

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19623

研究課題名（和文）飲む褥瘡予防法の確立に向けた、皮膚-腸管ネットワークによる創傷治癒制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of wound healing responses through skin-intestine networks

研究代表者

菅野 恵美（Kanno, Emi）

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10431595

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：近年、腸内環境（腸管免疫）を起点とした全身の臓器間ネットワーク機構が次々に明らかにされている。申請者らは腸管免疫を介した褥瘡の難治化予防法の確立を目指し、ナノ型乳酸菌（加熱殺菌体）を内服後の腸内環境の関与について検証を行った。

免疫を抑制し、ナノ型を内服した実験群では、対照群と比較して、十二指腸から回腸末端の絨毛・筋層長が有意に長かった。さらに実験群では、十二指腸から空腸移行部において、Foxp3 陽性細胞の増加、IL-10陽性細胞数の有意な増加を認めた。

以上のことより、ナノ型乳酸菌は炎症を制御し、腸内の免疫環境を整える可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、褥瘡など難治性皮膚潰瘍に対する治療は、皮膚潰瘍発生後に集中的に行われているが、「急性創傷と難治性皮膚潰瘍の分かれ道は、発生直後の免疫応答が決める」との指摘がある。我々は、創傷が難治化しやすい方に対し、皮膚潰瘍の発生前から腸管免疫を高めることにより、難治化を予防できる方法を確立できないかと考えた。

今回の解析により、加熱殺菌体であるナノ型乳酸菌の経口投与により、腸管の炎症を制御できることが明らかになった。より詳細な作用機序を解明し、皮膚潰瘍の重症化予防に寄与する方法が確立されれば、治癒機関の短縮、在宅や外来通院で治すことのできる重症度が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of our study is to develop an “innovative wound care using heat-killed nano-type lactic acid bacteria (nano-type LAB) through skin-intestine networks”. We analyzed villus length, the Foxp3 positive cells and IL-10 positive cells in small intestine after oral administration of nano-type LAB in immunosuppressive mice. We found that nano-type LAB contributed to increased villus length, Foxp3 positive cells and IL-10 positive cells. Thus, we concluded that heat-killed nano-type LAB may be involved in controlling intestinal conditions by anti-inflammatory activity.

研究分野：臨床看護学

キーワード：褥瘡 皮膚-腸管ネットワーク 腸管免疫 乳酸菌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 2025年、わが国の65歳以上人口は30%を越え、皮膚潰瘍の原因の25%を占める糖尿病患者は、2,200万人に達する。褥瘡などの皮膚潰瘍では、一晩で細菌感染や壊死が急激に進行する感染症例があるが、既存の対策では発症前、発症直後の制御は困難である。急激な重症化の背景には、宿主免疫の不全が指摘されている。

(2) 近年、腸内環境の以上がアレルギー疾患、慢性炎症。アトピー性皮膚炎など全身の免疫以上に発展する、すなわち腸内環境（腸管免疫）を起点とした全身の臓器間ネットワーク機構が次々と明らかにされている。長年、皮膚の創傷（キズ）は、皮膚に存在する線維芽細胞や受傷後、創部に遊走する免疫細胞が治すと考えられてきたが、申請者は皮膚-腸管免疫ネットワークの関与を推測している。

(3) 順調に治癒に至る急性創傷では、炎症期、増殖期、再構築期を経て治癒に至る。一方、高齢者や免疫不全患者に多発する褥瘡や下腿潰瘍などの慢性創傷は、炎症期が遷延し、増殖期以降のステップに進まない。これまでに、急性創傷と慢性創傷の分かれ道（分岐点）は、創傷発生直後の免疫応答が決めるとの指摘がある。

このこともふまえ、申請者らは、創傷治癒を司るマスター細胞が、皮膚ではなく、腸管に存在する可能性を推察しており、粒子サイズのナノ化により高い免疫活性化能を有する「ナノ型乳酸菌」による予防法の確立が可能であると考えます。

## 2. 研究の目的

本研究では、創傷治癒への皮膚-腸管免疫ネットワークを明らかにするため、今回は、ナノ型乳酸菌内服による腸管、全身性免疫への影響について明らかにすることを目的とする。

我々がすでに確立したマウス免疫不全モデルを用いて、ナノ型乳酸菌経口投与が腸管免疫に与える効果を解明する。今回は、炎症を制御する制御性リンパ球（Treg細胞）、抗炎症性サイトカインであるIL-10に注目する。

## 3. 研究の方法

免疫抑制マウスモデルの作成、ナノ型乳酸菌（加熱殺菌体）の投与  
＜実験モデルの確立＞

野生型マウス（C57BL/6）に5-FU 50 mg/kgを隔日で3回腹腔内に投与し、小腸絨毛への影響を確認する。

ナノ型乳酸菌（加熱殺菌体）を5-FU投与開始と同時に連日5回ゾンデを用いて経口投与する。対照群には、ナノ型乳酸菌の希釈溶媒である生理食塩水を投与する。

＜病理組織標本の作成＞

・摘出した小腸組織を4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定し輪切りにした後、パラフィンに包埋した。半切した断面から薄切した切片を作成し、Hematoxylin-Eosin (HE)染色を施した。

・免疫組織学染色には、脱パラフィン後、各々の切片を抗 CD45 (clone 30-F11) 抗体 (1: 500, Biolegend, San Diego, CA, USA) にて反応させた。または、抗原賦活処理として pH9 の抗原不活化液 (ニチレイバイオサイエンス, 東京) で 120 °C、5 分 オートクレーブした後、抗 Foxp3 (clone EPR22102-37) 抗体 (1: 200, Abcam plc, Cambridge, UK) にて反応させた。また、抗原賦活処理として界面活性剤が含まれる抗原賦活液 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) で 120 °C、5 分オートクレーブした後、抗 IL-10 (clone 60269-1-Ig) 抗体 (1: 200, proteintech, Rosemont, IL, USA) にて反応させた。その後、二次抗体としてペルオキシダーゼ標本抗体 (ニチレイバイオサイエンス) と反応させた。抗 CD45 抗体、抗 IL-10 抗体標本は 10 倍のレンズ (オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X810, キーエンス, 東京) を使用し、単位面積当たりの平均陽性細胞数を算出した。

#### <絨毛・筋層長の解析>

・絨毛・筋層長は漿膜から絨毛構造の先端までを測定した。一つの標本の絨毛長を全て測定し、長い方より 10 本の絨毛・筋層長を選択し、その平均値を示した。

#### 4. 研究成果

(1) これまでに、5-FU 投与によって腸管粘膜への細胞障害が生じ、絨毛長が短縮することが報告されている。5-FU 誘発性口腔粘膜潰瘍モデルにおける小腸粘膜へのダメージを評価するため、HE 染色を用いて小腸組織の絨毛・筋層長の測定を行った。絨毛の短縮が著しく絨毛のみの測定が難しい標本があるため、小腸の絨毛構造の先端から漿膜までの長さを絨毛・筋層長として測定した。前提条件として、事前に非処置マウス、5-FU/ 生理食塩水投与群、5-FU/ ナノ型乳酸菌投与群の間で筋層長に差がないことを確認した。

その結果、十二指腸から空腸移行部において、5-FU 投与により絨毛・筋層長が有意に短縮し、ナノ型乳酸菌 (加熱殺菌体) 投与により有意に高まることを確認した。

##### (2) 小腸組織中の Foxp3 陽性細胞

5-FU 投与後、小腸組織中の Foxp3 陽性細胞免疫染色による Foxp3 (Treg 細胞マーカー) 染色標本を用いて、小腸組織中の Foxp3 陽性細胞数を解析した。その結果、非処置マウスと比較して 5-FU 投与群で Foxp3 陽性細胞数が減少する傾向がみられた ( $p=0.07$ )。また、5-FU 投与群と比較して 5-FU/ナノ型乳酸菌投与群で Foxp3 陽性細胞数が増加する傾向がみられた ( $p=0.09$ )。

##### (3) 小腸組織中の IL-10 陽性細胞

ナノ型乳酸菌投与群において、Foxp3 陽性細胞の増加傾向を確認したため、免疫染色による IL-10 染色標本を用いて、IL-10 の陽性細胞数のカウントを行った。その結果、十二指腸から空腸移行部において、非処置マウスと比較し 5-FU/ 生理食塩水群で IL-10 陽性細胞が有意に減少し、ナノ型乳酸菌投与群で IL-10 陽性細胞数の有意な増加を確認した。

#### まとめ

以上のことから、免疫抑制マウスへのナノ型乳酸菌の経口投与は、小腸組織中の Foxp3 陽性細胞および IL-10 産生細胞数を高め、小腸の絨毛を延長させ、腸内環境の制御に関わる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 志済真優, 丹野寛大, 黒坂志歩, 及川ゆかり, 才神利奈, 黒澤佑太, 新井山ももこ, 菅野恵美
2. 発表標題 慢性創傷の創面環境調整 (Wound bed preparation) 達成に向けた乳酸菌の効果検証
3. 学会等名 第41回日本看護科学学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅野恵美
2. 発表標題 高分散性ナノ型乳酸菌による新規・創傷被覆材開発へのチャレンジ
3. 学会等名 第51回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 口内炎処置用組成物	発明者 渡邊卓巳、生天目由里子、菅野恵美、川上和義、丹野寛大、	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、210048WOP	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔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	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	佐藤 光  (Sato Ko)  (20832124)	東北大学・医学系研究科・助教   (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	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