

腔上皮細胞の再上皮化に対する
Lactobacillus crispatus の関与の研究

日本大学大学院医学研究科博士課程
病理系感染制御科学専攻

高田和秀

修了年 2019 年

指導教員 早川 智

目次

概要	．．．．1
緒言	．．．．4
対象と方法	．．． 10
結果	．．． 15
考察	．．． 18
まとめ	．．． 23
今後の展望	．．． 23
謝辞	．．． 25
図	．．． 26
図説	．．． 32
引用文献	．．． 35
研究業績	．．． 45

概要

背景：ヒト免疫不全ウイルス(HIV) や子宮頸がんの原因となるヒトパピローマウイルス(HPV) 等、生命の危機につながる感染症は粘膜経由で感染することが多い。従って粘膜上皮の堅牢性低下によるバリア機能の破綻は、これら病原体の体内への侵入につながる。健常女性の膣内では *Lactobacillus* 属を主体とする細菌叢が見られることが多いが、その中でも *L. crispatus* 主体の細菌叢は乳酸や H₂O₂ 産生による膣内 pH の低下および、病原菌の上皮細胞への付着阻止などの機序により、炎症反応を抑えるなど健常な膣内環境の維持に重要であり、HIVをはじめとする様々な感染症の局所防御に寄与していると考えられている。一方で *L. crispatus* を含む各種の乳酸菌自体が膣上皮細胞自体に与える影響はまだ不明な点が多い。

目的：上皮細胞によるバリア機能の修復・維持において重要な要素の一つに、損傷を受けた上皮組織周辺の上皮細胞が、遊走並びに増殖することで創傷部位を再び覆う再上皮化がある。しかしこのプロセスにおける乳酸菌の影響は完全には解明されておらず、膣上皮細胞における再上皮化に対する関与を検討する為、本研究を行った。

方法：ヒト不死化腔上皮細胞株 MS74 と腔乳酸菌の優位種である *L.crispatus* あるいは *L. acidophilus* を共培養し、スクラッチアッセイにて *L.crispatus* の再上皮化に対する影響を評価した。また細胞培養上清中の Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF) の濃度を ELISA 法にて検討した。次に蛍光免疫染色法によりスクラッチアッセイにおける VEGF およびその受容体である VEGFR1 及び 2 の発現を評価した。さらに明視野において菌体の細胞への付着を観察した。またヒトリコンビナント VEGF と *L.crispatus* の菌培養上清を添加し、再上皮化に対する影響を併せて評価した。

結果：*L.crispatus* との共培養時に MS74 細胞の再上皮化は有意に促進したが、細胞障害性に有意な変化は見られなかった。一方 *L. acidophilus* 共培養や加熱処理した *L.crispatus* の死菌では再上皮化に対する影響は見られなかった。また *L.crispatus* は細胞培養上清中の VEGF の濃度を有意に上昇させたが *L. acidophilus* では有意な変化は見られなかった。免疫蛍光染色において VEGF はスクラッチ端での発現が増加し、VEGFR1 及び 2 の発現はスクラッチによる影響は認められなかった。次に明視野で *L. crispatus* がスクラッチ端に多く付着している様子が観察され、*L. acidophilus* では同様の現象は認められなかった。糖鎖付加阻害剤を添加したところ、スクラッチ端における *L. crispatus* の接着

数は有意に減少した。またリコンビナントヒト VEGF は有意に MS74 細胞の遊走を促進し、菌の分泌成分を含む培養上清単独添加時においても、再上皮化の促進及び VEGF 濃度の増加が認められた。

結論と考察: *L. crispatus* は何らかの可溶性成分によって腔上皮細胞の VEGF 産生を上昇させることで、腔における再上皮化を促進している可能性が示唆された。また *L. crispatus* は創傷部位付近に糖鎖を介して付着することで、他の菌の接着を阻害する可能性が示唆された。これらの結果は腔上皮組織における創傷治癒と、創傷部位からの HIV をはじめとする感染リスクにおける *L. crispatus* のさらなる重要性を示唆するものである。*Lactobacillus* 属主体の腔細菌叢は霊長類に共通ではなく、ヒト独特のものである。ヒトと *L. crispatus* は共進化した可能性がある。

1. 緒言

細菌叢について

微生物は地球上のあらゆる環境に存在し、ヒトでの臓器や組織も例外ではない¹。医微生物学の歴史ではヒトへの病原性のある微生物を中心に研究がされており²、ヒトにおける細菌の叢（むら）がり、つまり細菌叢に関しては十分な研究がされてこなかった³。また従来の培養法では発育しない菌種の存在などが、細菌叢全体の解明をするうえで障害となっていたが、16S ribosomal RNA のシーケンシングやメタゲノム解析などの分子生物学的技術の発展により、ヒト細菌叢への理解は急速に進んでいる⁴。近年では細菌叢と宿主を一つの集合体としてとらえ、各組織における細菌叢を生体の構成要素や「臓器」の一つとして理解する見方も出てきており⁵⁻⁷、従来の自己・非自己という枠組みを超え、更なる統合的な機能理解が求められている。

ヒトにおける細菌叢の分布と役割

ヒトでは 100 兆個以上の細菌がおり、その菌種数は数百に及ぶとされる^{8, 9}。またヒトにおける細菌叢は各組織によって異なり、大きく分類すると表皮^{10, 11}（数千種、手掌単独で平均約 160 種）、口腔咽頭・呼吸器¹²（700 種以上）、消化器^{13, 14}（100~1000 種）、泌尿生殖器¹⁵（60 種以上）において、それぞれ独自の

細菌叢が分布している¹⁶ (図 1)。また各組織において細菌叢は様々な役割を担っており、ヒト細菌叢の大部分を占める消化管¹⁷ を例にとれば、ビオチンや葉酸など栄養素の合成、鉄、マグネシウム、カルシウムの吸収補助、消化不能な物質の代謝、IgA 分泌など免疫能の調整、そして後述するようにそれ自体がバリアとなつての病原体に対する感染防御などの役割を担っている¹⁸。

細菌叢と疾患

細菌叢は個人間において内容差を生じうるが、一個人内においては数種類の重要な菌の組み合わせを長期にわたって保持する傾向がある^{19, 20}。細菌叢との共存とそこから得られる利益の継続性という観点からみれば、細菌叢の安定性は宿主の健康に深く関与していると捉える事が出来る¹⁷。また細菌叢の大きな変化はしばしば宿主の病的な状態と関連している¹⁷。この点について具体的な疾患としては、炎症性腸疾患、肝疾患、代謝性疾患、感染性疾患、腫瘍性疾患、自己免疫性疾患、精神疾患などと、細菌叢の関連が現在までに研究されてきている²¹。

腔内細菌叢とその研究意義について

腔における細菌叢の研究も近年進んできており²²。その結果、健常人におけ

る腔細菌叢では *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jensenii* 等の *Lactobacillus* 属が大部分を占めることが分かってきた^{23, 24}。しかしこれらの菌が感染症の感受性においてどのような役割を果たしているかは、1892年にドイツの産科医 Albert Döderlein が腔常在菌である *Lactobacillus* 属の乳酸による病原体の増殖阻止を発表して以来²⁵、まだ不明な点が多い²⁶。

Lactobacillus 属は植物や、植物由来製品、発酵食品において、またヒトや動物の口腔、消化管、腔で見られ²⁷、その中でも *L. acidophilus* が様々な発酵食品から検出されるなどの理由で、最も幅広く知られている²⁸。ヒトにおいては *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. brevis*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. vaginalis* 等が口腔内で優位菌種であり、これらは糞便中でも検出される²⁷。しかし *Lactobacillus* 属は消化管において、数の観点からはマイナーな集団であり、これらは主に口腔内や食べ物が由来であるとされる^{27, 29}。25種類の *Lactobacillus* 属の遺伝子比較では、腔における優位4種 (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jensenii*) は、他の *Lactobacillus* 属の菌種よりもゲノムサイズと GC 含有率が有意に低いとされる³⁰。またこの4種特有のたんぱく質発現は見られなかったが、発現率の違いは他の *Lactobacillus* 属の菌種との間で認められ³⁰、なぜこの4種が腔における優位菌種なのかを十分説明できる知見が求められている³¹。

また消化管では細菌叢の菌種の多様性が健康に良いと考えられているが、膣では1、2種類の *Lactobacillus*-dominantの方が膣の健康維持に重要であるとされている²²。細菌叢自体が少数の菌種で構成されているならば、*in vitro*においてその菌種単独の関与を検討することは、生体内における実際の機能を推察するのに有用な可能性がある。

***Lactobacillus*による膣内環境維持への役割**

細菌叢には上述のように病原体に対するバリア機能を有する側面があり、競合的な上皮細胞への接着阻止、雑菌繁殖を不安定化させる各種酸や抗菌物質の産生などのメカニズムを有している^{18, 32}。*Lactobacillus*属は乳酸、 H_2O_2 、BACTERIOCINなど防御因子を産生することで、病原体増殖を不安定化させ、殺菌作用を持ち合わせるとされる^{33, 34}。また *LACTOBACILLUS*は上皮細胞に接着することで他の病原体の増殖を競合阻害的に阻害している³⁵。細菌叢における *LACTOBACILLUS*属の減少は、膣において最も多い感染症である BACTERIAL VAGINOSIS (BV) の特徴の一つであり、BVは様々な産科合併症や術後感染症³⁶のみならず、性感染症や HIV の感染リスクを上昇させる³⁷⁻³⁹。BVでは1、2種類の *LACTOBACILLUS*で構成された細菌叢が^{22, 31, 40}、*GARDNERELLA VAGINALIS*等の様々な通性嫌気性菌で置き換えられる⁴¹。

BV の病態生理はまだ不明であるが⁴²、*LACTOBACILLUS* による抗菌要素は腔内環境の維持と強い結びつきを示している⁴³。同様に、子宮頸癌の原因となるヒトパピローマウイルスに対する、*LACTOBACILLUS* の保護的な側面にも近年注目が集まっている⁴⁴。

生体バリアの種類

感染性疾患において病原体の体内への侵入という観点で言えば、皮膚や粘膜上皮組織は細菌叢と共に、体内と体外を隔てる生体バリアの第一線として機能する。バリアの構成要素としては、細胞分泌物による化学的バリア（ムチン⁴⁵、抗菌ペプチド⁴⁶など）、細胞自体による物理的バリア（タイトジャンクション形成⁴⁷など）、免疫細胞による生物学的バリア（自然免疫^{48,49}、獲得免疫⁵⁰など）があり、これらのメカニズムを通じて上皮細胞は異物や病原体の体内への侵入を阻止し、人体の感染制御において大きな役割を担っている（図 2）。またこの他に上述の細菌叢によるバリアも存在している（図 2）。さらには細菌叢と各種バリア間で相互に影響し合っていることが予想されるが、この点に関してはまだ不明な点が多い。

腔上皮細胞による腔内環境維持への役割

腔上皮細胞も腔内環境維持に重要な役割を担っている。腔上皮細胞はグリコーゲンが豊富で、腔分泌液中のグリコーゲン濃度と *Lactobacillus* の増殖には関係があることが判明している⁵¹。腔上皮細胞は *Lactobacillus* の産生する防御因子と共に、病原体に対する物理的バリアとして機能し⁵²、腔上皮組織の細胞間隙などは HIV が体腔に侵入する経路となりうる。また性交、殺精子剤や性感染病原体によって引き起こされる腔上皮の組織損傷は、バリア機能の堅牢性を低下させる^{38, 53-55}。実際、生殖器における炎症と HIV の伝染は関係していることが判明してきており^{54, 56, 57}、*Trichomonas vaginalis* は腔上皮細胞に対し細胞毒性を示し⁵⁸、上皮モノレイヤーでの HIV-1 の通過性を亢進させた⁵⁹。更に HIV-1 の存在自体が上皮細胞の堅牢性を直接阻害するという報告がなされている⁶⁰。それゆえ創傷治癒の遅れは炎症を悪化させ、病原体の侵入へつながり、その逆に、バリアの堅牢性維持は腔環境の維持に必要である⁶¹。

創傷治癒と再上皮化

上皮組織が損傷してそのバリア機能が破綻した際は、組織修復のプロセスが通常開始される⁶²。創傷治癒は一般的に、血小板やフィブリンゲンによるフィブリン形成などが起きる止血期が初めに起こり、好中球、マクロファージなど

炎症性細胞が浸潤し、壊死組織等の貪食や創の清浄化が行われる炎症期、肉芽形成や再上皮化が起こる増殖期、癒痕形成や成熟が起きるリモデリング期を経る⁶³⁻⁶⁵。これらの過程を通じ上皮細胞、免疫細胞、線維芽細胞、内皮細胞等が協調し、上皮の欠損部位の再被覆、新たな結合組織の形成並びに血管の新生が行われる⁶⁶。これらの過程のうち再上皮化とは、損傷を受けた上皮組織周辺の上皮細胞が、遊走並びに増殖することで創傷部位を再び覆うプロセスであり、上皮バリア機能の修復・維持において重要な要素の一つである⁶⁷⁻⁶⁹ (図 3)。

***L. crispatus* と膣上皮の再上皮化**

膣常在菌の優位菌種の一つであり、かつ性感染症に対し最も強い抵抗性を示す *L. crispatus* が⁷⁰、膣上皮の再上皮化においてどのように関与しているのかはまだ不明であり、その点を検討するため、本研究で私は不死化膣上皮である MS74 細胞⁷¹を用いて、再上皮化に対する検討を行った。

2. 対象と方法

細胞培養

ヒト不死化膣上皮細胞株である MS74 は John F. Alderete 教授 (Texas 大学) から分与されたものを使用した。DMEM 培地 (Gibco, Carlsbad, CA, USA) に

10% fetal bovine serum と 100 U/mL penicillin、0.1 mg/mL streptomycin を加え、37°C、5% CO₂の環境で培養した。

細菌培養

L.crispatus (JCM 7696) 及び *L. acidophilus* (JCM 2124) は理研バイオリソース研究センターより提供を受けた。MRS broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) で震盪せずに 37°C で培養した。菌数は broth の 600 nm における混濁度を、吸光度計 (Amersham Pharmacia Biotech, Cardiff, United Kingdom) で計測し、同時に MRS agar (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) での培養で得られたコロニー数をカウントして検量線を作成し、その検量線を元に Colony-forming unit (CFU) として定量した。MS74 細胞との共培養時には菌液を 3500 rpm で 15 分遠心した後、上清である MRS broth を取り除き、細胞培養に用いる DMEM で再溶解したものを用いた (2% 以上の MRS broth が MS74 に対し細胞毒性を示したため)。死菌の影響を検討する際には、100°C で 15 分処理した菌を上記同様遠心した後に DMEM に再懸濁したものを培養細胞に添加した。

スクラッチアッセイによる再上皮化の検討

MS74 細胞を 24-well プレート (Falcon, Corning, NY, USA) に 1mL の

DMEM で培養し、コンフルエントになった後に 2mm 幅の Cell Scratcher (Iwaki Glass, Chiba, Japan) を用いて直線状のスクラッチ形成を行った⁶⁹。Phosphate buffered saline (PBS) で一回洗浄したのち、*L. crispatus* の共培養や死菌の添加を行った。細胞は 24 時間後に 7.5% formaldehyde と 0.25% の crystal violet (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) で固定染色した後、well 中心の 4 x 4 mm²内の残存創傷面積 (remaining wound area) を Image J software (NIH) で定量した。

細胞障害性の検討

L. crispatus 共培養や他の添加物の MS74 細胞の viability に対する影響を調べるため、trypan blue 色素排除試験を行った。96-well プレートに MS74 細胞を 5000 個ずつ 24 時間培養し、菌や添加物を加えたのち更に 24 時間培養し、10% trypsin-EDTA で処理・回収した。回収した細胞を trypan blue で染色し、血球計算盤で viability を測定した。trypan blue 色素を細胞外に排除できた細胞数 / 全細胞数を viability の指標とした。

L. crispatus 培養上清の再上皮化に対する影響の検討

L. crispatus 由来の可溶性因子の影響を評価するため、 2.5×10^4 CFU の *L.*

crispatus を DMEM 中で 24 時間培養した後、3500 rpm で 15 分間遠心し上清を回収し、使用前まで -80°C で保存した。この菌培養上清 700 μ L と新しい DMEM 300 μ L を混ぜたものを、上記同様スクラッチ後のサンプルに添加した。

細胞培養上清中の VEGF 濃度の測定

スクラッチ後 24 時間経過した細胞培養上清を 3000 rpm で 15 分遠心した後で回収し、測定に使用するまで -80°C で保存した。VEGF 濃度は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キット (R&D Systems, Mineapolis, MN, USA) を用い、付属の説明書に従って計測した。マイクロプレートリーダー (iMark Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて、450 nm で吸光度を測定した。

免疫蛍光染色による VEGF の発現局在性の検討

スクラッチしたサンプルを 24 時間培養後に -20°C の methanol で 5 分間固定し、1% bovine serum albumin (BSA, Sigma, St. Louis, MO, USA) in PBS で洗浄した後、3% BSA in PBS で 30 分間ブロッキングを行った。次に anti-VEGF antibody (1:50; Abcam, Cambridge, UK)、anti-VEGFR1 antibody (1:100; Abcam, Cambridge, UK)、及び anti-VEGFR2 antibody (1:250; Abcam,

Cambridge, UK)、を加え overnight で反応させ洗淨した後、二次抗体である CF488A-labeled anti-rabbit antibody (1:250; Biotium, Hayward, CA, USA) を加え室温で 30 分静置した。洗淨後 Mounting Medium with DAPI (Biotium, Hayward, CA, USA) で細胞をマウントした。VEGF の染色に当たっては、サイトカインを細胞内に留めるために、固定の 4.5 時間前から Brefeldin A (50 µg/mL; Sigma, St. Louis, MO, USA) を添加した。

***Lactobacillus* の細胞表面への接着の検討**

L. crispatus および *L. acidophilus* とスクラッチした MS74 細胞を共培養し、24 時間後に明視野における観察を行った (EVOS FLoid Cell Imaging Station : Thermo Fisher Scientific, Boston, MA, USA)。また糖鎖付加阻害剤として Benzyl-2-acetamido-2deoxy- α -D-galactopyranoside (2mM; Calbiochem, Billerica, MA, USA) を添加し、PBS で 2 回洗淨した後のスクラッチ端 150 × 150 µm² における菌数を盲検法により計測した。

リコンビナントヒト Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF) による再上皮化に対する影響の検討

VEGF の細胞遊走に対する影響を調べるため、10 µg/mL mitomycin C (MMC;

Kyowa Hakko Kirin Co, Tokyo, Japan) でスクラッチ前に 2 時間処理し、細胞増殖を阻害した後 PBS で洗浄してからスクラッチアッセイを行った。100 および 1000 pg/mL のリコンビナントヒト VEGF₁₆₅ (血管増殖の観点から最も豊富に存在し作用力のある VEGF の isoform の一つ⁷², PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) を添加し、上記同様 48 時間後に固定染色し定量した。

統計学的処理

実験の結果は平均±SEM で示し、有意差検定は Statcel 3 (OMS publishing Inc, Saitama, Japan) を用いて Tukey-Kramer 検定及び Mann-Whitney 検定を行った。P 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意とした。

3. 結果

L. crispatus の MS74 細胞の再上皮化への影響

2.5 x 10⁴ CFU/mL の *L. crispatus* は MS74 細胞の再上皮化を有意に促進した (図 4A)。2.5 x 10⁵ CFU/mL においても同様に有意な促進が見られたが、2.5 x 10⁴ CFU/mL での残存創傷面積と有意な差は認められなかった (図 4A)。一方で口腔内や腸管、発酵食品で多く見られる *L. acidophilus* では 2.5 x 10⁴ CFU/mL において MS74 細胞の再上皮化を促進しなかった (図 4A)。この結

果から 2.5×10^4 CFU/mL の *L.crispatus* を以降の実験で用いることとした。

MS74 細胞の viability に *L. crispatus* が与える影響について検討したところ、

L.crispatus は MS74 細胞の viability を増加させる傾向を認めたものの、有意

ではなかった (図 4B)。また加熱処理した *L. crispatus* の死菌では再上皮化に

対する影響は認められなかった (図 4C)。

再上皮化における VEGF の関与の検討

腔細菌叢の異常を伴う集団では、腔内の VEGF の濃度は *Lactobacillus* 主体の細菌叢を有する集団よりも低いとの報告がある⁷³。また腔内環境維持で重要なエストロジオールを始めとする女性ホルモンは VEGF 産生を促進するとの報告もあるため^{74,75}、本研究では VEGF に着目をした。

L.crispatus と MS74 細胞の共培養により、24 時間後に培養上清中の VEGF 濃度は有意に上昇した。*L. acidophilus* との共培養では VEGF 産生の上昇は認めなかった。また *L.crispatus* による産生量とは有意差を認めた (図 5A)。しかし予想に反して *L.crispatus* 共培養での上昇率はコントロール群と比べ 10% 程度であった。それゆえ局所的な影響を検討するため、免疫蛍光染色法にて VEGF 及び、その受容体である VEGFR1 及び 2⁷⁶ の発現を評価したところ、VEGF はスクラッチ端において発現の増加が見られた (図 5B)。一方 VEGFR1 及び 2

は局所的な発現変化は見られなかった (図 5B)。次に明視野で *L. crispatus* がスクラッチ端に多く付着している様子が観察され、*L. acidophilus* では同様の現象は認められなかった (図 5C)。糖鎖付加阻害剤を添加したところ、スクラッチ端における *L. crispatus* の接着数は有意に減少した (図 5D)。

リコンビナント VEGF の再上皮化に対する影響

次に VEGF の影響を検討するため 100 および 1000pg/mL のリコンビナント VEGF を、MMC 処理し細胞増殖を阻害した後にスクラッチした MS74 細胞に添加した。48 時間後にリコンビナント VEGF は用量依存性に残存創傷面積を有意に減少させた (図 6A)。

L. crispatus 培養上清の再上皮化に対する影響

L. crispatus から産生された可溶性因子の影響を検討するため、菌の培養上清をスクラッチした後の MS74 細胞に加えたところ、24 時間後に残存創傷面積を有意に減少させた (図 6B)。また細胞培養上清中の VEGF 濃度も有意に増加させた (図 6C)。

4. 考察

Lactobacillus 属はいくつかの組織において創傷治癒に影響する可能性が示唆されている。胃潰瘍⁷⁷⁻⁷⁹や皮膚上皮^{67, 80-82}においては保護的な効果が報告されている一方で、口腔内上皮においては *L. salivarius* と *L. plantarum* は創傷治癒を阻害するという⁸³。最近では CXCL12 をコードしたプラスミドを組み込んだ *L. reuteri* がマウスにおける表皮の創傷治癒を促進する一方で、通常の *L. reuteri* は創傷治癒を遅らせたとの報告がある⁸⁴。本研究においては、膣の優位菌種である *L. crispatus* は膣上皮細胞における再上皮化と VEGF の産生を促進することが明らかになった。

現在までに *L. crispatus* の創傷治癒に対する影響はほとんど知られておらず、抗炎症に関する報告がいくつか散見される程度である。PubMed で検索可能な限りでは、凝集性を持つ *L. crispatus* 株は LPS による腸管上皮細胞の遊走阻害を軽減したが、凝集性を持たない *L. crispatus* 株ではその効果が見られなかったという研究が一報存在するのみであり⁸⁵、今回我々は膣上皮細胞を用いたスクラッチアッセイ法を用い、*L. crispatus* が再上皮化を促進することを初めて報告した。抗炎症性に関しては、*L. crispatus* とその培養上清は、*Chlamydia trachomatis* 存在下での HeLa 細胞における炎症誘発性サイトカインの減少、並びに免疫応答の抑制作用を示す IL-10 の産生を増加させ⁸⁶、この作用では

Toll-like receptor (TLR) 2 および TLR4 の関与が示唆されている^{85, 87}。

Lactobacillus 属が腔においても同様の作用を示すかは不明であるので⁸⁸、腔粘膜上皮における *Lactobacillus* 属の抗炎症作用について今後の解明が望まれる。

腔内には 20 種類以上の *Lactobacillus* 属が検出されているが⁴³、腔分泌液中の濃度は $10^7 - 10^8$ CFU/mL である^{89, 90}。腔上皮細胞の重層培養では *L. crispatus* は約 10^5 CFU/mL で増殖が均衡状態となったとの報告がある⁹¹。このことは本研究において *L. crispatus* の再上皮化促進効果が、同じく 10^5 のオーダーでそれ以上の増加を認めなかった知見と矛盾しない。臨床と実験条件における整合性、とりわけ BV など *Lactobacillus* 属の数が減少する状況など、より多くの条件検討が必要である。

VEGF は組織修復の過程において重要であり、上皮細胞の遊走促進因子としても知られている^{92, 93}。*Lactobacillus* 属が大半を占めている健常人群と、尿路感染症を繰り返す患者群（50%以上で腔細菌叢の異常を認めた）とでは、前者の方がヒトの腔分泌液中における VEGF 濃度は有意に高かった⁷³。本研究では MS74 細胞と *L. crispatus* との共培養時、並びに菌培養上清添加時において細胞培養上清中の VEGF 濃度は有意に上昇した。また死菌では再上皮化は促進しなかった。これらの結果から、生菌からの可溶成分が VEGF の産生を促進している可能性が考えられる。同様に *L. plantarum* が産生する plantaricin A が表皮

ケラチノサイトの VEGF の mRNA 上昇を伴う細胞増殖と遊走促進をしたとの報告がある⁸¹。この研究では VEGF の他に TGF-β1、FGF7、IL-8 の mRNA 上昇を伴っており⁸¹、plantaricin A がこれらサイトカイン上流の転写因子活性にある程度調節している可能性があり、同様に *L. crispatus* の産生する可溶性成分の VEGF 上流の転写因子活性における影響が示唆される。一方でプロバイオティクスに用いられる *L. rhamnosus* と *L. reuteri* は膣上皮細胞において VEGF の産生に影響を及ぼさなかった⁹⁴。健常女性における cervicovaginal lavage 中タンパク質の網羅的解析では、S-layer protein、bacterial surface layer protein や cell separation protein が *L. crispatus* 由来として同定され⁹⁵、glucose-6-phosphatate isomerase 等他のタンパク質も *L. crispatus* から分泌されると言われており⁹⁶、これらの可溶性物質が膣上皮細胞からの VEGF 産生を誘導する可能性がある。

本研究では VEGF の発現がスクラッチ端において増強しており、自己分泌や傍分泌による局所的な作用を示唆していると考えられる。さらに 100 pg/mL のリコンビナント VEGF の添加時に有意に遊走が促進したことから、約 10% の VEGF の増加は生理的活性を示すのに十分量であると考えられる。一方で受容体である VEGFR1 および 2 の発現はスクラッチ端での明らかな上昇は見られず、スクラッチ端における VEGF の細胞側受容体に対する結合効率には影響を及ぼ

さない可能性がある。またスクラッチ端では障害を受けた細胞を中心に reactive oxygen species (ROS) が生じ mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を活性化することが、細胞のシート状遊走に重要とされ⁹⁷、消化管粘膜における *Lactobacillus* の ROS 産生による上皮修復の可能性も指摘されている⁹⁸。一方、物理的な障害を伴わない細胞遊走を測定する系では、シート状遊走が起こりにくいと報告されている⁹⁷。MAPK 経路の下流には VEGF が存在するため⁹⁹、これらのメカニズムの関与の可能性が本研究でも示唆される。また Toll-like receptor を始めとするパターン認識受容体の検討も必要である。スクラッチアッセイにおける VEGF の発現増加と *L. crispatus* のスクラッチ端への遍在は、これらメカニズムに対する *L. crispatus* の関与の可能性を示唆しており、今後の検討課題である。

以上で述べた通り、*L. crispatus* の MS74 細胞における VEGF 産生促進の機序は、*L. crispatus* 由来の可溶性成分及び *L. crispatus* の菌体成分の直接的な接触の両方の可能性があるため、チャンバーを用いて *L. crispatus* の非接触的影響を検討する予定である。

組織修復には様々な細胞が関与しており、本研究では上皮細胞の検討しか行っていないため、その点が限界の一つである¹⁰⁰。それゆえ in vivo における検討や、細菌叢の内部での相互作用などの検討も今後必要である。また腔内部

での部位によって細菌叢が異なるとの報告があり¹⁰¹、その影響も否定できない。組織学的には腔壁は重層扁平上皮であるが、子宮頸部では扁平上皮-円柱上皮移行帯(Squamo-columnar junction:SCJ))があり単層立方上皮へと移行する¹⁰²。HPVは子宮頸部での感染が重要であるが¹⁰²、単層立方上皮の組織修復過程は重層扁平上皮とは異なる点もある⁴⁸。子宮頸癌由来のHeLa細胞を用いたスクラッチアッセイでは*L. iners*の培養上清は再上皮化に影響を及ぼさなかったが、*G. vaginalis*の培養上清は有意に再上皮化を抑制したという報告がある⁶¹。*L. crispatus*が子宮頸部上皮細胞の再上皮化に与える影響について更なる検討が必要である。

*L. crispatus*は健常人における細菌叢としての他に、プロバイオティクスとして応用も検討されている¹⁰³。*L. crispatus*は再発性のBV¹⁰⁴と尿路感染症^{105, 106}において再発率の低下を示し、後者は再発性の尿路感染において腔細菌叢の異常がみられるとの報告⁷³と矛盾しない。消化管において、*L. crispatus*は有意ではないもののクローン病の患者からのex vivoサンプルにおいてTNF- α の産生を抑制した¹⁰⁷。またマウスにおける腸炎においても*L. crispatus*は保護効果を示している^{108, 109}。

興味深いことに、腔と直腸は解剖学的に近いため細菌叢の移行があり、*Lactobacillus*属を共有しているとの報告がある。それによれば、*L. crispatus*

と *L. jensenii* は膣と直腸の両方に存在し、*L. inners* は膣、*L. gasseri* は直腸でより多く検出された¹¹⁰。これらの研究から *Lactobacillus* 属は泌尿生殖器系と消化器系の双方において、病原体に対する抵抗性を持っている可能性があり、*L. crispatus* をはじめとして常在細菌叢を構成する *Lactobacillus* 属の多種多様な機能の解明が望まれる。

5. まとめ

結論として、本研究では *L. crispatus* が VEGF 濃度の上昇を伴う膣上皮 MS74 細胞の再上皮化を促進することを示した。また *L. crispatus* は創傷部位付近に糖鎖を介して付着することで、他の菌の接着を阻害する可能性が示唆された。この結果は膣上皮組織における創傷治癒と、創傷部位からの HIV をはじめとする感染リスクにおける *L. crispatus* のさらなる重要性を示唆するものである。

6. 今後の展望

考察で述べた各項目の他、三次元培養や *in vivo* など、より実際の人体に近い条件での検討や、スクラッチアッセイ以外でのバリア機能の堅牢性に対する評価、*L. crispatus* 以外の健常及び各種病態で見られる他の菌種による影響に関してまだ不明な点が多いため、これらの点に関し更なる比較検討が必要である。更な

る因子や経路の特定についてはマイクロ DNA アレイやプロテインアレイを始めとする網羅的解析手法での検討を予定している。また *Lactobacillus* 属主体の腔細菌叢は霊長類に共通ではなく、ヒト独特のものである¹¹¹。ヒトと *L. crispatus* は共進化している可能性があり、多様な視点からの今後の研究を進めていきたい。

謝辞

本研究の遂行にあたり、この分野にお導き下さるとともに、研究者を目指す心構えに始まり、研究計画の立て方や研究費取得の方法、論文の書き方に至るまで研究に関する本質的なご指導を賜りました早川 智教授（日本大学医学部病態病理学系微生物学分野）に深謝いたします。実験手技や論文執筆に関するご指導やご助言を賜りました相澤志保子準教授、**Quang Duy Trinh** 助教、**Ngan Thi Kim Pham** 先生（微生物学分野）に深謝いたします。また共同で実験を行った笹野まり先生（日本大学医学部脳神経外科学系神経外科学分野）、蔵持智也君、伊藤 駿君（医学部学生）に厚く御礼申し上げます。

図 1

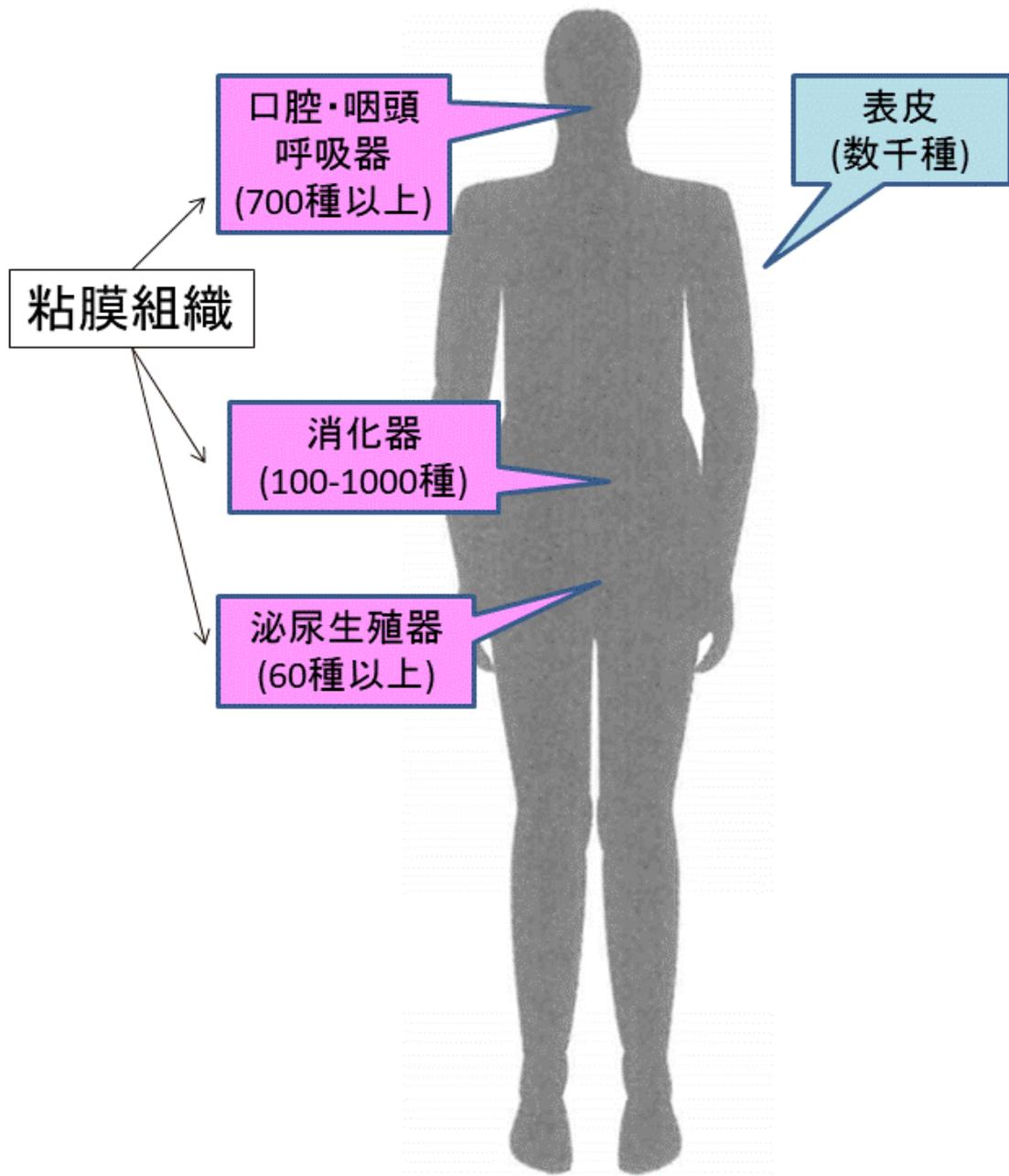


図 2

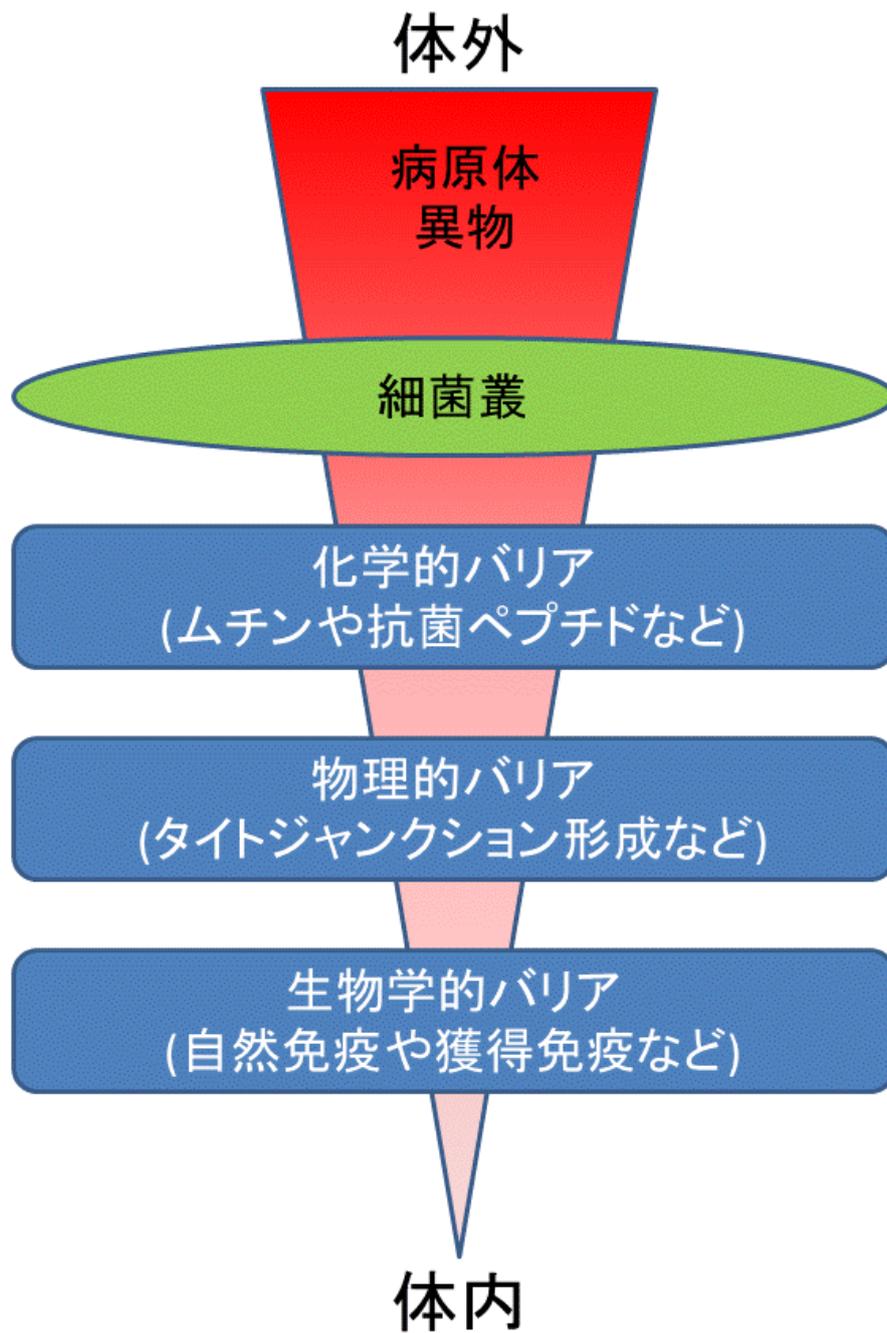
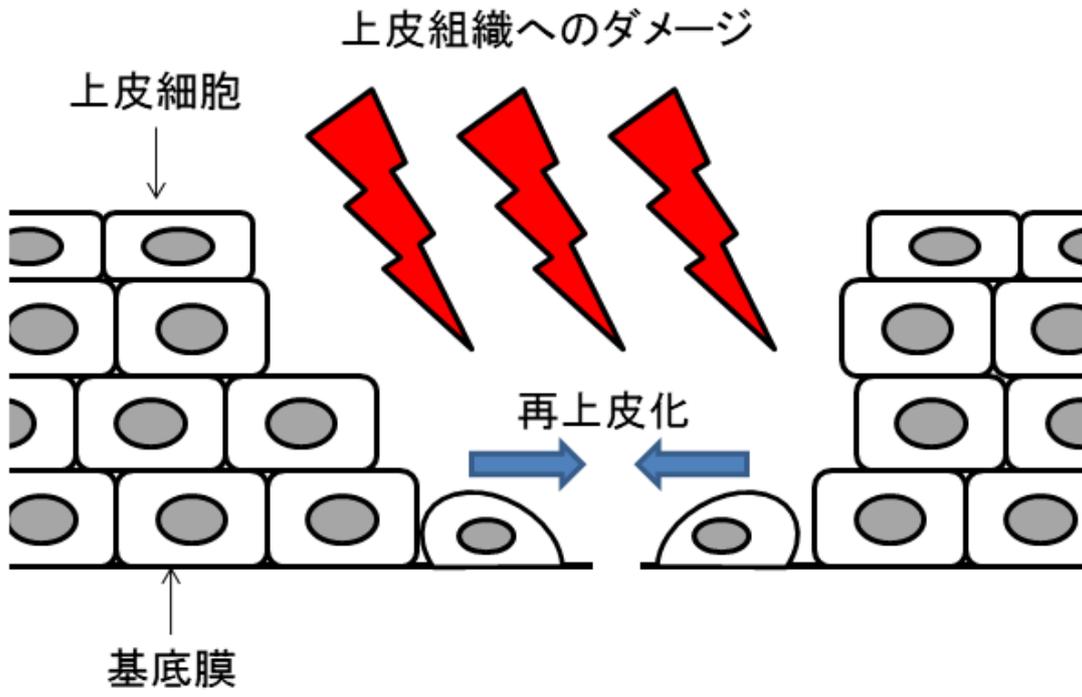
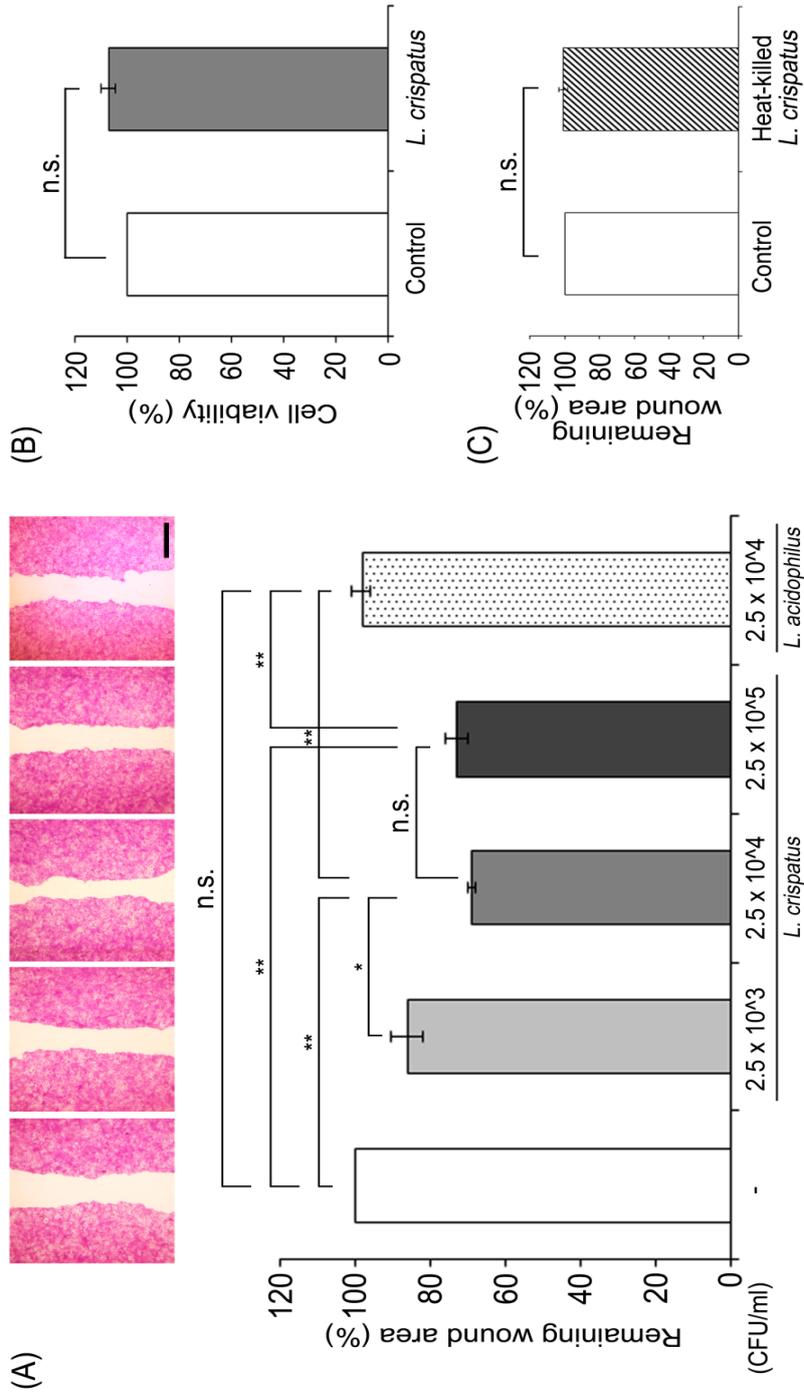


図 3





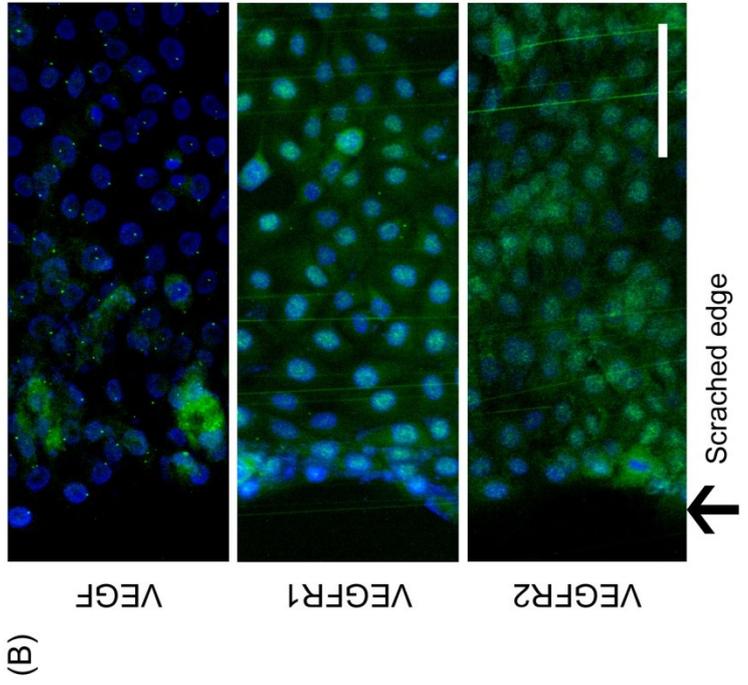
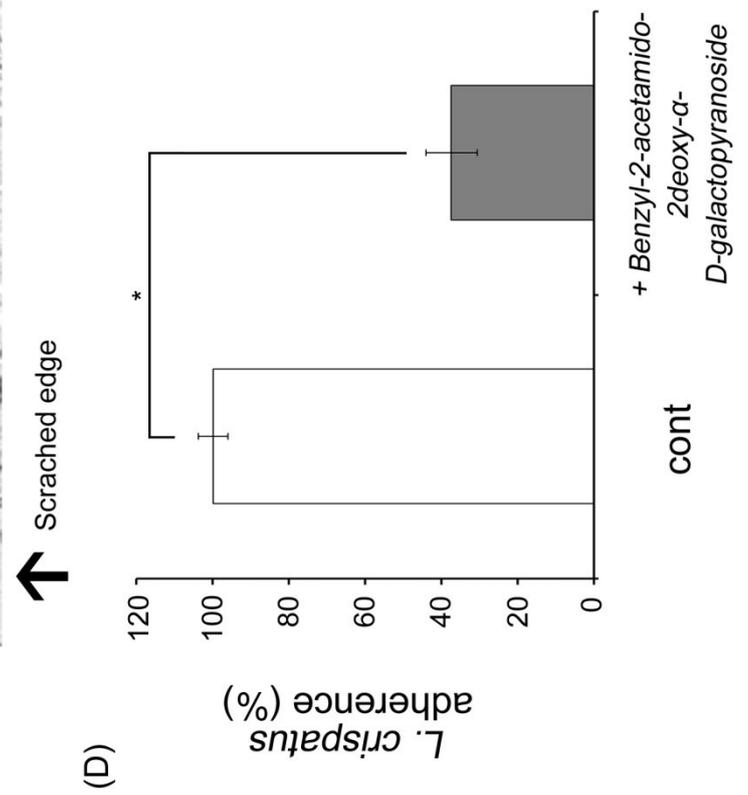
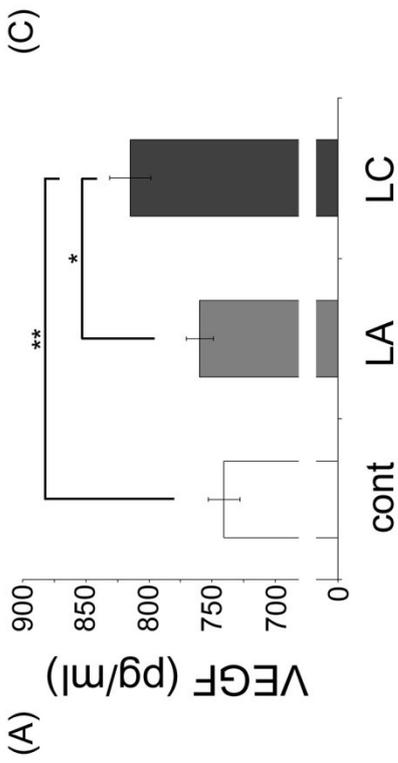
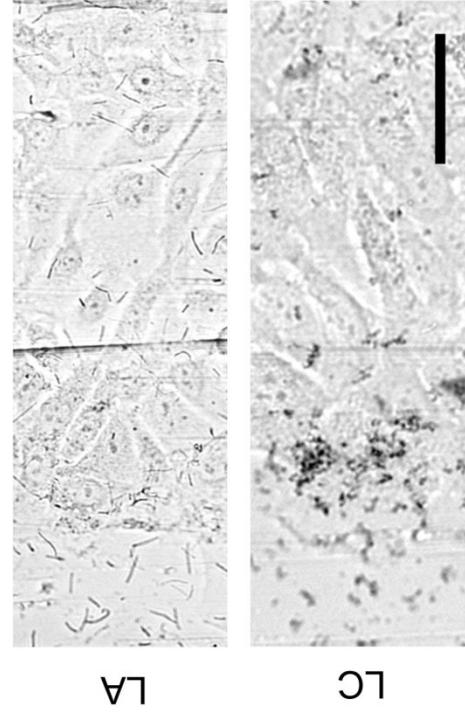
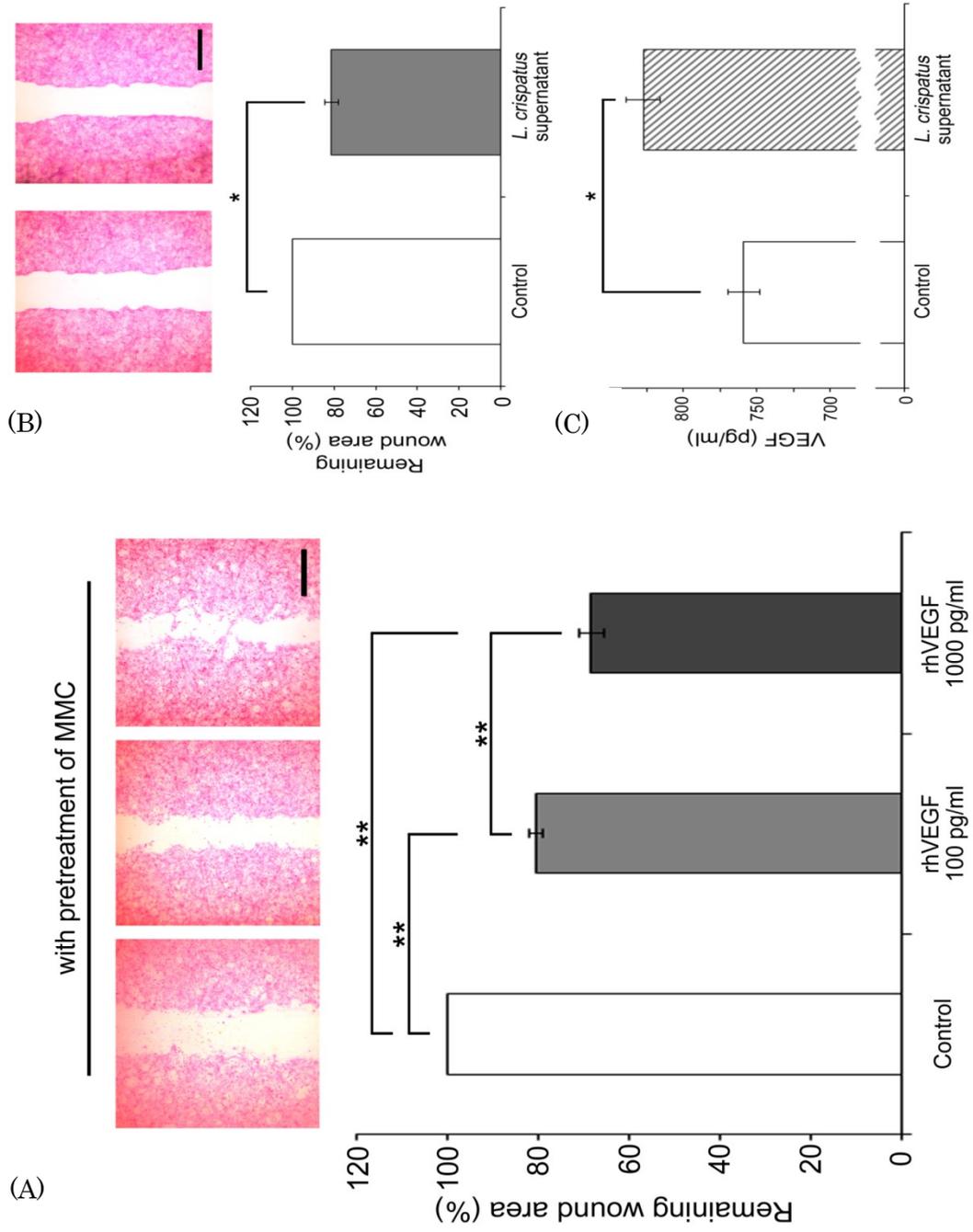


Figure 6



図説

図 1. ヒトにおける細菌叢とその分布および菌種数

大きく分類すれば表皮、口腔咽頭・呼吸器、消化器、泌尿生殖器において、それぞれ独自の細菌叢が分布している。

図 2. 生体バリアの各構成要素

病原体や異物は、細菌叢、化学的バリア（ムチンや抗菌ペプチドなどの細胞分泌物）、物理的バリア（タイトジャンクション形成など）、生物学的バリア（自然免疫、獲得免疫など）によって、体内への侵入や感染を阻止されている。

図 3. 再上皮化の模式図

上皮組織が損傷を受けた際には、周囲の上皮細胞が遊走・増殖をすることで損傷部位を再び覆う再上皮化が起こる。再上皮化はバリア機能の維持・回復に重要なプロセスの一つである。

図 4. *L. crispatus* の MS74 細胞における再上皮化への影響

(A) 各 CFU における *L. crispatus* の MS74 細胞における影響をスクラッチアッ

セイにて評価した (n = 3)。また *L. acidophilus* は一般的な *Lactobacillus* 属の比較対象として用いた。(B) *L. crispatus* の viability への影響を trypan blue 色素排除試験にて評価した (n = 4)。(C) 加熱処理した *L. crispatus* 死菌の再上皮化への影響をスクラッチアッセイにて検討した (n = 3)。結果は平均±SEM で示した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、n.s. : not significant、scale bar = 1mm

図 5. VEGF の MS74 細胞遊走への影響

(A) *L. crispatus* (LC) および *L. acidophilus* (LA) 共培養時における 24 時間後の細胞培養上清中の VEGF 濃度を ELISA 法にて計測した (n = 4-8)。(B) VEGF、VEGFR1 および 2 の発現を免疫蛍光染色により評価した。(C) 明視野においてスクラッチ端と菌体の遍在を評価した。(D) 糖鎖付加阻害剤 (Benzyl-2-acetamido-2deoxy- α -D-galactopyranoside) 存在下において、24 時間共培養後に PBS で 2 回洗浄した後の、スクラッチ端での *L. crispatus* の菌数を評価した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、scale bar = 100 μ m

図 6. リコンビナントヒト VEGF の MS74 細胞遊走に対する影響と *L. crispatus* 菌培養上清の MS74 細胞における再上皮化への影響

(A) Mitomycin C (MMC) で細胞増殖を止める前処置をした後、リコンビナント

ヒト VEGF を添加し 48 時間後の細胞遊走をスクラッチアッセイにて評価した (n = 3)。(B) 菌培養上清の MS74 細胞における再上皮化への影響をスクラッチアッセイにて評価した。(C) 菌培養上清添加時における 24 時間後の細胞培養上清中の VEGF 濃度を ELISA 法にて計測した (n = 3)。結果は平均±SEM で示した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、scale bar = 1mm

引用文献

- 1 Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI: The human microbiome project. *Nature* 2007;449:804-810.
- 2 Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Di Francesco V, Howcroft TK, Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H, Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C, Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little AR, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH, Starke-Reed P, Zakhari S, Read J, Watson B, Guyer M: The NIH Human Microbiome Project. *Genome research* 2009;19:2317-2323.
- 3 Relman DA, Falkow S: The meaning and impact of the human genome sequence for microbiology. *Trends in microbiology* 2001;9:206-208.
- 4 Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavard G, Crabtree J, Orvis J, Hall AB, Brady A, Creasy HH, McCracken C, Giglio MG, McDonald D, Franzosa EA, Knight R, White O, Huttenhower C: Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature* 2017;550:61-66.
- 5 O'Hara AM, Shanahan F: The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports* 2006;7:688-693.
- 6 Eberl G: A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism. *Mucosal immunology* 2010;3:450-460.
- 7 Lee WJ, Hase K: Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nature chemical biology* 2014;10:416-424.
- 8 Lozupone C, Faust K, Raes J, Faith JJ, Frank DN, Zaneveld J, Gordon JI, Knight R: Identifying genomic and metabolic features that can underlie early successional and opportunistic lifestyles of human gut symbionts. *Genome research* 2012;22:1974-1984.
- 9 Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE: Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science (New York, NY)* 2006;312:1355-1359.
- 10 Chen YE, Tsao H: The skin microbiome: current perspectives and future challenges. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2013;69:143-155.
- 11 Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA: The human skin microbiome. *Nature reviews Microbiology* 2018;16:143-155.

- 12 Verma D, Garg PK, Dubey AK: Insights into the human oral microbiome. *Archives of microbiology* 2018;200:525-540.
- 13 Konturek PC, Haziri D, Brzozowski T, Hess T, Heyman S, Kwiecien S, Konturek SJ, Koziel J: Emerging role of fecal microbiota therapy in the treatment of gastrointestinal and extra-gastrointestinal diseases. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 2015;66:483-491.
- 14 Browne HP, Forster SC, Anonye BO, Kumar N, Neville BA, Stares MD, Goulding D, Lawley TD: Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature* 2016;533:543-546.
- 15 Thomas-White K, Forster SC, Kumar N, Van Kuiken M, Putonti C, Stares MD, Hilt EE, Price TK, Wolfe AJ, Lawley TD: Culturing of female bladder bacteria reveals an interconnected urogenital microbiota. *Nature communications* 2018;9:1557.
- 16 Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486:207-214.
- 17 Coyte KZ, Schluter J, Foster KR: The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science (New York, NY)* 2015;350:663-666.
- 18 Martin R, Miquel S, Langella P, Bermudez-Humaran LG: The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. *Virulence* 2014;5:413-423.
- 19 Vanhoutte T, Huys G, Brandt E, Swings J: Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. *FEMS microbiology ecology* 2004;48:437-446.
- 20 Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, Clemente JC, Knight R, Heath AC, Leibel RL, Rosenbaum M, Gordon JI: The long-term stability of the human gut microbiota. *Science (New York, NY)* 2013;341:1237439.
- 21 Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L: The human microbiota in health and disease. *Engineering* 2017;3:71-82.
- 22 Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Romero R: The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 2011;118:533-549.
- 23 Ma B, Forney LJ, Ravel J: Vaginal microbiome: rethinking health and disease. *Annual review of microbiology* 2012;66:371-389.

- 24 Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO: Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108:4680-4687.
- 25 Döderlein A: The vaginal transsudate and its significance for childbed fever. *Centralblatt für bacteriologie* 1892;11:699-700.
- 26 van Houdt R, Ma B, Bruisten SM, Speksnijder A, Ravel J, de Vries HJC: Lactobacillus iners-dominated vaginal microbiota is associated with increased susceptibility to Chlamydia trachomatis infection in Dutch women: a case-control study. *Sexually transmitted infections* 2018;94:117-123.
- 27 Walter J: Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Applied and environmental microbiology* 2008;74:4985-4996.
- 28 Anjum N, Maqsood S, Masud T, Ahmad A, Sohail A, Momin A: Lactobacillus acidophilus: characterization of the species and application in food production. *Critical reviews in food science and nutrition* 2014;54:1241-1251.
- 29 Koleva PT, Bridgman SL, Kozyrskyj AL: The infant gut microbiome: evidence for obesity risk and dietary intervention. *Nutrients* 2015;7:2237-2260.
- 30 Mendes-Soares H, Suzuki H, Hickey RJ, Forney LJ: Comparative functional genomics of Lactobacillus spp. reveals possible mechanisms for specialization of vaginal lactobacilli to their environment. *Journal of bacteriology* 2014;196:1458-1470.
- 31 Witkin SS, Linhares IM: Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 2017;124:606-611.
- 32 Hand TW: The Role of the Microbiota in Shaping Infectious Immunity. *Trends in immunology* 2016;37:647-658.
- 33 O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA: Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota. *PloS one* 2013;8:e80074.
- 34 Spurbeck RR, Arvidson CG: Lactobacilli at the front line of defense against vaginally acquired infections. *Future microbiology* 2011;6:567-582.
- 35 Kovachev S: Defence factors of vaginal lactobacilli. *Critical reviews in microbiology* 2018;44:31-39.
- 36 Martin DH, Zozaya M, Lillis R, Miller J, Ferris MJ: The microbiota of the human genitourinary tract: trying to see the forest through the trees. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 2012;123:242-256.
- 37 Unemo M, Bradshaw CS, Hocking JS, de Vries HJC, Francis SC, Mabey D,

- Marrazzo JM, Sonder GJB, Schwebke JR, Hoornenborg E, Peeling RW, Philip SS, Low N, Fairley CK: Sexually transmitted infections: challenges ahead. *The Lancet Infectious diseases* 2017.
- 38 Petrova MI, van den Broek M, Balzarini J, Vanderleyden J, Lebeer S: Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. *FEMS microbiology reviews* 2013;37:762-792.
- 39 Martin DH: The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. *The American journal of the medical sciences* 2012;343:2-9.
- 40 Gosmann C, Anahtar MN, Handley SA, Farcasanu M, Abu-Ali G, Bowman BA, Padavattan N, Desai C, Droit L, Moodley A, Dong M, Chen Y, Ismail N, Ndung'u T, Ghebremichael MS, Wesemann DR, Mitchell C, Dong KL, Huttenhower C, Walker BD, Virgin HW, Kwon DS: Lactobacillus-Deficient Cervicovaginal Bacterial Communities Are Associated with Increased HIV Acquisition in Young South African Women. *Immunity* 2017;46:29-37.
- 41 Nasioudis D, Linhares IM, Ledger WJ, Witkin SS: Bacterial vaginosis: a critical analysis of current knowledge. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 2017;124:61-69.
- 42 Muzny CA, Schwebke JR: Pathogenesis of Bacterial Vaginosis: Discussion of Current Hypotheses. *The Journal of infectious diseases* 2016;214 Suppl 1:S1-5.
- 43 Borges S, Silva J, Teixeira P: The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Archives of gynecology and obstetrics* 2014;289:479-489.
- 44 Mitra A, MacIntyre DA, Marchesi JR, Lee YS, Bennett PR, Kyrgiou M: The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? *Microbiome* 2016;4:58.
- 45 Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC: The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:15064-15069.
- 46 Selsted ME, Ouellette AJ: Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature immunology* 2005;6:551-557.
- 47 Tsukita S, Furuse M, Itoh M: Multifunctional strands in tight junctions. *Nature reviews Molecular cell biology* 2001;2:285-293.
- 48 Kurashima Y, Kiyono H: Mucosal ecological network of epithelium and immune cells for gut homeostasis and tissue healing. *Annual review of immunology* 2017;35:119-147.
- 49 Fritz JH, Le Bourhis L, Magalhaes JG, Philpott DJ: Innate immune recognition at

- the epithelial barrier drives adaptive immunity: APCs take the back seat. *Trends in immunology* 2008;29:41-49.
- 50 Sutherland DB, Suzuki K, Fagarasan S: Fostering of advanced mutualism with gut microbiota by Immunoglobulin A. *Immunological reviews* 2016;270:20-31.
- 51 Mirmonsef P, Hotton AL, Gilbert D, Burgad D, Landay A, Weber KM, Cohen M, Ravel J, Spear GT: Free glycogen in vaginal fluids is associated with Lactobacillus colonization and low vaginal pH. *PloS one* 2014;9:e102467.
- 52 Blaskewicz CD, Pudney J, Anderson DJ: Structure and function of intercellular junctions in human cervical and vaginal mucosal epithelia. *Biology of reproduction* 2011;85:97-104.
- 53 Rodriguez-Garcia M, Patel MV, Wira CR: Innate and adaptive anti-HIV immune responses in the female reproductive tract. *Journal of reproductive immunology* 2013;97:74-84.
- 54 Thurman AR, Doncel GF: Innate immunity and inflammatory response to *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis: relationship to HIV acquisition. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)* 2011;65:89-98.
- 55 Shattock RJ, Moore JP: Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nature reviews Microbiology* 2003;1:25-34.
- 56 Passmore JA, Jaspan HB, Masson L: Genital inflammation, immune activation and risk of sexual HIV acquisition. *Current opinion in HIV and AIDS* 2016;11:156-162.
- 57 Hearps AC, Tyssen D, Srbinovski D, Bayigga L, Diaz DJD, Aldunate M, Cone RA, Gugasyan R, Anderson DJ, Tachedjian G: Vaginal lactic acid elicits an anti-inflammatory response from human cervicovaginal epithelial cells and inhibits production of pro-inflammatory mediators associated with HIV acquisition. *Mucosal immunology* 2017;10:1480-1490.
- 58 Gilbert RO, Elia G, Beach DH, Klaessig S, Singh BN: Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. *Infection and immunity* 2000;68:4200-4206.
- 59 Guenther PC, Secor WE, Dezzutti CS: *Trichomonas vaginalis*-induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: implications for the sexual transmission of HIV-1. *Infection and immunity* 2005;73:4155-4160.
- 60 Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, Ouellet M, Tremblay MJ, Gray-Owen SD, Arsenault AL, Kaushic C: Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS pathogens* 2010;6:e1000852.
- 61 Zevin AS, Xie IY, Birse K, Arnold K, Romas L, Westmacott G, Novak RM,

- McCorrister S, McKinnon LR, Cohen CR, Mackelprang R, Lingappa J, Lauffenburger DA, Klatt NR, Burgener AD: Microbiome Composition and Function Drives Wound-Healing Impairment in the Female Genital Tract. *PLoS pathogens* 2016;12:e1005889.
- 62 Enyedi B, Niethammer P: Mechanisms of epithelial wound detection. *Trends in cell biology* 2015;25:398-407.
- 63 Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT: Wound repair and regeneration. *Nature* 2008;453:314-321.
- 64 Coulombe PA: Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. *The Journal of investigative dermatology* 2003;121:219-230.
- 65 Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, Patel SB, Khalid L, Isseroff RR, Tomic-Canic M: Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in wound care* 2014;3:445-464.
- 66 Ripperda CM, Maldonado PA, Acevedo JF, Keller PW, Akgul Y, Shelton JM, Word RA: Vaginal estrogen: a dual-edged sword in postoperative healing of the vaginal wall. *Menopause (New York, NY)* 2017;24:838-849.
- 67 Mohammedsaeed W, Cruickshank S, McBain AJ, O'Neill CA: Lactobacillus rhamnosus GG Lysate Increases Re-Epithelialization of Keratinocyte Scratch Assays by Promoting Migration. *Scientific reports* 2015;5:16147.
- 68 Rohani MG, Parks WC: Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2015;44-46:113-121.
- 69 Takada K, Komine-Aizawa S, Hirohata N, Trinh QD, Nishina A, Kimura H, Hayakawa S: Poly I:C induces collective migration of HaCaT keratinocytes via IL-8. *BMC immunology* 2017;18:19.
- 70 Lewis FM, Bernstein KT, Aral SO: Vaginal Microbiome and Its Relationship to Behavior, Sexual Health, and Sexually Transmitted Diseases. *Obstetrics and gynecology* 2017;129:643-654.
- 71 Klumpp DJ, Forrestal SG, Karr JE, Mudge CS, Anderson BE, Schaeffer AJ: Epithelial differentiation promotes the adherence of type 1-piliated Escherichia coli to human vaginal cells. *The Journal of infectious diseases* 2002;186:1631-1638.
- 72 Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH: Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Journal of cellular and molecular medicine* 2005;9:777-794.
- 73 Kirjavainen PV, Pautler S, Baroja ML, Anukam K, Crowley K, Carter K, Reid G: Abnormal immunological profile and vaginal microbiota in women prone to urinary tract infections. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2009;16:29-36.

- 74 Zhang J, Song H, Lu Y, Chen H, Jiang S, Li L: Effects of estradiol on VEGF and bFGF by Akt in endometrial cancer cells are mediated through the NF-kappaB pathway. *Oncology reports* 2016;36:705-714.
- 75 Zhang L, Xiong W, Xiong Y, Liu H, Liu Y: 17 beta-Estradiol promotes vascular endothelial growth factor expression via the Wnt/beta-catenin pathway during the pathogenesis of endometriosis. *Molecular human reproduction* 2016;22:526-535.
- 76 Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L: Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* 2016;17:611-625.
- 77 Elliott SN, Buret A, McKnight W, Miller MJ, Wallace JL: Bacteria rapidly colonize and modulate healing of gastric ulcers in rats. *The American journal of physiology* 1998;275:G425-432.
- 78 Lam EK, Yu L, Wong HP, Wu WK, Shin VY, Tai EK, So WH, Woo PC, Cho CH: Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG enhances gastric ulcer healing in rats. *European journal of pharmacology* 2007;565:171-179.
- 79 Uchida M, Shimizu K, Kurakazu K: Yogurt containing *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21 yogurt) accelerated the healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2010;74:1891-1894.
- 80 Peral MC, Martinez MA, Valdez JC: Bacteriotherapy with *Lactobacillus plantarum* in burns. *International wound journal* 2009;6:73-81.
- 81 Pinto D, Marzani B, Minervini F, Calasso M, Giuliani G, Gobbetti M, De Angelis M: Plantaricin A synthesized by *Lactobacillus plantarum* induces in vitro proliferation and migration of human keratinocytes and increases the expression of TGF-beta1, FGF7, VEGF-A and IL-8 genes. *Peptides* 2011;32:1815-1824.
- 82 Tsiouris CG, Kelesi M, Vasilopoulos G, Kalemikerakis I, Papageorgiou EG: The efficacy of probiotics as pharmacological treatment of cutaneous wounds: Meta-analysis of animal studies. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2017;104:230-239.
- 83 De Ryck T, Vanlancker E, Grootaert C, Roman BI, De Coen LM, Vandenberghe I, Stevens CV, Bracke M, Van de Wiele T, Vanhoecke B: Microbial inhibition of oral epithelial wound recovery: potential role for quorum sensing molecules? *AMB Express* 2015;5:27.
- 84 Vagesjo E, Ohnstedt E, Mortier A, Lofton H, Huss F, Proost P, Roos S, Phillipson M: Accelerated wound healing in mice by on-site production and delivery of CXCL12 by transformed lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2018;115:1895-1900.

- 85 Voltan S, Castagliuolo I, Elli M, Longo S, Brun P, D'Inca R, Porzionato A, Macchi V, Palu G, Sturniolo GC, Morelli L, Martines D: Aggregating phenotype in *Lactobacillus crispatus* determines intestinal colonization and TLR2 and TLR4 modulation in murine colonic mucosa. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2007;14:1138-1148.
- 86 Rizzo A, Fiorentino M, Buommino E, Donnarumma G, Losacco A, Bevilacqua N: *Lactobacillus crispatus* mediates anti-inflammatory cytokine interleukin-10 induction in response to *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. *International journal of medical microbiology : IJMM* 2015;305:815-827.
- 87 Rizzo A, Losacco A, Carratelli CR: *Lactobacillus crispatus* modulates epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptors 2 and 4, interleukin 8 and human beta-defensins 2 and 3. *Immunology letters* 2013;156:102-109.
- 88 Mitchell C, Marrazzo J: Bacterial vaginosis and the cervicovaginal immune response. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)* 2014;71:555-563.
- 89 Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Klebanoff SJ, Young-Smith K, Critchlow CM, Holmes KK: Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *Journal of clinical microbiology* 1989;27:251-256.
- 90 Sobel JD, Chaim W: Vaginal microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis. *Journal of clinical microbiology* 1996;34:2497-2499.
- 91 Rose WA, 2nd, McGowin CL, Spagnuolo RA, Eaves-Pyles TD, Popov VL, Pyles RB: Commensal bacteria modulate innate immune responses of vaginal epithelial cell multilayer cultures. *PloS one* 2012;7:e32728.
- 92 Wilgus TA, Matthies AM, Radek KA, Dovi JV, Burns AL, Shankar R, DiPietro LA: Novel function for vascular endothelial growth factor receptor-1 on epidermal keratinocytes. *The American journal of pathology* 2005;167:1257-1266.
- 93 Bulut K, Pennartz C, Felderbauer P, Ansorge N, Banasch M, Schmitz F, Schmidt WE, Hoffmann P: Vascular endothelial growth factor (VEGF164) ameliorates intestinal epithelial injury in vitro in IEC-18 and Caco-2 monolayers via induction of TGF-beta release from epithelial cells. *Scandinavian journal of gastroenterology* 2006;41:687-692.
- 94 Martinez RC, Seney SL, Summers KL, Nomizo A, De Martinis EC, Reid G: Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 on the ability of *Candida albicans* to infect cells and induce inflammation. *Microbiology and immunology* 2009;53:487-495.

- 95 Kalyoussef S, Nieves E, Dinerman E, Carpenter C, Shankar V, Oh J, Burd B, Angeletti RH, Buckheit KW, Fredricks DN, Madan RP, Keller MJ, Herold BC: Lactobacillus proteins are associated with the bactericidal activity against E. coli of female genital tract secretions. *PloS one* 2012;7:e49506.
- 96 Borgdorff H, Armstrong SD, Tytgat HL, Xia D, Ndayisaba GF, Wastling JM, van de Wijgert JH: Unique Insights in the Cervicovaginal Lactobacillus iners and L. crispatus Proteomes and Their Associations with Microbiota Dysbiosis. *PloS one* 2016;11:e0150767.
- 97 Nikolic DL, Boettiger AN, Bar-Sagi D, Carbeck JD, Shvartsman SY: Role of boundary conditions in an experimental model of epithelial wound healing. *American journal of physiology Cell physiology* 2006;291:C68-75.
- 98 Bachmann R, Leonard D, Delzenne N, Kartheuser A, Cani PD: Novel insight into the role of microbiota in colorectal surgery. *Gut* 2017;66:738-749.
- 99 Matsumura A, Kubota T, Taiyoh H, Fujiwara H, Okamoto K, Ichikawa D, Shiozaki A, Komatsu S, Nakanishi M, Kuriu Y, Murayama Y, Ikoma H, Ochiai T, Kokuba Y, Nakamura T, Matsumoto K, Otsuji E: HGF regulates VEGF expression via the c-Met receptor downstream pathways, PI3K/Akt, MAPK and STAT3, in CT26 murine cells. *International journal of oncology* 2013;42:535-542.
- 100 Herbst-Kralovetz MM, Pyles RB, Ratner AJ, Sycuro LK, Mitchell C: New Systems for Studying Intercellular Interactions in Bacterial Vaginosis. *The Journal of infectious diseases* 2016;214 Suppl 1:S6-s13.
- 101 Kim TK, Thomas SM, Ho M, Sharma S, Reich CI, Frank JA, Yeater KM, Biggs DR, Nakamura N, Stumpf R, Leigh SR, Tapping RI, Blanke SR, Slauch JM, Gaskins HR, Weisbaum JS, Olsen GJ, Hoyer LL, Wilson BA: Heterogeneity of vaginal microbial communities within individuals. *Journal of clinical microbiology* 2009;47:1181-1189.
- 102 Frouard J, Le Tortorec A, Dejuçq-Rainsford N: In vitro models for deciphering the mechanisms underlying the sexual transmission of viruses at the mucosal level. *Virology* 2018;515:1-10.
- 103 Ngugi BM, Hemmerling A, Bukusi EA, Kikuvu G, Gikunju J, Shiboski S, Fredricks DN, Cohen CR: Effects of bacterial vaginosis-associated bacteria and sexual intercourse on vaginal colonization with the probiotic Lactobacillus crispatus CTV-05. *Sexually transmitted diseases* 2011;38:1020-1027.
- 104 Bohbot JM, Daraï E, Bretelle F, Bami G, Daniel C, Cardot JM: Efficacy and safety of vaginally administered lyophilized Lactobacillus crispatus IP 174178 in the prevention of bacterial vaginosis recurrence. *Journal of gynecology obstetrics and human reproduction* 2018;47:81-87.

- 105 Uehara S, Monden K, Nomoto K, Seno Y, Kariyama R, Kumon H: A pilot study evaluating the safety and effectiveness of Lactobacillus vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *International journal of antimicrobial agents* 2006;28 Suppl 1:S30-34.
- 106 Stapleton AE, Au-Yeung M, Hooton TM, Fredricks DN, Roberts PL, Czaja CA, Yarova-Yarovaya Y, Fiedler T, Cox M, Stamm WE: Randomized, placebo-controlled phase 2 trial of a Lactobacillus crispatus probiotic given intravaginally for prevention of recurrent urinary tract infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2011;52:1212-1217.
- 107 Borrueal N, Carol M, Casellas F, Antolin M, de Lara F, Espin E, Naval J, Guarner F, Malagelada JR: Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut* 2002;51:659-664.
- 108 Castagliuolo I, Galeazzi F, Ferrari S, Elli M, Brun P, Cavaggioni A, Tormen D, Sturniolo GC, Morelli L, Palu G: Beneficial effect of auto-aggregating Lactobacillus crispatus on experimentally induced colitis in mice. *FEMS immunology and medical microbiology* 2005;43:197-204.
- 109 Zhou FX, Chen L, Liu XW, Ouyang CH, Wu XP, Wang XH, Wang CL, Lu FG: Lactobacillus crispatus M206119 exacerbates murine DSS-colitis by interfering with inflammatory responses. *World journal of gastroenterology* 2012;18:2344-2356.
- 110 Antonio MA, Rabe LK, Hillier SL: Colonization of the rectum by Lactobacillus species and decreased risk of bacterial vaginosis. *The Journal of infectious diseases* 2005;192:394-398.
- 111 Yildirim S, Yeoman CJ, Janga SC, Thomas SM, Ho M, Leigh SR, White BA, Wilson BA, Stumpf RM: Primate vaginal microbiomes exhibit species specificity without universal Lactobacillus dominance. *The ISME journal* 2014;8:2431-2444.

研究業績目録

高田和秀

- I 発表
 - ①一般発表 10
 - ②特別発表 なし
- II 論文
 - ①原著論文 5 (単 0 / 共 5)
 - ②症例報告 なし
 - ③総説 1 (単 0 / 共 1)
- III 著書 なし

I 発表

①一般発表

1. 高田和秀, 宗正泰成, 藤野博美, 北岡康史 : NMDA 誘発網膜神経細胞死モデルにおけるサリドマイドの保護効果について, 第 30 回 日本臨床薬理学会年会, 神奈川, 2009.
2. Kazuhide Takada, Yasunari Munemasa, Hiromi Fujino, Yasushi Kitaoka : Thalidomide Has a Protective Effect Against N-Methyl-D-Aspartate-Induced Retinal Neurotoxicity, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Florida, USA, May, 2010.
3. Yasunari Munemasa, Kazuhide Takada, Kaori Kojima, Satoki Ueno, Yasushi Kitaoka : The novelty of Toll like receptor-4 ligand and RGC degeneration, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Florida, USA, May, 2013.
4. 高田和秀, 廣畑直子, Quang Trinh, 相澤志保子, 早川 智 : 性ホルモンと Toll-like receptor リガンドの HaCaT 細胞における遊走及び Epithelial-Mesenchymal Transition に対する影響, 第 43 回 日本臨床免疫学会総会, 兵庫. 2015 年 10 月.

5. 伊藤 駿, 蔵持智也, 高田和秀, 相澤志保子, 早川 智 : TLR3 刺激はヒト粘膜型 NK 細胞の SGK1 発現を誘導する, 第 44 回 日本臨床免疫学会総会, 東京. 2016 年 9 月.
6. トリンズイ クアン, 高田和秀, 相澤志保子, 早川 智 : 炎症誘導蛋白 High Mobility Group Box 1 はヒト初代 T 細胞で HIV の複製を促進する, 第 32 回 日本生殖免疫学会総会・学術集会, 東京. 2017 年 12 月.
7. 伊藤 駿, 堀内洋子, 相澤志保子, 高田和秀, 早川 智 : Serum and Glucocorticoid inducible Kinase 1 (SGK1)は大顆粒NKリンパ球のサイトカイン産生を負に制御する, 第 32 回 日本生殖免疫学会総会・学術集会, 東京. 2017 年 12 月.
8. 高田和秀, 相澤志保子, トリンズイ クアン, 早川 智 : デーデルライン桿菌は膣上皮細胞の re-epithelialization を促進する, 第 32 回 日本生殖免疫学会総会・学術集会, 東京. 2017 年 12 月.
9. 蔵持智也, 伊藤 駿, 高田和秀, 相澤志保子, 早川 智 : デーデルライン桿菌によるヨーグルトの作成, 第 32 回 日本生殖免疫学会総会・学術集会, 東京. 2017 年 12 月.
10. 高田和秀, 相澤志保子, Qunag Duy Trinh, 早川 智. *Lactobacillus*

crisoatus は臍上皮細胞の再上皮化を促進する：第 35 回日本産婦人科感染症学会学術集会, 岐阜. 2018 年 5 月.

II 論文

①原著論文

1. Kazuhide Takada, Yasunari Munemasa, Junko Kuribayashi, Hiromi Fujino, Yasushi Kitaoka : Protective effect of thalidomide against N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity, *Journal of Neuroscience Research*, 89:1596-1604, 2011.
2. Quang D. Trinh, Ngan Thi Kim Pham, Kazumasa Fuwa, Kazuhide Takada, Shihoko Komine-Aizawa, Mitsuo Honda, Hiroshi Ushijima, Satoshi Hayakawa : High Mobility Group Box 1 Protein Enhances HIV Replication in Newly Infected Primary T Cells, *Clinical Laboratory*, 62:2305-2311, 2016.
3. Kazuhide Takada, Shihoko Komine-Aizawa, Naoko Hirohata, Quang Duy Trinh, Atsuyoshi Nishina, Hirokazu Kimura and Satoshi Hayakawa : Poly I:C induces collective migration of HaCaT keratinocytes via IL-8, *BMC Immunology*, 18:19, 2017.

4. Quang Duy Trinh, Ngan Thi Kim Pham, Kazuhide Takada, Shihoko Komine-Aizawa and Satoshi Hayakawa : Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-Independent Rubella Infection of Keratinocytes and Resistance of First-Trimester Trophoblast Cells to Rubella Virus In Vitro, *Viruses*, 10:23, 2018.
5. Kazuhide Takada, Shihoko Komine-Aizawa, Tomoya Kuramochi, Shun Ito, Quang Duy Trinh, Ngan Thi Kim Pham, Mari Sasano, Satoshi Hayakawa : *Lactobacillus crispatus* accelerates re-epithelialization in vaginal epithelial cell line MS74, *American Journal of Reproductive Immunology*, doi: 10.1111/aji.13027, 2018.

③総説

1. 大西弘高, 飯岡緒美, 高田和秀 : 患者教育に関する医療者教育をどう改善すべきか, *家庭医療*, 15:46-53, 2010.