVs の表皮角化細胞への取り込みと、取り込まれた MVs が皮膚バリア機能に及ぼす影響について検討した。

## 2.1. 実験材料および実験方法

### 2.1.1. 細胞培養

ヒト表皮角化細胞株 (Human adult Ca<sup>2+</sup> Temperature cell, 以下, HaCaT 細胞) は, American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA) より入手した。HaCaT 細胞の角化誘導培養には, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM/ HIGH GLUCOSE, 高カルシウムイオン濃度 (1.8 mM Ca<sup>2+</sup>), GE Healthcare UK Ltd., Amersham Place, England) を, 角化未誘導培養には, EpiLife™ medium (低カルシウムイオン濃度 (0.06 mM Ca<sup>2+</sup>), Thermo Fisher Scientific) をそれぞれ用いて, 37°C, 95%空気-5%CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。両培地には, 10%ウシ胎児血清, 50 U/mL ペニシリン, 50 µg/mL ストレプトマイシン (以上 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を添加した。

### 2.1.2. *St. epidermidis* が分泌した MVs の HaCaT 細胞への取り込み

PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) 中の PKH67 cell linker 液と Diluent C 液を混合し, 4×10<sup>-6</sup> M の蛍光色素液を調製した。1.1.2 項で調製した SE-MVs 溶液と等量の蛍光色素液を混合し, 25°C で 5 分間静置した。その後, 等量の 1%ウシ血清アルブミン (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を添加し反応を停止した。

LAB-TEK® II Chamber Slide (Thermo Fisher Scientific) に HaCaT 細胞 (2.0×10<sup>5</sup> cells/mL) を 0.5 mL 播種し 37°C で培養した。コンフルエント後, 蛍光標識 MVs を 5 µL 添加し, 24 時間 37°C で培養した。24 時間後, Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) を終濃度が 50 µg/mL, CellMask Orange plasma membrane stain (Thermo Fisher Scientific) を終濃度が 5 µg/mL となるように, それぞれチャン



バースライド中の培地に添加し、核および細胞膜を染色した。その後、Black Slide Separator (Thermo Fisher Scientific) を用いてガラススライドを分離し、Pro Long™ Glass Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) をスライドに滴下した後にカバーガラスを被せた。カバーガラスは Covergrip™ Coverslip Sealant (コスモバイオ株式会社, 東京都) を用いて固定した。観察スライドは、蛍光顕微鏡 BZ-800 (キーエンス株式会社, 大阪府) にて蛍光観察を行った。

### 2. 1. 3. *St. epidermidis* が分泌した MVs 刺激による HaCaT 細胞の皮膚バリア機能分子の遺伝子発現への影響

#### 2. 1. 3. 1. 全 RNA の抽出

HaCaT 細胞 ( $2 \times 10^5$  cells/mL) を 6 ウェルマルチプレートに 2 mL ずつ播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、95% 空気-5%  $\text{CO}_2$  環境下で 1 週間培養した。その後、SE-MVs (終濃度: 10 または 100 ng/mL) を培地に添加した。刺激から 72 時間後、6 ウェルマルチプレートを PBS (-) で洗浄し (0.5 mL  $\times$  3 回)、TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を 1 mL 加え、セルスクレーパーで細胞を回収した。その後、クロロホルムを 200  $\mu\text{L}$  を加え、遠心分離 (8,100  $\times g$ , 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ) を行った。上清を別のチューブに移し 2-プロパノールを 500  $\mu\text{L}$  加え、10 分間室温で放置して遠心分離 (8,100  $\times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) を行った。遠心後、ペレットに 75% エタノールを 500  $\mu\text{L}$  加え、遠心分離 (5,000  $\times g$ , 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ) を行った。ペレットを 30 分間室温で乾燥させ、DEPC water を 180  $\mu\text{L}$  加え、沈殿物を溶解させた。溶解後、10 $\times$ Buffer を 20  $\mu\text{L}$  と DNase を 2  $\mu\text{L}$  加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間インキュベートした。1 時間後、酢酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪府) を 40  $\mu\text{L}$  とフェノール-クロロホルムを 150  $\mu\text{L}$  を加え、遠心分離 (13,500  $\times g$ , 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ) を行った。遠心後、上清にエタノールを 800  $\mu\text{L}$  加え、遠心分離 (13,500  $\times g$ , 30 min,  $4^\circ\text{C}$ ) を行った。遠

心後、ペレットに 75%エタノールを 500  $\mu\text{L}$  加え洗浄し、遠心分離 (13,500  $\times g$ , 15 min, 4°C) を行った。その後、ペレットを 1 時間室温で乾燥させ、DNase-RNase free water を 20  $\mu\text{L}$  加え、全 RNA 溶液サンプルを作製した。全 RNA 溶液サンプルの RNA 濃度を NanoDrop Lite 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) により測定し、RNA 濃度が 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  になるように DNase-RNase free water で濃度を調整した。

### 2. 1. 3. 2. 逆転写反応

High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) に構成される 2 $\times$ RT Buffer (10  $\mu\text{L}$ ) と 20 $\times$ RT Enzyme Kit (1  $\mu\text{L}$ ) を混合させた RT master mix に、全量が 20  $\mu\text{L}$  になるように RNA サンプル (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  調整済み, 2. 1. 3. 1 項) を 1  $\mu\text{L}$ , DNase-RNase free water を 8  $\mu\text{L}$  加えた。次に、Veriti 96 well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) を用いて、RNA から cDNA への逆転写反応を 37°C で 60 分 (逆転写反応), 95°C で 5 分 (逆転写酵素の熱失活), 4°C (冷却) で行った。

### 2. 1. 3. 3. リアルタイム PCR

Power SYBR Green PCR master mix (Thermo Fisher Scientific) を 10  $\mu\text{L}$ , DNase-RNase free water を 6.4  $\mu\text{L}$ , cDNA サンプル溶液を 2  $\mu\text{L}$ , DNase-RNase free water で 5 倍希釈した 10  $\mu\text{M}$  の各プライマー (タカラバイオ株式会社, 滋賀県, Table 1) を 0.8  $\mu\text{L}$  加えたものを組成とし、リアルタイム PCR 反応液を作製した。Fast Optical 48-well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific) に 20  $\mu\text{L}/\text{well}$  入れ、プレートに 48-well Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific) で覆った。その後、Step One Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて PCR 反応を行い、mRNA 発現量を測定した。PCR 条件は Holding Stage ; 95°C で 10 分, Cycle

Stage ; 95°Cで15秒, 60°Cで1分を45サイクル行い, Melt Curve Stage ; 95°Cで15秒, 60°Cで1分とした。PCR後, 内部標準遺伝子を *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (以下, *GAPDH*) とし, 比較  $C_t$  法によって相対的定量を行った。

**Table 1. Primer sequences for quantitative real-time PCR.**

<i>Gene</i>	Primer sequences	
	Forward	Reverse
<i>BLMH</i>	5'-GGTGAAGACCATGGCCACAA-3'	5'-AGGGCAGTATCACTCAGCCAAAG-3'
<i>CASP14</i>	5'-CAGCACCAGGCTGGAAGTCA-3'	5'-GCTGGATGTGCCCGTAGGTTA-3'
<i>CLDN1</i>	5'-CAGCTGGCTGAGACACTGAAGA-3'	5'-AAGGCACTGAACCACATGAAGGTA-3'
<i>FLG</i>	5'-TCACGTGGCAGTCCTCACAG-3'	5'-AGTGTCTAAACCCGGATTCACCATA-3'
<i>HAS2</i>	5'-GGCATCAGATAATGCCACCAAAG-3'	5'-TTTCAGGCGGATGCACAGTAAG-3'
<i>IVL</i>	5'-GGCCCTCAGATCGTCTCATACAA-3'	5'-ACCTAGCGGACCCGAAATAAGTG-3'
<i>KRT10</i>	5'-ACTGATAATGCCAACATCCTGCTTC-3'	5'-GCGCAGAGCTACCTCATTCTCA-3'
<i>LOR</i>	5'-GGCTGCATCTAGTTCTGCTGTTTA-3'	5'-CAAATTTATGACTGAGGCACTGG-3'
<i>OCN</i>	5'-AGTGCCACTTTGGCATTATGAGA-3'	5'-CTTGTGGCAGCAATTGGAAAC-3'
<i>TGMI</i>	5'-TGGCCAGGAGYGYGAAGTACAGA-3'	5'-CACTGTTTCATTGCCTCCAATGTC-3'
<i>TJPI</i>	5'-ATAAAGTGCTGGCTTGGTCTGTTG-3'	5'-GCACTGCCCACCCATCTGTA-3'

#### 2.1.4. 統計処理

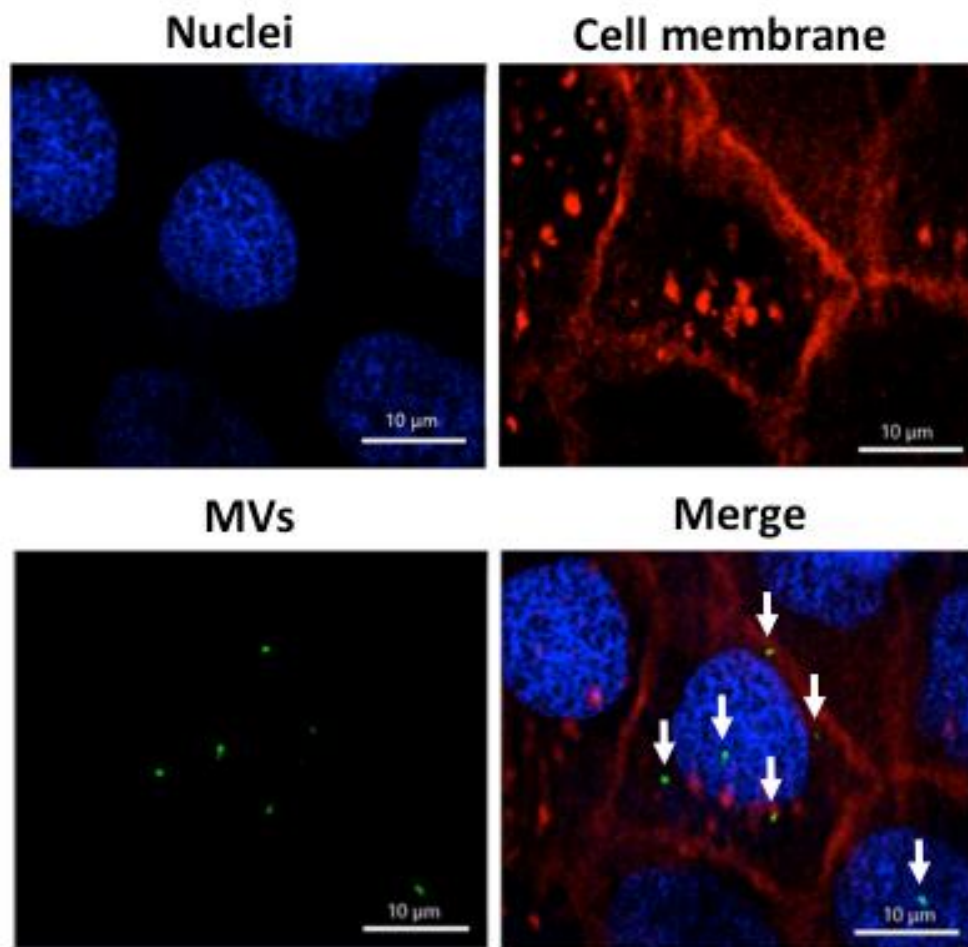
測定値は, 平均±標準誤差で示した。多群間の処理は Tukey-Kramer 法 ( $p < 0.05$ ) により, それぞれ有意差の検定を行った。

## 2.2. 結 果

### 2.2.1. ヒト表皮角化細胞株への *St. epidermidis* 分泌 MVs の取り込み

分化を繰り返し、表皮を形成する HaCaT 細胞において、SE-MVs が皮膚恒常性機能に何らかの貢献を資するためには細胞に取り込まれなくてはならない。そこで、核を Hoechst33342、細胞膜を CellMask、SE-MVs の脂質膜を PKH67 Green Fluorescent Cell Linker（以下、PKH67）にてそれぞれ蛍光染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、HaCaT 細胞の細胞内に PKH67 の緑色の蛍光を示す MVs の点在を確認した (Fig. 2-1A)。また、三次元観察において MVs が HaCaT 細胞の細胞膜を通過し、核表面に位置しているのを観察した (Fig. 2-1B)。

**(A)**



**(Figure 2-1 continued)**

**(B)**

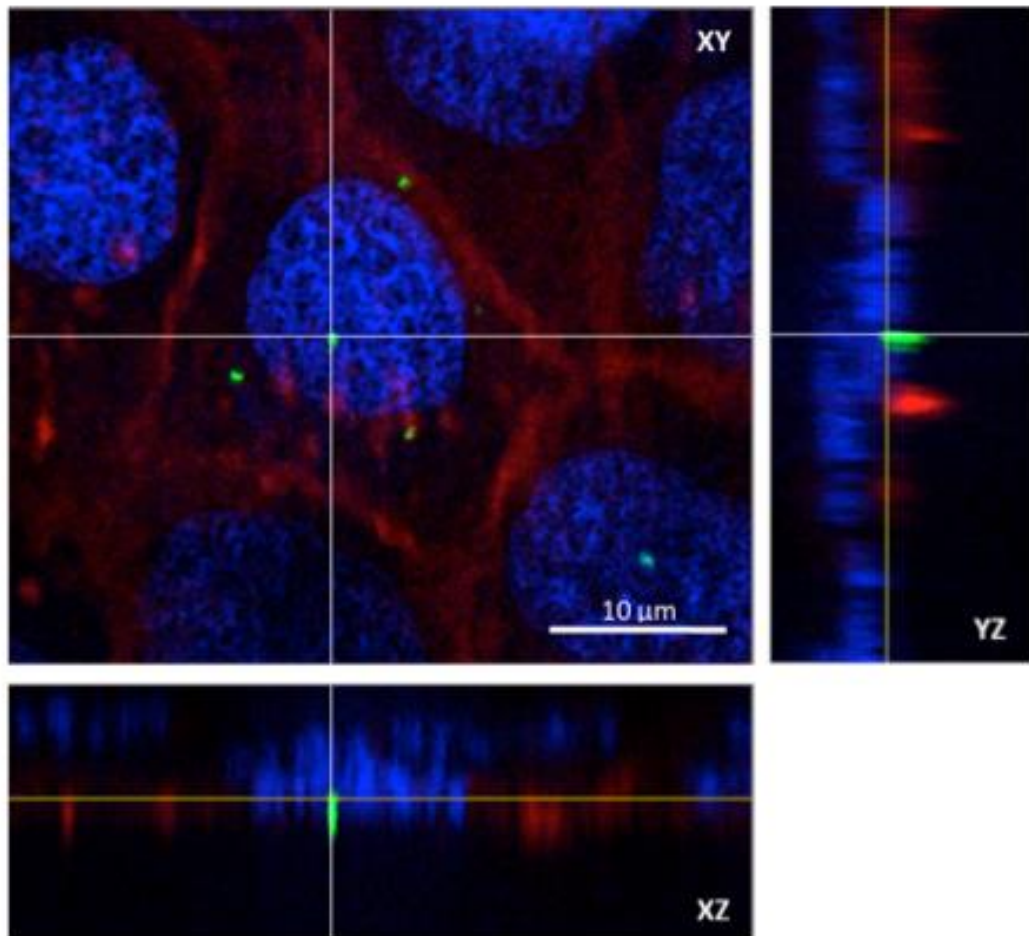


Figure 2-1. *St. epidermidis*-derived MVs were incorporated into HaCaT cell. MVs were labeled with PKH67 green fluorescent cell linker and cultured with HaCaT cells for 24 h. (A) Fluorescence signal were examined by fluorescence microscope. (B) Three-dimensional image. Arrow: MV. Nuclei: Hoechst33342, Cell membrane: CellMask Orange plasma membrane stain, MVs: PKH67, Scale bars: 10  $\mu\text{m}$

### 2.2.2. *St. epidermidis* が分泌した MVs によるヒト表皮角化細胞株 (HaCaT 細胞) の皮膚バリア機能分子の mRNA 発現量変化

ヒト表皮は、最下層にある基底層から上層の顆粒層へとカルシウムイオン濃度が高まることで角化が進行する<sup>38)</sup>。そのため、培養表皮細胞は培地に含まれるカルシウムイオンによって角化が誘導される。そこで、カルシウムイオン濃度が異なる条件で培養を行った HaCaT 細胞 (未角化または角化誘導 HaCaT 細胞) に対して、SE-MVs を加え、皮膚バリア機能に関連する分子の遺伝子発現変化について定量的リアルタイム PCR 法にて検討した。その結果、未角化 HaCaT 細胞において天然保湿因子 (natural moisture factor, NMF) の産生に関与する *FLG* は、100 ng/mL SE-MVs 処理によって 1.48 倍に、ブレオマイシン水解酵素 (*bleomycin hydrolase, BLMH*) は、10 ng/mL SE-MVs 処理によって 1.65 倍にそれぞれ増加した。一方、同じく NMF 産生に関わっているカスパーゼ 14 (*caspase 14, CASP14*) は、両 SE-MVs 処理濃度において変化しなかった。角質細胞の周辺帯 (cornified cell envelope, CE) および骨格形成に関与する *LOR*, インボルクリン (*involcurin, IVL*), トランスグルタミナーゼ 1 (*transglutaminase, TGM1*) および *KRT10* の発現に関しては、*IVL* のみが 100 ng/mL SE-MVs 処理において SE-MVs 未処理のコントロールと比較し、4.31 倍に増加した。密着接合形成に関与するタイトジャンクションタンパク質 1 (*tight junction protein 1, TJP1*), オクルディン (*occludin, OCLN*) およびクロードイン 1 (*claudin, CLDN1*) は、*OCLN* および *CLDN1* が 10 ng/mL SE-MVs 処理において SE-MVs 未処理のコントロールと比べ、それぞれ 1.68 倍, 1.64 倍に増加した。ヒアルロン酸合成に関わるヒアルロン酸合成酵素 2 (*hyaluronan synthase 2, HAS2*) の発現に関しては、両 SE-MVs 処理濃度において変化しなかった。

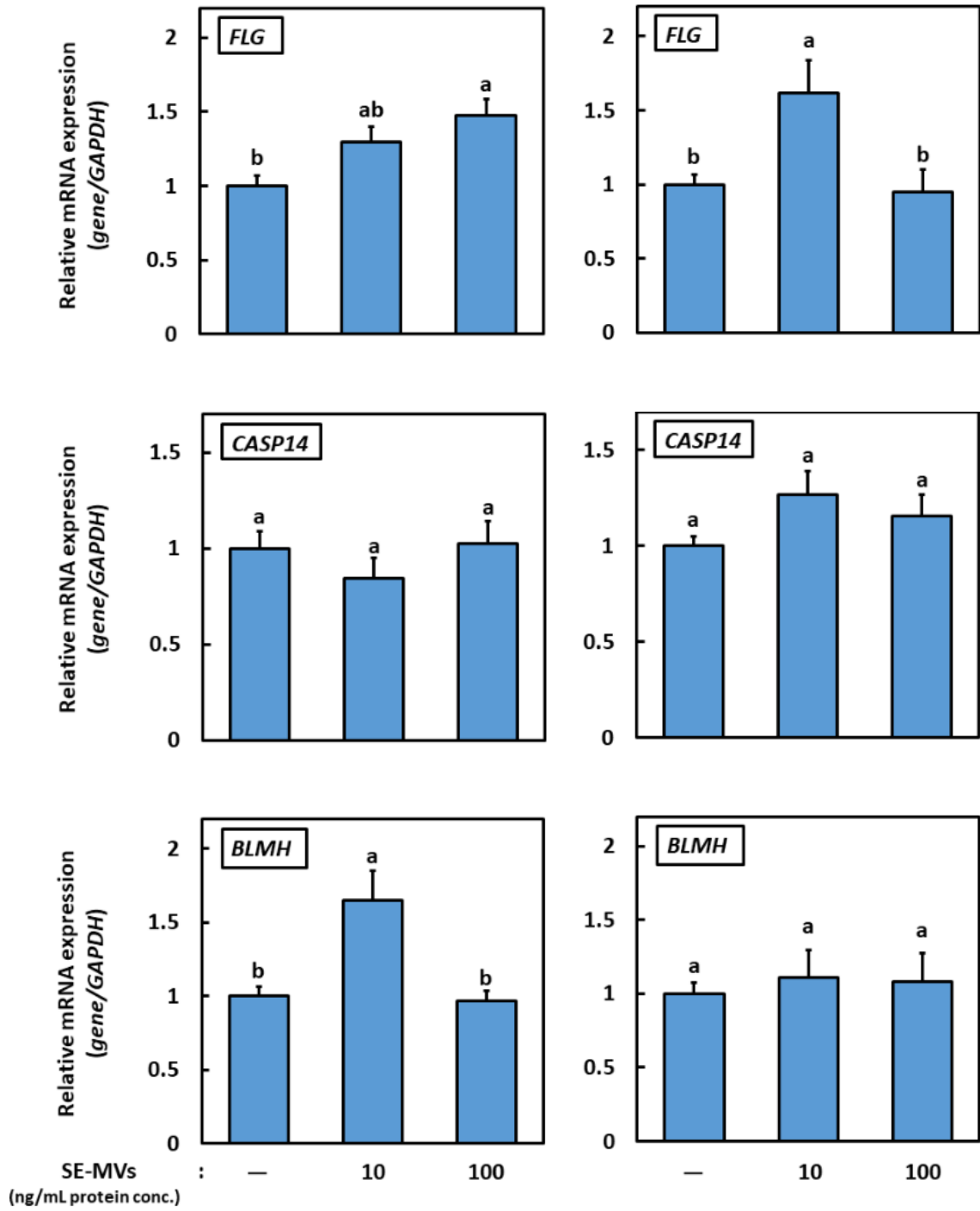
一方、角化誘導 HaCaT 細胞においては、*KRT10* が SE-MVs 処理濃度依存的

に有意に増加し、*FLG*、*LOR* および *IVL* が 10 ng/mL SE-MVs 処理において、SE-MVs 未処理のコントロールと比較し、それぞれ 1.62 倍、1.85 倍、1.80 倍に増加した。*FLG*、*LOR*、*IVL* および *KRT10* 以外の遺伝子に関しては、どの処理濃度においても有意に遺伝子発現が増加しなかった。SE-MVs 処理をした未角化および角化誘導 HaCaT 細胞では、共通して表皮バリア（保湿）に関与する *FLG* および *IVL* の発現が増加した。



**(A) 0.06 mM Ca<sup>2+</sup>**

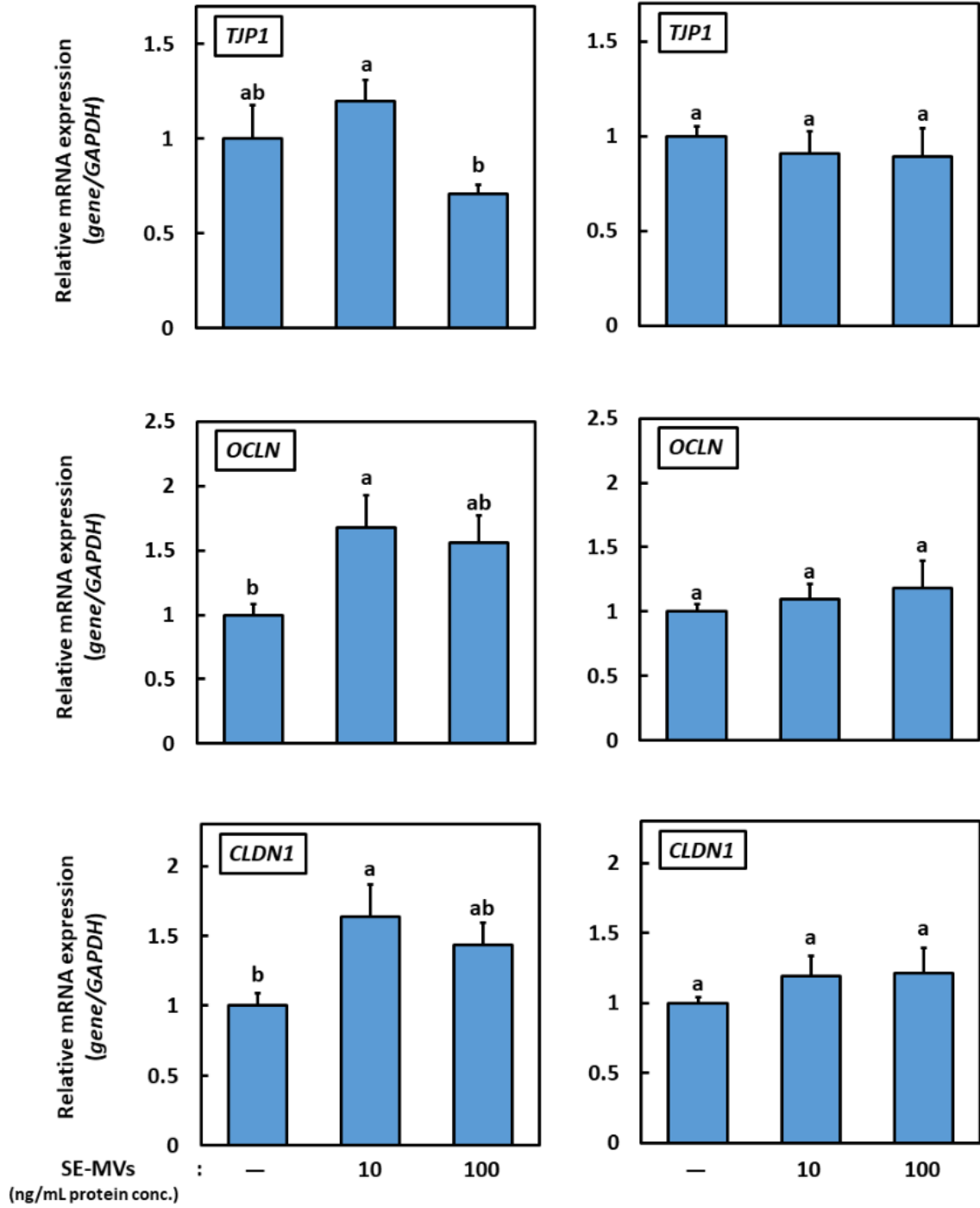
**(B) 1.8 mM Ca<sup>2+</sup>**



(Figure 2-2 continued)

**(A) 0.06 mM Ca<sup>2+</sup>**

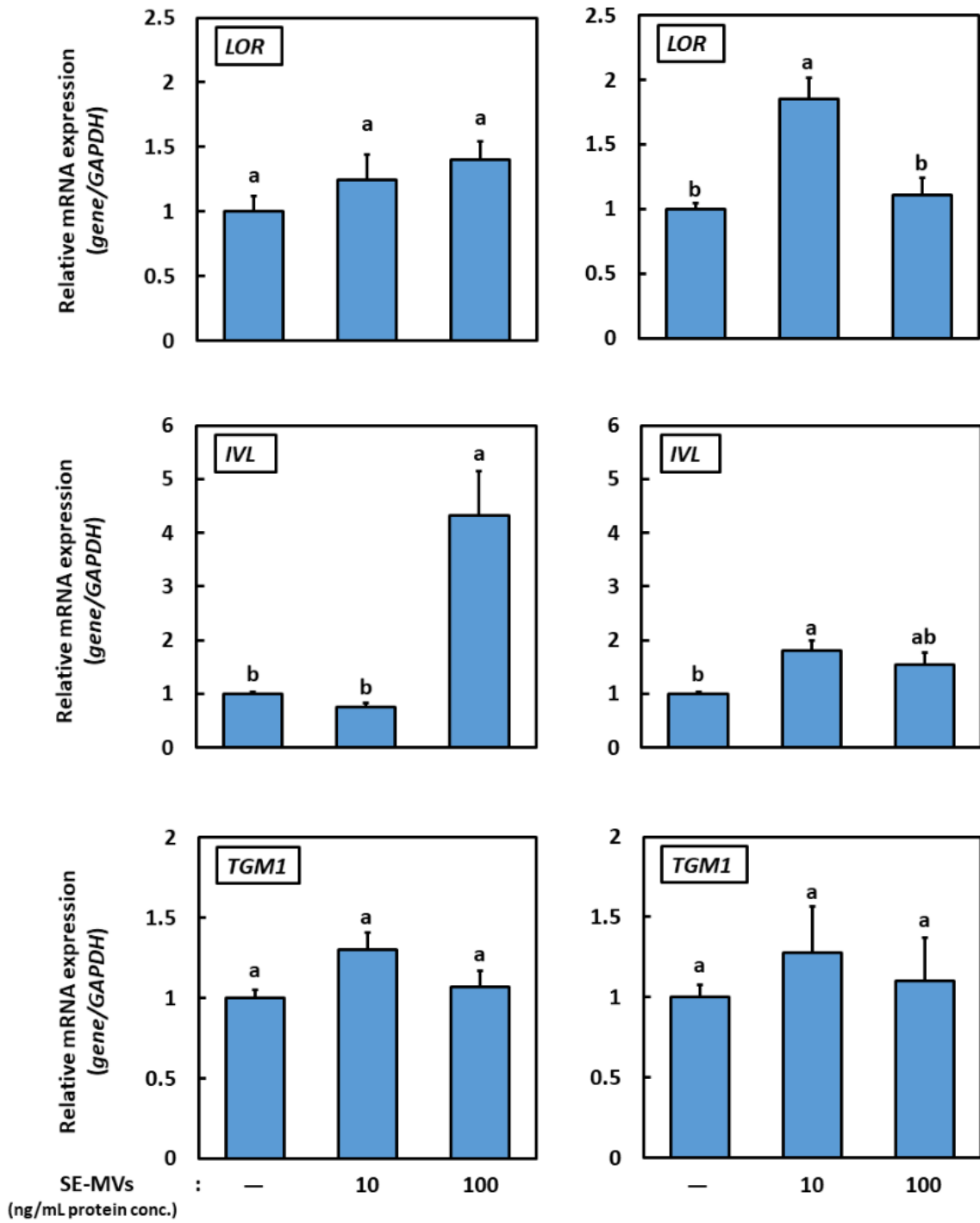
**(B) 1.8 mM Ca<sup>2+</sup>**



(Figure 2-2 continued)

**(A) 0.06 mM Ca<sup>2+</sup>**

**(B) 1.8 mM Ca<sup>2+</sup>**



(Figure 2-2 continued)

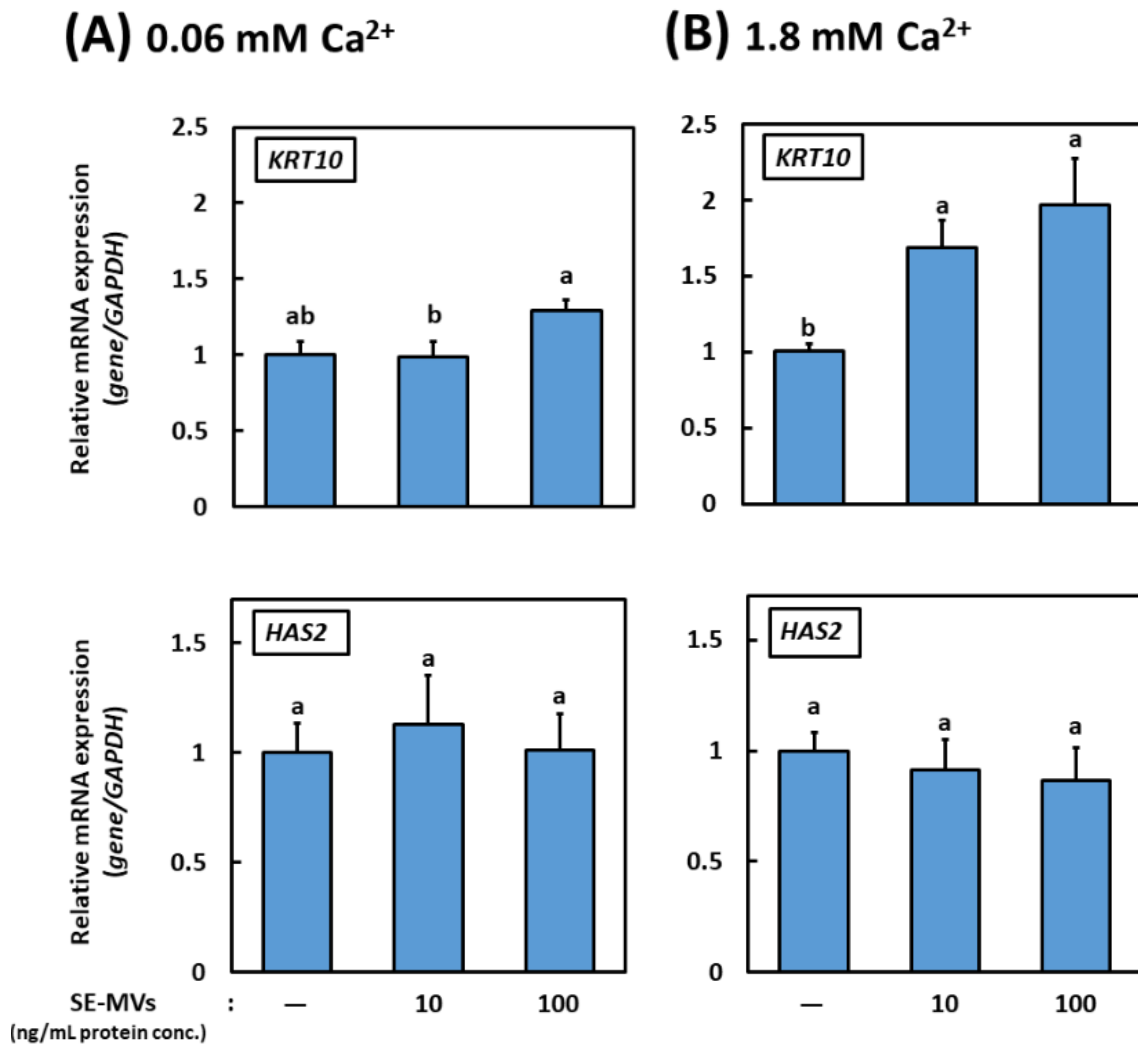


Figure 2-2. *St. epidermidis*-derived MVs (SE-MVs) upregulate moisturizing factor gene expression in HaCaT cells. Cells were treated with SE-MVs (10 and 100 ng/mL) for 72 hours and cultured medium containing (A) 0.06 mM or (B) 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>. Quantitative real-time PCR was performed for *FLG*, *CASP14*, *BLMH*, *TJPI*, *OCLN*, *CLDN1*, *LOR*, *IVL*, *TGMI*, *KRT10*, *HAS2*. *GAPDH* was used as an internal standard. Data represent the mean ± SE and statistical analysis was conducted by a Tukey-Kramer test (n = 6, p < 0.05).

### 2.3. 考 察

細菌由来の MVs は、動物細胞から分泌されるエクソソームと同様に、核酸、タンパク質、脂質といった物質を含む<sup>23)</sup>。MVs 内包物質が表皮角化細胞に何らかの影響を及ぼすためには、MVs 自身が細胞内に取り込まれるまたは細胞膜表面にある受容体に結合する必要があるため、SE-MVs の脂質膜を PKH67 により蛍光標識し、蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、HaCaT 細胞の細胞内に PKH67 によって緑色の蛍光を示す SE-MVs の点在を確認した (Fig. 2-1A)。さらに、三次元観察において、SE-MVs が HaCaT 細胞の細胞膜を通過し、核表面に位置することを観察した (Fig. 2-1B)。今回、細胞内に取り込まれた SE-MVs は細胞膜透過後も蛍光を示していることから、HaCaT 細胞の細胞膜と MVs 膜が融合した形での細胞内への取り込み様式ではなく、エンドサイトーシスによって膜構造を保持しながら細胞内に取り込まれたと考えられた。

ヒトの表皮は、最下層側から基底層、有棘層、顆粒層および角質層の 4 層から成る。基底層に存在する基底細胞は、基板を介して真皮に存在するコラーゲンと近接しており、有棘細胞への角化の過程で KRT1 や KRT10 といった細胞骨格を担うケラチンを産生する。その後、有棘細胞は TJP1, OCLN および CLDN1 といった分子により密着接合を強め、プロフィラグリンを合成する顆粒細胞へと角化をする。そして顆粒細胞は TGM により LOR および IVL などが架橋することで CE を形成し、ケラチン線維とともに角質細胞へと角化する。顆粒細胞に存在したプロフィラグリンは脱リン酸化により FLG に分解され、CASP14 や BLMH の作用を受けて角質層上層で、表皮バリア (保湿) を示す NMF へと分解される (Fig. 2-3)。本章において、SE-MVs が表皮角化細胞に取り込まれることを確認したので、SE-MVs が表皮角化細胞に取り込まれること

で、上記のような皮膚バリア機能を担う分子の遺伝子群の発現変化を誘導するか定量的リアルタイム PCR 法にて検討した。その結果、未角化 HaCaT 細胞において、NMF 産生に関与する *FLG* および *BLMH* の発現が SE-MVs 処理によって有意に増加したが、*CASP14* の発現は変化しなかった。角質細胞を構成する *LOR*, *IVL*, *TGMI* および *KRT10* は、*IVL* のみが 100 ng/mL SE-MVs 処理において、4.31 倍に増加した。密着接合に関わる *TJPI*, *OCLN* および *CLDN1* では、*OCLN* および *CLDN1* が 10 ng/mL SE-MVs 処理において、それぞれ 1.68 倍、1.64 倍に増加した。*HAS2* の発現に関しては両 SE-MVs 処理濃度において有意に変化しなかった (Fig. 2-2A)。一方、角化誘導 HaCaT 細胞では、*KRT10* の発現が SE-MVs 処理濃度依存的に有意に増加し、10 ng/mL SE-MVs 処理によって *LOR* および *IVL* の発現が、それぞれ 1.85 倍、1.80 倍に増加した (Fig. 2-2B)。また、*FLG* も 10 ng/mL SE-MVs 処理によって、1.62 倍に増加した。SE-MVs 処理により、未角化および角化誘導 HaCaT 細胞に共通して *FLG* および *IVL* の発現の有意な増加を確認したが、遺伝子発現の増加がみられる SE-MVs 処理濃度はそれぞれ異なった (Fig. 2-2A,B)。

本章の実験結果より、*St. epidermidis* が分泌する MVs は、MVs 膜構造を保持したままエンドサイトーシスによって表皮角化細胞に取り込まれ、表皮バリア (保湿) を担う *FLG* および *IVL* の発現を有意に増加させることで、表皮バリアを高めると推察された。

SE-MVs の HaCaT 細胞への取り込み実験において、MVs の膜構造が保たれた状態で細胞に取り込まれたことから、エンドサイトーシスによって MVs が取り込まれたと推察しているが、今後エンドサイトーシスによる細胞内への取り込み様式を確定するために、クロルプロマジンやナイスタチンといったエンドサイトーシス阻害剤を用いて MVs の取り込みが減少するか検討する予定であ

る。また、MVsの取り込み実験において、SE-MVsを本研究では直接HaCaT細胞に処理したが、皮膚上に存在する*St. epidermidis*が分泌するMVsが表皮角化細胞に到達するためには、角質細胞とその周辺部を角質間成分によって充填されている角質層を通過しなければならない。この点についてはヒト皮膚三次元培養モデルを用いて、MVsが角質層を通過し表皮角化細胞に到達するか検討することを進めている。

各遺伝子群の定量リアルタイムPCRにおいて、本研究ではSE-MVs処理後72時間後の遺伝子発現レベルを確認したが、処理濃度によって遺伝子の発現量が変わった結果が得られたため、経時的な発現量変化を検討する必要がある。

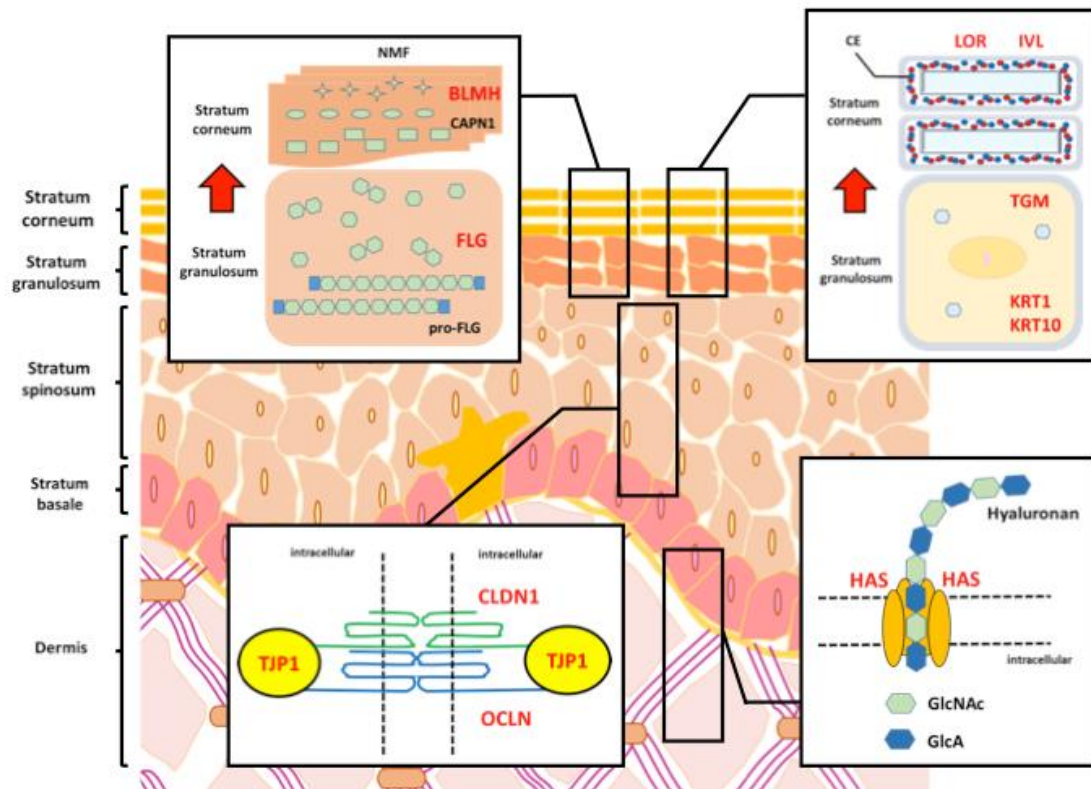


Figure 2-3. Mechanisms of keratinocytes differentiation.<sup>10)</sup> The epidermis is generally consisted of four layers, stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum and stratum basale. While keratinocytes stem cells in the basal layer move upwards, they produce proteins which are crucial for maintaining healthy skin.



### 第3章 皮膚常在菌由来膜小胞の免疫細胞への影響

ヒトの皮膚には表皮角質層および密着接合による病原体の侵入を阻むバリアに加えて、表皮角化細胞、樹状細胞およびマクロファージによる免疫学的バリアが存在する<sup>9)</sup>。表皮に存在する樹状細胞はランゲルハンス細胞と呼ばれ、通常、未成熟樹状細胞として存在するが、樹状突起による抗原の捕捉や表皮角化細胞から分泌されるサイトカインにより成熟樹状細胞へと分化し、T細胞に抗原提示を行うことで局所的な炎症を誘導する。また、マクロファージも樹状細胞と同様、病原体を貪食しT細胞に抗原提示をするとともに、サイトカインおよび一酸化窒素（nitric oxide, NO）の産生により病原体の排除を行う<sup>39)</sup>。さらに、炎症部位に集積した単球が樹状細胞またはマクロファージに分化することでさらなる炎症を引き起こされる<sup>40)</sup>。

細菌由来の MVs は、細胞膜および細胞壁を經由して形成され、ペプチドグリカン、糖タンパク質、糖脂質といった抗原として認識される因子を膜表面に保持していると推測されるため<sup>41,42)</sup>、細菌由来の MVs が免疫細胞と接触した際に、炎症を引き起こす可能性があると考えられる。したがって、細菌由来の MVs を化粧品素材として利用する場合、MVs が過剰な免疫炎症反応を誘発しないか安全性の面から確認する必要がある。本章では、マウスマクロファージである RAW264.7 細胞と樹状細胞分化能を有する THP-1 細胞を用いて、*C. acnes* および *St. epidermidis* が分泌する MVs による免疫反応の一部について検討した。

### 3.1. 実験材料および実験方法

#### 3.1.1. RAW264.7 細胞における *St. epidermidis* および *C. acnes* が分泌した MVs 刺激による一酸化窒素産生能への影響

RAW264.7 細胞 ( $2 \times 10^5$  cells/mL) を 24 ウェルマルチプレートに 0.5 mL ずつ播種し、24 時間培養した。その後、*St. epidermidis* および *C. acnes* 由来の MVs (終濃度: 12.5, 25, 50, 100 および 200 ng/mL) を各ウェルに添加し、24 時間刺激を行った。陽性対照には LPS (終濃度: 200 ng/mL) と IFN- $\gamma$  (終濃度: 25 ng/mL) を添加した。刺激後、RAW264.7 細胞が産生した NO の分解生成物である亜硝酸 ( $\text{HNO}_2$ ) を Griess 試薬 (Promega, Madison, WI, USA) により発色させ、プレートリーダー (Infinite M200 FA 富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪府) を用いて、540 nm における吸光度を測定し、間接的に NO 産生量を測定した。

#### 3.1.2. *St. epidermidis* が分泌した MVs の樹状細胞分化への影響

##### 3.1.2.1. 細胞溶解サンプルの調製

THP-1 細胞 ( $1 \times 10^4$  cells/mL) を 6 ウェルマルチプレートに 2 mL ずつ播種し、2 時間インキュベートした。その後、SE-MVs (終濃度: 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 および 1,000 ng/mL) を各ウェルに添加し、1 週間刺激した。陽性対照には、GM-CSF (Shenandoah Biotechnology, Inc., Warminster, PA, USA) 終濃度 100 ng/mL, IL-4 (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) 終濃度 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を 5 日間刺激し、5 日後に TNF- $\alpha$  (富士フィルム株式会社, 東京都) 終濃度 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  をさらに 2 日間刺激した。処理後、PBS (-) で洗浄し (0.5 mL  $\times$  3 回), 2% protease inhibitor, 2% phosphatase inhibitor (以上 Roche Diagnostics GmbH,

Mannheim, Germany) を含む RIPA Buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.6) , 150 mM NaCl, 1%NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS) ) で細胞を溶解した。回収した細胞溶解液は 30 分氷上で保管後, 超音波破碎機を用いて (10 秒×3 回) 破碎した。細胞破濁後, 13,500 × g, 15 分, 4°Cにて遠心分離し, 上清をサンプル溶液として回収した。サンプル溶液中のタンパク質濃度は, ウシ血清アルブミン (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を標準物質として, DC Protein Assay キット (Bio-Rad) を用いて測定した。タンパク濃度を調整したサンプル溶液に, 10%メルカプトエタノールを含むサンプルバッファーを加え, 98°Cの条件下で 5 分間加熱し, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-Poly Acrylamide gel Electrophoresis, SDS-PAGE) 供試サンプルとした。

### 3. 1. 2. 2. SDS-PAGE

泳動槽に目的タンパク質分離に適したポリアクリルアミドゲルをセットし, 泳動バッファー (Bio Rad, Tris/Glycine Buffer) を泳動槽の約 3 分の 1 まで入れた。ゲルの各レーンに 12  $\mu$ L (タンパク量 : 20  $\mu$ g/Lane) ずつサンプルを, 端の使用しないレーンには等量のタンパク質分量マーカーをアプライし, 125V, 90 分で泳動することによりサンプルのタンパク質を分離した。泳動後, ガラスプレートからゲルを慎重に外し, 不要な濃縮ゲルを切り取り, ブロッキングバッファー (Bio Rad, Tris/Glycine Buffer 10%, メタノール 20%, 超純水 70%) に浸した濾紙の上へ移した。

### 3.1.2.3. ウェスタンブロッティング

メンブレン (Polyvinylidene difluoride, GE Healthcare UK Ltd, Amersham Place, England) を、メタノールに 20 秒浸し、親水化処理後、ブロッティングバッファーに浸して平衡化した。ブロッティングバッファーをよく染み込ませたスポンジとろ紙のそれぞれ 2 枚を一組とし、前述 2.1.4.2 項の SDS-PAGE を行ったゲルとメンブレンを挟み、ブロッティング槽にセット後、氷水で冷やしながら 60V, 90 分で SDS-PAGE によって分離したタンパク質をメンブレンに転写した。転写後、メンブレンを 5%脱脂粉乳 (Difco Laboratories Inc, MI, USA) 含有トリス緩衝化生理食塩水 (T-TBS) 溶液に浸して 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング終了後、T-TBS で洗浄後 (10 分×3 回), CD54 (#4915S, Cell Signaling Technology, MA, USA) および  $\beta$ -actin (#4967S, Cell Signaling Technology) の各種一次抗体溶液 (希釈倍率 1:1,000) に浸して、4°Cで一晩振盪した。その後、T-TBS で洗浄後 (10 分×3 回), 5%脱脂粉乳含有 T-TBS 溶液により希釈した二次抗体 (Enhanced chemiluminescence™ (ECL) Anti-Rabbit IgG, Horseradish peroxidase linked whole antibody または ECL Anti-Mouse IgG, Horseradish peroxidase linked whole antibody, GE Healthcare) (希釈倍率 1:10,000) に浸して再び 1 時間振盪した。T-TBS にて洗浄後 (10 分×3 回), ECL Prime 検出試薬 (GE Healthcare) で 5 分処理し, iBright Imaging System (Thermo Fisher Scientific) で検出した。

## 3.2. 結 果

### 3.2.1. *St. epidermidis* および *C. acnes* 分泌 MVs 刺激によるマウスマクロファージ様細胞株 (RAW264.7 細胞) における一酸化窒素産生能への影響

マクロファージは LPS などの微生物成分の刺激によって、Toll-like receptor (以下、TLR) を介したシグナル伝達を経て NO を産生することで、病原菌に対して生体防御反応を示す<sup>43)</sup>。菌体から分泌される MVs には、菌体膜成分が含まれていると予想されるため、マクロファージによる免疫炎症反応が起きることが推察される。そこで、MVs の化粧品への応用を展望に、MVs によるマクロファージの免疫応答レベルを RAW264.7 細胞から生成される NO の分解生成物である亜硝酸 ( $\text{HNO}_2$ ) を Griess 試薬により発色させ、間接的に NO 産生量を測定することで検討した。その結果、*C. acnes* 由来 MVs を添加した細胞は、MVs 未処理の細胞と比較して最大で MVs タンパク濃度 1,000 ng/mL において 1.46 倍であった。SE-MVs を添加した細胞は、未処理細胞と比較して最大で MVs タンパク濃度 1,000 ng/mL において 4.53 倍であった。両菌体由来 MVs は、LPS および IFN- $\gamma$  を加え過剰な免疫反応を引き起こされた陽性対照と比較して、大幅に低い NO 産生誘導能であることが確認した (Fig. 3-1)。

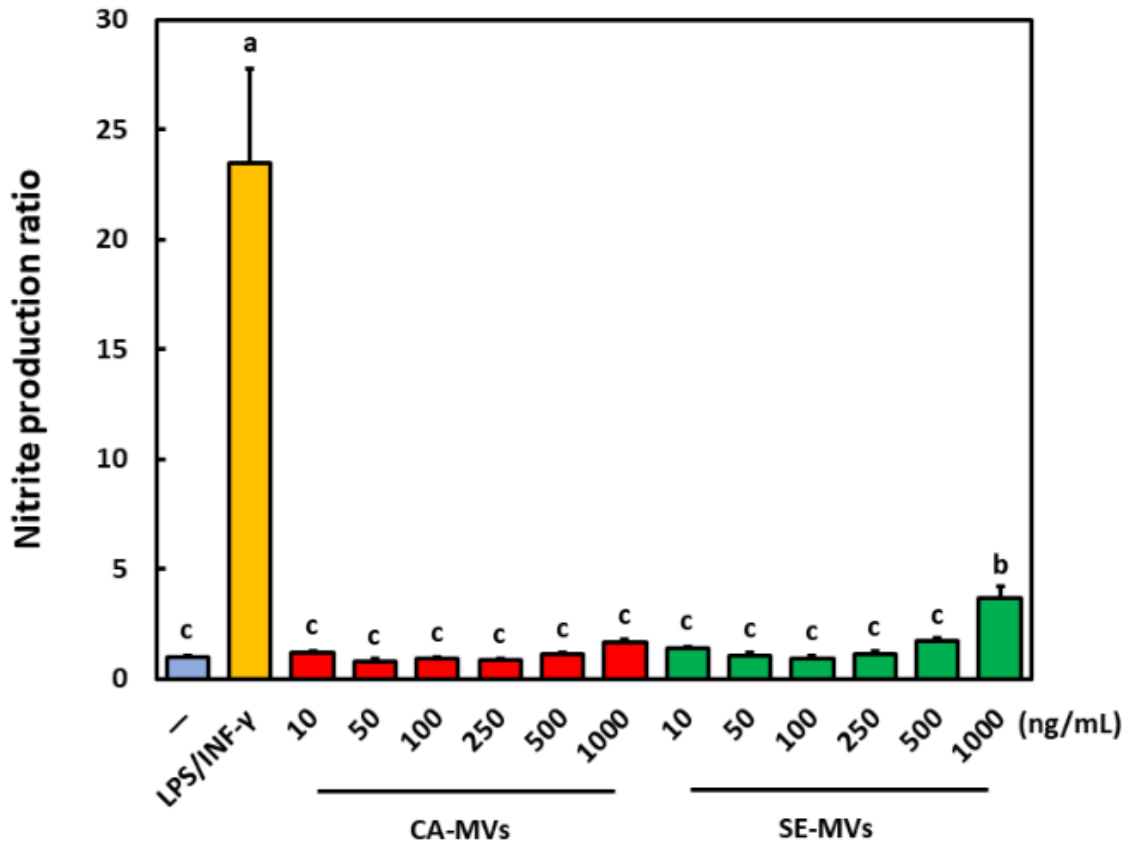


Figure 3-1. The effect of *C. acnes* and *St. epidermidis*-derived MVs on RAW264.7 cells nitric oxide (NO) production. Cells ( $2.0 \times 10^5$  cells/mL) were treated with both MVs (10~1,000 ng/mL). LPS (200 ng/mL) and IFN- $\gamma$  (25 ng/mL) co-stimulation was as a positive control. The concentration of NO in the medium was analyzed as nitrite using a Griess reagent kit. Data represent the mean  $\pm$  standard error (n = 8).

### 3.2.2. ヒト単球由来細胞株 (THP-1 細胞) における *St. epidermidis* が分泌した MVs 刺激による CD54 のタンパク質の発現変化

ヒト単球である THP-1 細胞は皮膚感作性物質に接触すると、T 細胞の活性化に寄与する共刺激分子 CD54 および CD86 の発現が上昇し、成熟樹状細胞へと分化する (Fig. 3-2)。そこで、SE-MVs による THP-1 細胞の樹状細胞分化への影響を確認するため、樹状細胞への分化マーカーである CD54 のタンパク発現の変化をウエスタンブロット法で検討した。その結果、GM-CSF、IL-4 および TNF- $\alpha$  で強制的に樹状細胞へと分化させた陽性対象と比較して、SE-MVs (終濃度 : 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 および 1,000 ng/mL) を添加した THP-1 細胞では CD54 の発現増加がどの処理濃度でも確認されなかった。

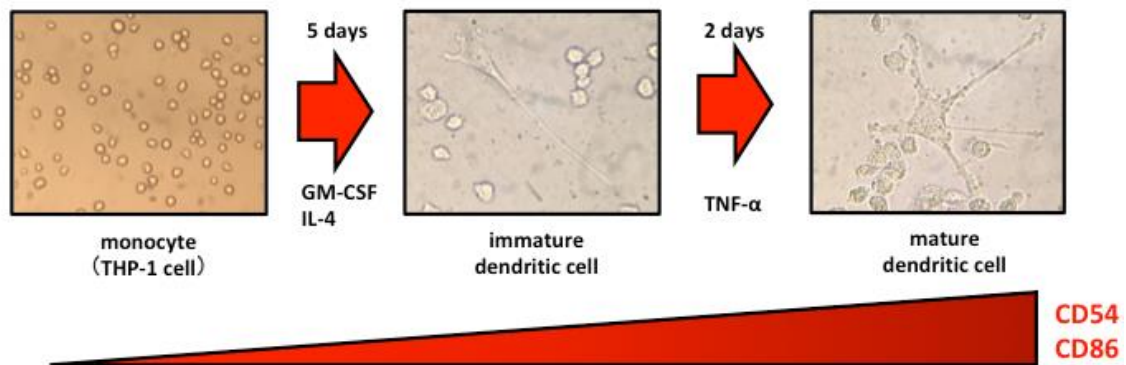


Figure 3-2. Dendritic cell (DC) differentiation phases on THP-1 cells. Cells were treated with GM-CSF and IL-4 to acquire the properties of immature DCs. After treatment for 5 days, immature DCs were treated with TNF- $\alpha$  for 2 days to acquire the properties of mature DCs.



Figure 3-3. The effect of *St. epidermidis*-derived MVs (SE-MVs) on THP-1 cell differentiation to dendritic cell (DC). Cells were treated with SE-MVs (10~1,000 ng/mL) for 1 week. GM-CSF, IL-4 and TNF- $\alpha$  were added to generate mature DCs from THP-1 cells as a positive control. Cell lysates were separated by SDS-PAGE and expression levels were determined using western blotting.  $\beta$ -actin was used as a loading control.



### 3.3. 考 察

ヒトの皮膚に微生物といった病原体が侵入すると、マクロファージや樹状細胞を中心とした自然免疫が働く。自然免疫には TLR が深く関与しており、微生物由来の分子を識別することで炎症性サイトカインの発現に寄与するシグナルを伝達することが知られている<sup>44)</sup>。マクロファージは細胞表面に TLR4, TLR2 を高発現しており<sup>45)</sup>、これら分子がグラム陰性菌、陽性菌の細胞壁成分を認識することで NO およびサイトカインを合成し、病原体の排除に伴う炎症を惹起する (Fig. 3-4)。しかし、過剰な炎症は正常な組織を破壊し、炎症局所の免疫力を逆に低下させる。そこで、RAW264.7 細胞に、細菌由来の細胞壁成分を含むと考えられる MVs の処理が、過剰な NO 産生を誘発するか検討した。その結果、*C. acnes* および *St. epidermidis* が分泌する MVs は、RAW264.7 細胞において、LPS および IFN- $\gamma$  の共刺激により惹起させた陽性対照のような過剰な NO 産生を誘導しなかった (Fig. 3-1)。両菌体と同じグラム陽性菌である枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は、細胞内で産生したエンドリシンにより細胞壁のペプチドグリカン層に穴を開け、その穴を通じて MVs を形成するとの報告がある<sup>37)</sup>。したがって、*St. epidermidis* や *C. acnes* の分泌 MVs の膜表面には細菌由来の細胞壁成分を多く含まれないために、RAW264.7 細胞に発現する TLR1/2 または 2/6 に認識されにくく、過剰な NO 産生を誘発しなかったのではないかと推察された。

次に、マクロファージと同様に食作用を示し、T 細胞へと抗原提示を行う樹状細胞に対する SE-MVs の影響を検討した。抗原提示を活発に行う成熟樹状細胞は、GM-CSF や TNF- $\alpha$  といった炎症性サイトカインによって単球から未熟樹状細胞を経て分化する (Fig. 3-2)。炎症局所における樹状細胞の増加はさらな

る炎症を招くため、細菌由来の MVs が単球の樹状細胞への分化を誘導するか確認した。一般に、単球からの樹状細胞分化の解析は、分化過程で高発現する CD54 および CD86 を指標としてフローサイトメーターで解析する皮膚感作性試験 (human Cell Line Activation Test, h-CLAT) が用いられる<sup>46)</sup>。そこでわれわれは、フローサイトメーターを用いない手法として、SE-MVs 添加による CD54 の発現量の変化をウェスタンブロッティング法で確認した。その結果、CD54 の発現がすべての MVs 処理濃度において確認されなかった (Fig. 3-3)。

本章の実験結果より、SE-MVs はマクロファージに対して、濃度が 10~1,000 ng/mL の範囲で過剰な免疫反応を引き起こさず、ヒト単球の樹状細胞分化を誘導しないことが明らかとなった。本実験において、ヒト単球に対して MVs を加えたが樹状細胞分化には段階が存在するため (Fig. 3-2)、未熟樹状細胞に MVs を加えた際の分化誘導についても確認する必要がある。また、表皮角化細胞は病原体と接触すると、樹状細胞の分化に関与するインターロイキン 1 (IL-1)  $\alpha$  や TNF- $\alpha$  といったサイトカインを分泌するため<sup>47)</sup>、SE-MVs を表皮角化細胞に加えた際に分泌されるそれらサイトカインの遺伝子発現変化を確認することも安全性を確認するために必要である。

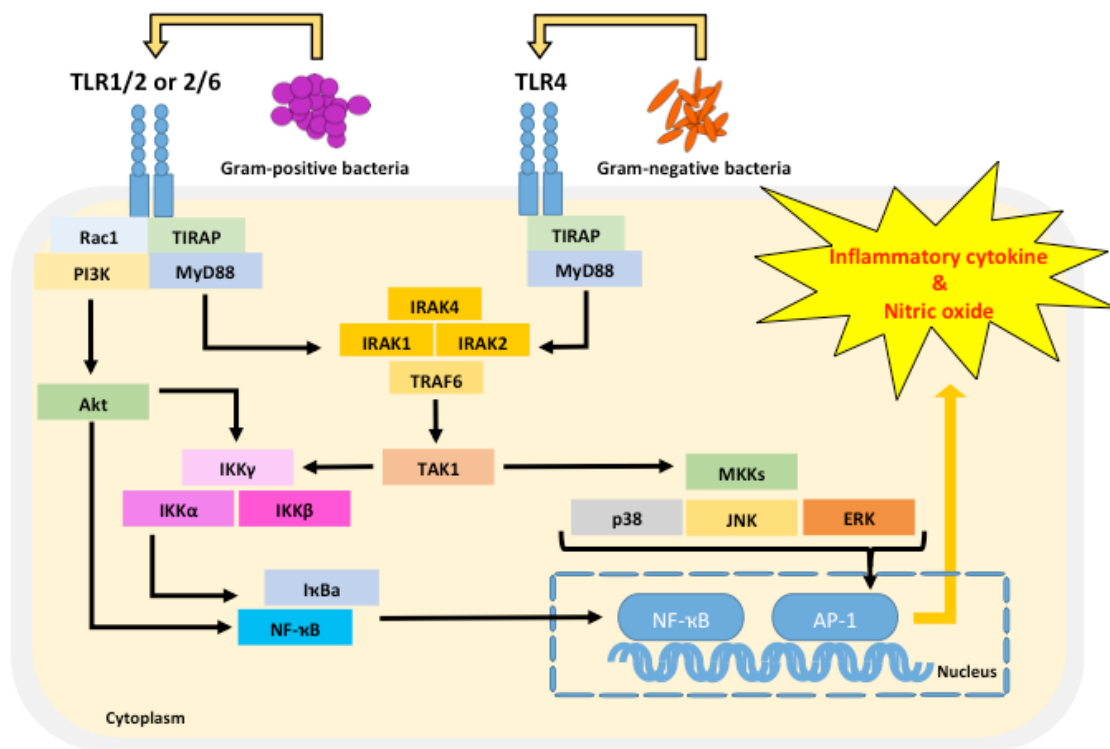


Figure 3-4. Toll-like receptor (TLR) signaling pathway.<sup>48-50</sup> TLR plays a crucial role in innate immune response which is triggered by bacterial components. Gram-positive and negative bacterial stimulation through the TLR2 and TLR4 respectively induce inflammatory factor production such as cytokine and nitric oxide.

## 総 括

ヒトの最大の臓器ともいわれる皮膚には  $10^6 \sim 10^9/\text{cm}^2$  もの常在菌が存在しており、皮膚恒常性に必要不可欠な存在であると考えられているが、皮膚常在菌の中には、黄色ブドウ球菌のような病原性を示す菌が存在する。近年、この黄色ブドウ球菌が分泌する MVs がアトピーのような皮膚炎を引き起こすという報告がされ、常在菌由来の MVs が皮膚バリア機構の制御に関与することが注目されている。本研究では、保湿および弱酸性環境といった皮膚の安定性をもたらす皮膚常在菌から分泌される MVs は、表皮バリア機能を強化するような作用を示すのではないかと作業仮説を立て、MVs が皮膚恒常性機構に及ぼす影響を検討した。

### 第 1 章 皮膚常在菌由来微小胞の回収と微小胞の形態観察

現在までに、アトピーの悪化に関与する *S. aureus* や日和見菌である *C. acnes* といった皮膚常在菌の MVs 分泌は報告されているが、*St. epidermidis* の MVs 分泌については報告がない。そこで、*St. epidermidis* の MVs 分泌を比較対象として、既に報告がある *C. acens* とともに、TEM および SEM にて観察した。その結果、両菌体の細胞壁から出芽するように MVs が形成されるのを確認した。両菌体からの MVs の分泌を確認したため、両菌体の培養上清から超遠心分離法によって調製した MVs を、SEM および Nanosight にて形態学的特徴を観察した。SE-MVs は 80 nm をピークとし、平均粒子径が 101 nm であった。一方、CA-MVs は 76, 135, 184 nm の 3 点にピークを持つ平均粒子径が 166 nm の MVs であり、SEM 観察においてもばらつきの MVs 像を確認した。MVs の膜表

面には、形成に伴ってさまざまな複合糖質が組み込まれると考えられ、それら複合糖質は MVs 膜表面の電荷に大きく関与するため、qNano を用いて調製した MVs のゼータ電位を測定した。その結果、SE-MVs と CA-MVs の間でゼータ電位に差があり、SE-MVs のゼータ電位の絶対値のほうが大きかったため、CA-MVs よりも SE-MVs のほうが分散度の高い安定した粒子であると考えられた。

## 第2章 *St. epidermidis* 由来 MVs の細胞内吸収と表皮細胞への影響

細菌由来の MVs は、形成過程で核酸、タンパク質および脂質などを内包しており、それら内包物質を送達された側は何らかの影響をうけると推測される。SE-MVs も同様に、内包される物質が表皮細胞の恒常性機能に影響を及ぼすためには、MVs 自身が細胞内に取り込まれる必要がある。そこで、SE-MVs の脂質膜を PKH67 により蛍光染色し、HaCaT 細胞への取り込みを蛍光顕微鏡にて観察した。蛍光顕微鏡による三次元観察の結果、MVs が細胞膜を通過し、核表面に位置することを観察した。細胞内に取り込まれた後も MVs の蛍光が粒子状に確認されたことから、MVs がエンドサイトーシスによって膜構造を保ったまま細胞内に取り込まれたと推察された。

次に、取り込まれた MVs が皮膚恒常性機能に関与する分子の遺伝子発現変化に影響を及ぼすか、定量的リアルタイム PCR 法にて検討した。角化未誘導 HaCaT 細胞において、表皮バリア（保湿）を担う *FLG*、*BLMH* および *IVL* に加え、密着接合に関与する *OCLN* および *CLDN1* の遺伝子発現の有意な増加が見られた。一方、角化誘導 HaCaT 細胞では、角化未誘導と共通して *FLG* および *IVL* の遺伝子発現が有意に増加した。

本章の結果より、*St. epidermidis* が分泌する MVs は、エンドサイトーシスに

より膜構造を保持したまま表皮角化細胞に取り込まれ、表皮バリア（保湿）を担う *FLG* および *IVL* の発現を有意に増加させることで、表皮バリア機能を高めると考えられた。

### 第3章 皮膚常在菌由来微小胞の免疫細胞への影響

ヒトの表皮は、角質層および密着接合によるバリアに加えて、角化細胞、樹状細胞およびマクロファージによる免疫バリアが存在する。それら免疫系細胞は、細菌成分を認識し免疫応答を引き起こすため、細菌由来の MVs と接触した際にも同様な免疫応答が誘導されると考えられる。そこで、皮膚常在菌由来の MVs の化粧品および医薬品への応用を考え、RAW264.7 細胞および THP-1 細胞を用いて MVs が過剰な免疫反応を誘発しないかを検討した。その結果、*C. acnes* および *St. epidermidis* が分泌した MVs は、RAW264.7 細胞において、LPS および IFN- $\gamma$  を加え過剰な免疫反応を引き起こされた陽性対照のような NO 産生を誘発しなかった。そして、THP-1 細胞に SE-MVs を加えたところ、樹状細胞分化マーカーである CD54 の発現増加がすべての処理濃度で確認されなかったことから、10~1,000 ng/mL の濃度域において SE-MVs は単球の樹状細胞分化に影響を与えないと考えられた。

これらの結果より、SE-MVs はマクロファージに対して、濃度が 10~1,000 ng/mL の範囲で過剰な免疫反応を引き起こさず、単球の樹状細胞分化を誘導しないことから、安全性が担保された化粧品および医薬品への応用が考えられた。

本研究結果は、皮膚常在菌と皮膚との相互関係について膜小胞機能からアプローチした新たな知見と、化粧品、医薬品分野における新しい皮膚恒常性素材への開発に貢献する基礎的な情報として期待できる。

## 参 考 文 献

- 1) Blum, H.E. The human microbiome. *Advances in Medical Sciences* **62**, 414-420 (2017).
- 2) 坂田 恒昭, 松本 弥生. 「日本マイクロバイオーームコンソーシアム (JMBC) の設立」 *ファルマシア* **53**, 1095 (2017).
- 3) Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Rahnavard, G., Crabtree, J., Orvis, J., Hall, A. B., Brady, A., Creasy, H. H., McCracken, C., Giglio, M. G., McDonald, D., Franzosa, E. A., Knight, R., White, O., Huttenhower, C.  
Strains, functions and dynamics in the expanded human microbiome project. *Nature* **550**, 61-66 (2017).
- 4) Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., Huttenhower, C. The healthy human microbiome. *Genome Medicine* **8**, 1-11 (2016).
- 5) Passos, M. D. C. F., Moraes-Filho, J. P. Intestinal microbiota in digestive diseases. *Arquivos De Gastroenterologia* **54**, 255-262 (2017).
- 6) Wilkins, T., Sequoia, J. Probiotics for gastrointestinal conditions : A summary of the evidence. *American Family Physician* **96**, 170-179 (2017).

- 7) Kang, H. J., Im, S. H. Probiotics as an immune modulator. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **61**, 103-105 (2015).
- 8) DiRienzo, D. B. Effect of probiotics on biomarkers of cardiovascular disease: implications for heart-healthy diets. *Nutrition Reviews* **72**, 18-29 (2014).
- 9) 熊ノ郷 淳. 「免疫ペディア 101 のイラストで免疫学・臨床免疫学に強くなる!」 羊土社, pp. 93-94, pp.137-138 (2017).
- 10) 清水 宏. 「あたらしい皮膚科学 第2版」 中山書店, pp. 1-9 (2011).
- 11) Schommer, N. N., Gallo, R. L. Structure and function of the human skin microbiome. *Trends in Microbiology* **21**, 660-668 (2013).
- 12) ヤクルト中央研究所 菌の図鑑. <https://institute.yakult.co.jp/bacteria/> (2019/9/17 アクセス)
- 13) 松尾聿朗, 犬飼則子. 「皮表脂質の生理的役割」 油化学 **37**, pp. 827-831 (1988).
- 14) 松本 美佐子, 瀬谷 司. 「Toll 様受容体の機能」 生化学 **81**, pp. 156-164 (2009).



- 15) Lai, Y., Nardo, A. D., Nakatsuji, T., Leichtle, A., Yang, Y., Cogen, A. L., Wu, Z. R., Hooper, L. V., Schmidt, R. R., Aulock, S. V., Radek, K. A., Huang, C. M., Ryan, A. F., Gallo, R. L. Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3– dependent inflammation after skin Injury. *Nature Medicine* **15**, 1377-1383 (2009).
- 16) Lai, Y., Cogen, A. L., Radek, K. A., Park, H. J., MacLeod, D. T., Leichtle, A., Ryan, A. F., Nardo, A. D., Gallo, R. L. Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections. *Journal of Investigative Dermatology* **130**, 2211-2221 (2010).
- 17) 菊池 賢. 「IV. 病原体別にみた院内感染と対策 2. 表皮ブドウ球菌」  
日本内科学会雑誌 **97**, pp. 41-45 (2008).
- 18) Hong, S. W., Kim, M. R., Lee, E. Y., Kim, J. H., Kim, Y. S., Jeon S. G., Gho, Y. S., Yang, J. M., Lee, B. J., Pyun, B. Y., Kim, Y. K. Extracellular vesicles derived from *Staphylococcus aureus* induce atopic dermatitis-like skin inflammation. *Experimental Allergy and Immunology* **66**, 351-359 (2011).
- 19) Son, E.D., Kim, H. J., Park, T., Shin, K., Bae, I. H., Lim, K. M., Cho, E. G., Lee, T.R. *Staphylococcus aureus* inhibits terminal differentiation of normal human keratinocytes by stimulating interleukin-6 secretion. *Journal of Dermatological Science* **74**, 64-71 (2014).

- 20) Wang, Y., Kuo, S., Shu, M., Yu, J., Huang, S., Dai, A., Two, A., Gallo, R. L., Huang, C. M. *Staphylococcus epidermidis* in the human skin microbiome mediates fermentation to inhibit the growth of *Propionibacterium acnes* : implications of probiotics in acne vulgaris. *Applied Microbial and Cell Physiology* **98**, 411-424 (2014).
- 21) Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., Agata, T., Mizunoe, Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*, Doi:10.1038/nature09074 (2010).
- 22) Toyofuku, M., Morinaga, K., Hashimoto, Y., Uhl, J., Shimamura, H., Inaba, H., Schmitt-Kopplin, P., Eberl, L., Nomura, N. Membrane vesicle-mediated bacterial communication. *The ISME Journal* **11**, 1504-1509 (2017).
- 23) Toyofuku, M., Tashiro, Y., Hasegawa, Y., Kurosawa, M., Nomura, N. Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid: Biology, environmental perspectives and applications. *Advances in Colloid and Interface Science* **226**, 65-77 (2015).
- 24) Li, X. J., Ren, Z. J., Tang, J. H., Yu, Q. Exosomal microRNA MiR-1246 promotes cell proliferation, invasion and drug resistance by targeting CCNG2 in breast Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry* **44**, 1741-1748 (2017).

- 25) Huang, C. C., Narayanan, R., Alapati, S., Ravindran, S. Exosomes as Biomimetic Tools for stem cell differentiation: applications in dental pulp tissue regeneration. *Biomaterials* **111**, 103-115 (2016).
- 26) Kalluri, R. The biology and function of exosomes in cancer. *The Journal of Clinical Investigation* **126**, 1208-1215 (2016).
- 27) Abcam. Secreted Extracellular Vesicles. <https://www.exosome-rna.com/secreted-extracellular-vesicles/> (2018/12/04 アクセス).
- 28) Borges, F. T., Reis, L. A., Schor, N. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Journal of Medical and Biological Research* **46**, 824-830 (2013).
- 29) 太田 敏子. 「病原細菌のゲノム生物学: 病原微生物の生存戦略」 生化学 **79**, pp. 1032-1045 (2007).
- 30) Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T., Horikoshi, K. Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH<sub>4</sub> production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 10949-10954 (2008).

- 31) Schleper, C., Puehler, G., Holz, I., Gambacorta, A., Janekovic, D., Santarius, U., Klenk, H. P., Zillig, W. *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a Novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. *Journal of Bacteriology* **177**, 7050-7059 (1995).
- 32) 横山 佳子, 松田 葵. 「ストレス環境下における細菌の増殖と形態変化」  
食物学会誌 **61**, pp. 29-34 (2006).
- 33) Nazimek, K., Bryniarski, K., Askenase, P. W. Functions of exosomes and microbial extracellular vesicles in allergy and contact and delayed-type hypersensitivity. *International Archives of Allergy and Immunology* **171**, 1-26 (2016).
- 34) Meiwafoysis. Variable nano pore. [http://www.meiwafosis.com/products/nanoparticle/nanoparticle\\_consumables.html](http://www.meiwafosis.com/products/nanoparticle/nanoparticle_consumables.html) (2021/01/20 アクセス).
- 35) Hiremath, P. S., Bannigidad, P., Yelgond, S. S. Identification of flagellated or fimbriated bacterial cells using digital image processing techniques. *International Journal of Computer Applications* **59**, 12-16 (2012).
- 36) Toyofuku, M., Carcamo-Oyarce, G., Yamamoto, T., Eisenstein, F., Hsiao, C. C., Kurosawa, M., Gademann, K., Pilhofer, M., Nomura, N., Eberl, L. Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*. *Nature Communications* **8**, 1-10 (2017).

- 37) Kashef, N., Huang, Y. Y., Hamblin, M. R. Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale. *Nanophotonics* **6**, 1-27 (2017).
- 38) Adams, M. P., Mallet, D. G., Pettet, G. J. Towards a quantitative theory of epidermal calcium profile formation in unwounded skin. *Public Library of Science One* **10**, 1-23 (2015).
- 39) Franken, L., Schiwon, M., Kurts, C. Macrophages: sentinels and regulators of the immune system. *Cellular Microbiology* **18**, 475-487 (2016).
- 40) 小野 さち子, 椛島 健治. 「皮膚免疫における樹状細胞・マクロファージの役割」 *Japanese Journal of Clinical Immunology* **39**, pp. 448-454 (2016).
- 41) Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., Casadevall, A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology* **13**, 620-630 (2015).
- 42) Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**, 443-451 (1999).

- 43) Yang, J. H., Kim, K. M., Kim, M. G., Seo, K. H., Han, J. Y., Ka, S. O., Park, B. H., Shin, S. M., Ku, S. K., Cho, I. J., Ki, S. H. Role of sestrin2 in the regulation of proinflammatory signaling in macrophages. *Free Radical Biology and Medicine* **78**, 156-167 (2015).
- 44) Akira, S. Toll-like receptor signalig. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 38105-38108 (2003).
- 45) O'mahny, D., Pham, U., Lyer, R., Hawn, T. R., Liles, W. C. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *International Journal of Medical Sciences* **5**, 1-8 (2008).
- 46) Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., Toyoda, H. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicology in Vitro* **20**, 767-773 (2006).
- 47) 島田 眞路. 「表皮細胞の免疫学」 山梨医大誌 **11**, pp. 1-7 (1996).

- 48) Cho, J. A., Kim, T. J., Moon, H. J., Kim, Y. J., Yoon, H. K., Seong, S. Y. Cardiolipin activates antigen-presenting cells via TLR2-PI3K-PKN1-AKT/p38-NF-kB signaling to prime antigen-specific naïve T cells in mice. *European Journal of Immunology* **48**, 777-790 (2018).
- 49) Lin, H. Y., Tang, C. H., Chen, Y. H., Wei, I. H., Chen, J. H., Lai, C. H., Lu, D. Y. Peptidoglycan enhances proinflammatory cytokine expression through the TLR2 receptor, MyD88, phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and NF-kappaB pathways in BV-2 microglia. *International Immunopharmacology* **10**, 883-891 (2010).
- 50) Belhaouane, I., Hoffmann, E., Chamillard, M., Brodin, P., Machelart, A. Paradoxical roles of the MAL/Tirap adaptor in pathologies. *Frontiers in Immunology* **11**, 1-9 (2020).

## 謝 辞

電子顕微鏡による菌体・膜小胞(MVs)の形態観察およびNanosightによるMVs粒子径の測定を頂きました, 大阪医科大学 一般・消化器外科研究室 伊藤 裕子先生および岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科 教授 赤尾 幸博 先生に, 謹んで厚く御礼申し上げます。

また, ゼータ電位測定および実験を進めるにあたってご指導いただいた, 一丸ファルコス株式会社 開発部部长, アルナシリ イダマルゴダ 先生(岐阜薬科大学特任教授), 開発部次長 中田 善久 先生, 開発部 製品開発3課 岡本 知也 先生に深く感謝の意を表します。