

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591321
 研究課題名（和文） スタチンによる糖尿病性潰瘍の新規治療法に関する研究
 研究課題名（英文） A study on the effectiveness of statins for diabetic wounds
 研究代表者
 竹中 秀也（TAKENAKA HIDEYA）
 京都府立医科大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：80254358

研究成果の概要：スタチンは、高コレステロール血症治療薬であるが、血管新生促進作用があることが知られてきた。そこで、スタチンによる糖尿病性潰瘍などの難治性潰瘍に対する新規治療法の開発に向けて実験を行った。糖尿病マウスの皮膚潰瘍に対し、スタチンの全身投与および外用投与を行った。スタチンを投与した群の方が、創傷治癒が促進し、創部により多くの血管およびリンパ管が新生した。スタチンの外用剤が、糖尿病性潰瘍の治療薬になる可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚病理学、創傷治癒、糖尿病、血管新生、リンパ管

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病性潰瘍は難治性皮膚潰瘍の代表的疾患の一つで、糖尿病患者の入院する主要な原因であり、しばしば患者の生命を脅かし、QOLを低下させる。糖尿病性潰瘍の主な原因として末梢循環障害による創傷治癒遅延が挙げられ、治療法としては、血流改善剤等の全身投与、種々の外用剤の使用、植皮術などの外科的治療が行われているが、これらの治療に抵抗性の場合も多い。最近ではこれらの治療法に加え、人工皮膚や細胞増殖因子製剤などが使用されるようにな

り、培養皮膚や遺伝子治療などの治療法が開発されつつあるが、今後さらに有効な治療法の開発が望まれている。

(2) 最近、創傷治癒過程において、リンパ管は間質余剰水分の排泄や免疫機構の維持などの働きにより重要な役割を果たしていることが知られるようになり、創傷治癒過程におけるリンパ管再生の重要性が認識されはじめてきた。

(3) HMG-CoA還元酵素阻害剤であるスタ

チンは、本来のコレステロール低下作用だけでなく、血管新生促進作用や抗炎症作用（免疫調節作用）があることが知られるようになった。糖尿病モデルマウスに生じた糖尿病性神経障害がスタチン投与により著明に改善し、その機序としてスタチンが神経の栄養血管を増加させることが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、スタチンの血管新生促進作用に着目し、糖尿病性潰瘍などの難治性潰瘍に対する新規治療法の開発に向けて、スタチンによる創傷治癒促進作用、血管新生・リンパ管新生促進作用、免疫調節作用および血管内皮前駆細胞や線維芽細胞などに対する作用などについて検討する。

3. 研究の方法

(1) 難治性皮膚潰瘍のモデルである2型糖尿病マウス (C57BLKS/J- $m^{+/+}$ *Lepr^{db}*) を用いて、背部に皮膚全層欠損創を作成し、スタチン (rosvastatin) の全身投与および局所投与を行い、その有効性を主に *in vivo* で検討した。8~10 週齢の糖尿病モデルマウス (db/db マウス) を用いた。ペントバルビタールによる麻酔の後、マウス背部に直径 8 mm の皮膚全層欠損創を作成し、0.5% rosvastatin 添加白色ワセリンまたは白色ワセリンを創部に外用した (創傷作成時、4, 7, 10 日後に外用)。創傷作成 4 日、7 日及び 14 日後に創傷面積を NIH Image software により測定した。

(2) 創傷作成 14 日後の組織を用いて血管およびリンパ管新生の程度を免疫組織学的に検討した。創部血管新生の免疫組織学的解析に、血管内皮特異的マーカーである CD31 染色を用いた。また、創部リンパ管新生の免疫組織学的解析に、リンパ管内皮特異的マーカーである LYVE-1 染色を用いた。染色された面積を NIH Image software により測定した。

(3) 培養リンパ管内皮細胞をスタチンにより刺激して、tube formation assay を行った。

4. 研究成果

(1) スタチン局所投与は糖尿病性潰瘍の創傷治癒を促進させる

スタチン局所投与の創傷治癒に対する効果を検討するため、db/dbマウスの背部に皮膚全層欠損創を作成し、スタチンを局所投与した。創傷作成4日後より、スタチン治療群では対照群に対して有意に上皮化が促進された (day4 in control vs simvastatin: 21.23 ± 15.48 vs $40.60 \pm 9.56\%$, $P < 0.05$; day7 in

control vs simvastatin: 52.45 ± 16.82 vs $79.26 \pm 11.09\%$, $P < 0.01$; day14: 82.92 ± 8.02 vs $96.83 \pm 4.65\%$, $P < 0.01$) (図1a, b)。スタチン局所投与の創傷治癒に対する促進効果は、全身投与による効果を上回った。

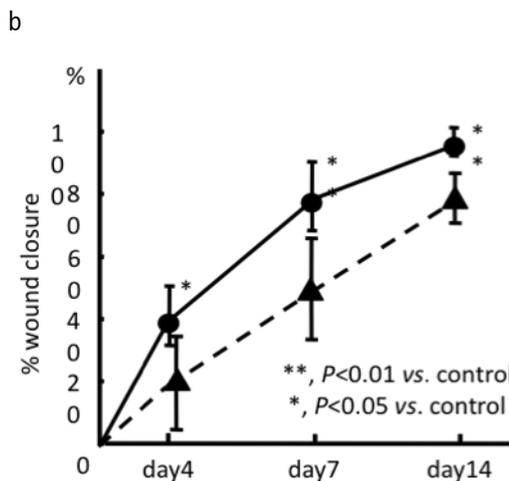
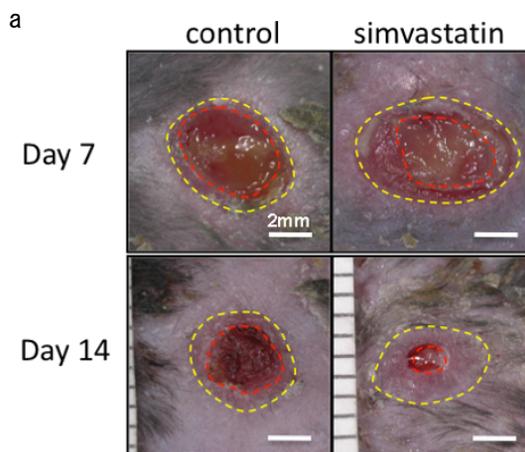


図1 創面積の縮小率

(2) スタチン局所投与は糖尿病性潰瘍肉芽組織内の血管新生・リンパ管新生を促進させる

続いて我々は、肉芽組織における血管新生について免疫組織学的に検討するため、創部血管を血管内皮細胞のマーカーである CD31 で染色しラベルした。スタチン治療群では、CD31 陽性細胞は対照群と比較して有意な増加を認めた (図 2a, b)。さらに、肉芽組織におけるリンパ管新生についてもリンパ管内皮細胞のマーカーである LYVE-1 で染色しリンパ管内皮をラベルした。スタチン治療群では、LYVE-1 陽性細胞は対照群と比較して有意な増加を認めた (図 3a, b)。

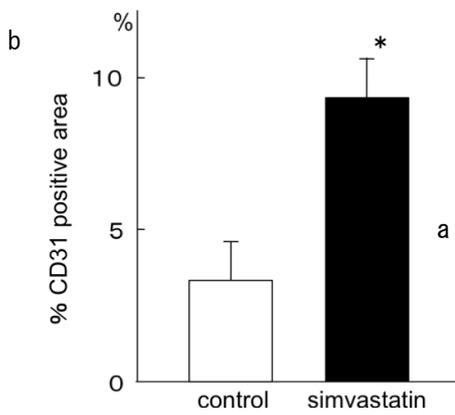
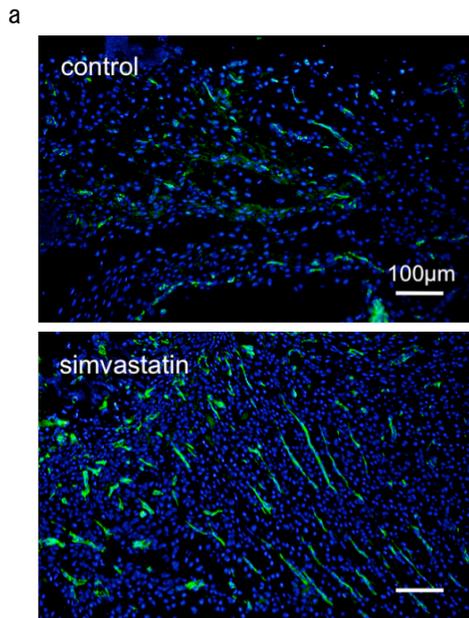


図2 肉芽組織内の血管

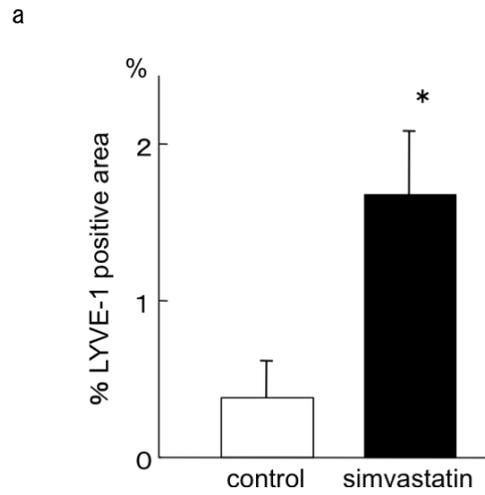
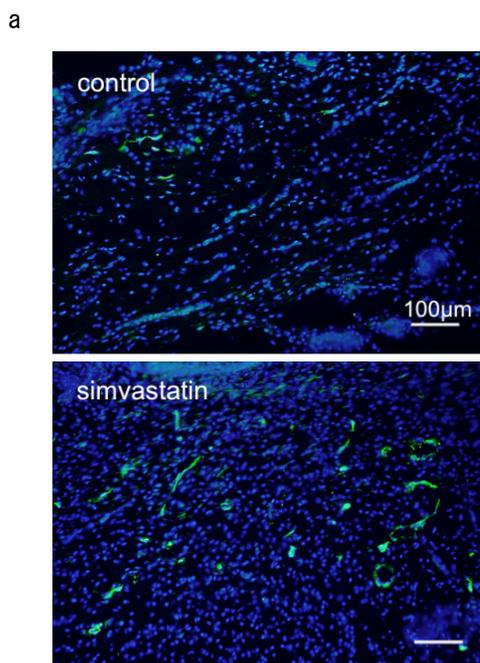


図3 肉芽組織内のリンパ管

(3) 培養リンパ管内皮細胞はスタチンの刺激により、有意に多くの脈管構造を形成した (図4a, b)。

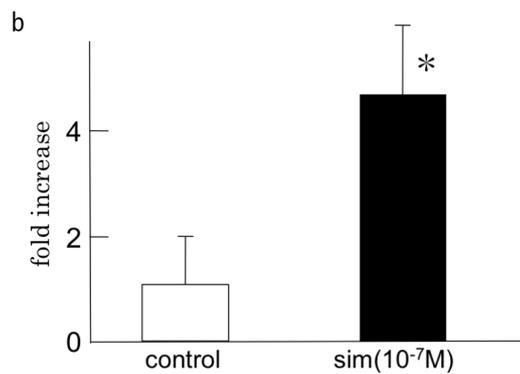
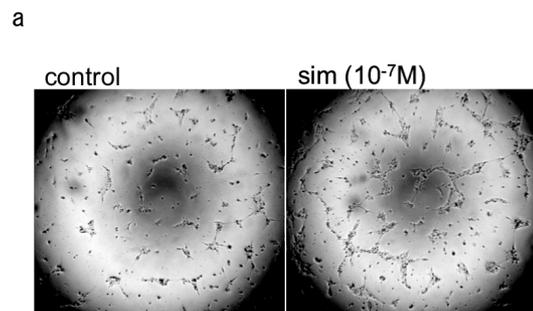


図3 リンパ管内皮細胞を用いた tube formation assay

(4) 本研究では、スタチンの血管新生促進作用に着目し、糖尿病性潰瘍などの難治性潰瘍に対する新規治療法の開発に向けて実験を行った。スタチンの糖尿病性潰瘍に対する治療効果が動物実験で実証された。その効果は、一部はスタチンによる血管新生・リンパ管新

生の促進作用によるものであることが示された。

(5) スタチンの投与により肉芽組織の成熟促進効果が見られたが、これは一部はスタチンの線維芽細胞に対する直接効果であることが示唆され、スタチンにこのような効果があることは新知見であると考えられる。この点に関しては、今後さらに検討すべき課題である。

(6) 特記すべきこととして、スタチンの外用薬としての局所投与による効果が、全身投与と同様あるいはそれ以上の効果を示した。このことは、糖尿病性潰瘍のスタチンによる臨床的な治療を考えた場合に、副作用が少なく、投与方法も簡便な外用療法という治療法として確立していく上で非常に有用なデータである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

① Asai J, Takenaka H, et al. Topical simvastatin accelerates wound healing in diabetes by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis. 69th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology. 2009 May 6-9; Montréal, Canada.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹中 秀也 (TAKENAKA HIDEYA)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：80254358

(2) 研究分担者

浅井 純 (ASAI JUN)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：50438222
伊井 正明 (II MASAOKI)
独立行政法人理化学研究所・幹細胞医療応用
研究チーム・研究員
研究者番号：10442922