

学 位 論 文 要 旨

氏 名 沖崎 進一郎



論 文 題 目

「Suppressed recruitment of alternatively activated macrophages reduces
TGF- β 1 and impairs diabetic wound healing」

(糖尿病創傷治癒遅延には選択的活性型マクロファージの集積抑制と TGF- β 1 産生減少が関与する)

指 導 教 授 承 認 印

七里 真美



【背景・目的】

血糖コントロール不良の糖尿病患者では創傷治癒が遅延し治療に難渋する事が多い。創傷治癒にはマクロファージが重要な役割を果たしているが、この創傷マクロファージは M1 型マクロファージ(古典的活性型, classical activation)と M2 型マクロファージ(選択的活性型, alternative activation)に大別される。すなわち M1 型マクロファージは炎症性サイトカインを産生し、組織傷害や炎症を促進し、M2 型マクロファージは炎症の収束や血管新生作用を介して創傷治癒や組織リモデリングを推進する。しかしながら、糖尿病創傷治癒にはどのようなマクロファージが寄与しているのかは不明である。そこで本研究では、糖尿病創傷治癒遅延における M1 型マクロファージ及び M2 型マクロファージの関与について検討し、マクロファージから産生される増殖因子が糖尿病創傷治癒遅延を改善する可能性を探ることを目的とした。

【方法】

(1) ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病マウスと皮膚創傷モデルの作製

実験動物には 8 週齢の野生型マウス (C57BL/6, WT) を用いた。糖尿病は STZ を 100 mg/kg、を腹腔内単回投与することで誘導し、投与 4 週間後の随時血糖値が 400 mg/dl 以上を示したマウスを糖尿病マウス (以下 DM 群) とした。対照には Vehicle であるクエン酸バッファーを投与したマウスを用いた (以下、対照群)。STZ 投与 4 週後に両側背部に 6mm 径の全層皮膚創傷を作成した。

(2) 創傷治癒評価

肉眼的な創部面積を経時的に測定して創傷閉鎖を評価した。組織学的評価は hematoxylin and eosin (H.E) 染色スライドを用いて肉芽組織面積を経時的に測定した。

(3) 創部肉芽組織中の血管新生やマクロファージ集積

(3)-1 創部における血管新生に関する評価

血管新生は創傷治癒に必須であり創部肉芽組織における血管新生と血管新生に寄与する増殖因子 (VEGF-A など) の発現を遺伝子解析 (Real time PCR) や免疫染色で比較検討した。

(3)-2 創傷マクロファージの関与に関する評価

マクロファージの創部肉芽組織への集積を検討するためマクロファージマーカーである CD11b を用いて肉芽組織の免疫染色を行い CD11b 陽性細胞数を比較検討した。

(3)-3 創傷マクロファージの表現型の特定と経時的な変化

肉芽組織へ集積されたマクロファージの表現形式の特定 (M1 型マクロファージマーカー: iNOS など, M2 型マクロファージマーカー: TGF- β など) しその動員内容に違いがあるかを評価するために、まず肉芽組織中の M1 型マーカー (iNOS と IL-6) と M2 型マーカー (TGF- β と Fizz1) の mRNA 発現を Real time PCR を用いて比較検討した。

さらに創傷マクロファージ (CD11b 陽性細胞) が iNOS (M1 型マーカー) や TGF- β (M2 型マーカー) を発現しているかどうか免疫二重染色を行い、二重陽性細胞数をカウントし比較検討した。

(4) TGF- β 投与による糖尿病創傷治癒促進効果

M2 マクロファージが分泌する TGF- β の効果を調べるために、マイクロポンプを用いて recombinant TGF- β を投与して糖尿病創傷治癒が促進するかどうか検討した。評価項目として上記と同様に創部面積の経時的な変化、血管新生作用、マクロファージの表現型の変化を評価した。

【結果・考察】

(1)創傷治癒評価

創傷閉鎖の経時的変化は0日の創傷面積を100%とし、創傷面積の変化の割合を評価した所、対照群よりもDM群でday1からday6までの間の創傷閉鎖が遅延した。また、肉芽組織面積は対照群においてday5で最大となり以降漸減した。DM群では対照群と比較してday3とday5で肉芽組織面積が低く肉芽組織形成が不良であり、創傷治癒が障害されていた。

(2) 創部肉芽組織中の血管新生や、マクロファージに関する評価

(2)-1 創部における血管新生作用

肉芽組織内の血管新生を血管内皮マーカーであるCD31によって染色し、その面積を測定したところ血管面積は対照群に比較して有意にDM群で減少した。PCRでも同様にCD31発現をマーカーとして評価するとDM群で有意に減少した。次に血管新生増殖因子のmRNA発現をPCRで評価したところVEGF、FGF-2、PDGF、 α SMAがDM群で抑制されていた。すなわち、DM群では血管新生に関する増殖因子発現が抑制され、創傷治癒が遅延する可能性が示唆された

(2)-2 創傷マクロファージの関与

マクロファージのマーカーであるCD11bの肉芽組織内の発現ならびに陽性細胞数はDM群で抑制された。また、マクロファージを肉芽組織に走化させるケモカインやその受容体発現をReal time PCRで評価した。CCL2(MCP-1)には差はなかったが、CCL2の受容体であるCCR2発現がDM群で抑制された。DM群では肉芽組織へのマクロファージの集積数が減少したことが創傷治癒遅延と関連する可能性が示唆された。

(2)-3 創傷マクロファージの表現型の特定と経時的な変化

肉芽組織へ集積した創傷マクロファージの表現形式を特定(M1型M ϕ マーカー:iNOSなど、M2型M ϕ マーカー:TGF- β など)しその動員内容に違いがあるかを評価するためiNOSやTGF- β の免疫染色を行い比較検討した。

同様に肉芽組織内のM1型、M2型マクロファージに関したmRNAの発現をReal time PCRを用いて比較検討した。Real time PCRにてM1マーカーであるiNOSやIL6はDM群で有意に高く、M2マーカーであるTGF- β やFizz1は有意に抑制された。免疫組織学的評価としてCD11b細胞マクロファージがM1型マクロファージかM2型マクロファージなのかを評価するためにM1マーカー(iNOS)あるいはM2マーカー(TGF- β)との二重染色をしたところDM群ではiNOS共発現細胞が有意に増加し、TGF- β 共発現細胞が有意に減少した。

これよりDM群で集積マクロファージ数が減少し、マクロファージの表現型としてはM1型マクロファージが増加し、M2型マクロファージが減少していた。

(4) 糖尿病創傷治癒促進効果

上記の結果からDM群でM1型マクロファージが増加しM2型マクロファージTGF- β の減少が創傷治癒に関与していることが示唆されたのでDM群にTGF- β を投与して創傷治癒に及ぼす効果を検討した。

(4)-1 創傷閉鎖の経時的変化

TGF- β 投与群で非投与群と比べ有意な創傷閉鎖促進を認めた。

(4)-2 血管新生に対する効果

血管新生をCD31免疫染色による血管面積で評価するとTGF- β 投与群で増強した。

(4)-3 マクロファージ集積に対する効果

TGF- β 投与による肉芽組織へのマクロファージの集積についても評価すると、M1 型マクロファージは減少し、M2 型マクロファージ数は増加した。

以上の結果から糖尿病マウスにおいてはM2型マクロファージから分泌される TGF β 1が減少していることから、糖尿病マウスに TGF β 1 を投与することで創傷治癒と血管新生が改善した。TGF β 1 の糖尿病創傷遅延を促進する効果にはM1 型とM2 型マクロファージの極性不均衡が是正されることが関与している可能性が考えられた。

【結論】

糖尿病における創傷治癒遅延には集積するマクロファージの減少に加え、 M1 型マクロファージ と M2 型マクロファージの極性不均衡が関係していた。M2 型マクロファージ から分泌される TGF- β 1 投与は糖尿病創傷治癒促進と血管新生を増強する有用な治療的手段となりうる可能性が示唆された。