

博士学位論文審査要旨

2022年1月17日

論文題目: *Staphylococcus aureus* Dysbiosis and the Role of Glycative Stress

(黄色ブドウ球菌のディスバイオシスと糖化ストレスの役割)

学位申請者: HAASBROEK KYLE

審査委員:

主査: 生命医科学研究科 教授 米井 嘉一

副査: 生命医科学研究科 教授 池川 雅哉

副査: 生命医科学研究科 教授 祝迫 恵子

要旨:

研究内容は、皮膚の常在細菌叢について、黄色ブドウ球菌 (SA) に注目し、糖化ストレスが細菌叢に及ぼす影響について検証したものである。皮膚常在細菌叢における優勢菌は表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*: SE) で共利共益性であるが、一方 SA は非共益性かつ弱病原性である。HAASBROEK KYLE 氏は、加齢および糖化ストレスの増大に伴い SE が減少し SA が増加すること (ディスバイオシス)、SA のバイオフィーム産生が増加することを見出した。糖化ストレスによって生じる終末糖化産物 (AGEs) は SE、SA に対し毒性を発揮して生存率を低下させる。種々の AGEs について皮膚細菌叢への影響について検証した結果、糖化ケラチンが SA の凝集とバイオフィーム産生を強力に促進することを見出した。バイオフィーム庇護下の SA 増加は皮膚の炎症やびらん形成を惹起するため、バイオフィームの形成抑制や分解促進は皮膚の健康増進に有用である。バイオフィーム阻害物質を探索した結果、アスタキサンチン、クローブエキス、ローズマリーエキスが有用であることを見出した。また、喫緊の課題として、糖尿病患者における COVID19 感染に対する脆弱性が SA コロニー増加に起因することが文献調査で示唆され、従来型アルコール消毒に起因する表皮障害は皮膚粘膜の防御機構の破綻をきたし、感染脆弱性を助長することが問題になっている。これに対し、安定型次亜塩素酸ナトリウムによる手指消毒は皮膚への刺激が僅かで、SA に対する殺菌効果が高いことを見出した。

皮膚常在細菌叢と糖化ストレスとの関連については国内外に研究者はなく、独創性の極めて高い研究領域である。SA や SE の培養条件、バイオフィームの性状など不明な点も多く、基礎的部分から実験を積み重ねてきた。これらの所見はすべて新規性が高く、貴重な研究成果である。化粧品科学領域においては SA 制御、SE 成育、バイオフィーム対策という新規機序化粧品の開発にも期待がかけられている。

よって、本論文は、博士 (理学) (同志社大学) の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2022年1月 17日

論文題目: *Staphylococcus aureus* Dysbiosis and the Role of Glycative Stress

(黄色ブドウ球菌のディスバイオシスと糖化ストレスの役割)

学位申請者: HAASBROEK KYLE

審査委員:

主査: 生命医科学研究科 教授 米井 嘉一

副査: 生命医科学研究科 教授 池川 雅哉

副査: 生命医科学研究科 教授 祝迫 恵子

要 旨:

上記審査委員は HAASBROEK KYLE 氏に対する総合試験を 2022 年 1 月 17 日午後 3 時より約 1 時間 40 分実施した。時間構成は口頭発表 60 分、質疑応答 20 分、口頭試問 20 分であった。

総合試験において学位申請者は、提出された論文の内容に関する口頭試問に適切に応答し、研究内容と意義、研究方法、解析法について深い理解を示すとともに、研究の背景について広範な専門知識を有していることを示した。

研究内容は、糖化ストレスの皮膚の常在細菌叢への影響についてである。研究背景には、表面積 1.6 m²、重量 1.5 kg に達するヒト最大の臓器である皮膚の常在細菌叢に関する研究が少ないこと、2 型糖尿病を代表とする糖化ストレス関連疾患が増加していること、COVID19 などの病原性生物による攻撃に対する皮膚粘膜防御機構が注目されている状況がある。実験の結果、糖化ストレスによって共利共生菌の表皮ブドウ球菌 (SE) が減り病原性を有する黄色ブドウ球菌 (SA) が増えること (ディスバイオシス)、糖化ケラチンにより SA の凝集とバイオフィーム産生が促進することが確認され、びらんなどの皮膚病変の形成のみならず防御機構の障害が惹起されることが示唆された。さらには、予防対策として、バイオフィーム形成を阻止する機能性物質の探索、皮膚防御機構に負荷をかけずに SA に対する殺菌効果を有する消毒剤の効能にまで研究が進められた。これらの所見は、健康的で美しい肌を保つためにも、皮膚防御機構の維持するためにも有意義と考えられる。また、化粧品科学 (コスメトロジー) の領域においても、新規機能性を有する製品開発につながる可能性があり、期待されている。

学位申請者は、本研究科修了に必要な所定の単位を修得していること、修了要件を満たしていることを成績原簿より確認した。語学能力については、日本語能力試験 (JLPT) N1 の上級レベルである。英文原著論文を 7 編執筆、国際学会での発表経験 (1 回)、日本語での国内学会発表 (1 回) もあり、語学の資質は十分備わっていると判断した。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

論文題目 : *Staphylococcus aureus* Dysbiosis and the Role of Glycative Stress
(黄色ブドウ球菌のディスバイオシスと糖化ストレスの役割)

氏名 : Haasbroek Kyle

要旨 :

Glycation is a non-enzymatic reaction that occurs between reducing sugars and proteins that occurs under physiological conditions. The final products of the glycation reaction are called advanced glycation endproducts (AGEs). AGEs impair protein function, promote inflammation, and disrupt a variety of processes in various tissues. Glycative stress contributes to the pathology of diseases associated with aging, as well as the general aging process itself. AGEs accumulate in the body over time, and under conditions of hyperglycemia glycative stress is heightened.

It has been thought that because bacteria are short lived with high protein turnover that glycative stress via non-enzymatic glycation is not a significant factor for their physiology. However, in recent years glycative stress has been observed to occur in bacteria. Glycation and AGEs are not only relevant for the survival and growth of bacteria, but also alter the human body in ways that promote infection.

Two major skin microbes that inhabit the skin microbiome are *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*.

S. epidermidis is a beneficial species. *S. epidermidis* produces antimicrobial peptides that inhibit the colonization and growth of pathogens. The presence of *S. epidermidis* also stimulates improved immune response by host skin cells, and inhabits ecological space that may otherwise be inhabited by pathogens.

S. aureus is a potential pathogen. It is present among a plurality of the population, and the leading cause of skin infection. Colonization with *S. aureus* causes inflammation in the skin and nasal epithelia. *S. aureus* frequently forms biofilms on surgical implants, catheters, and skin lesions.

Several conditions are strongly linked with skin lesions and *S. aureus*. Atopic dermatitis, psoriasis, and diabetes mellitus all show elevated abundance of *S. aureus*, associated with increased severity of symptoms and risk of infection. While the etiology of these disorders varies, all are associated with increased glycative stress throughout the body and accumulation of AGEs in the skin. We have also observed and increased abundance of *S. aureus* on the skin of healthy seniors, who have significantly increased fluorescent AGE accumulation in the skin compared to young adults.

We hypothesized that AGEs may increase pathogenicity of *S. aureus*, and conducted testing to examine the *in vitro* effects of glycated keratin.

Previously, a loss of cell viability from elevated glucose and AGEs from was observed in *S. epidermidis*. Expanding testing to *S. aureus*, a similar reduction in cell viability was observed in both species. Exposure to glycated keratin triggered membrane damage and cellular aggregation in *S. aureus*. It was observed that *S. aureus* metabolizes fluorescent AGEs from high molecular weight forms to low.

Glycated keratin induced biofilm formation in a dose dependent manner, and high molecular weight AGEs had a significantly stronger biofilm promoting effect at the same dosage. Exploring potential topical treatments against elevated skin AGEs and *S. aureus* biofilm formation, we examined the biofilm inhibitory effects of several known AGE crosslink breakers in the AGE-biofilm model. Astaxanthin, clove extract, and rosemary extract demonstrated a strong ability to inhibit AGE-induced *S. aureus* biofilms.

A review of the literature was conducted regarding the potential interactions between glycative stress, *S. aureus* colonization, and viral infection that may play a role in the increased vulnerability to COVID19 reported in those with diabetes. Finally, a stable form of sodium hypochlorite was tested for its skin safety and bactericidal efficacy against *S. aureus* for use as a hand sanitizer. It was determined to be a safe product, and demonstrated effectiveness at sterilizing *S. aureus*.

The aging microbiome of the skin is characterized by increasing abundance, in absolute and relative terms, of *S. aureus*. AGEs produced from glucose and keratin triggered cellular aggregation and biofilm production in *S. aureus*. The presence of elevated concentrations of AGEs in the skin likely exacerbates *S. aureus* dysbiosis. Treatments to reduce the buildup of AGEs in the skin may help to reduce the severity of skin lesions, recurring staph infections, and other risks of *S. aureus* carriage in those experiencing elevated glycative stress. Such preventative measures may also help to avoid the overuse of antibiotics and the development of further antibiotic strains of *S. aureus* and other bacteria.