

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791086

研究課題名（和文） スタチンによるリンパ管新生を介した難治性皮膚潰瘍治療の基礎研究

研究課題名（英文） The effects of statin on lymphangiogenesis in impaired wound healing

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：高コレステロール血症治療薬の一つであるスタチンがマクロファージを介したリンパ管新生を促進することを示した。その機序として、マクロファージ自身のリンパ管内皮細胞への分化を誘導することが明らかになった。スタチンがリンパ管新生を介した難治性皮膚潰瘍の新しい治療法として有効な治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The present study showed topical application of simvastatin promoted lymphangiogenesis as well as angiogenesis during wound healing in genetically diabetic mice. These results suggested that both pre-existing lymphatic endothelial cells and infiltrating macrophages might contribute to newly organized vessels induced by simvastatin. In conclusion, a simple strategy of topically applied simvastatin may have significant therapeutic potential for enhanced wound healing in patients with impaired microcirculation such as occurs in diabetes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：マクロファージ、リンパ管、創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性潰瘍、下腿潰瘍や膠原病に伴う皮膚潰瘍などの難治性皮膚潰瘍に対する治療法としては、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が開発が望まれる。

近年、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。糖尿病性潰瘍をはじめとした難治性皮膚潰瘍では、多くの症例で潰瘍周辺部の顕著な浮腫や細菌感染を認めるが、これらの原因として血流障害だけでなく、リンパ管還流障害による間質への余剰水分の貯溜や、炎症細胞・debrisの排泄不良があると考えられる。従来の難治性潰瘍に対する治療法の多くは血流改善・新生血管誘導に主眼がおかれているが、これらの治療法が高い臨床効果を得ることができなかった原因として、血流改善に伴う間質液貯溜に対し、余剰水分排泄機構であるリンパ管の不足により起こる還流障害が一つの可能性として考えられる。つまり、創傷治癒においてリンパ管を誘導することは、血管を誘導することと同様、非常に意義の大きくまた高い臨床効果が望める可能性を持っているといえる。

最近我々はマクロファージが創傷治癒過程において新生リンパ管に分化することを発見した。さらに、これらがリンパ管増殖に必須である **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-C** を豊富に産生し、**autocrine** にリンパ管新生を促進させることがわかった。これらの発見は、今まで不明であったリンパ管新生のメカニズムを解明する大きな手がかりになると考えられ、当分野において非常に重要な発見であるといえる。さらに、糖尿病マウスのマクロファージでは、**real-time PCR**によりRNAを定量的に測定したところ、リンパ管新生に必要な **VEGF-C** およびその受容体である **VEGFR3** の発現が著明に低下していることを発見した。これらのことから、糖尿病性潰瘍において創傷治癒遅延の原因の一つとなっているリンパ管新生不良が、マ

クロファージの機能不全により引き起こされている可能性を示した。

HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるスタチンは、高脂血症の治療薬として用いられている。近年、スタチンに本来のコレステロール合成阻害作用だけでなく、血管新生促進作用があることが動物実験により明らかになった。さらに、糖尿病モデルマウスに生じた糖尿病性神経障害が著明に改善し、その機序として神経の栄養血管を増加させることが報告された。しかし、スタチンの皮膚潰瘍に対する作用、特に創傷治癒に重要なリンパ管新生に対する作用については未だに研究がなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病性皮膚潰瘍をはじめとする難治性皮膚潰瘍に対するスタチンの創傷治癒促進作用について、特にスタチンのリンパ管新生に対する作用について、基礎実験として糖尿病モデルマウスに皮膚全層欠損創を作成し、スタチンを局所投与してその有効性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

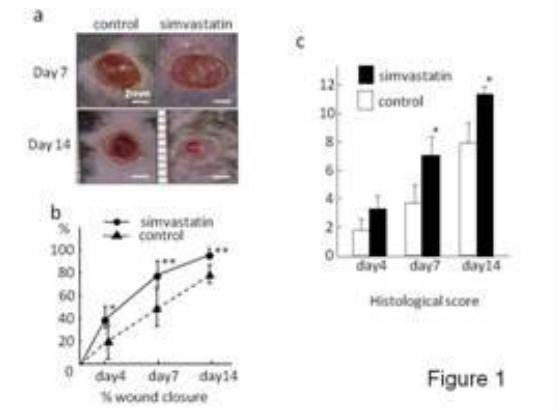
糖尿病モデルマウス背部に皮膚全層欠損創を作成し、シンバスタチン外用による創傷治癒促進効果を経時的に観察し、検討した。また創部肉芽組織内の血管およびリンパ管を免疫組織染色にて検討した。

In vitroの実験として、ヒトリンパ管内皮細胞とマウス腹腔内マクロファージを用いてスタチンによるリンパ管新生への影響を検討した。

4. 研究成果

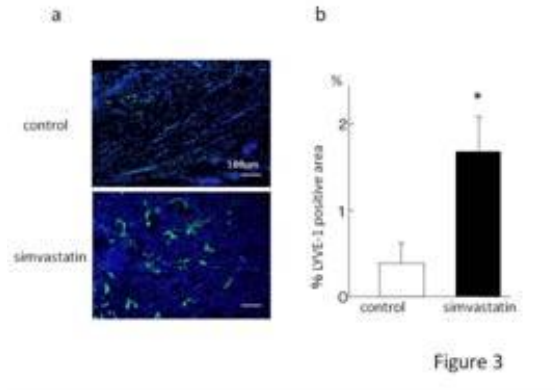
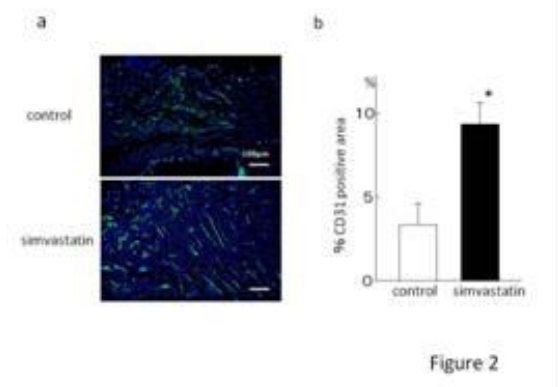
(1)スタチンは糖尿病マウス皮膚全層欠損創の治癒を促進させた。(Figure 1)マ

ウス背部に直径8 mm の創を作成し、シンバスタチン外用を行ったところ、創傷作成4日より有意差をもってシンバスタチン外用により創傷治癒が促進された。またその差は7日で最大となった。



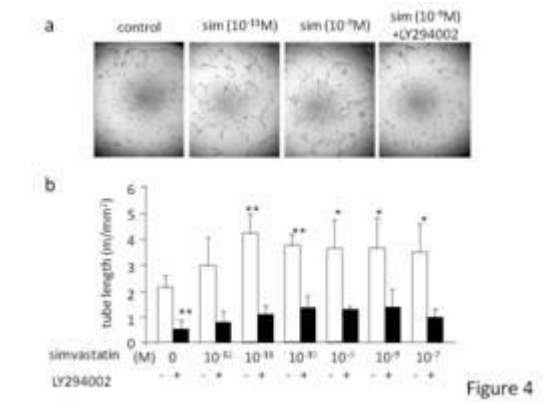
(2) スタチン外用により創部肉芽組織内の血管新生およびリンパ管新生が有意に促進した。(Figure 2, Figure 3)

創部肉芽組織における新生血管を抗 CD31 抗体を用いて染色し、スタチン投与群と対照群で比較検討したところ、スタチン投与群で有意に新生血管の増加が認められた。また、同様に抗 LYVE-1 抗体を用いてリンパ管を染色したところ、スタチン投与群において対照群と比して有意に新生リンパ管の増加を認めた。



(3) スタチン刺激によりリンパ管内皮細胞の脈管形成能は亢進した。(Figure 4)

ヒト由来リンパ管内皮細胞を用いて脈管形成能試験 (tube formation assay) を行った。スタチン刺激によりリンパ管内皮細胞の脈管形成能は有意に亢進し、またそれらは Akt/PI3kinase 経路阻害剤である LY294002 により阻害された。



(4) 創部肉芽組織内でマクロファージがリンパ管内皮細胞へと分化する (Figure 5)

創部肉芽組織におけるマクロファージとリンパ管内皮細胞を免疫組織学的に検討した。シンバスタチン投与群では対照群と比較して浸潤マクロファージ (F4/80 陽性細胞) 数が有意に増加した。またそれらマクロファージのリンパ管内皮細胞への分化について検討するためリンパ管内皮細胞特異的マーカー

の一つである LYVE-1 と F4/80 の二重染色を施行したところ、F4/80 陽性かつ LYVE-1 陽性の細胞数がシンバスタチン投与群において有意に増加していた。

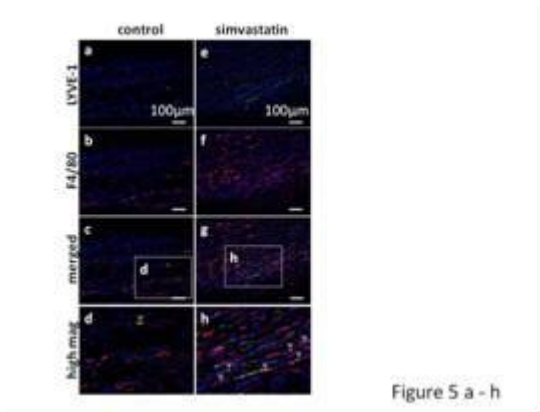


Figure 5 a - h

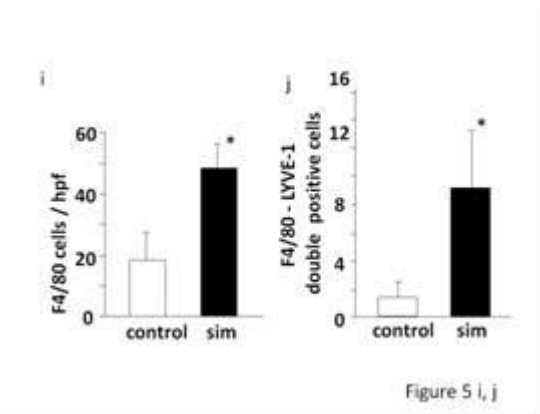


Figure 5 i, j

以上より、スタチンは糖尿病性皮膚潰瘍モデルマウス皮膚全層欠損創において、創傷治癒を促進させることが示された。またその機序として、①リンパ管内皮細胞の脈管形成を促進させる ②創傷治癒に重要なマクロファージの浸潤を増加させ、その一部をリンパ管内皮細胞へと分化させることが示唆された。本研究により、スタチン外用療法が糖尿病性皮膚潰瘍をはじめとする難治性皮膚潰瘍に対する新しい治療法の一つとなる可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

Asai J., et al. Case of Autoimmune Progesterone Dermatitis Presenting as Fixed Drug Eruption. *Journal of Dermatology*, 2009;36:643-645.

[学会発表] (計 1 件)

Asai J., et al. Topical Simvastatin Accelerates Wound Healing in Diabetes by Enhancing Lymphangiogenesis 40th Annual ESDR Meeting. Helsinki, Finland. 2010年9月8-11日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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：54238222