

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03716

研究課題名(和文) 組織修復時の好中球動態に及ぼす腸内細菌叢の役割

研究課題名(英文) Role of microbiome on neutrophil recruitment in tissue injury

研究代表者

本田 正樹 (Honda, Masaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員

研究者番号：80573609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓に熱損傷を加え2光子励起顕微鏡で観察を行い、1)好中球が壊死物質を貪食し、除去に貢献すること、2)抗生剤投与マウスでは壊死物質の除去、血管再生、コラーゲン組織の沈着が遅延することを見出した。また、Flow cytometryを用いて広域抗生剤投与により血液・骨髄中の好中球総数が減少すること、Ly6Gint/hi好中球ともに影響を受けることを明らかにした。肝臓に熱損傷を加え2光子励起顕微鏡で経時的に4時間の観察を行い、損傷部位への好中球集積の抑制を確認した。以上より、広域抗生剤投与では血中・骨髄中の好中球数減少、肝障害部位への好中球集積の抑制を来とし組織修復過程が遅延することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織修復過程における免疫機構を解明することは全ての外科手術において重大な課題である。近年、免疫システムの構築において腸内細菌叢が重要な役割を果たすことが明らかになってきているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、広域抗生剤投与により血中・骨髄中の好中球数減少がもたらされることに加え、肝臓障害部位への好中球集積が障害され組織修復過程が遅延することを示した。これらは組織修復メカニズムの解明において、腸内細菌叢-好中球-組織修復の相互作用に着目した新たな知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：1. Tissue repair of the liver in Abx-treated mice: Using two-photon laser-scanning microscopy (TPLSM) and liver thermal injury methods, we found that 1) neutrophils phagocytosed the necrotic cells and contributed to the removal, and 2) the removal of necrotic cells, vascular regeneration and collagen deposition was delayed in Abx-treated mice. 2. Changes in neutrophil dynamics during liver injury: Using flow cytometry, we found that administration of Abx reduced the total number of neutrophils in blood and bone marrow (BM). A more detailed examination revealed that both Ly6Gint and Ly6Ghi neutrophils was affected. When the liver was thermally injured and observed with a TPLSM for 4 hours, neutrophil accumulation at the damaged site was suppressed. These results suggest that use of broad-spectrum Abx not only reduces the number of neutrophils in blood and BM, but also impairs neutrophil accumulation at the site of liver damage, delaying the tissue repair.

研究分野：小児外科学

キーワード：好中球 腸内細菌叢 組織修復 生体イメージング

1. 研究開始当初の背景

近年、免疫システムの構築において腸内細菌叢が重要な働きをしていることが明らかになってきている。腸内細菌叢とその遺伝子、宿主の代謝産物を包括しマイクロバイームと呼ぶが、腸内細菌叢の構成異常 (dysbiosis) は免疫の異常をもたらし、腸管のみならず消化器疾患、代謝性疾患、自己免疫性疾患、精神疾患、悪性腫瘍など様々な疾患を誘発する。腸内細菌と宿主免疫細胞の相互作用、疾患発症のメカニズムには未だ不明な点が多く、病態解明・治療法の確立が急がれる。

外科領域において、良好な組織修復は肝再生に代表される臓器再生、臓器離断面の閉鎖、吻合部の早期治癒等において非常に重要である。また、外科領域のみならず良好な組織修復が様々な疾患の治癒過程において必須の要素であることは論を俟たない。従来、無菌マウスでは創傷治癒遅延を呈することが知られているが、腸内細菌叢が組織修復過程における免疫細胞の動態に与える影響に関する知見は乏しい。一方、無菌マウスでは血中の好中球数が著明に減少していることが知られており、炎症・障害時の好中球動態の不備や機能の変化が起こることが予測される。近年、好中球は炎症領域に集積したのち、壊死物質の除去、サイトカインの等メディエーターの産生を介して組織修復を促進することが報告されており、組織修復に関わる腸内細菌叢-免疫システム相互作用の重要な関係性の存在を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、生体内蛍光イメージング法を用いて、臓器障害時の組織を生理的な環境で直接観察することにより新たな病態解明につながると考えた。すなわち、

- 1) マウスを用いた生体内蛍光イメージング法が技術的に困難で十分確立されていないこと
 - 2) 非侵襲的かつ経時的に障害組織と好中球動態の関係性を観察できること
 - 3) 2光子励起顕微鏡では数百 μm までの深部観察が可能であるため、特に腸管の観察において腸間壁を切開することなく漿膜から管腔内の粘膜まで各層の観察ができること
- 以上の点が独創的と考えられる。生体内イメージング法は現在開発が進んでいる分野であり、生細胞や生体内で標的となる分子を動的に捉え、生命現象を解き明かす強力な手段として利用されてきている。近年開発された 2光子励起顕微鏡は、物質励起に 2光子吸収過程を利用しており、従来の共焦点励起顕微鏡と比較し、1) 高い空間解像度が得られる。2) 励起する部位が限定されるので、生体に対する光毒性が抑えられる。3) 深部組織の観察に適している。という利点がある。いずれも、「組織・臓器の生体活動をリアルタイムに観察」するために極めて有用である。

分子イメージング技術を応用し障害組織における好中球動態を *in vivo*、*real time* に観察することで、今まで静的な評価しかできなかった疾患病態の詳細な解明が可能となりうる。腸内細菌叢が好中球動態に与える影響を解析することで、腸内細菌-免疫システム相互作用のメカニズムを解明し、組織修復に適した腸内環境を免疫学的側面から明らかにする。さらには患者治療において腸内細菌叢に働きかける薬剤投与の具体的な作用機序を経時的に評価することによって、それが創薬プロセスの改革につながり、医学への直接的かつ多様な応用を図ることができる。そうすることで、例えばこれまで小児外科・移植外科領域で救命困難であった壊死性腸炎や十分な肝再生を得られない **Small for size syndrome** の治療や予防が可能となり、不幸な転機を取る患者を減らすことができる。また、2光子励起顕微鏡を用いた生体内イメージングの分野は技術的に困難で未開拓な領域であるため現時点でも活発に行われているとは言えず、今回の研究によって生体内イメージング技術全体の効果的進展にも貢献しうると考える。

3. 研究の方法

1) 腸内細菌叢除去マウスにおける好中球 Phenotype の検討

広域抗生剤による腸内細菌叢除去マウスを作成するにあたり、アンピシリン (1g/L)、バンコマイシン (0.5g/L)、ネオマイシン (1g/L)、メトロニダゾール (1g/L)、シプロフロキサシン (0.2g/L) を妊娠マウスの飲料水に混入する。抗生剤は子マウスの出生後から実験に用いる 8 週以降まで継続的に使用し、抗生剤入り飲料水は 1 週間おきに新しいものと交換する。申請者はすでに同モデルにおける腸内細菌が 99.6%以上除去されることを明らかにしている。腸内細菌叢除去マウスの骨髓、血中における好中球数、Phenotype をフローサイトメトリーを用いて SPF マウスと比較検討する。

2) マウス肝臓・大腸障害モデルの作成

生後 8-12 週齢の C57BL/6 マウス、LysM-EGFP マウスを用いる。LysM-EGFP マウスは励起により好中球が蛍光反応し緑色の励起光を発する遺伝子改変マウスで、すでに作成者より供与頂き当該施設で飼育中である。麻酔、小開腹後電気メス+30G 針で肝臓被膜または腸管漿膜筋層-粘膜層に微小な損傷部位を作成し、閉腹する。また、より臨床的な臓器障害モデルとして、四塩化炭素

による肝炎モデル、4%DSSによる大腸炎モデルを作成する。各々組織障害の程度を血液生化学、病理学的に評価を行いSPFマウスと腸内細菌叢除去マウスで比較する。また、臓器障害による体重減少からの回復過程、生存率を比較検討する。実験は小動物保温用温熱パッド上で行い、マウスの体温を37°Cに保つようにする。動物モデルの作成は、熊本大学動物資源開発研究施設で行う。

3) 2光子励起顕微鏡による観察

障害後設定した時間において2光子励起顕微鏡による観察を行い、組織損傷に対する好中球の応答及び修復過程(壊死物質の除去、血管再生)を経時的に解析する。セットアップはBX61WI+FV100MPE(Olympus)およびMai Tai HP Deep See femtosecond-pulsed laser(Spectra Physics)を用いる。前準備としてキシラジン(10mg/kg)+ケタミン(100mg/kg)の腹腔内投与による麻酔下にプラスチック製の細径チューブを内径静脈に留置する。開腹し、生きた状態で肝臓または大腸を体外に露出し固定する。蛍光試薬(TRITC)を静注し、2光子励起顕微鏡を用いてイメージングを行う。2光子励起顕微鏡では数百マイクロメートルまでの深部観察が可能であるため、肝被膜や腸管壁を切開することなく深部まで観察可能である。励起光を840nmに設定することで、好中球は緑、血管は赤色に励起され、臓器微小環境での好中球および血管系がin vivoで同時に観察可能となる。組織修復の程度は障害部位における壊死物質(SYTOX+ cells)の除去、血管再生、結合組織の再生を蛍光イメージングにて評価する。2光子励起レーザー顕微鏡は申請者の所属大学共同総合実験施設ですでに購入、設置されているためモデル動物を施設まで運びreal timeに障害臓器を観察する。

4. 研究成果

1) Flow cytometryによる血液・骨髄中好中球の解析

Flow cytometryを用いて広域抗生剤投与により血液・骨髄中の好中球総数が減少すること、Ly6G^{int/hi}好中球ともに影響を受けることを明らかにした(図1)。

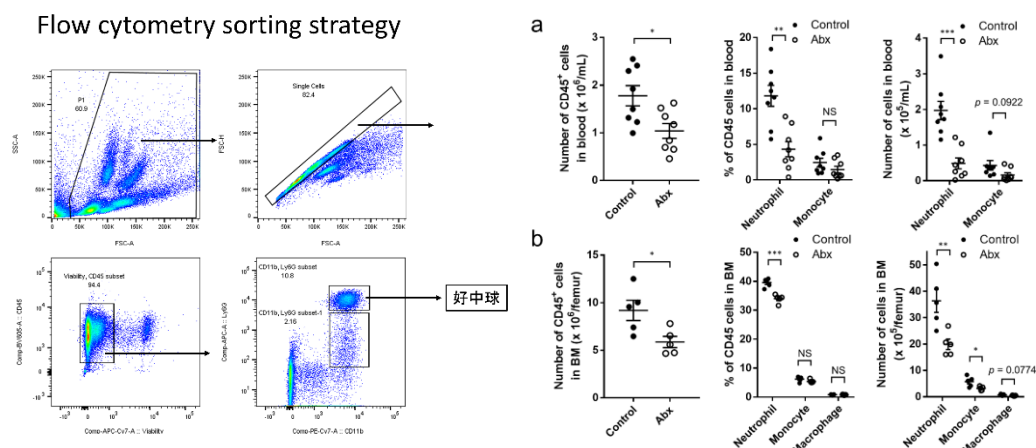


図1: Flow cytometryによる血液・骨髄中好中球の解析

- コントロール及び抗生剤投与マウスにおける血液中白血球数、好中球割合、好中球数の比較
- コントロール及び抗生剤投与マウスにおける骨髄中白血球数、好中球割合、好中球数の比較

2) 腸内細菌叢除去マウスにおける肝修復過程の評価

肝臓に熱損傷を加え2光子励起顕微鏡で観察を行い、1)好中球が壊死物質(SYTOX orange+ cell)を貪食し、除去に貢献すること(図2)、2)抗生剤投与マウスでは壊死物質の除去、血管再生、コラーゲン組織の沈着が遅延することを見出した。

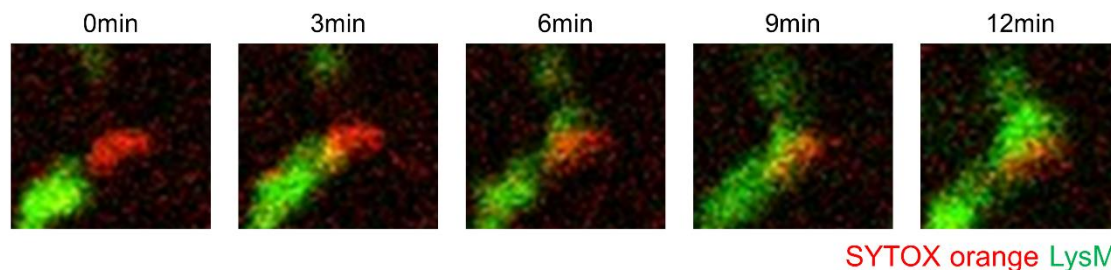


図2: 好中球(LysM^{hi} cell)による壊死物質(SYTOX orange+ cell)貪食像

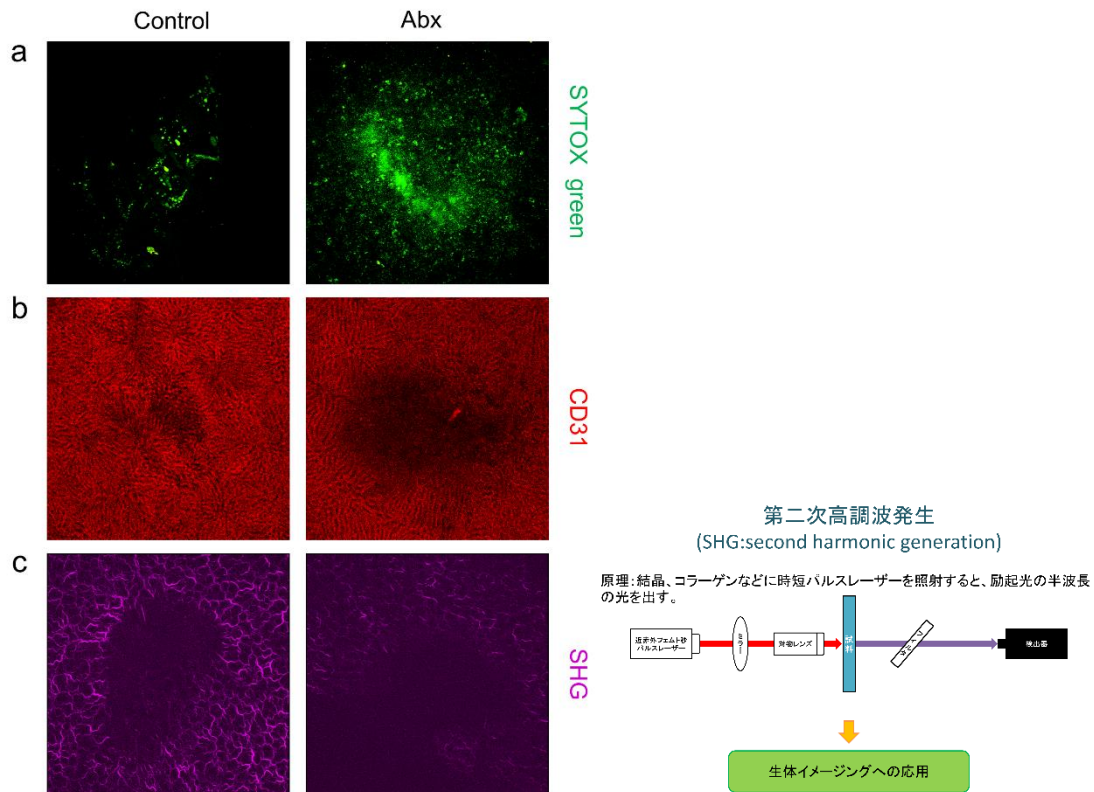


図 3: コントロール及び抗生剤投与マウスにおける (a) 肝障害部位壊死物質 (障害 24 時間後)、(b) 血管再生 (障害 7 日後)、(c) コラーゲン沈着 (障害 4 日後)

3) 肝障害時好中球動態の変化

肝臓に熱損傷を加え 2 光子励起顕微鏡で経時的に 4 時間の観察を行ったところ、損傷部位への好中球集積は抑制された (図 4)。

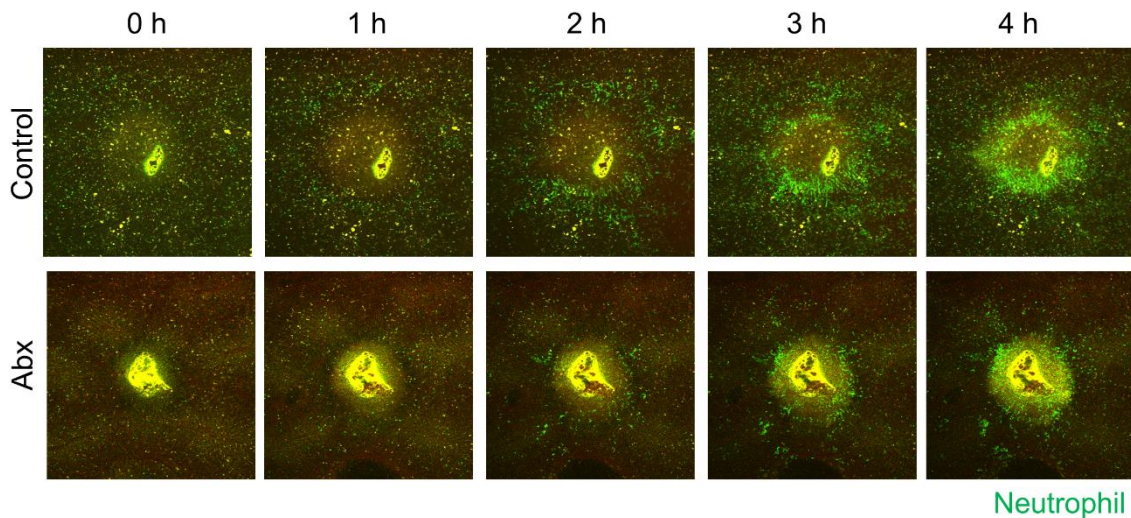


図 4: コントロール及び抗生剤投与マウスにおける肝障害後好中球動態イメージング (0-4 時間)

4) 腹腔内 GATA6+マクロファージの腸管修復における役割

腸管損傷部位のイメージングに際し、腸管障害部位への腹腔内大型マクロファージの集積を同定した (損傷 2 時間後より確認され、24 時間後にピークに達した) (図 5)。LysMegfp マウス (腹腔内マクロファージの 80%が GFP+) より腹腔洗浄液を採取し C57BL マウスへ経静脈または経腹腔的に投与し、これらのマクロファージは腹腔内で直接腸管損傷部位へ集積することを確認した。Clodronate liposome を用いて腹腔内マクロファージを消失させると、腸管損傷部位での壊死物質 (SYTOX green+細胞) の除去が遅延した。抗生剤を用いた腸内細菌叢除去マウスで腹腔洗浄液中の大型マクロファージの割合・数および GATA6・CD44 の発現は SPF マウスと比較して差を認めず、腸管損傷時の動態にも変化は認めなかった (図 6)。この研究成果は、国際誌 Nature Communications に掲載された。

腸管損傷24時間後

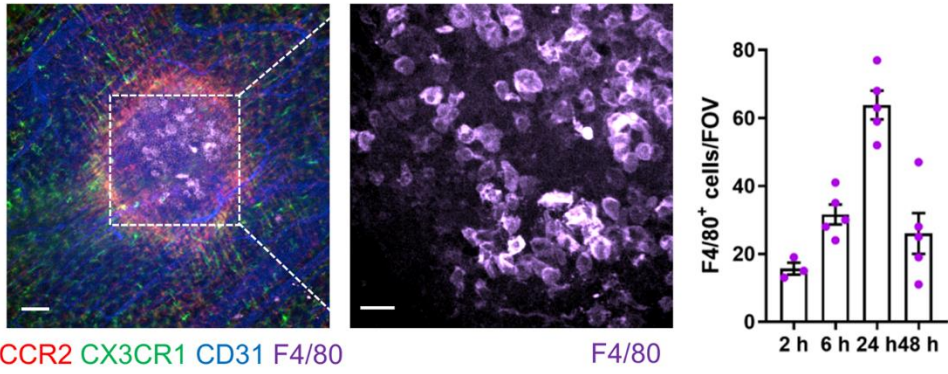


図 5 : 腸管損傷 24 時間後イメージング

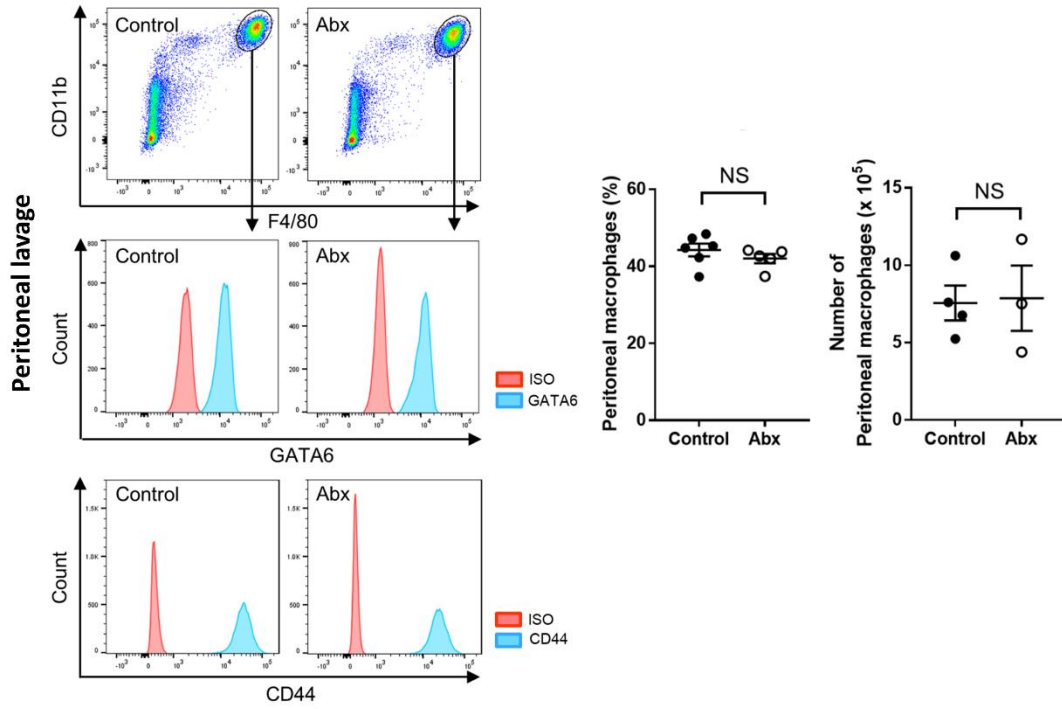


図 6 : コントロール及び抗生剤投与マウスにおける腹腔内マクロファージの解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Honda Masaki, Kadohisa Masashi, Yoshii Daiki, Komohara Yoshihiro, Hibi Taizo	4. 巻 12
2. 論文標題 Directly recruited GATA6+ peritoneal cavity macrophages contribute to the repair of intestinal serosal injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-27614-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Honda Masaki, Surewaard Bas G. J., Watanabe Mayuki, Hedrick Catherine C., Lee Woo-Yong, Brown Kirsty, McCoy Kathy D., Kubes Paul	4. 巻 11
2. 論文標題 Perivascular localization of macrophages in the intestinal mucosa is regulated by Nr4a1 and the microbiome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15068-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本田 正樹、門久政司、日比 泰造、Kubes, Paul
2. 発表標題 腸内細菌叢が古典的単球由来マクロファージ及び腹腔内マクロファージの組織障害部位への集積に与える影響
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 門久政司、本田正樹、入江友章、川端誠一、磯野香織、山本栄和、中野美和子、菅原寧彦、Kubes, Paul、日比泰造
2. 発表標題 DSS 腸炎における腹腔内マクロファージの役割
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本田 正樹
2. 発表標題 腸管恒常性維持におけるマクロファージと腸内細菌叢の関係
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本田 正樹、日比 泰造、Paul Kubes
2. 発表標題 腸内細菌叢が腸管CX3CR1+マクロファージのバリア機構構築に与える影響
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本田 正樹、日比 泰造、Paul Kubes
2. 発表標題 腹腔内GATA6+マクロファージの腸管修復における役割
3. 学会等名 第57回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本田 正樹、日比 泰造、Paul Kubes
2. 発表標題 手術侵襲を受けた組織の修復における腸内細菌叢の役割
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	日比 泰造 (Hibi Taizo) (10338072)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	門久 政司 (Kadohisa Masashi)	熊本大学・病院 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------