

氏名(本籍) ないとう れいこ
 内藤 玲子 (福岡県)

学位の種類 博士(医学)

報告番号 甲第1498号

学位授与の日付 平成26年3月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当(課程博士)

学位論文題目

Edaravone, a Free Radical Scavenger, Accelerates Wound Healing in Diabetic Mice

(糖尿病マウスモデルにおけるフリーラディカルスカベンジャー、エダラボンの創傷治癒促進効果)

論文審査委員 (主査)	福岡大学	教授	中山 樹一郎
(副査)	福岡大学	教授	石倉 宏恭
	福岡大学	教授	柳瀬 敏彦
	福岡大学	教授	高木 誠司

【目的】糖尿病患者の増加に伴い、糖尿病に伴う創傷治癒遷延は医学的課題となっている。創傷治癒は細胞、炎症メディエータ、サイトカイン、ホルモン、増殖因子間で厳密に制御された過程である。しかし、糖尿病では血管新生障害をはじめとする様々な原因により創傷治癒遷延が生じる。1型、2糖尿病ともに認められる高血糖は、血管内皮細胞といった高血糖に感受性の高い細胞の細胞内高血糖を導き、さらに細胞高血糖が組織障害を招く。最近、高血糖がミトコンドリアにおける過剰活性酸素産生を引き起こし組織を障害することが示唆された。加えて、糖尿病ではリンパ管新生が減少すること、マクロファージの機能が障害されることが示されている。エダラボンは日本で急性脳梗塞に対してすでに適応されている薬剤である。動物実験では過剰活性酸素を減らし、ウサギで虚血脊髄の eNOS を誘導することが示されている。我々は、特に血管新生に着目して糖尿病モデルマウスにおける、エダラボン塗布の創傷治癒促進効果について調べた。

【対象と方法】 C57/BL6 マウスを STZ 腹膜内投与により高血糖とし、脱毛後、毛周期が telogen のマウス背部正中皮膚を 8 mm biopsyパンチを用いて除いた。プロペト塗布群を control 群として、実験群としてエダラボン(エダラボン 0.03 g/プロペト 0.97 g)を皮膚欠損部に術後 0、4 日目に 10 mg 塗布し創傷治癒過程を術後 0、4、7 日後にカメラを用いて記録した。創傷治癒効果は術後 0 日目に対する該当日の皮膚欠損部減少割合として評価した。術後 7 日目、創部の von Willebrand factor 抗体、LYVE-1 抗体による免疫染色によって、血管新生およびリンパ管新生の評価を行った。エダラボンの酸化ストレスにおける関与を評価するために NO シグナル遺伝子に関するマイクロアレイを行った。さらに血管

新生、リンパ管新生に関する VEGF-A、VEGF-C、SDF-1a、FGF-2 発現を実験群と control 群において比較した。

【結果】実験群では、術後 7 日目に皮膚欠損部の有意な減少がみられた。組織学的に実験群では創辺縁に血管を多く認め、さらに血管は control 群と比較しより欠損部中心寄りにみられた。免疫染色の結果、実験群では lumen を形成する von Willebrand factor 抗体陽性、および LYVE-1 抗体陽性細胞が有意に増加しており、エダラボンの血管新生、リンパ管新生増強効果を認めた。NO シグナル関連遺伝子のマイクロアレイによる検索では、実験群における Nos3 の増加を認めた。実験群で eNOS の mRNA レベル増加を確認し、組織染色では control 群に比べ、腔を形成する eNOS 陽性細胞は多かった。評価を行った、血管新生、リンパ管新生に関わる増殖因子のうち、VEGF-C、SDF-1a、FGF-2 は実験群の有意な増加がみられたが、VEGF-A は実験群の有意な低下を認めた。

【結論】エダラボンは糖尿病マウスにおいて創傷治癒を促進し、血管新生、リンパ管新生を増強した。さらにエダラボン塗布皮膚では eNOS 発現上昇を認めた。糖尿病患者の創傷治癒遷延に対して、エダラボン単純塗布は、簡便な方法という利点をもった、治療オプションとなる可能性がある。

審査の結果の要旨

現在糖尿病患者の増加に伴い、糖尿病合併症のひとつである創傷治癒遷延は臨床における課題となっている。糖尿病における創傷治癒遷延の要因として、血管・リンパ管新生障害が挙げられる。本論文は臨床使用されているエデラボンを、局所塗布するという比較的簡便な方法を用いて、糖尿病マウスモデルにおける創傷治癒促進効果を明らかにした。エデラボン塗布群では、血管・リンパ管が増生していること、また eNOS の発現も増加することが示された。本実験は、糖尿病の創傷遷延において、エデラボンの塗布が治療法として使用される可能性を示唆した。

本研究の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ、主な質疑内容は以下の通りである。

1. 斬新さ

本研究は糖尿病マウスモデルにおいてエデラボン塗布が創傷治癒を促進し、血管・リンパ管を増生させ、eNOS 発現を増加させることを示した点が独創的かつ斬新であると言える。

2. 重要性

本研究はエデラボンという脳保護剤の単純塗布という比較的簡便な方法によって増加傾向にある糖尿病性皮膚潰瘍等の創傷治癒を促進する可能性を示した点で臨床的に重要であると思われる。

3. 実験方法の正確性

本研究では週齢および毛周期を一定に揃え薬剤投与後、血糖測定を複数回行い糖尿病マウスモデル作製の条件を一定にしている（自然発症糖尿病モデルマウスではこの事が困難である）。また、結果は創閉鎖測定法、蛍光免疫染色法、real-time PCR などいずれも確立された方法を用いており、正確性は十分にある。また、結果は対照群をおくことによる的確な比較がなされている。

4. 表現の明確さ

本論文は研究背景、目的、方法を簡潔・明確に記載している。現在、WOUNDS という雑誌に投稿し、minor change 中であり論文表現の明確さも評価されていると思われる。

5. 主な質疑応答

Q1-1: エデラボンの性状は？

A1-1: エデラボンは粉末であり、エデラボン群では投与時にはエデラボン粉末をプロペトに混合し使用した。

Q1-2: エデラポンを塗布以外の方法、例えば i.v.した場合、効果の違いはあるのか？血管内にいれるよりも局所塗布したほうが吸収がよいなどの違いがみられるのか？

A1-2: 塗布以外の方法は検討していない。投与法に塗布を選択した理由は、血管内投与であれば全身投与となるため、副作用も全身性となる可能性が考えられるためである。逆に、局所塗布であれば、全身性の場合よりも高い濃度での投与が可能となり薬剤の効果を幅広く検討できるのではないかと考えた。また、臨床応用を考えた場合、塗布のほうが血管内投与に比較し簡便であると判断し塗布を選んだ。

Q1-3: vWF、LYVE-1 は炎症細胞などには染まらず、脈管に特異的に染まったのか？

A1-3: vWF は管腔構造を伴う細胞に陽性であった。また、LYVE-1 はひしゃげた管腔構造を伴う細胞に陽性であった。管腔構造を伴う細胞の他には、陽性の細胞は認めなかった。vWF、LYVE-1 陽性細胞はいずれも脈管構造を伴っていたことから、vWF、LYVE-1 は脈管特異的に染まったと考えている。

Q1-4: 高血糖による酸化ストレスが血管新生障害に関わるという理由から、STZ を用いた糖尿病マウスを実験に使用しているが、酸化ストレスに関わるモデルであればエデラポンで同じ効果が期待できるのか？

A1-4: 今回は糖尿病を背景とした創傷治癒遷延をテーマとしたため、OKD48 (Keap1-dependent Oxidative stress Detector, No-48). transgenic マウスのような高血糖を導かずに実験可能なモデルでの検討はしておらず、今後、高血糖と限定されない酸化ストレスにおいてもエデラポンに創傷治癒促進効果があるのか検討したい。

また、糖尿病マウスモデルを考えたとき、候補として db/db マウス、NOD マウスなどが挙げられるが、毛周期を揃え、創傷治癒条件を一定にする目的で C57BL/6 マウスに STZ を投与する方法を選択した。

Q1-5: STZ 投与による高血糖誘発はインスリン欠乏によるものである。インスリンが増殖因子であることを考えると、創傷治癒遷延がインスリン欠乏単独によって生じた可能性が 0 ではない。この実験が、血糖特異的に観察されているということを証明するために例えばインスリンを使用して血糖をコントロールした場合の創傷治癒促進効果については検討されたのか？(インスリン+エデラポン、インスリン+プラセボを加えて、この実験結果がインスリン欠乏によらないことを示せばよかったのではないかと加えて、血糖に特異的であることを db/db マウス、ob/ob マウスなどで明らかにできればもっとよいのではないかと？)

A1-5: インスリンを加える実験は行っておらず、db/db や ob/ob マウスでの検討は毛周期との関連で行っていない(A1-4 参照)が今後検討したい。

Q1-6: SDF-1 α も上昇しているがエダラボンは血管形成だけでなく脈管形成にも働いたと考えているのか？

A1-6: エダラボンの局所における効果により SDF-1 α が上昇した可能性を考えており、これは脈管形成を促しえるのではないかと考えている。

Q2-1: エダラボンの濃度に関して、ひとつの濃度でしか検討されていないが、この濃度に決めた経緯は何なのか？

A2-2: 至適濃度を求めるための予備実験は行っていない。これまでシンバスタチンを用いて糖尿病モデルマウスにおいて創傷治癒を検討した論文があり、今回はその論文の濃度算定を参考にして本実験で使用した濃度が妥当であろうと判断し、実験を行った。

Q2-3: エダラボンはスカベンジャーであるため、NOを阻害することが考えられる。本実験結果で、eNOSの発現が上昇していることを考えると今回使用したエダラボンの濃度がスカベンジャーとしての働きをしているかどうか、ということ NOの代謝産物などを測定することによって検討してもよかったのではないかと？

A2-3: 今後検討したい。

Q2-4: VEGF-Aだけが有意に低下していたのはなぜなのか？

A2-4: NOとVEGF-Aは互いに regulate していることが報告されており、VEGF-AによってeNOSが活性化されると、NOが upregulate される。このNOの upregulationはVEGF-Aを upregulate するという報告がある一方で、downregulate するという報告もある。このVEGF-Aに対するNO regulationの違いは、細胞の種類、NO濃度、局所の酸素濃度によるのではないかとこの見方も提唱されており、我々も同様に考察している。従って、今回VEGF-Aが低下していたことは、その他の血管新生因子であるVEGF-C(R2を介し)、SDF-1 α 、FGF-2などが upregulate されており、免疫染色にて確認された血管新生効果に矛盾しないと考えている。

Q3-1: VEGFには様々な種類があると思うが、なぜVEGF-AとVEGF-Cに着目したのか？

A3-1: 血管新生においてはVEGF-Aが、リンパ管新生においてはVEGF-Cが代表的 growth factor であるため、この2つに着目した。

Q3-2: 肉眼的には創傷治癒促進が上皮化よりは創収縮によって生じているようだが、今回調べた血管増生と創収縮や fibroblast などとの関係などは調べたのか？

A3-2: 今後検討したい。特に上皮化を明確に観察するために、創部をリングで囲む実験モデルを追加したい。

Q3-3: 今回使用したマウスは高血糖にしてから実験までの経過が短く、急性期高血糖における創傷治癒をみているようだが、慢性期糖尿病モデルマウスを使ってみたらどうなるのか？

A3-3: 今後検討したいと考えるが、例えば、db/db マウスで同様の実験を行った場合、マウスの個体間で毛周期に差があるため、毛周期による創傷治癒への修飾が考えられ実験条件を統一化できない点に留意が必要である。

Q: 皮膚の layer でいけば、エデラボンはどこに効果があったと考えているか？

A: 血管形成は生理的な部位である真皮で生じており、少なくとも真皮には効果があったのではないかと考えている。

本論文は斬新さと重要性、および的確な質疑への応答により学位論文に値すると評価された。