

令和元年5月17日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20712

研究課題名(和文) 糖尿病性潰瘍の治癒促進に向けたエストロゲンによる血管新生促進作用の解明

研究課題名(英文) Investigation of the effect of the estrogen in angiogenesis for promoting cutaneous wound healing in diabetic ulcer

研究代表者

向井 加奈恵 (Mukai, Kanae)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：30755335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性潰瘍は糖尿病の重大な合併症の一つである。糖尿病性潰瘍の治療は難治することが多いのが現状であり、効果的な局所創傷治療の開発が切望されている。そこで本研究課題では、2型糖尿病モデル動物へのエストロゲン投与による皮膚創傷治療への効果の検証を目的とした。2型糖尿病モデルとしてdb/dbマウスを用い、創傷の治癒過程の推移や各種免疫組織化学染色による分析を実施した。その結果、2型糖尿病マウスへのエストロゲン投与はYm1陽性細胞数を増加させ、上皮形成や脈管形成を促進し、皮膚創傷治療を促すことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性潰瘍の治療は難治することが多いのが現状であり、効果的な局所創傷治療の開発が切望されている。本研究課題では皮膚創傷治療に効果的に作用する女性ホルモンのエストロゲンに着目し、糖尿病性潰瘍皮膚創傷治療への効果を検証した。その結果、2型糖尿病マウスへのエストロゲン投与がYm1陽性細胞数を増加させ、上皮形成や脈管形成を促進し、皮膚創傷治療に促進的に作用することが明らかとなった。本研究成果は糖尿病性潰瘍治療へ向けた、新たな方向性を提言できる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Diabetic ulcer is one of the most serious complications. The treatment of diabetic ulcers is difficult; therefore, the development of an effective local wound treatment is desired. In this study, we investigated the effect of estrogen on cutaneous wound healing in diabetes mellitus mice model. The db/db mice were used as a model for type 2 diabetes, and wound healing process and several immunohistochemical staining methods were performed. It was observed that estrogen promoted cutaneous wound healing in type 2 diabetes mice model by increasing Ym1 positive cells and promoting re-epithelialization and angiogenesis.

研究分野：基礎看護学

キーワード：エストロゲン 皮膚創傷治療 糖尿病

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性潰瘍は糖尿病の重大な合併症の一つである。難治性であり、重症化すると壊疽に陥るため患肢の切断が余儀なくされる。世界中で糖尿病のために30秒毎に下肢が切断されていると推定されており (Boulton AJ et al., 2005) 見過ごすことはできない。そのため、糖尿病性潰瘍が重症化する前に治癒させることが重要である。

潰瘍とは真皮全層あるいは皮下組織にも達する深い欠損創であり、治癒には血管や膠原繊維に富む肉芽による充填、上皮化及び創収縮による創閉鎖が必要である。糖尿病性潰瘍は炎症性反応や血管新生遅延に伴う肉芽形成低下によって治癒遅延する (Falanga V 2005 & Brem H et al., 2007) が、なかでも血管新生の遅延が糖尿病性潰瘍の治癒遅延に深く関係する。糖尿病性モデル動物において血管新生に關与する血管内皮前駆細胞の創部への流入遅延及び stromal derived factor-1 や stem cell factor などの局所サイトカイン発現が低下することが報告されている (Botusan IR et al., 2008)。従って血管新生を促進させる試みが糖尿病性潰瘍の治癒促進には必要不可欠であるといえる。

この血管新生に関して、エストロゲンが血管内皮細胞の機能を向上させる (Paul RJ et al., 2007) という報告がある。エストロゲンは性機能と生殖能の調節に最も重要な役割を果たすホルモンであるが、女性の創傷治癒に大きな影響を及ぼすことが明らかとなりつつある。申請者は2010年から2014年にかけて創傷治癒遅延に影響を与える要因である加齢・栄養不良に着目し、卵巣切除マウスへのエストロゲン投与による創傷治癒への効果について検証した。その結果、継続的に生体外からエストロゲンを経皮投与し、一定以上の血中濃度を維持することで皮膚創傷治癒は年齢の影響を受けることなく促進すること (Mukai K et al., 2014abc)、エストロゲンの経皮投与により創傷治癒促進作用を発揮する Ym1 陽性細胞 (M2 型マクロファージ) の出現が増加すること (Mukai K et al., 2014d) を明らかにした。これらの研究結果より、若く栄養状態が良好な卵巣切除マウスのみならず、加齢や栄養不良といったシビアな条件下に晒された場合においてもエストロゲンに創傷治癒促進効果があることを示した。さらに2型糖尿病モデルラットの大動脈でもエストロゲン受容体 (estrogen receptor: ER) /nitric oxide synthase-3 (NOS-3) シグナル経路を抑制することで血管内皮細胞の機能を抑制するが、エストロゲン投与により緩和する (Han Y et al., 2012) という報告がある。つまり、糖尿病という条件下でもエストロゲンが血管新生に重要な役割を果たすことが考えられる。しかしながら、現段階においてエストロゲン投与によって糖尿病性潰瘍の血管新生が促進することで皮膚創傷治癒を促すのか否かは明らかとはなっていない。

2. 研究の目的

本研究では糖尿病性モデル動物へのエストロゲン投与による創傷治癒への効果を明らかにする。

3. 研究の方法

10週齢の B6.BKs(D)-Lepr^{db}/J (db/db) を db/db 群、db/db+エストロゲン塗布群、db/db+vehicle 塗布群の3群に無作為分類した。さらに positive control として12週齢の C57BL/6 を WT 群として設けた。背部皮膚に直径4mmの皮膚全層欠損創を左右2個作製し、15日間治癒過程の観察と尾静脈採血による血糖値測定を実施した。db/db+エストロゲン塗布群には estradiol benzoate 0.75 µg/g/day を創部塗布、db/db+vehicle 塗布群には sasemi oil を同量創部塗布した。創作製後7、14日目に創部組織を採取し、採取した組織は OCT コンパウンドに包埋後5µmの凍結切片を薄切し、HE染色、抗 Mac-3 抗体免疫染色、抗 Ym1 抗体免疫染色、抗 CD31 抗体免疫染色を実施した。血糖値、創面積比 (各日の創面積 / 創作製時の創面積)、再上皮化率 (新生表皮の長さ / 創部の長さ)、単位面積当たりの新生血管数割合を比較した。また、創作製後14日目に子宮を採取し、湿性重量を測定した。本研究は本学動物実験倫理審査委員会に承認された (AP-163749)。

4. 研究成果

(1) 血糖値の推移 (図1)

WT 群と比べて db/db の3群はいずれも全期間を通して血糖値が有意に高かった ($p < 0.01$)。しかしながら、エストロゲンを投与すると血糖値が徐々に下降していき、創作製後13、14日目に db/db+エストロゲン塗布群は db/db 群及び db/db+vehicle 群と比べて血糖値が有意に低下した ($p < 0.01$)。

(2) 子宮の湿性重量の比較

創作製後14日目に採取した子宮の湿性重量は db/db+エストロゲン塗布群が他の3群と比べて有意に重かった ($p < 0.01$)。

(3) 創面積比の推移 (図2)

db/db 群の創面積比は創作製後5日目まで

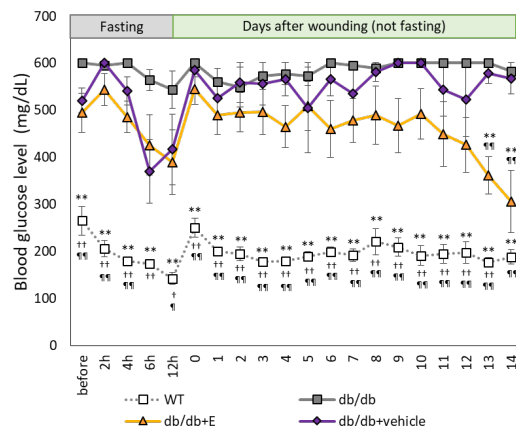


Figure 1. Blood Sugar level

Tukey-Kramer HSD test, ** $p < 0.01$: versus db/db, †† $p < 0.01$, † $p < 0.05$: versus db/db+E and †* $p < 0.01$, * $p < 0.05$: versus db/db+vehicle, $n = 3-6$ each groups, data was mean \pm SEM.

拡大し続け、その後縮小はしたものの、WT 群と比べて創傷製後 3-14 日目で有意に大きかった ($p < 0.05$)。一方、db/db+エストロゲン塗布群は創傷面積比が創傷製後拡大することなく縮小し、創傷製後 14 日目までに癒傷治癒した。db/db+エストロゲン塗布群の創傷面積比は WT 群と比べて創傷製後 1-14 日目において有意に小さく ($p < 0.05$)、db/db 群と比べて創傷製後 3-14 日目において有意に小さかった ($p < 0.01$)。また、db/db+vehicle 群においても創傷面積比は創傷製後拡大することなく縮小し、WT 群と比べて創傷製後 3、5-8 日目において有意に小さく ($p < 0.05$)、db/db 群と比べて創傷製後 3-14 日目において有意に小さかった ($p < 0.05$)。

(4) マクロファージ数当たりの Ym1 陽性細胞数割合の比較 (図 3)

db/db 群のマクロファージ数当たりの Ym1 陽性細胞数は創傷製後 7 日目において有意差はないものの WT 群と比べて少なかった。一方、db/db+エストロゲン塗布群のマクロファージ数当たりの Ym1 陽性細胞数は創傷製後 7 日目において db/db 群と比べて有意に高く ($p < 0.01$)、WT 群及び db/db+vehicle 群と比べても有意に多かった ($p < 0.01$)。

(5) 再上皮化率の比較 (図 4)

db/db 群の再上皮化率は創傷製後 7、14 日目において WT 群と比べて有意に低かった ($p < 0.05$)。一方、db/db+エストロゲン塗布群の再上皮化率は創傷製後 7、14 日目において db/db 群と比べて有意に高かった ($p < 0.05$)。また、db/db+vehicle 群の再上皮化率も創傷製後 7、14 日目において db/db 群と比べて有意に高かった ($p < 0.05$)。

(6) 新生血管数割合の比較 (図 5)

db/db 群の新生血管数割合は創傷製後 7、14 日目において WT 群と比べて有意に低かった ($p < 0.05$)。一方、db/db+エストロゲン塗布群の新生血管数割合は創傷製後 7 日目においては WT 群と比べて有意に低かったが ($p < 0.01$)、創傷製後 14 日目においては db/db 群と比べて有意に高かった ($p < 0.05$)。また、db/db+vehicle 群の新生血管数割合は創傷製後 7 日目においては WT 群と比べて有意に低かったが ($p < 0.01$)、創傷製後 14 日目においては db/db 群と比べて有意に高かった ($p < 0.05$)。

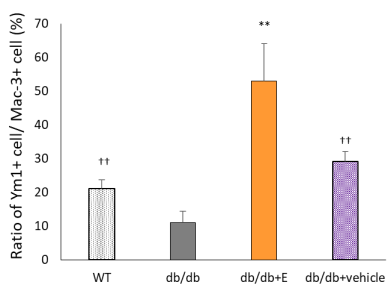


Figure 3. Ratios of Ym1+/Mac-3+
Tukey-Kramer HSD tests, ** $p < 0.01$: vs db/db, †† $p < 0.01$: versus db/db+E, $n = 4-6$, data was mean \pm SEM.

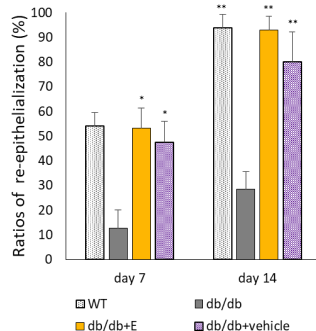


Figure 4. Re-epithelialization
Tukey-Kramer HSD tests, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$: vs db/db, $n = 4-6$, data was mean \pm SEM.

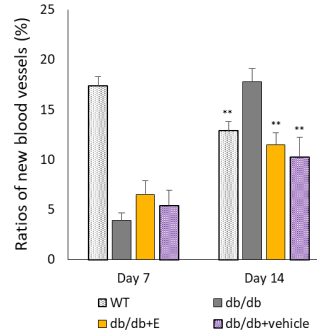


Figure 5. New blood vessels
Tukey-Kramer HSD tests, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$: vs db/db, $n = 4-6$, data was mean \pm SEM.

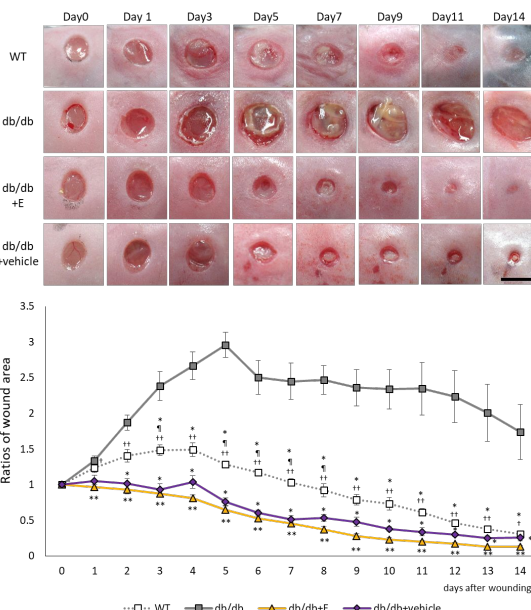


Figure 2. Wound area

Tukey-Kramer HSD test, ** $p < 0.01$: versus db/db, †† $p < 0.01$, † $p < 0.05$: versus db/db+E and * $p < 0.01$, † $p < 0.05$: versus db/db+vehicle, $n = 6-12$ each groups, data was mean \pm SEM.

(7) 結論

以上の結果より、2型糖尿病モデル db/db マウスへのエストロゲン投与により Ym1 陽性細胞数の増加、再上皮化促進、脈管形成促進の効果を示し、皮膚創傷治癒を促すことが明らかとなった。今後はどのようにしてエストロゲン投与によって 2型糖尿病モデル db/db マウスの皮膚創傷治癒が促進するのか、遺伝子レベルでの分析や作用経路の検討などを進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Tamae Urai, Yukari Nakajima, Kanae Mukai, Kimi Asano, Mayumi Okuwa, Junko Sugama, Toshio Nakatani, Does Obesity without Hyperglycemia Delay Wound Healing in an Obese Mouse Model Induced by a High-Fat Diet?, Health, 査読有, 9(12):1660-1679, 2017 (doi: 10.4236/health.2017.912122)

Kanae Mukai, Yukari Nakajima, Tomotaka Nakano, Manami Okuhira, Aya Kasashima, Hanae Nitta, Rina Hayashi, Misaki Yamashita, Tamae Urai, Toshio Nakatani, Safety of venipuncture sites at the cubital fossa as assessed by ultrasonography, Journal of Patient Safety[Epub ahead of print], 査読有, 2017 (doi: 10.1097/PTS.0000000000000441)

Kanae Mukai, Wenjing Zhu, Yukari Nakajima, Masato Kobayashi, Toshio Nakatani, Non-invasive longitudinal monitoring of angiogenesis in a murine full-thickness cutaneous wound healing model using high-resolution three-dimensional ultrasound imaging, Skin Research and Technology, 査読有, 23(4):581-587, 2017 (doi: 10.1111/srt.12374)

向井加奈恵, 山口豪, 大島千佳, 石田陽子, 松田友美, 竹野ゆかり, 荒川満枝, 看護系大学における解剖生理学教育の実態調査、形態・機能、査読有、16(1):8-18, 2017

Kanae Mukai, Emi Komatsu, Misa Yamanishi, Misako Hutakuchi, Kayo Kanzaka, Yuka Uno, Shizuka Yamazaki, Shizuka Kato, Tomomi Yamamoto, Mayumi Hattori, Yukari Nakajima, Tamae Urai, Kimi Asano, Naoko Murakado, Mayumi Okuwa, Toshio Nakatani, Effectiveness of changing the application of Japanese honey to a hydrocolloid dressing in between the inflammatory and proliferative phases on cutaneous wound healing in male mice, Wounds, 査読有, 29(1):1-9, 2017

浦井珠恵, 浅野きみ, 中島由加里, 向井加奈恵, 中谷壽男, 肥満マウスにおける円形皮膚全層欠損創の創形状保持を目的とした板状皮膚保護材使用の有用性、形態・機能、査読有、15(2):57-61, 2017

Emi Komatsu, Yukari Nakajima, Kanae Mukai, Tamae Urai, Kimi Asano, Mayumi Okuwa, Junko Sugama, Toshio Nakatani, Lymph drainage during wound healing in a hindlimb mouse model, Lymphatic Research and Biology, 査読有, 15(1):32-38, 2017 (doi: 10.1089/lrb.2016.0026)

Kanae Mukai, Tamae Urai, Kimi Asano, Yukari Nakajima, Toshio Nakatani, Evaluation of effects of topical estradiol benzoate application on cutaneous wound healing in ovariectomized female mice, PLOS ONE, 査読有, 11(9):e0163560, 2016 (doi: 10.1371/journal.pone.0163560)

Tamae Urai, Haryanto, Kanae Mukai, Tatsuhiko Matsushita, Kimi Asano, Yukari Nakajima, Mayumi Okuwa, Junko Sugama, Toshio Nakatani, The relationship between cutaneous wounds made on obese mice or those with decreased body weight and serum leptin level, Health, 査読有, 8(11), 1015-1028, 2016 (doi: 10.4236/health.2016.811105)

〔学会発表〕(計24件)

中島由加里, 三角筋と中殿筋における安全な筋肉内注射部位の検討: 解剖学的知見に基づいた新たな筋肉内注射部位の提案、第37回日本看護科学学会学術集会、2017

向井加奈恵, 2型糖尿病モデルマウス(db/db)皮膚創傷へのestradiol benzoate創部塗布の効果の検証、第47回日本創傷治癒学会、2017

中島由加里, インドシアニングリーン蛍光造影を用いたマウス下肢リンパドレナージに貢献する新たなリンパ管の同定、第47回日本創傷治癒学会、2017

大貝和裕, 療養型施設入居者を対象とした褥瘡発症と皮膚細菌の関連についての臨床研究、第47回日本創傷治癒学会、2017

向井加奈恵, 適な肘窩の静脈穿刺部位の選定 超音波診断装置による駆血前後の血管面積・深さ・正中神経及び上腕動脈との距離の計測から、第5回看護理工学会学術集会・第11回看護実践学会学術集会・国際リンパ浮腫フレームワーク・ジャパン研究協議会第7回学術集会合同学術集会、2017

長瀬賢史, 高齢者 若年者間における皮膚細菌叢を構成する細菌群の比較、第5回看護理工学会学術集会・第11回看護実践学会学術集会・国際リンパ浮腫フレームワーク・ジャパン研究協議会第7回学術集会合同学術集会、2017

中島由加里, マウス下肢慢性リンパ浮腫モデル作製に向けて、第5回看護理工学会学術集会・第11回看護実践学会学術集会・国際リンパ浮腫フレームワーク・ジャパン研究協議会第7回学術集会合同学術集会、2017

中谷壽男, 超音波診断装置を用いた三角筋での適切な筋注部位と肘窩の皮静脈の目視可能な条件に関する研究、日本解剖学会第77回中部支部学術集会、2017

中島由加里, マウス鼠径リンパ節切除後の下肢皮膚の組織学的特徴、第19回日本褥瘡学会学術集会、2017

向井加奈恵, 肘窩の皮静脈の可視性に与える要因の検討、コ・メディカル形態機能学会第16回学術集会・総会、2017

中島由加里、三角筋部における新たな筋肉内注射部位の確立、コ・メディカル形態機能学会第 16 回学術集会・総会、2017

向井加奈恵、超音波診断装置を用いた肘窩の静脈穿刺を安全に実施するための基礎研究 駆血前後の血管径・深さ・神経及び動脈との位置関係の計測、第 122 回日本解剖学会総会全国学術集会、2017

中島由加里、超音波診断装置を用いた三角筋部の安全な筋肉内注射部位の検討、第 122 回日本解剖学会総会全国学術集会、2017

長瀬賢史、非侵襲的吸着法による新規皮膚細菌叢分布測定法の開発並びに、同法による高齢者、若年者における同細菌叢の相違に関する検討、第 32 回日本環境感染学会総会・学術集会、2017

向井加奈恵、小動物用超音波高解像度イメージングシステム Vevo2100 を用いた血管新生の 3 次元縦断評価方法の検討、第 46 回日本創傷治癒学会、2016

中島由加里、Establishment of a chronic lymphedema model in mice、第 46 回日本創傷治癒学会、2016

山中知子、スモールチェンジシステム搭載型エアマットレス導入前後の褥瘡発生率、発生部位、深達度の比較、第 46 回日本創傷治癒学会、2016

澤崎拓人、甘露蜂蜜のマウス皮膚全層欠損創への効果の検証、第 46 回日本創傷治癒学会、2016

浅野きみ、肥満マウスの皮膚張力による創形状変形回避のためにストーマ補正用皮膚保護材を副子として用いる有用性の検証、第 46 回日本創傷治癒学会、2016

中島由加里、マウス皮膚全層欠損創への蜂蜜塗布の創傷治癒遅延要因の探索、第 46 回日本創傷治癒学会、2016

①向井加奈恵、OVX マウスの皮膚創傷への Estradiol benzoate 創部塗布の効果、コ・メディカル形態機能学会第 15 回学術集会・総会、2016

②向井加奈恵、看護学分野における解剖生理学教育の実態調査、コ・メディカル形態機能学会第 15 回学術集会・総会、2016

③中島由加里、マウス下肢リンパ浮腫モデルにおけるリンパの流れと創傷治癒との関連、コ・メディカル形態機能学会第 15 回学術集会・総会、2016

④長瀬 賢史、寝たきり高齢入院患者と若年健常人における皮膚細菌叢の比較、第 58 回日本老年医学会学術集会、2016

〔その他〕

ホームページ等

所属研究グループのウェブサイト

<http://wmn.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者:該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。