

令和 5 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09842

研究課題名(和文) Biofilm形成に関わる免疫と細菌間クロストークの解明、新規治療法の開発

研究課題名(英文) The crosstalk between bacterial communities and biofilm formation

研究代表者

下寺 佐栄子 (Shimodera, Saeko)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：10868227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは難治性皮膚潰瘍におけるBiofilm形成への免疫と細菌間クロストークの関与について解明し、新規治療法の確立を目指している。緑膿菌クオラムセンシング分子3-oxo-C12-HSLを創傷部位に投与後、TNF- $\alpha$ 産生を伴い創傷に大量の好中球が集積した。次に3-oxo-C12-HSLの働きを阻害するanti-3-oxo-C12-HSL抗血清を用いて解析を行ったところ、この抗血清投与群では、再上皮化、創部への好中球集積、TNF- $\alpha$ 産生が優位に減弱することを確認した。以上より、anti-3-oxo-C12-HSL抗血清を用いた免疫を介したバイオフィーム阻害の可能性が導かれた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長年、Biofilmが皮膚潰瘍難治化の主因として注目されている。皮膚潰瘍部から機械的に除去しても、数時間以内に再形成され、既存の治療では制御できず、急激に進行する感染症例が報告されている。

Biofilmは細菌の生存戦略の一つであり、免疫と細菌間クロストークの関与が予想されるが、免疫をターゲットとした治療法はみられない。潰瘍部への好中球添加により、Biofilm形成の促進が報告されていることから、好中球遊走を促す細菌因子を特定し、阻害することにより、Biofilm制御が可能になると考える。Biofilm関連感染症は、尿路感染、カテーテル感染など多岐にわたることから、その意義は計り知れない。

研究成果の概要(英文)：The purpose of our study is to elucidate the crosstalk between bacterial communities and biofilm formation. N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL) is synthesized by an autoinducer synthase encoded by the bacterial lasI gene in *P. aeruginosa*, which regulates the production of virulence factors and biofilm formation in this bacterium.

Wounds were created on the backs of Sprague-Dawley (SD) rats and 3-oxo-C12-HSL was administered on to the wound surface.

Administration of 3-oxo-C12-HSL significantly promoted wound healing and neutrophil accumulation, and these responses were reversed by treatment with anti-3-oxo-C12-HSL antiserum. These results suggest that 3-oxo-C12-HSL may be involved in biofilm formation through inflammatory response such as neutrophil accumulation.

研究分野：形成外科学

キーワード：Biofilm クオラムセンシング 好中球 免疫

## 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、Biofilm形成をともなう感染による治癒遅延が大きな問題となっている。

(2) 皮膚潰瘍の治療は、Biofilmとの戦いといっても過言ではない。現在、Biofilmを含めた感染対策は、抗菌成分を含むプロントザンなどを用いた細菌数減少にフォーカスされており、免疫とのクロストークに注目した治療法は存在しない。Biofilmは除去後、数時間以内に再形成されるため、既存の治療では制御できない、急激に進行する感染症例がある。

申請者は、宿主側の免疫機構に感染・Biofilm誘導因子の存在を推測している。皮膚潰瘍の難治化における免疫の関与を考えた場合、好中球の遷延が第一に予測される。

(3) これまでに、*in vitro*の報告から、好中球添加により緑膿菌Biofilm形成が促進されることが報告されている。

また、申者者らの解析より、非虚血創と比較し、虚血創では、好中球浸潤が乏しく、Biofilmが発達しないことを確認している。このことより、好中球がバイオフィーム誘導に関わっている可能性を考える。

(4) 創傷治癒において、好中球は最も早く創部に到達し初期の感染防御、炎症反応に重要な役割を担う。しかしBiofilmを伴う皮膚潰瘍では、好中球による細胞障害が報告されており、過剰な好中球の集積や活性化が創傷の難治化、慢性的な感染症のトリガーではないかと考える。

## 2. 研究の目的

本研究では、難治性皮膚潰瘍部において、好中球遊走を促す緑膿菌因子について明らかにすることを目的とする。

申請者がすでに確立したラット緑膿菌感染モデルを用いて、創傷治癒への影響、好中球集積、炎症性サイトカイン産生に緑膿菌因子が与える影響を解明する。緑膿菌因子として、今回は、クオラムセンシング分子でありBiofilm形成の誘導に関わる3-oxo-C12-HSLに注目している。

## 3. 研究の方法

皮膚潰瘍Biofilmモデル作成後、潰瘍部における好中球集積、誘導因子の特定

<実験モデルの作成>

・SDラットに直径6mmのデルマパンチを用いて全層欠損創を作成し、創部に緑膿菌PAO1株、3-oxo-C12-HSLの合成に関わる*lasI*遺伝子を欠損した緑膿菌PAO1株を接種し、解析日まで閉鎖環境を保つ。対照の創部には、緑膿菌の希釈溶媒である生理食塩水を投与した。

#### < 虚血モデルの作成 >

・SD ラットに皮弁を作成し、皮弁上に直径 6 mm のデルマパンチを用いて全層欠損創を作成し、創部に緑膿菌 PAO1 株を接種した。対照の創部には、緑膿菌の希釈溶媒である生理食塩水を投与した。

#### < 解析項目 >

##### ・潰瘍部への好中球の集積数

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 TM ) にて、細胞数について解析する。

・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- $\alpha$  など) を ELISA キットで解析し定量化する。

##### ・上皮化率の解析

摘出した皮膚よりパラフィンブロックを作成、パラフィン切片にヘマトキシリンエオジン染色を施し、上皮化率を算出する。

#### 4 . 研究成果

(1) SD ラットを用いて皮膚潰瘍緑膿菌 Biofilm 形成モデルを確立した。

(2) 皮膚潰瘍への緑膿菌接種により、24 時間をピークに好中球集積数が高まり、その後低下を認めた。緑膿菌を接種した非虚血創と比較し、緑膿菌を接種した虚血創では、好中球集積数の低下を認めた。緑膿菌を接種した非虚血創と比較し、緑膿菌を接種した虚血創では、Biofilm 形成が減弱する傾向を認めた。

(3) 創部に PAO1 株を接種した群と比較して、3-oxo-C12-HSL 合成に関わる lasI 遺伝子を欠損した緑膿菌株を接種した群では、創傷作成 1 日目の創部への好中球集積が約半数に減少した。また、創部への好中球誘導に関わるサイトカインである TNF- $\alpha$  は約 3 分の 1 の産生量に減少した。次に lasI 遺伝子が産生に関わるクオラムセンシング分子である 3-oxo-C12-HSL を創傷部位に投与したところ、TNF- $\alpha$  産生を伴い、創傷部位に大量の好中球集積を認めた。

(4) クオラムセンシング分子である 3-oxo-C12-HSL の働きを阻害する anti-3-oxo-C12-HSL 抗血清を用いて解析を行ったところ、anti-3-oxo-C12-HSL 抗血清投与群では、再上皮化、創部への好中球集積、TNF- $\alpha$  産生が有意に減弱することを確認した。

#### まとめ

以上のことから、緑膿菌クオラムセンシング分子 3-oxo-C12-HSL は、好中球の遊走、TNF- $\alpha$  産生の増加に関与することが明らかになり、anti-3-oxo-C12-HSL 抗血清を用いて免疫を介したバイオフィーム阻害の可能性が導かれた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 丹野寛大, 菅野恵美	4. 巻 9(4)
2. 論文標題 創傷における感染防御機構, 影響を与える要因	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 WOC Nursing	6. 最初と最後の頁 4-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 菅野恵美, 丹野寛大	4. 巻 9(4)
2. 論文標題 Wound hygiene (ウンドハイジーン) の概念	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 WOC Nursing	6. 最初と最後の頁 12-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅野恵美
2. 発表標題 Current treatment and potential therapeutic targets of biofilms in chronic nonhealing wounds
3. 学会等名 第99回日本生理学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅野恵美, 川上和義, 丹野寛大, 山口賢二, 館正弘
2. 発表標題 褥瘡の感染・バイオフィルムに対する治療・ケア - ターゲットの再考
3. 学会等名 第22回日本褥瘡学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅野恵美, 川上和義, 丹野寛大, 山口賢次, 館正弘
2. 発表標題 皮膚創傷治癒の免疫機構と緑膿菌感染とのクロストーク
3. 学会等名 第94回日本感染症学会総会・学術講演会 シンポジウム12 緑膿菌に学び, 緑膿菌を操る(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 菅野恵美	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ケーシーアイ株式会社	5. 総ページ数 5
3. 書名 NPWTi-dにおける感染制御の機序. 第49回日本創傷治癒学会 記録集 スーツセミナー1 周期的洗浄併用陰圧閉鎖療法(NPWTi-d)における感染制御の機序と治療設定の実際	

1. 著者名 菅野恵美	4. 発行年 2020年
2. 出版社 サラヤ株式会社	5. 総ページ数 7
3. 書名 Hospital Communication	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東北大学 形成外科  <a href="http://www.prs.med.tohoku.ac.jp/">http://www.prs.med.tohoku.ac.jp/</a></p>
---

## 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	館 正弘 (Tachi Masahiro)  (50312004)	東北大学・医学系研究科・名誉教授  (11301)	
研究分担者	菅野 恵美 (Kanno Emi)  (10431595)	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・講師  (11301)	
研究分担者	高木 尚之 (Takagi Naoyuki)  (30569471)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師  (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