

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17032

研究課題名(和文)慢性炎症性潰瘍に対する新規創傷被覆材の開発

研究課題名(英文)Development of a new wound dressing for chronic inflammatory ulcers

研究代表者

櫻井 洸貴(SAKURAI, Koki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：60772473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性足潰瘍などの創傷治癒遅延は、慢性炎症により皮膚潰瘍が生じることによって引き起こされる。創傷治癒は3つの過程で完了する。1つ目は炎症期、2つ目は増殖期、3つ目は再構築期である。慢性炎症では炎症期が遷延することによって潰瘍が生じていると考えられ、実際そのことを証明する論文も散見される。この中で、マクロファージの影響が強く出ているとの報告もある。研究代表者は糖尿病性皮膚潰瘍に対して糖尿病治療薬であるPPAR アゴニストを徐放し長期局所投与を行うことによって早期に治癒することに関して研究した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性足潰瘍などの創傷治癒遅延は、慢性炎症により皮膚潰瘍が生じることによって引き起こされる。慢性炎症性潰瘍は通院期間も長く経済的な負担も余儀なくされる。慢性炎症では炎症期が遷延することによって潰瘍が生じていると考えられ、実際そのことを証明する論文も散見される中で、マクロファージの影響が強く出ているとの報告もある。研究代表者は糖尿病性皮膚潰瘍に対して糖尿病治療薬であるPPAR アゴニストを徐放し長期局所投与を行うことによって早期に治癒することを証明しその中でマクロファージの影響が強く出ている場合には慢性炎症性潰瘍すべてに作用すると考え研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Delayed wound healing, such as skin ulcers, is caused by chronic inflammation. Wound healing process complete in three steps. The first is the inflammatory phase, the second is the proliferative phase, and the third is the remodeling phase. Chronic inflammation is caused by prolongation of the inflammation stage. There are some reports that the influence of macrophages is strong. The research representative studied the early healing of diabetic skin ulcers by drug delivery system as long-term topical administration of PPAR agonist, which is a drug for treating diabetes.

研究分野：形成外科

キーワード：慢性炎症性潰瘍

1. 研究開始当初の背景

糖尿病・下肢虚血・炎症性皮膚疾患などの慢性炎症は創傷治癒の遅延により皮膚潰瘍を引き起こすことが知られている。創傷治癒の過程として、炎症期、増殖期、再構築期が存在するが慢性炎症に伴う潰瘍では炎症期の遷延により潰瘍が生じていると考えられている。慢性炎症に伴う潰瘍の治療では炎症のコントロールを行うことで増殖期・再構築期を誘導することが重要であると考えられる。マクロファージの Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (以下 PPAR と記載) を Knockout したマウスに皮膚欠損創を作成すると慢性炎症性皮膚潰瘍と同様の経過をたどることが報告された (Chen H Cell Death Dis. 2015 Jan 15;6:e1597.)。マクロファージには In Vitro ではフェノタイプが知られており、クラシックな M1 マクロファージと創傷治癒に関与する M2 マクロファージが存在すると言われている。潰瘍の発症時には M1 マクロファージが多く存在し、PPAR 作用によって M2 マクロファージに分化することによって治癒するが、この機序の欠損によって潰瘍の遷延することが証明されている。研究代表者らの研究では PPAR アゴニストである Pioglitazone をゼラチンハイドロゲルから徐放し、長期局所投与を行い慢性炎症性皮膚潰瘍の早期治癒を促すことに成功し報告してきた。その中でもマクロファージの影響が強く出ていると考えている。さらにこれらの創傷は癒痕化の少ない創傷治癒であることが確認された。本研究では PPAR アゴニストの作用がマクロファージに限局したものか相互的な作用であるか探究し、将来実現可能な創傷被覆材の開発に向けた基礎研究である。

2. 研究の目的

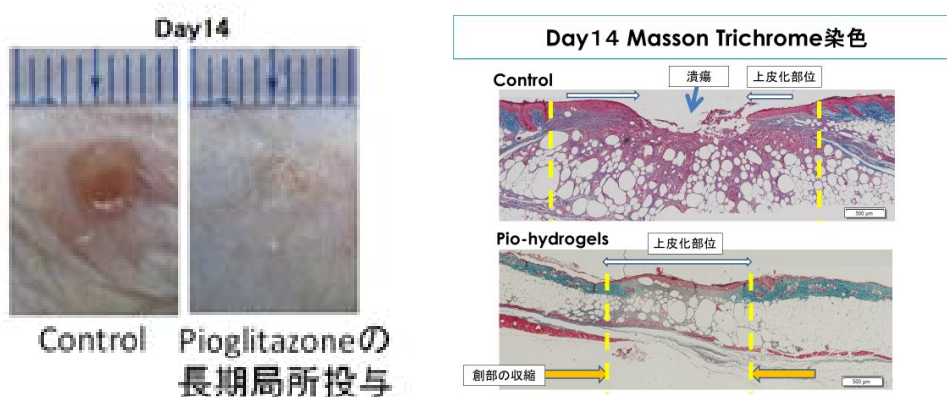
糖尿病性潰瘍は難治性であり、感染の遷延や敗血症性ショックのために下肢切断を余儀なくされる。しかし下肢切断された患者の生命予後は著しく低下するとされており、足首下での切断、膝下での切断、大腿部での切断と血行動態の変化の大きさに応じて生命予後が悪くなる。糖尿病性足潰瘍の温存療法により創部の治癒は行われるが、治療には難渋し、通院回数も増えるため経済的、時間的な負担も大きい。糖尿病性足潰瘍に対して糖尿病治療薬を局所に作用させる目的で、インスリンをガーゼに浸して創部に貼付するインスリンシップを行われた時代もあったが、全身への影響による低血糖のリスクなどがあり現在ではほとんど行われていない。本研究は糖尿病性潰瘍に対して、インスリン抵抗性改善薬を局所徐放させることによって潰瘍を治療させることに始まり、慢性炎症性潰瘍の治療法として将来実現可能な創傷被覆材の開発に向けた基礎研究である。PPAR アゴニストの一つである Pioglitazone はアディポネクチン産生脂肪細胞への分化誘導によるインスリン抵抗性の改善・レプチン産生やマクロファージの Phenotype を M1 から M2 に変化させることによる創傷治癒促進効果、iNOS・TNF \cdot MMP9 阻害による抗炎症作用などが報告されている (Cell Metabolism 6, 137-143, (2007) Cell 123, 993-999, (2005) Experimental Dermatology 19, 12-18, (2009))。PPAR アゴニストの一つである Troglitazone は経口投与で重大な肝障害が報告され販売を中止されている。Pioglitazone においては浮腫・心不全・肝障害・膀胱癌のリスク上昇などが報告されている。これらの副作用を考慮すると糖尿病の足潰瘍には内服による治療よりも局所での作用が期待される。Pioglitazone を長期局所投与するにはゼラチンハイドロゲルを用いた Drug delivery system の一つである徐放が用いられる。徐放を用いた治療は副作用を最大限に抑え薬物の効果を最大限に発揮することが期待される。研究代表者らの研究では PPAR アゴニストである Pioglitazone をゼラチンハイドロゲルから徐放し、長期局所投与を行い糖尿病性皮膚潰瘍の早期治癒を促すことに成功し報告してきた。PPAR アゴニストの創傷治癒機転としてインスリン抵抗性の改善、炎症のコントロール、マクロファージの変化が挙げられるが、研究代表者らはマクロファージの影響が強く出ていると考えている。またこれらの創傷は癒痕化の少ない創傷治癒であることが確認され、癒痕抑制効果が期待できると考えた。本研究では PPAR アゴニストの作用がマクロファージに限局したものか相互的な作用であるかを観察することが目的であり、これらのメカニズム解明は慢性炎症性潰瘍の治療に重要な知見となると考える。

3. 研究の方法

8週令オスの C57BL/6 および C57BLKS/J Iar- +Lepr^{db}/+Lepr^{db} マウスを用い背部皮膚に 8 mm の皮膚全層欠損を作製し、Pioglitazone の単回投与に効果があることを確認する。次に Pioglitazone 長期局所徐放群を用い、コントロールとしては、Pioglitazone を含有していないゼラチンハイドロゲルを使用する。肉眼的・組織学的評価を行う。Pioglitazone 徐放化ゼラチンハイドロゲルが創傷治癒を促進したデータの免疫組織学的な評価を行い、さらに炎症性サイトカインの動態評価を行う。

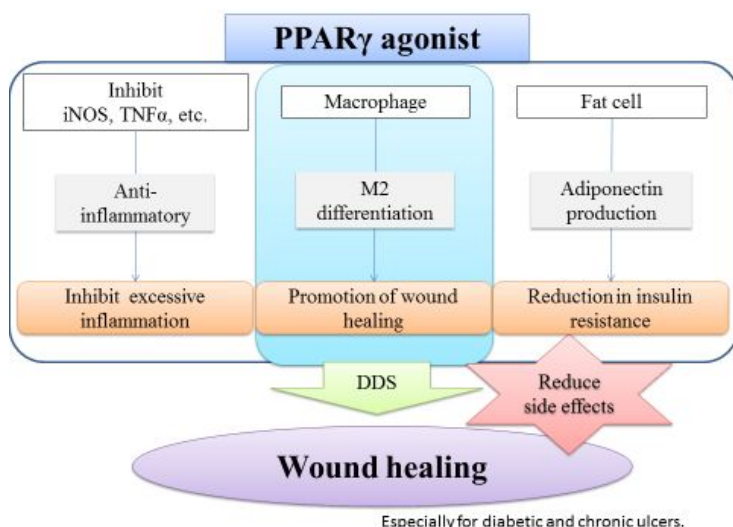
4. 研究成果

糖尿病・下肢虚血・炎症性皮膚疾患などの慢性炎症は創傷治癒の遅延により皮膚潰瘍を引き起こす。糖尿病性潰瘍は難治性であり、感染の遷延や敗血症性ショックのために下肢切断を余儀なくされる。しかし下肢切断された患者の生命予後は著しく低下すると言われており、足首下での切断、膝下での切断、大腿部での切断と血行動態の変化に応じて生命予後が悪くなる。糖尿病性足潰瘍の温存療法により創部の治癒は行われるが、治療には難渋し、通院回数も増えるため経済的、時間的な負担も大きい。これらの多くは炎症が遷延することによっておこる慢性炎症に伴う問題であり、この炎症のコントロールを行うことで創傷治癒過程である、炎症期を終了させ、増殖期・再構築期を誘導することで創傷が治癒すると考えられている。しかしこの炎症の終了はいかに誘導されるのかが疾患によって異なり、このことが治療を難渋させる。今回われわれの着目した糖尿病マウスは難治性潰瘍モデルとして使用される。個体差はあるが、おおむね血糖値が 200 mg/dl 以上を示していた。これらのモデルマウスに対して、PPAR γ アゴニストである Pioglitazone の徐放を用いて長期局所投与することによって早期に創傷治癒することが観察された(図1)。



(図1)

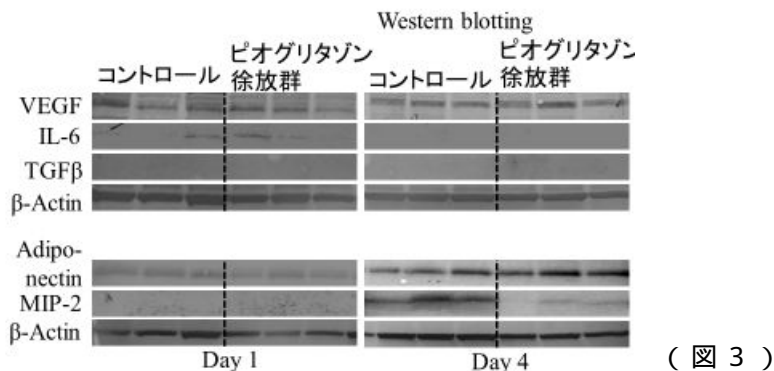
PPAR γ アゴニストの作用機序を考慮すると、3つの創傷治癒機転が働いたと考えられており、1つにアディポネクチン産生脂肪細胞への分化誘導によるインスリン抵抗性の改善とレプチン産生。次にマクロファージの Phenotype を M1 から M2 に変化させることによる創傷治癒促進効果。さらに iNOS・TNF α ・MMP9 阻害による抗炎症作用による改善効果が挙げられる(図2)。これらを副作用少なく最大限に作用させることができた。この中でマクロファージの効果が強いと考えた。



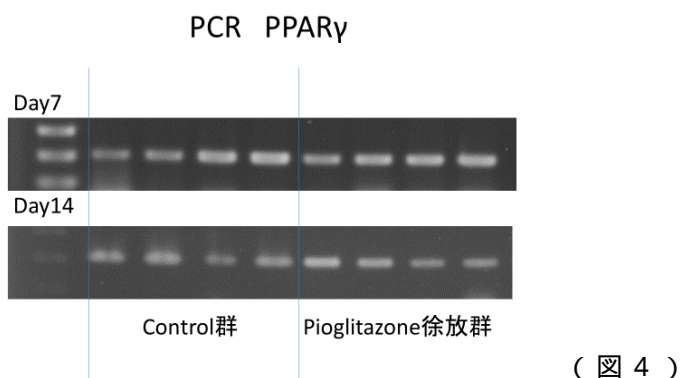
(図2)

(Wound Repair and Regeneration 2016 Jan;24(1):57-64.)

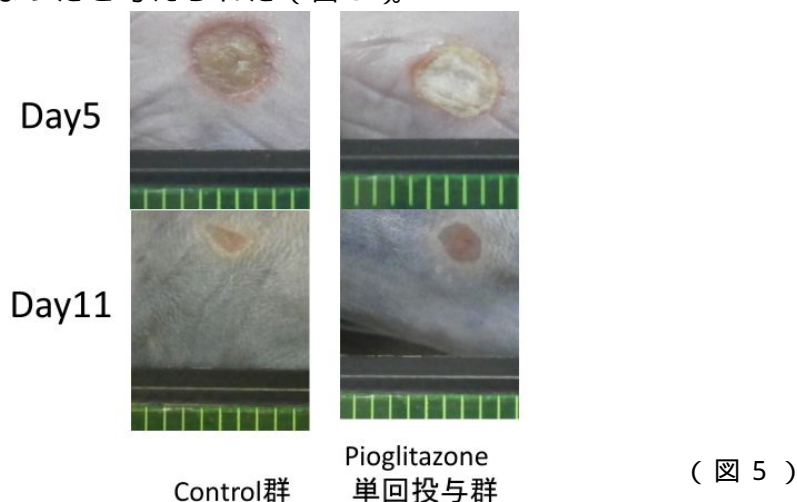
創傷部位での経時的な変化を観察するために行われた Western blotting では創傷治癒作製後 4 日目において、マクロファージの活性化である MIP2 が抑制されており、マクロファージの変化が予想された。(図 3)



PCR において PPAR γ は創傷作製後 7 日目には徐放群で上昇しており、14 日目にはコントロール群と同等程度となっていた。そこで比較的早期に PPAR γ アゴニストが作用していることが考えられた(図 4)。



早期であれば Pioglitazone 単回投与でも効果があると仮定し BL6 マウスで投与を行ったが高濃度のためと脂溶性のため吸収されずに創傷治癒がやや遅延となったと考えられた(図 5)。



マクロファージの変化を観察すべく、免疫染色、フローサイトメトリーも試みたが、生体内では In Vitro の様に明確なフェノタイプには分けることはできなかった。結果として研究代表者の予想していたマクロファージの変化のみではなく、インスリン抵抗性の改善、抗炎症作用などの相互的な作用により創傷治癒の促進に至ったと考える。

5. 主な発表論文等 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。