

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592639

研究課題名(和文) 低出力体外衝撃波を用いた慢性創傷に対する非侵襲性治療法の開発

研究課題名(英文) Low-energy extracorporeal shock wave therapy enhances skin wound healing in diabetic mice: a critical role of endothelial nitric oxide synthase.

研究代表者

今井 啓道 (IMAI, Yoshimichi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80323012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：西欧諸国では糖尿病性足潰瘍や慢性下腿潰瘍に対して低出力体外衝撃波治療が実際に用いられている国があるが、本邦での認可はされていない。糖尿病、重症虚血肢(閉塞性動脈硬化症など)が原因となる動脈性・虚血性潰瘍で血行再建が難しい症例において本法は最後の切り札としての役割も期待できる。動物実験を通じてその血管新生作用が明らかにされた。並行して、臨床応用のために準備を進めてきた。

研究成果の概要(英文)：There is the country where low power outside the body shock wave treatment is really used for for a diabetic foot ulcer and a chronic leg ulcer in the Western European countries, but the authorization in this country is not done. The fundamental law can expect the role as the ace in the hole in the case that revascularizing it has difficult for diabetes, the arterial ischemia-related ulcer caused by the seriously ill ischemic limb (occlusive arteriosclerosis). The vascularization action was clarified through animal experiment. I pushed forward preparations for clinical application in parallel.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：創傷治癒学

キーワード：体外衝撃波治療 慢性創傷 血管新生 創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

創傷治癒過程は、人体が外界からの脅威を防御するうえできわめて重要なプロセスである。創傷治癒過程は大きく、止血・炎症期、増殖期(肉芽形成・創収縮・再上皮化)、組織再構築期の3期に分けられる。炎症期に浸潤してくる好中球やマクロファージなどの免疫細胞は、異物の除去や感染防御作用に加えて、さまざまなサイトカインや細胞成長因子を産生することで創傷治癒を促進させる。一方、糖尿病性潰瘍、褥瘡、膠原病や血管炎症候群に伴う潰瘍など、さまざまな難治性潰瘍が大きな社会問題となっている。難治性潰瘍では免疫細胞が十分に働かないために創の清浄化の遅延、線維芽細胞の増殖遅延、血管新生の遅延が生じる。すなわち炎症期から増殖期への移行が障害されることによって創傷治癒過程は失速する。潰瘍が難治化すると感染症のリスクに常に曝されるばかりでなく、生活の質(QOL)も著しく障害される。難治性潰瘍の治療において、創部への血液供給の改善は重要な因子の一つであり、さまざまな取り組みがなされてきた。

最近の研究によると、結石破碎に用いる出力の約10%程度の低出力体外衝撃波治療は、血管新生および組織の修復を促す効果があると考えられている。体外衝撃波が生体に与える影響は完全には解明されておらず、キャビテーションは生体に対して単に副作用を及ぼすものでなく、そのエネルギー量によって細胞代謝を促進する良好な生物作用があるのかもしれない。欧米諸国では結石破碎治療以外でも、整形外科領域において、テニス肘、足底腱膜炎や偽関節の治療で広く臨床応用されている。本邦においても、研究分担者である伊藤の所属する東北大学大学院医学系研究科循環器内科の下川らは低出力衝撃波をウサギ重症下肢虚血モデルに対して体外衝撃波を照射することで、血管新生因子であるVEGFおよびその受容体であるFlt-1のmRNAの発現増加を認め、衝撃波による血管新生治療の可能性を見出した。西欧諸国では皮膚創傷領域において体外衝撃波治療はすでに臨床応用されておりモレッティらは糖尿病性足潰瘍の患者に体外衝撃波治療を行い、良好な結果が得られたことを症例報告している。しかしながら、体外衝撃波治療は依然、臨床研究が先行しており、創傷に対するその有効性についてはメカニズムがはっきりしておらず、照射エネルギー、照射回数や照射間隔など未だに課題が多くある。

## 2. 研究の目的

低～中エネルギーで体外衝撃波治療を行った場合、生体に与える影響として(1)

血管新生(2)抗炎症作用(3)細胞の代謝促進が知られている。したがって、今回、我々は皮膚領域において体外衝撃波治療の至適エネルギー量を検討するとともに、創傷治癒に与える影響として(1)血管新生(2)抗炎症作用(3)細胞の代謝促進を病理組織学的かつ分子医学的に評価する。具体的には、病理組織学的評価として血管新生や創収縮の程度を検討する。分子医学的評価としては血管新生に関係するサイトカインとしてVEGFの発現やその産生を誘導するeNOSの発現などを調べる。また、創傷治癒に関係する炎症性サイトカインについても調べる。

体外衝撃波において、結石破碎として使用する泌尿器科領域では1～2mJ/m<sup>2</sup>の照射エネルギーが用いられている。一方、偽関節や足底腱膜炎などの治療として使用する整形外科領域では0.2～0.5mJ/m<sup>2</sup>が用いられている。前者を高エネルギーとすると後者は低～中等度のエネルギーに相当する。今回、我々は実際の創正面に対して体外衝撃波照射療法の至適エネルギー量を検討するとともに、最適な被覆方法についても検討を加えたい。なお、動物実験用に開発された体外衝撃波の装置は東北大学と共同開発を行っているスイス、ストルツ社製を用いる。

西欧諸国では糖尿病性足潰瘍や慢性下腿潰瘍に対して体外衝撃波治療が実際に用いられている国があるが、本邦での認可はされていない。糖尿病、重症虚血肢(閉塞性動脈硬化症など)が原因となる動脈性・虚血性潰瘍で血行再建が難しい症例において本法は最後の切り札としての役割も期待できる。動物実験を通じてその血管新生作用が明らかにすると並行して、臨床応用のために準備を進める。研究分担者である伊藤健太は当院循環器内科で重症心筋梗塞患者に対して低出力衝撃波治療を厚生労働省の高度先進医療として開始している(2010年7月1日)。また、循環器内科と当院血管外科で動脈硬化性下肢病変に対する低出力衝撃波治療も開始されている。創部に体外衝撃波を照射するためにはクリアすべきハードルもあるが当大学での臨床例を集約することで、より安全性を高められると考えている。

## 3. 研究の方法

使用する衝撃波発生装置はStorz社製Duolith SD-1である。7～8週齢の成熟雄マウス(C57BL/6J)とeNOSノックアウトマウス(eNOS-KO)を使用した。18時間の絶食後、STZ 150mg/kgマウス(0.15mg/g)投与9日後に血糖値が300mg/dl以上をSTZ誘発糖尿病マウスとし、直径8mmのデルマ

パンチを用いて背側皮膚に、脊柱から離れたところで、潰瘍創を1か所作成した。創作成3日目に、照射は創部に直接行い、創1ヶ所あたり毎秒4発で100発、0.25mJ/mm<sup>2</sup>の強さで一回行った。照射後3、5、7、10日目に安楽死させた後、組織をサンプリングし、組織学的検討および生化学的検討を行った。創床の面積はデジタルカメラで撮影した画像をスキャナーを用いてコンピュータに取り込んだ後、画像解析システム (AxioVision imaging software Release 4.6, Carl Zeiss Micro Imaging Japan, Tokyo, Japan) によって測定した。摘出された検体は4%ホルマリン固定後パラフィン包埋し、光顕用、免疫組織化学用の薄切片(3 $\mu$ m)を作成した。光顕用はヘマトキシリン-エオジン(HE)染色を行い、形態学的に観察し、組織写真を撮影した。肉芽・瘢痕形成の評価として真皮中層の幅(W)および創床中央の真皮の厚さ(H)を用いた<sup>26)</sup>。真皮中層の幅(W)は真皮中層のレベルで創端における毛包間の距離を求めた。免疫組織化学的染色は avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 法に準じて行った。創床における血管新生の評価については、CD31 および CD34 染色標本を用い血管内皮細胞を染色し、創縁および創床における一視野(400倍)あたりの微小血管密度(microvessel density:MVD)を計測した。サイトカインのmRNAの発現確認は、サイトカインの一部を増幅するプライマーを用い、RT-PCR法によって行った。また、ウェスタンブロット法によって発現したサイトカインの蛋白量の測定を行った。

動物実験と並行して、体外衝撃波治療のプロトコールを作成し、臨床応用を考えた。使用する衝撃波発生装置はストルツ社製 Modulith SLC を使用する。Energy flux density 0.005-0.50mJ/m<sup>2</sup>、Frequency 1-5Hz, focal size 2.4mm x 25mm Focal distance 50mm, 超音波内臓で深部組織の描出が可能である。評価期間は原則として照射後8週間とし、早期に癒合した場合にはその時点で終了し、最終評価を行う。介入前の創収縮率と介入後の1週間当たりの平均創収縮率を比較する。モレッティらのデータをもとに通常の皮膚潰瘍面積の平均創収縮率を計算すると1週間当たり4.7%であった。衝撃波治療群の平均創収縮率は8.4%程度であった。このデータをそのまま同一患者の自己対照にあてはめ、脱落率20%として計算するとサンプル数は33人である。

#### 4. 研究成果

本研究では、糖尿病マウスを用いて難治性創傷モデルを作成し、創傷治癒過程における低出力衝撃波治療の影響について解析

を行い、衝撃波が創傷部位における eNOS 及び VEGF の発現を高め、血管新生を促進するとともに、創傷治癒に対する促進効果を示すことを確認した。さらに、衝撃波の創傷治癒促進効果に eNOS が関与するかどうかを検討するために、糖尿病状態の eNOS-KO マウスと WT マウスの皮膚に創傷を作成し、衝撃波の創傷治癒過程に対する促進効果について両群間で比較検討を行った。その結果、eNOS-KO マウスでは、WT マウスに比べて、衝撃波による VEGF の発現の減少と共に、血管新生促進効果の減弱がみられ、さらに衝撃波による創傷治癒促進効果が有意に減弱することが明らかとなった。これらの結果から、衝撃波は、eNOS の発現誘導を介することで、VEGF 発現とともに血管新生を増強し、創傷治癒の促進効果を示すことが明らかになった。eNOS の活性化は、VEGF の発現を誘導するため、血管新生において重要な過程である。

低出力衝撃波治療が創傷部位における eNOS 及び VEGF の発現を高め、血管新生を促進するとともに、創傷治癒に対する促進効果を示すことを確認した。eNOS-KO マウスでは、WT マウスに比べて、低出力衝撃波治療による創傷治癒促進効果が有意に減弱し、VEGF の発現の減少と共に、血管新生促進効果の減弱がみられることが明らかとなった。これらの結果から、低出力衝撃波治療は、eNOS の発現誘導を介することで、VEGF 発現とともに血管新生を増強し、創傷治癒の促進効果を示すことが明らかになった。低出力体外衝撃波治療の創傷治癒促進作用は、eNOS を活性化させることによって血管新生を引き起こすことによりもたらされることを初めて明らかにした。

このように、低出力体外衝撃波治療は創傷に対して血管新生を増強し、創傷治癒を促すと考えられている。近年、創部の血管新生を促して皮膚血流を改善し、創傷治癒を促進する目的として、骨髄細胞移植療法、血管増殖因子局所投与方法が試みられているが、細胞移植では自己の骨髄細胞を採取する侵襲を伴うこと、血管増殖因子を用いた方法では腫瘍の発生や増殖促進の可能性を否定できないこと、繰り返し実施できないことなどの問題がある。また、このような治療で効果的に血管新生が得られないとの報告が多々あり、その原因として遺伝子材料を用いた場合にはその導入効率の低いことや、タンパクを用いた場合には生体内で速やかに分解・除去されてしまうことなどが考えられる。さらには、機能的な側副血行路が発達するためには複数の内因性血管新生因子が必要とされるため、単一の外因性血管新生因子を投与方法ではその効果が制限されてしまうと考えられる。そして、血管新生因子の投与により局所濃

度が高くなりすぎると、浮腫・血管腫・血管傷害後の過度の内膜形成・腫瘍血管新生などの危険が高まる可能性がある。  
一方、低出力体外衝撃波治療は麻酔や侵襲を伴う操作が不要であること、必要ならば繰り返し実施可能であること、副作用が極めて少ないと予想されることや生理学的に複数の内因性血管新生因子の産生を促し血管新生作用を有するなど数多くの優れた利点がある。今後、多岐にわたって臨床への応用が期待される治療手技と思われる。しかしながら、臨床応用は現在4症例のみ実施したが、残念ながらその有用性はまだ実証できていない。

#### 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)

Low-energy extracorporeal shock wave therapy enhances skin wound healing in diabetic mice: a critical role of endothelial nitric oxide synthase.

Denso Hayashi, Kazuyoshi Kawakami, Kenta Ito, Keiko Ishii, Hiromasa Tanno, Yoshimichi Imai, Emi Kanno, Ryoko Maruyama, Hiroaki Shimokawa, and Masahiro Tachi

WRR.2012 Nov-Dec;20(6):887-95. 査読有 doi: 10.1111/j.1524-475X

〔学会発表〕(計 1件)

「STZ 誘発糖尿病モデル慢性皮膚潰瘍に対する低出力体外衝撃波治療の有効性の検討について」 林殿聡, 川上和義, 伊藤健太, 下川宏明, 館正弘 第55回形成外科学会総会、2012年4月12日、東京

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

今井 啓道 (IMAI, Yoshimichi)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80323012

(2)研究分担者

伊藤 健太 (ITOU, Kenta)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50375086

川上 和義 (KAWAKAMI, Kazuyoshi)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究番号：10253973

武田 睦 (TAKEDA, Atsushi)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究番号：30333800

菅野 恵美 (KANNO, Emi)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究番号：10431595

(3)連携研究者

( )

研究者番号：