

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：22401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463213

研究課題名(和文) 糖尿病の皮膚創傷治癒過程における血管新生とコラーゲン形成に関する形態学的研究

研究課題名(英文) Morphological study of angiogenesis and type III collagen synthesis in diabetic wound healing

研究代表者

林 弘之 (Hayashi, Hiroyuki)

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：80121028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は糖尿病における創傷治癒遅延の原因について形態学的に検索した。実験には糖尿病雄マウスを用い、血管新生、血流開始時期、Ⅲ型コラーゲンの形成について免疫組織学的に検討した。その結果、糖尿病における創傷治癒過程での血管新生は正常のものよりも2～3日遅延が観察された。新生血管に血流が認められるのはさらにその1～2日後であった。Ⅲ型コラーゲンの形成は血流開始と一致して認められた。これらのことより、糖尿病マウスにおける創傷治癒の遅延の原因は血管新生の遅れと、血流開始の遅れにより、創部に必要な栄養供給ができないことがその原因の一つであることが推察された。

研究成果の概要(英文)：The wound healing in diabetes was taken for morphological analyses. For the experiments, diabetic male mice were used and immunohistological analysis for angiogenesis, blood flow and formation of type III collagen.

As a result, a delay of 2 to 3 days was observed in angiogenesis in wound healing process in diabetes than in normal cases. Blood flow was observed in new blood vessels after 1 or 2 days. Formation of type III collagen was observed consistent with the onset of blood flow. These results may suggest that the cause of delay in wound healing in diabetic mice is one of the causes of the delay in angiogenesis and the delay in starting blood flow, which makes it impossible to supply the wound with the nutrition

研究分野：組織学

キーワード：創傷治癒 糖尿病 血管新生 VEGF 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は創傷治癒を障害する全身的要因の一つであり、看護においては褥瘡、外科的侵襲後の回復過程において、アセスメントすべき重要な疾患である。

創傷治癒において、糖尿病は皮膚潰瘍に深く関係していることから、潰瘍の病態解明に注目した研究報告が多くみられる。糖尿病モデル動物の創傷治癒において、高血糖状態により、好中球機能の低下、リンパ球、マクロファージなどの細胞性免疫機能低下、末梢神経障害、血流障害、コラーゲン線維産生能低下等により治癒が遅延する¹⁾ことが指摘されているが、*in vitro*での報告が多く、実験形態学的に調査したものはほとんどみられない。

そこで本研究では糖尿病マウスを用い血管新生、コラーゲン線維の形成について実験形態学的研究を進める。

2. 研究の目的

(1) 血管新生

生体において身体の一部に損傷を受け、組織に障害が加わると、組織を再築するための生体反応が創傷治癒である。正常の創傷治癒過程には個人差があるが、一般的には3~14日を要し、炎症期・増殖期・修復期の3つの過程を経て組織の再生が行われ、回復へと向かっていく。糖尿病の場合、白血球の免疫反応が低下することや、血流障害による創部の酸素供給の低下などがおこるため、血管新生と肉芽増生の抑制による創治癒の遅延を認める事が多く、創傷治癒過程における炎症期と増殖期が障害されることにより創傷治癒が遅れる²⁾。よって、糖尿病患者の手術などの外科的処置では、一般的に創傷部の治癒遅延や、感染による創傷部の離解などを起こしやすい状態であると言える。本研究では、糖尿病に

おける創傷治癒について、血管新生に着目し、特に血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor、VEGF)³⁾を指標に血管新生の過程を検索した。また新生された血管が血流を有する機能血管として働いているかを検索するため、血管内皮細胞に特異的に結合するトマトレクチン⁴⁾を用い、新生血管の性状についても検索した。

(2) コラーゲン線維の形成

創傷治癒は多くの細胞、サイトカイン、マトリックスが高次的、経時的に複雑に絡み合っていく高度な組織再生反応であり、その反応の終点も規定されている。これらのどの部分が異常を起こしても、創傷は治癒遅延、瘢痕形成など臨床的問題となって現れる²⁾。創傷の治癒には、時間的な差異がある。この時間的差異は創の性状や環境に影響される。創傷治癒過程に影響を与える生体側因子として、年齢・体重、栄養状態(低タンパク血症やビタミンC欠乏症)、脱水、免疫状態、合併疾患、受傷部位への血流状態、受傷部位への放射線照射の有無などがあげられる²⁾。上に示したように創傷治癒過程において、増殖期は肉芽組織が形成され、上皮化が進行する時期である。この肉芽形成は創傷治癒にとって最も大切な治癒過程の一つであり、皮下組織の主要な要素であるコラーゲンが新生、再構築される時期となる⁵⁾。この過程が障害を受けると創の治癒は遅延する。

コラーゲンは現在主なものだけで型から型までの5種類が知られ、さらにコラーゲンの分子内の架橋により十数種類の架橋結合が知られている⁶⁾。そのうち型コラーゲンは生体に認められる最も一般的なもので、結合組織、皮膚、骨など多くの組織で認められ

る。また、Ⅲ型コラーゲンは胎児の皮膚や血管に多くみられる⁶⁾。創傷治癒過程において初期にはⅢ型コラーゲンが出現し、その後Ⅰ型コラーゲンとなることが報告されている⁷⁾。⁸⁾創傷治癒過程においてⅢ型コラーゲンとⅠ型コラーゲンの比率は創傷治癒を知る上で重要な鍵となると考える。そこで、本研究では特にⅢ型コラーゲンに着目し組織学的ならびに免疫組織化学的な解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 血管新生

10週齢(40~52g)のKK-A^y/TaJcl系(日本クレア)雄マウス25匹を清浄飼育室にて、自由運動下および餌・水を常時摂取可能な環境で飼育した。

1) 創傷作製

実験動物をラット・マウス用三種混合麻酔(ドミツール・ミダゾラム「サンド」・ベトルファール)にて麻酔後、背部を除毛し、ポビドンヨード(イソジン[®]:明治製菓株式会社)で消毒後、3mmの皮膚トレパン(デルマパンチ[®]:ニプロ医工株式会社)にて、4ヶ所創傷を作製した。作製した創傷部を粘着性透明創傷被覆保護材(3M[™]テガダームトランスペアレントドレッシング:スリーエムヘルスケア株式会社)にて被覆後、粘着性伸縮包帯(ハイラテックステープ[®]:イワツキ株式会社)を用い固定した。

2) 組織学的検索

創作製後(受傷後)3日、5日、7日、10日、14日後にマウスにペントバルビタールナトリウムを腹腔内に過剰投与にて屠殺後、創部皮膚組織を正常皮膚組織、皮下組織とともに採取し、10%中性緩衝ホルマリンにて一昼夜固定した。その後組織はエタノール系列で脱水

し、パラフィン包埋した。5µmの切片を作製後、Hematoxylin Eosin (HE)染色を施し、光学顕微鏡にて観察した(データ未提示)。

3) 免疫組織化学的検索

創部における新生血管の動態を観察する目的で、抗-VEGF抗体を用い、免疫組織化学的検索を行った。マウスを上記と同様に屠殺し、組織を採取後、パラフィン切片を作製した。

免疫染色は、Cell & Tissue Staining Kit (R&D Systems社:USA)を用い、アビチン・ビオチン(ABC)法を用い、DAB(3,3'-Diaminobenzidine)にて発色させた。染色手順としては、標本を脱パラフィン後、PBS(Phosphate Buffered Saline, pH7.4)で洗浄後、0.3%過酸化水素にて室温で2時間反応させた。その後PBSで洗浄し、ウサギ正常血清を室温で20分間反応させた。次に抗-VEGF抗体(R&D Systems社:U.S.A)を、ウサギ正常血清を用いて1000倍に希釈し4℃で一昼夜反応させた。PBSで洗浄、二次抗体としてビオチン抗体を室温で30分間反応させ、PBSで洗浄、ABC液を室温で30分間反応させた。その後PBSで洗浄し、DABで発色後、対比染色としてヘマトキシリンにて核染した。エタノールで脱水し、キシレンで透徹、封入後、光学顕微鏡を使い観察した。

また、新生血管が血流を有する機能血管かを調べるため、血管内皮細胞に特異的に結合するビオチン化したトマトレクチン(*Lycopersicon esculentum*)を用い検索した。上記と同様に麻酔したマウス1個体当たり100µgのトマトレクチン(Vector Lab.:USA)を尾静脈より注射し、5分後に開胸し左心室より4% Paraformaldehydeの灌流固定をおこない、組織を採取後同固定液で一昼夜後固定した。その後上記と同様にパラフィン切片

を作成し、Tex Red (1:200) にて染色後蛍光顕微鏡で観察した。

(2) コラーゲン線維の形成

創部におけるⅢ型コラーゲンを検出する目的で抗-コラーゲンタイプⅢ抗体 (Acris Antibodies Inc.; USA) を用い、免疫組織化学的検索を行った。

上記抗-VEGF 抗体で行ったと同様に作製した試料に抗-コラーゲンタイプⅢ抗体 (1:200) を用いて4℃で一昼夜反応させ、DAB液で発色後、観察に用いた。

本研究は、埼玉県立大学共同実験管理部会の承認を得て実施した (承認番号: 26 - 3号)。

4. 研究成果

(1) 血管新生

抗-VEGF 抗体を用いた血管新生

受傷後3日では創部に VEGF 陽性反応は認めることができなかったが、受傷後5日で創周囲部に VEGF 免疫陽性細胞を認めることができた (写真1)。

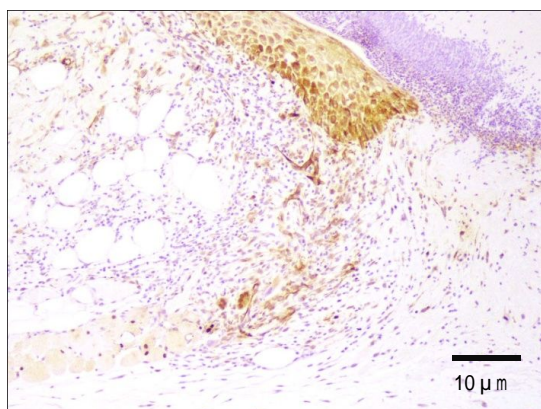


写真1 写真1の四角部分の拡大

創周囲部に VEGF 陽性細胞を認めることができる。

受傷後7日では VEGF 陽性細胞が再生された

上皮直下に多数認められた。さらに創深部に VEGF 陽性細胞を確認することができた (写真2)。

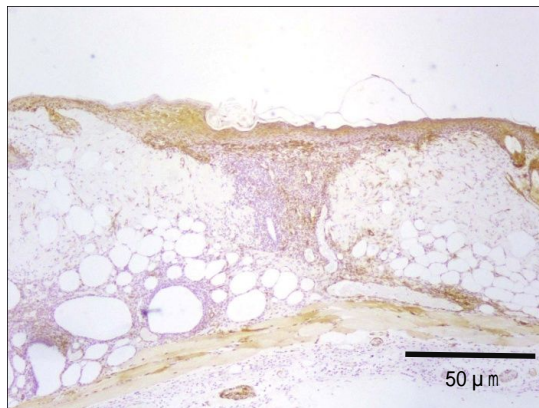


写真2 受傷後7日の VEGF 免疫染色像

上皮直下や創深部に VEGF 陽性細胞を認めることができる。

受傷後10日では創全体に VEGF 陽性細胞を観察することができた (写真3)。

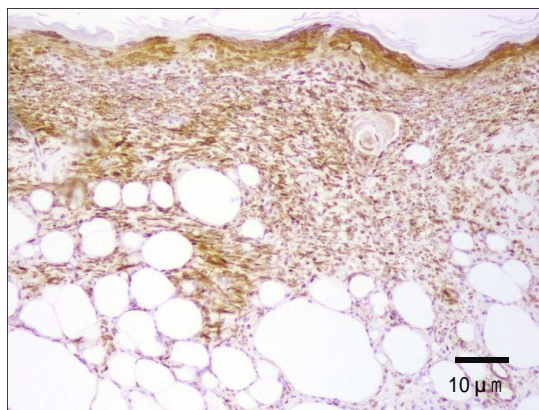


写真3 受傷後10日の VEGF 免疫染色像

創内に多くの VEGF 陽性細胞が観察される

トマトレクチンを用いた免疫組織学的検索
VEGF の免疫組織学的検索では受傷後5日より VEGF 陽性細胞を観察することができ、この時期より血管の新生が始まっていることが認められた。次にこれら新生された血管が血流を有する機能血管として働いているのかを

検討するため、血管内皮細胞に特異的に結合するトマトレクチンを用いて検索した。

受傷後7日まではトマトレクチンとVEGFはそれぞれ別々に染色して観察された。しかしながら、受傷後10日ではVEGF陽性の血管にトマトレクチンの陽性を観察することができた(写真4)。

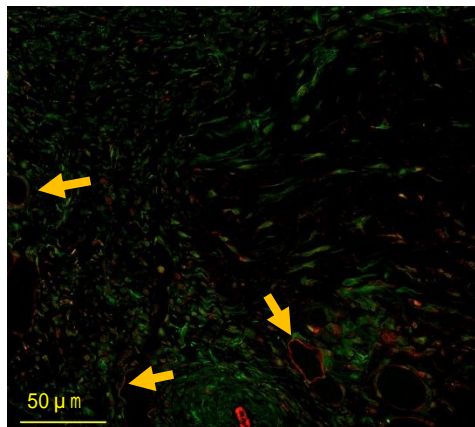


写真4 受傷後10日のトマトレクチン(赤)とVEGF(緑)の免疫染色像

トマトレクチンとVEGFの両者によって染色される血管(矢印)を観察することができる。

(2) コラーゲン線維の形成

受傷後7日の型コラーゲンの免疫染色では創周囲部の血管周囲に陽性反応が認められた(写真5)。

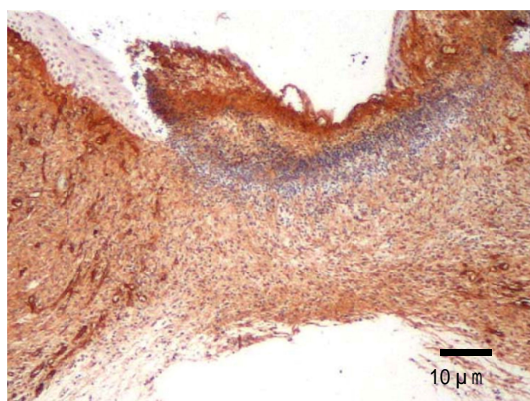


写真5 受傷後7日型コラーゲン創周囲部の血管周囲に陽性反応が認められる。

受傷後10日の型コラーゲンの免疫染色では創内の血管周囲に免疫陽性反応が認められた(写真6)。

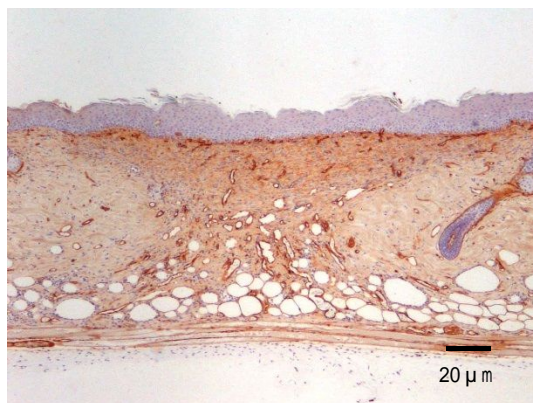


写真6 受傷後10日の型コラーゲン創内の血管周囲に陽性反応を認める。

以上の結果より、糖尿病マウスにおける創傷治癒過程での血管新生はVEGFの結果より受傷後5日目より開始されることが観察された。これは正常マウスよりも2~3日遅れている。さらに新生された血管に血流が認められるのはさらにそれより2日ほど遅延していた。創傷治癒に必要な型コラーゲンの形成はこの血流開始と一致して認めることができた。これらのことより、糖尿病マウスにおける創傷治癒の遅延の原因は血管新生の遅れと、さらに新生された血管内の血流開始の遅れにより、創部に必要な栄養成分を運ぶのが遅れることが創傷治癒遅延の一つであることが推察された。すなわち、本研究により新生血管内の血流開始遅延が糖尿病における創傷治癒の遅延の一つであることが形態学的に確認された。

引用論文

1. Marhoffer, W., et al., Diabetes. Res. Clin. Pract., 19, 1993, 183-188.

2. 塩谷信幸．創傷治癒，ブレーン出版，東京，2005，1-42.
3. Mustonen, T., Alitalo, K., J. Cell Biol., 129, 1995, 895-898.
4. Debbge, PL., et al., J. Histochem. Cytochem., 46, 1998, 627-639.
5. 田澤賢次編．創傷管理と治癒システム，金原出版，東京，1998，43-47.
6. 藤田尚男、藤田恒夫．標準組織学・総論（第5版）医学書院 東京 2015 ,119-12.
7. Gay S, et al., Acta Chir. Scand., 144, 1978, 205 -211.
8. Clore JN, Cohen IK, Diegelmann RF. Proc. Soc. Exp. Biol Med., 161, 1979, 337-340.

5. 主な発表論文等

[学会発表]計5件

岩田佳矢子、伊藤紗也美、孔令帥、林 弘之．創傷治癒過程に関する形態学的研究、埼玉県立大学保健医療福祉科学学会第5回学術集会、平成26年10月、越谷市。

伊藤紗也美、岩田佳矢子、孔令帥、林 弘之．口腔粘膜における創傷治癒に関する形態学的研究、埼玉県立大学保健医療福祉科学学会第5回学術集会、平成26年10月、越谷市。

林 弘之、他9名．糖尿病マウス創傷治癒過程における血管新生．第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、平成28年3月、郡山市。

林 弘之、成瀬秀夫、寺嶋美帆、武田美津代、金村尚彦、木村明彦、五味敏昭．埼玉県立大学保健医療福祉科学学会第7回学術集会、平成28年10月、越谷市。

林 弘之、他6名．糖尿病マウス創傷治

癒過程における型コラーゲンの形成．第122回日本解剖学会総会・全国学術集会、平成29年3月、長崎市。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 弘之 (HAYASHI, Hiroyuki)
埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授
研究者番号：80121028

(2) 研究分担者

金村尚彦 (KANEMURA, Naohiko)
埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授
研究者番号：20379895

武田美津代 (TAKEDA, Mituyo)
埼玉県立大学・保健医療福祉学部・准教授
研究者番号：90279852

成瀬秀夫 (NARUSE, Hideo)
東京有明医療大学・保健医療学部・教授
研究者番号：40563416

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

五味敏昭 (GOMI, Toshiaki)
木村明彦 (KIMURA, Akihiko)
寺嶋美帆 (TERAJIMA, Miho)
伊藤紗也美 (ITOH, Sayami)
岩田佳矢子 (IWATA, Kayako)
孔 令帥 (KONG, Lingshuai)
内倉知恵 (UTHIKURA, Chie)
大竹恵美 (OOTAKE, Emi)