

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03918

研究課題名(和文) 難治性皮膚潰瘍に対する「ナノ型乳酸菌」による炎症制御効果の解明、新規ケア法の開発

研究課題名(英文) Development of wound care for regulating inflammatory responses using nano-type lactic acid bacteria

研究代表者

菅野 恵美 (Kanno, Emi)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10431595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは皮膚潰瘍に対する「ナノ型乳酸菌(加熱死菌KH2株)」の効果について、マウス創傷モデルを用いて解明することを目的とした。

申請者らの解析により、野生型マウス創傷にナノ型乳酸菌を投与すると創傷治癒、肉芽組織形成が促進し、炎症性サイトカインであるTNF- α 、IL-6、増殖因子であるbFGF、TGF- β 1 産生の上昇を伴っていた。また、この治癒促進は、TGF- β 1 産生増加を伴い、糖尿病マウスモデルでも同様に確認されたことから、ナノ型乳酸菌(加熱死菌KH2株)は、新規の難治性皮膚潰瘍の治療法として有効である可能性が高いと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、重症化した皮膚潰瘍に対する治療は、医療機関に入院し、陰圧閉鎖療法等で創部感染を抑え、肉芽組織を高めた後に手術を実施するのが一般的となっている。

今回の解析により、ナノ型乳酸菌を用いた治療法が確立されれば、在宅や外来通院により、事前に良質な肉芽組織を高める治療を行い、短期間の入院での手術が可能となる。さらに創底をしっかりとつくることにより、再発予防に寄与する可能性も高い。

研究成果の概要(英文)： The purpose of our study is to develop an “innovative skin wound care using nano-type lactic acid bacteria (heat-killed KH2).”

We analyzed percent wound closure and granulation area. We found that heat-killed KH2 contributed to the acceleration of the formation of granulation tissue by inducing tumor necrosis factor- α , interleukin-6, basic fibroblast growth factor, transforming growth factor (TGF)- β 1 production. In addition, heat-killed KH2 also improved wound closure, which was accompanied by the increased production of TGF- β 1 in diabetic mice. Topical administration of heat-killed KH2 might have therapeutic potential for the treatment of chronic skin wounds in diabetes mellitus. In the present study, we concluded that heat-killed KH2 promoted skin wound-healing through the formation of granulation tissues and the production of inflammatory cytokines and growth factors.

研究分野：基礎看護学

キーワード：難治性皮膚潰瘍 創傷治癒 ナノ型乳酸菌 炎症

1. 研究開始当初の背景

(1) 2025年、わが国の65歳以上の人口は30%を超え、皮膚潰瘍の原因の25%を占める糖尿病患者数は、その予備軍を含め2,200万人に達する。このような状況下、褥瘡や下腿潰瘍など難治性皮膚潰瘍を有する患者が急増している。難治性皮膚潰瘍は治療に長期間を要し、莫大な医療費、精神的な忍耐力が必要とされる。

順調に治癒する急性創傷に対し、難治性皮膚潰瘍では、感染、免疫細胞の機能不全による炎症期の遷延が大きな問題となっている。

(2) 現在、皮膚潰瘍における炎症制御法として、外科的に壊死組織を除去後、抗菌作用を持つ銀イオンやヨード製剤が選択されているが、これらは強い細胞毒性・アレルギー反応性を併せ持つ。

さらに頭頸部がんや皮膚がんでは、皮膚と照射ターゲットが近接しているため、放射線皮膚炎が発生しやすく、過剰な炎症により、治療を中断する症例も多い。しかし、抗菌作用を有する銀イオンやヨード製剤は金属を含み放射線を散乱させるため、使用が禁忌とされており、有効な炎症制御法がない状況にある。

申請者は新たな炎症制御法の開発に向け、乳酸菌の中でも、特に免疫活性化能の高い「ナノ型乳酸菌」に注目している。乳酸菌の効果は菌の生死に関係なく、菌体が免疫機能を活性化させた結果起こると考えられている。本研究で用いるナノ型乳酸菌は、乳酸菌 (*Enterococcus faecalis*) の加熱死菌であり、粒子径 1.0 μm 未満にサイズコントロールされていることにより、免疫細胞に認識されやすく、免疫活性化能が高い。

2. 研究の目的

難治性皮膚潰瘍に対する「ナノ型乳酸菌 KH-2」の効果 (免疫細胞の活性化、炎症反応、治癒) について明らかにする。

申請者がすでに確立したマウスモデルを用い、創傷部位にナノ型乳酸菌を局所投与し、ナノ型乳酸菌が免疫細胞 (マクロファージなど) 炎症反応 (炎症性サイトカイン産生: TNF-α、IL-6 など) 治癒過程 (創部面積、病理学的に再上皮化率、肉芽組織形成など) に与える効果について解明する。

3. 研究の方法

ナノ型乳酸菌が糖尿病性皮膚潰瘍マウスモデルに与える影響

< 実験モデルの作成 >

・野生型マウス (C57BL/6) に直径 6mm のデルマパンチを用いて全層欠損創を作成し、創部にナノ型乳酸菌を投与し、解析日 (創作成 1、3、7、14 日) まで湿潤環境を保つ。対照の創部には、ナノ型乳酸菌の希釈溶媒である生理食塩水を投与する。

< ナノ型乳酸菌 >

Enterococcus faecalis の加熱死菌 (粉末) を溶媒に希釈して使用する。

< 解析項目 >

・潰瘍部への好中球、マクロファージ、リンパ球の集積数、細胞内サイトカイン産生
皮膚組織を摘出、ホモジナイズし、酵素処理後、比重遠心法により白血球を回収し、直ちに蛍光標識された抗体により染色を行い、共通機器室に設置されたフローサイトメトリー (FACS Canto™II) にて、細胞数について解析する。※好中球 = Ly6G 陽性、マクロファージ = F4/80 陽性、T 細胞 = CD3 陽性となる。白血球共通抗原 CD45 抗体で同時に染色することで、上皮系細胞は除去することが出来る。

・サイトカイン・ケモカイン産生の解析

皮膚ホモジネート上清中のサイトカイン (TNF- α 、IL-6 など)、増殖因子 (TGF- β など) を ELISA キットで解析し定量化する。

・創収縮率、筋線維芽細胞の分化 (α -SMA)、血管新生 (CD31) の解析

- 1) 創収縮率：創作成時と摘出時に創部の肉眼所見をデジタルカメラで撮影し、PC ソフト Axio Vision を用いて面積を算出し、創収縮率を評価
- 2) 筋線維芽細胞数：パラフィン切片を用いて、創収縮に関わる筋線維芽細胞のマーカである抗 α -SMA 抗体により免疫染色し、陽性細胞を同定評価
- 3) 血管新生：パラフィン切片を用いて、血管内皮細胞のマーカである抗 CD31 抗体により免疫染色し、陽性細胞を同定評価

4. 研究成果

(1) 野生型 (WT) マウスの創傷治癒過程におけるナノ型乳酸菌 KH2 の効果 急性創傷の治癒過程への影響

KH2 投与が創傷治癒に与える影響を明らかにするために、創作成直後に創部に KH2 を投与し、治癒過程への影響を解析した。

KH2 投与により、創作成後 5、7、14 日目に Vehicle 投与と比較し創閉鎖率が有意に増加した。また、創閉鎖以外の治癒の指標として、肉芽面積、再上皮化率、血管新生を解析した。Vehicle 投与と比較し、KH2 投与により、創作成後 7、10 日目の肉芽面積が有意に増加した。また創作成後 5、7、10 日目の再上皮化率が有意に増加した。血管内皮細胞のマーカである CD31 陽性細胞をカウントしたところ、CD31 陽性細胞数は、Vehicle 投与と比較し KH2 投与により創作成後 10 日目に有意に増加した。

急性創傷の白血球集積に与える影響

KH2 投与による創部白血球集積への影響を明らかにするため、創作成後の創部白血球を採取し、その分画を解析した。KH2 投与により、Vehicle 投与と比較して創作成後 12 時間目の好中球数、リンパ球数が有意に増加した。

急性創傷のサイトカイン産生に与える影響

KH2 投与による創部炎症性サイトカイン、ケモカイン産生への影響を明らかにするため、TNF- α 、IL-6 を測定した。Vehicle 投与と比較し、KH2 投与によって、創作成後 6、12、24、72 時間目で TNF- α 産生が有意に増加し、創作成後 6、12、24 時間で IL-6 の産生が KH2 投与により有意に増加した。

急性創傷の増殖因子産生に与える影響

KH2 投与により肉芽形成、再上皮化率、CD31 陽性細胞数の増加を認めたため、これらの因子を促進する増殖因子産生を解析した。Vehicle 投与と比較し、KH2 投与により、創作成後 5 日目の bFGF、TGF- β 1、VEGF 産生が有意に増加した。

糖尿病マウス創傷モデルに対する影響

糖尿病マウスモデルの創部にナノ型乳酸菌 KH2 を投与したところ、TGF- β 1 の増加を伴い、創閉鎖率が高まることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanno Hiromasa, Kanno Emi, Kurosaka Shiho, Oikawa Yukari, Watanabe Takumi, Sato Ko, Kasamatsu Jun, Miyasaka Tomomitsu, Ishi Shinyo, Shoji Miki, Takagi Naoyuki, Imai Yoshimichi, Ishii Keiko, Tachi Masahiro, Kawakami Kazuyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Topical Administration of Heat-Killed Enterococcus faecalis Strain KH2 Promotes Re-Epithelialization and Granulation Tissue Formation during Skin Wound-Healing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1520 ~ 1520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9111520	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丹野寛大, 黒坂志歩, 島谷香波, 佐々木綾子, 石井恵子, 丸山良子, 館正弘, 川上和義, 菅野恵美
2. 発表標題 乳酸菌Enterococcus faecalis局所投与による皮膚創傷治癒の促進.
3. 学会等名 コ・メディカル形態機能学会第18回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丹野寛大, 菅野恵美, 黒坂志歩, 島谷香波, 佐々木綾子, 石井恵子, 丸山良子, 川上和義, 館正弘
2. 発表標題 乳酸菌Enterococcus faecalis KH株のもつ免疫賦活作用が創傷治癒に与える影響.
3. 学会等名 第21回日本褥瘡学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野恵美
2. 発表標題 皮膚創傷治癒の昔と今～乳酸菌による整創作用に注目して～.
3. 学会等名 第3回バイオジェニックスセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 菅野 恵美	4. 発行年 2019年
2. 出版社 バイオジェニックス連絡協議会	5. 総ページ数 18
3. 書名 バイオジェニックスの新知見の紹介	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 皮膚塗布用の皮膚創傷治癒促進組成物、その製造方法、及び創傷被覆材	発明者 菅辰彦、渡邊卓巳、 菅野恵美、川上和 義、館正弘、丹野寛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-195712	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	川上 和義 (Kawakami Kazuyoshi) (10253973)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	丹野 寛大 (Tanno Hiromasa) (10755664)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	
研究分担者	高木 尚之 (Takagi Naoyuki) (30569471)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	
研究分担者	館 正弘 (Tachi Masahiro) (50312004)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	丸山 良子 (Maruyama Ryoko) (10275498)	東北大学・医学系研究科・名誉教授 (11301)	

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