

## 論文の内容の要旨

論文題目 Investigation of the role of dysbiotic wound microbiota on the establishment of critical colonization

(クリティカルコロナイゼーション成立にディスバイオシス状態の創部細菌叢が果たす役割の解明)

氏名 國光 真生

### 序文

創部への細菌定着と感染の間に位置するクリティカルコロナイゼーションでは創傷治癒が遅延する。この状態の創部では組織への細菌侵入に対する免疫反応が起きているが、臨床的な感染徴候がないために治療開始が遅れ、致命的な合併症である感染に移行する可能性が高いため、クリティカルコロナイゼーションの予防方法の確立が喫緊の課題である。

現在は、クリティカルコロナイゼーションの原因である創部上の細菌について、細菌数やそれらが形成するバイオフィルムを評価し、治療が進められている。しかし、褥瘡などの難治性創傷では常に外部環境の細菌に曝露するため、創面を無菌的に維持することは不可能である。したがって、過剰な免疫反応を引き起こさない創部細菌叢を作ることが重要である。

創部細菌叢と治癒遅延の関係については研究報告が散見されるものの、結果に一貫性がなく、難治性創傷特有の細菌叢はどのようなものか明らかにされていない。これは創部や皮膚の細菌叢は個人差が大きい、それを考慮して解析していないことが原因として考えられる。これに対し、著者は非感染褥瘡では創部と創周囲皮膚の細菌叢で優勢な細菌が同じなのに対し、感染創では異なることを症例研究として報告し、創部－創周囲皮膚間の細菌叢類似性がクリティカルコロナイゼーションの成立と関連があると仮説を立てた。

本研究の最終的な目標はクリティカルコロナイゼーションを予防するための創部細菌叢をターゲットにした新たな介入方法の確立である。その第一歩として、本稿では褥瘡の治癒傾向と創傷－創傷周囲皮膚間の細菌叢類似性の関連を調査する観察研究を実施した（研究1）。その結果、難治性褥瘡では創傷周囲皮膚の細菌叢との類似性が低いディスバイオシス状態の創部細菌叢が形成されている可能性が高いことを明らかにした。そこで、その状態の創部細菌叢を伴うクリティカルコロナイゼーションの創部を模した動物モデルを確立し（研究2）、そのモデルを用いてディスバイオシス状態の創部細菌叢と宿主免疫の関連について検証した（研究3）。

研究1：褥瘡における創傷治癒傾向と創部－創周囲皮膚間の細菌叢類似性の関連

### 背景

難治性創傷に特有の優勢細菌や細菌叢組成については報告がない。したがって、創部細菌

叢をターゲットにした介入の確立にはどのような細菌叢がクリティカルコロナイゼーションと関連するか明らかにする必要がある。そこで研究 1 では治癒傾向と創部-創周囲皮膚間の細菌叢類似性との関連について調査した。

#### 方法

65 歳以上の褥瘡患者を対象に前向きコホート研究を実施した。褥瘡は深達度によって創部環境が大きく異なるため、真皮までの浅い褥瘡と真皮を超える深い褥瘡に分類して解析を実施した。ベースラインから 2 週間後、褥瘡状態判定スケールである DESIGN-R®の得点に変化しなかった/増加した創部を難治群とし、減少した創部を治癒傾向群とした。創底と創周囲皮膚からスワブサンプルを採取し、抽出した細菌 DNA を次世代シーケンサーによる 16S rRNA 遺伝子解析に供した。配列データから Weighted UniFrac dissimilarity index を算出し、創部-創周囲皮膚間の細菌叢類似性を PERMANOVA によって評価した。

#### 結果

本研究では浅い褥瘡 15 例と深い褥瘡 7 例が解析対象だった。浅い褥瘡における Weighted UniFrac dissimilarity index の値は、難治群と治癒傾向群においてそれぞれ 0.42 (Interquartile range、IQR: 0.31–0.50) と 0.26 (IQR: 0.14–0.37) だった。深い褥瘡では 0.56 (IQR: 0.52–0.67) と 0.29 (IQR: 0.22–0.35) であり、難治群の創部細菌叢と創周囲皮膚細菌叢には系統学的な違いが認められた ( $p = 0.05$ )。

#### 考察

深い褥瘡では、治癒傾向群より難治群のほうが創部-創周囲皮膚間の細菌叢類似性が低かった。皮膚細菌叢では構成や機能的バランスが乱れた状態であるディスバイオシスが発生すると、皮膚の免疫恒常性が破綻し、炎症性疾患の発生につながる。このことから、ディスバイオシス状態の創部細菌叢が形成されたとき、宿主免疫を変化させ、創部の過剰な炎症やそれに続く治癒遅延が発生する可能性がある。

#### 小括

研究 1 では、治癒傾向と創部-創周囲皮膚間の細菌叢類似性の関連について調査した。その結果、深い難治性褥瘡では創周囲皮膚との類似性が低いディスバイオシス状態の創部細菌叢が形成されている可能性が高いことを示した。そこで、研究 2 ではディスバイオシス状態の創部細菌叢を伴うクリティカルコロナイゼーションを模した動物モデルを確立し、モデルの特徴として過剰な免疫を抑制する制御性 T 細胞 (Treg) について調べる。

### 研究 2: ディスバイオシス状態の創部細菌叢を伴うクリティカルコロナイゼーションを模した創傷モデルの確立

#### 背景

クリティカルコロナイゼーションや治癒遅延の創部を模した動物モデルは報告されているが、これらのモデルでは単一の病原性細菌やその毒素を投与しており、多様な細菌によって形成されているディスバイオシス状態の創部細菌叢を模したモデルとしては使用できな

い。そこで、研究 2 ではラットの皮膚常在細菌叢を由来として作製したディスバイオシス状態の細菌叢を創部に移植することでクリティカルコロナイゼーションの創部を模したモデルを確立することを目的とした。

#### 方法

ディスバイオシス状態の細菌叢の細菌液は、壊死組織を模した人工真皮とともにラット皮膚から採取した細菌を LB 培地中で 72 時間培養することによって作製した。6 ヶ月齢の雄性 SD ラットの背部皮膚に全層欠損創を作製した。創作製後 1 日目にディスバイオシス状態の細菌叢の細菌液とともに 1.5 時間インキュベートしたガーゼを創部に貼付することで細菌叢を移植し、2 日目にそのガーゼを除去した（ディスバイオシス群）。コントロールは創部細菌を含まない LB 培地を用いた。この創部では皮膚常在細菌が定着している創部を再現している（常在細菌叢群）。創作製 4 日目に創部組織を採取し、組織学的評価と遺伝子発現解析を行った。

#### 結果

ディスバイオシス群では常在細菌叢群と比較して創傷治癒が遅延した。また、両群で肉眼的な感染徴候は観察されなかったが、ディスバイオシス群では肉芽組織への好中球の浸潤が多かった。さらに、ディスバイオシス群の創部の肉芽組織では Treg が少なく、Treg のマーカー遺伝子である Foxp3 の発現量が低い傾向がみられた。

#### 考察

ラットの皮膚常在細菌叢を由来として作製されたディスバイオシス状態の細菌叢を創部に移植することで臨床のクリティカルコロナイゼーションの創部を模したモデルを確立した。このモデルでは Treg の誘導が少ない可能性があり、ディスバイオシス状態の細菌叢では、過剰な炎症を Treg によって抑制できていないと考えられる。

#### 小括

ラットの皮膚常在細菌叢の培養によってディスバイオシス状態の細菌叢を再現し、それを創部に移植することでクリティカルコロナイゼーションの創部を模した動物モデルを確立した。研究 3 では同モデルを用いて、常在細菌叢およびディスバイオシス状態の細菌叢の創部における Treg と過剰な炎症の関連について調査する。

### 研究 3: クリティカルコロナイゼーション成立にディスバイオシス状態の創部細菌叢が果たす役割の解明

#### 背景

研究 2 の結果から、常在細菌叢の創部では Treg によって過剰な炎症が抑制されることで正常に治癒するが、ディスバイオシス状態の創部では Treg が少ないことにより過剰な炎症が抑制できず、その結果治癒が遅延するという仮説を立てた。この仮説を検証するため、研究 3 では、Treg を抑制したときに常在細菌叢およびディスバイオシス状態の細菌叢の創部において過剰な炎症が発生し、治癒が遅延するか調査した。

## 方法

研究 2 で確立した常在細菌叢とディスバイオシス状態の細菌叢の創傷モデルに対し、創作製前日から作製後 3 日目まで腹腔内投与によって FK506 あるいはビークルを投与した。創作製 4 日目に創部組織と末梢血を採取し、組織学的解析、分子生物学的解析に供した。

## 結果

FK506 を投与したラットの末梢血単核細胞における FOXP3 陽性細胞の割合はビークル投与群と比較して有意に低かった。ビークル+常在細菌叢群と比較し、FK506+常在細菌叢群、ビークル+ディスバイオシス群、FK506+ディスバイオシス群では肉芽組織への好中球の浸潤が観察され、治癒が遅延した。

## 考察

Treg を抑制すると、常在細菌叢の創部においても過剰な炎症が発生し、治癒が遅延した。このことから、常在細菌叢の創部において Treg が炎症抑制および正常な治癒の進行に関与していると考えられる。今後は Treg の活性化実験によってディスバイオシス状態の細菌叢の創部でも過剰な炎症が抑制され、正常に治癒が進むかを確認する必要がある。

## 小括

研究 3 では Treg の抑制実験によって、創部細菌叢に対する炎症発生と治癒遅延に対する Treg の関与を調査した。その結果、常在細菌叢の創部において過剰な炎症が発生し、治癒が遅延したことから、Treg が常在細菌叢に対する炎症抑制に関与している可能性が示された。

## 総合考察・結論

常在細菌叢の創部では Treg によって過剰な炎症が抑制され、正常に治癒するのにに対し、ディスバイオシス状態の細菌叢の創部では、Treg が少ないことにより過剰な炎症が抑制されず、その結果クリティカルコロナイゼーションが引き起こされていると考えられる。創部細菌叢の形成に大きく寄与する創部環境を是正しなければディスバイオシス状態の細菌叢を改善したり、皮膚常在細菌叢を定着させたりすることは困難である。したがって、今後はディスバイオシス状態の細菌叢に関連する創傷環境の特徴を明らかにする必要がある。そして、その結果をもとに創傷環境を是正するケアプロダクトを開発することで創部細菌叢をターゲットとしたクリティカルコロナイゼーション予防の介入の確立を目指す。