

原 著

## 糖尿病ラット筋損傷治癒過程における成長因子 mRNA の過剰発現

獨協医科大学 整形外科

今村 直樹

**要 旨** 糖尿病症例の創傷治癒遅延は、臨床的にしばしば経験される。しかし、創傷治癒遅延の原因について検討した報告は少ない。本研究では、糖尿病モデルラットを使用し、筋損傷治癒過程における血管新生に関連する成長因子である vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor 1 (Flt-1), vascular endothelial growth factor receptor 2 (Flk-1), basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ), nerve growth factor (NGF) の mRNA の発現量を経時的に real time RT-PCR法を用いて解析し、糖尿病における創傷治癒遅延の原因を検討した。糖尿病ラットでは、成長因子 VEGF, bFGF, TGF-beta, NGF の産生分泌過剰を生じていること、および VEGF のレセプターの1つである Flt の発現異常を認めた。

本研究から糖尿病群では、新生血管に対する成長因子の mRNA の過剰発現が存在するにもかかわらず、創傷治癒が良好ではないことが判明した。

**Key Words** : 糖尿病, 筋損傷, 血管新生, 成長因子

### 諸 言

日常診療上、糖尿病患者では創傷治癒が遅延することをしばしば経験する。特に下肢に発生する糖尿病性壊疽は難治性であり、切断に至る症例も多い。また下肢を切断しても創の治癒が遅延し、より高位での再切断術を必要とする症例も少なくない。最近、実験的にウサギの急性下肢虚血モデルで vascular endothelial growth factor (VEGF) を局所投与することにより血管新生が認められたとする報告がある<sup>1)</sup>。また慢性閉塞性動脈硬化症による下肢壊疽に VEGF や hepatocyte growth factor (HGF) を局所投与することにより血管新生を促進し、循環障害を改善して下肢切断を免れた症例や、より低位の下肢切断で治癒した症例の報告がある<sup>2)</sup>。しかし糖尿病性壊疽では、VEGF や HGF の局所投与を行っても難治性であり治療成績も良くない<sup>3,4)</sup>。

そこで糖尿病における創傷治癒遅延の病態を解明するには創の修復過程での血管の新生機序を検討する必要があるのではないかと考え、糖尿病モデルラットを使用し、

筋損傷治癒過程における血管新生に関わる各種の成長因子を経時的に分子生物学的に検討した。

### 材料と方法

10週齢雄の Sprague-Dawley ラット (SD ラット : Charles-River 社, 横浜) (対照群) と糖尿病モデルラット (GK ラット : Charles-River 社) (糖尿病群) を使用した。実験を実施するあたり獨協医科大学動物実験委員会の実験許可を得た (実験番号 0138)。

筋損傷モデルの作成は、Menetrey らの報告<sup>5)</sup> に従った。すなわち腹腔内麻酔 (ペントバルビタール 0.5 ml/kg) 下に、ラット左下腿の外側腓腹筋に対して筋中央横軸方向に筋幅の 75%, 筋の厚さに対して 50% の切創を手術用メスで作成したうえで、皮膚縫合した。対照群、糖尿病群ともに、ゲージ内で飼育した。糖尿病群には、糖尿病ラット専用の餌 (Charles-River 社製) を与えた。0, 24, 48, 72, 96, 120, 168 (1週間), 336 (2週間) 時間毎に各群のラット (N=6) にペントバルビタール (0.5 ml/kg) を腹腔内投与し屠殺した。屠殺時に体重および静脈血の血糖値を測定した。

切創を作成した外側腓腹筋を無菌的に摘出し組織を細切した後、組織容量あたり 5 倍量の RNA later (TAKARABIO 社 : 東京) に浸潤した。4℃ のフリーザ

平成 15 年 12 月 3 日受付, 平成 15 年 12 月 18 日受理

別刷請求先 : 今村直樹

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880

獨協医科大学 整形外科

表1 成長因子のプライマー配列

GAPDH	Forward : 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3' Reverse : 5'-GGATGCAGGGATGATGTTC-3'
VEGF	Forward : 5'-GGTCTCAATTCGGCAAT-3' Reverse : 5'-TACCTCCACCATGCCAAGTG-3'
Flt	Forward : 5'-CGAGTAGCCATGCACCGAAT-3' Reverse : 5'-CGGCTGTCCATGAAAGTGAA-3'
Flk	Forward : 5'-TTGCAAACCTGGTGTGAGTGATTC-3' Reverse : 5'-AACCGAGCGGGAGAGTATGTC-3'
b-FGF	Forward : 5'-GGATCCCAAGCGGCTCTACT-3' Reverse : 5'-CACTCCCTTGATGGACACAACCTC-3'
IGF-1	Forward : 5'-AGATGTACTGTGCTCCGCTGAA-3' Reverse : 5'-TCTGTAGGTCTTGTTCCTGCACCTT-3'
TGF-beta	Forward : 5'-TGCCCCTGCTGTACCTTCATAC-3' Reverse : 5'-TTCTGATCACCCTGGCATATGT-3'
NGF	Forward : 5'-AGCGCTTTCATCCTCAAGG-3' Reverse : 5'-CGTTATTCAGAGCGATGTCAGAA-3'

ー内で24時間浸漬した後、 $-200^{\circ}\text{C}$ の液体窒素内にRNA抽出まで保存した。摘出後RNA later内に保存していたサンプルに対して、組織容量の10倍量のEasy Prep RNA (TAKARABIO社)に浸漬し、ホモジェナイザー(HMX-2000: TOYOBO社, 東京)を使用し、10分間ホモゲナイズした。ホモゲナイズしたサンプルを室温で5分静置後、開始容量の0.2倍量のクロロホルムを添加しさらに20秒混合し、その後、室温で10分間静置した。次に $4^{\circ}\text{C}$  15000 rpmで15分間遠心分離した後、上層の水層を約100  $\mu\text{l}$ 採取し、開始容量と等量のイソプロパノールを加え、 $4^{\circ}\text{C}$  15000 rpmで15分間遠心分離を実施した。上清を捨てて、RNA検体に開始容量と等量の75%冷エタノールを加え、 $4^{\circ}\text{C}$  15000 rpmで15分間遠心分離した。上清を捨てて、沈殿したRNAを10分間室温で風乾した。得られたRNAの純度を、A 260/A 280の比率で求めた。その比率が1.7~2.1の範囲に入ったサンプルのみを高品質のtotal RNAが採取できたサンプルとして使用した。Taq Man Reverse Transcription Regents (Applied Biosystems社, 東京)を使用し、total RNAをcDNAに逆転写した。200 ngのRNAを用いて100  $\mu\text{l}$ の溶液中で逆転写した。切断酵素は、Random Hexamerを5.0  $\mu\text{l}$ 使用し、逆転写の条件は、 $25^{\circ}\text{C}$  10分、 $48^{\circ}\text{C}$  30分、 $95^{\circ}\text{C}$  5分とした。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を内源性コントロールした。

血管新生にかかわる成長因子およびその受容体として、血管新生因子は、VEGFとその受容体vascular endothelial growth factor receptor 1 (Flt-1), vascular endothelial growth factor receptor 2 (Flk-1), 血管周囲の間質組織の再生因子として、basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1),

transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )を検討した。さらに血管新生と共に併走する神経再生の指標となる神経栄養因子としてのnerve growth factor (NGF)を検討した。

各々の成長因子のmRNAの発現量をreal time RT-PCR法を用いて測定し検討した。

VEGF, Flt-1, Flk-1, bFGF, IGF-1, TGF-beta, NGFに対する特有のプライマーを選択し使用した。プライマーは、Gen Bankからラットの遺伝子を選択し、Primar express (Applied Biosystems社)を使用し、配列を決定した(表1)。

cDNAサンプル2.5  $\mu\text{l}$ にSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems社) 12.5  $\mu\text{l}$ と各々のgrowth factorおよびその受容体のプライマー0.5  $\mu\text{mol}$ を用いて、ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems社: 東京)にてreal time RT-PCR法によりサンプル内のRNAの定量測定を実施した。定量測定の条件は、 $95^{\circ}\text{C}$  15秒、 $60^{\circ}\text{C}$  1分40サイクルとした。

また、実験は1回実施し、同一サンプルをreal time RT-PCRにて3重測定した。

real time RT-PCRが適切に行われているか、real time RT-PCR産物をアガロースゲル泳動し確認した(図1)。

real time RT-PCR法にて得られたデータは、対照群のラット手術前の検体のGAPDHの測定値を基準として、各々の成長因子およびその受容体の値との比をデルタデルタ法を用いて相対的に算出し値を比較検討した<sup>6) 7) 8)</sup>。具体例としては、対照群の手術前のGAPDHの測定値を $Cg_0$ とし、目的とする成長因子の測定値を $Cta_0$ とすると、 $\Delta Ct_0 = Cta_0 - Cg_0$ となる。次に各時間のGAPDHの値を $Cg_x$ とし、成長因子の値を $Cta_x$ とすると

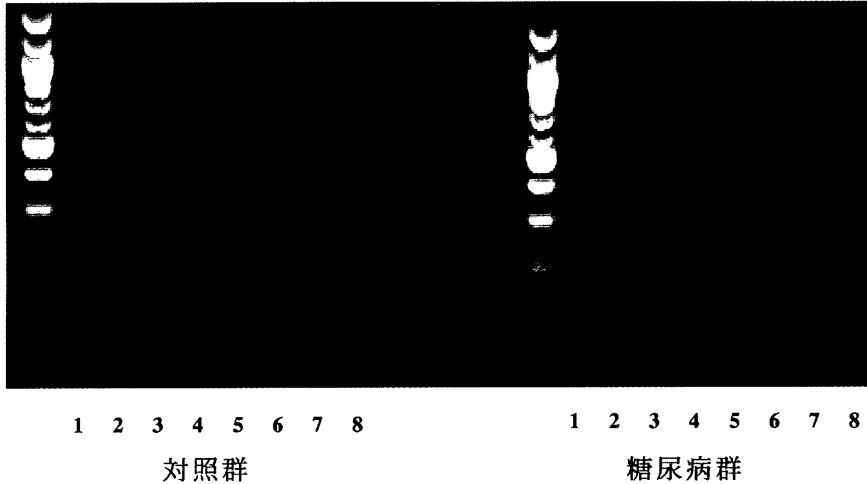


図1 Real time RT-PCR産物のアガロースゲル泳動  
各々1種のパンドを認める.

1. GAPDH 2. VEGF 3. Flt 4. Flk 5. bFGF 6. IGF-1 7. TGF-beta 8. NGF

表2 対照群ラットと糖尿病群ラットの体重, 血糖値

	対照群	糖尿病群	
	SD rat	GK rat	
week	10 week (n = 6)	10 week (n = 6)	
gender	male	male	
body weight (g)			
0 hr	362.0 ± 13.51	320.4 ± 10.50	*
24 hr	351.0 ± 20.33	307.8 ± 7.50	*
48 hr	337.8 ± 23.48	296.8 ± 7.95	*
72 hr	344.2 ± 16.65	333.6 ± 13.45	
96 hr	379.0 ± 11.94	318.4 ± 17.57	*
120 hr	405.0 ± 28.06	309.2 ± 11.37	*
168 hr	372.3 ± 2.13	310.7 ± 8.92	*
336 hr	435.7 ± 13.28	319.3 ± 9.35	*
blood glucose (mg/dl)			
0 hr	123.0 ± 17.15	188.0 ± 37.73	*
24 hr	123.6 ± 23.73	163.6 ± 21.63	
48 hr	113.8 ± 9.96	211.0 ± 20.09	*
72 hr	141.2 ± 7.73	258.8 ± 25.35	*
96 hr	129.0 ± 21.07	255.4 ± 16.64	*
120 hr	103.2 ± 16.45	258.8 ± 34.67	*
168 hr	115.5 ± 7.26	236.3 ± 13.57	*
336 hr	109.5 ± 16.89	205.6 ± 12.74	*

\* : p < 0.05

同様に  $\Delta Ct_x = Ct_{a_x} - Cg_x$  となる.  $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_x - \Delta Ct_0$  より得られた値に対して,  $2^{-\Delta \Delta Ct}$  の解が解析に使用する値となる.

統計処理は, t検定を用いて検討し,  $p < 0.05$  を有意差ありとした.

### 結 果

1. 体重について: 糖尿病群の体重値は, 対照群の体

重値と比較して低値であり, 術後72時間の値を除き全てに有意差 ( $p < 0.05$ ) を認めた (表2).

2. 血糖値について: 糖尿病群の血糖値は, 対照群の血糖値と比較して高値であり, 術後24時間の値を除き全てに有意差 ( $p < 0.05$ ) を認めた (表2).

3. 創部の肉眼的観察: 糖尿病群では処置後120時間でも, 手術創は開離しており筋組織の表面は痂皮化し, さらに筋肉組織には癒合不全を認め創傷治癒遅延と判断

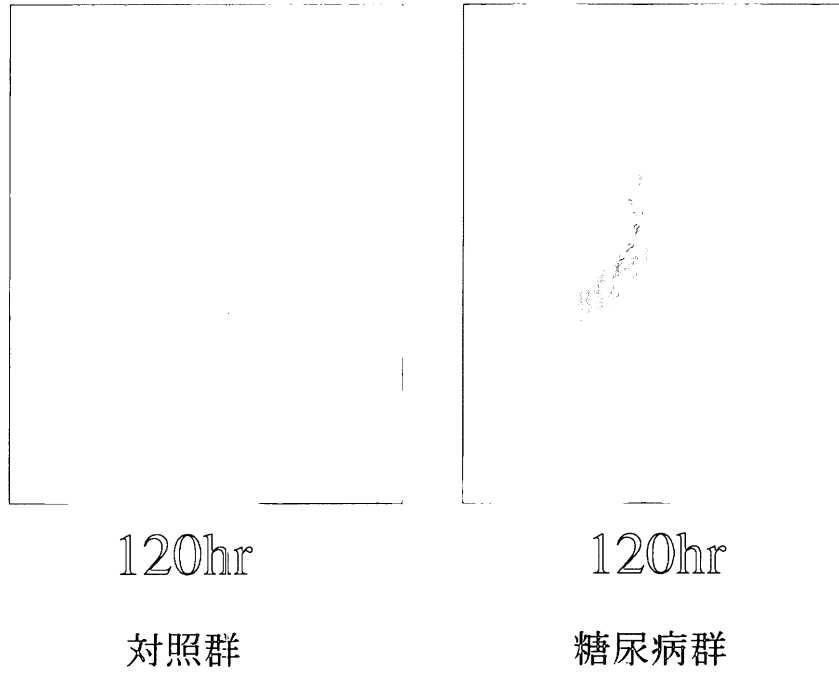


図2 対照群と糖尿病群の損傷左下腿外側腓腹筋肉眼的所見  
 対照群では、術後120時間で筋組織の良好な修復を認める。

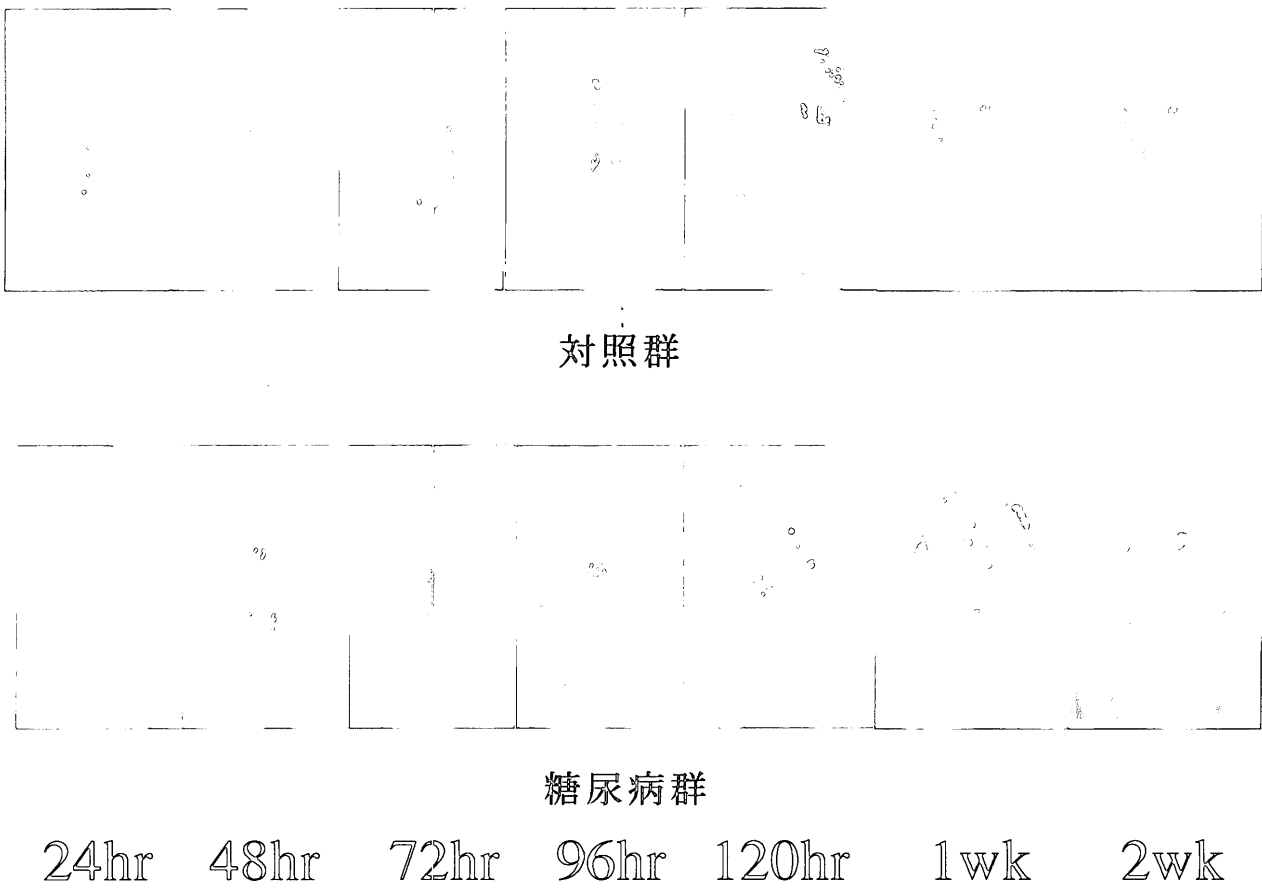


図3 対照群と糖尿病群の左下腿創部の肉眼的所見  
 対照群では、術後120時間で創部の開離を認めない。糖尿病群では、術後120時間で創部の開離および皮下の露出組織の痂皮化を認める。

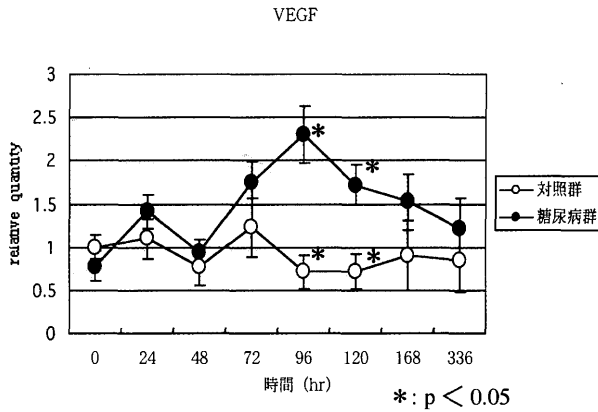


図4 対照群, 糖尿病群 VEGF mRNA の発現量  
術後96, 120時間において, 糖尿病群の値は高値であり有意差を認める.

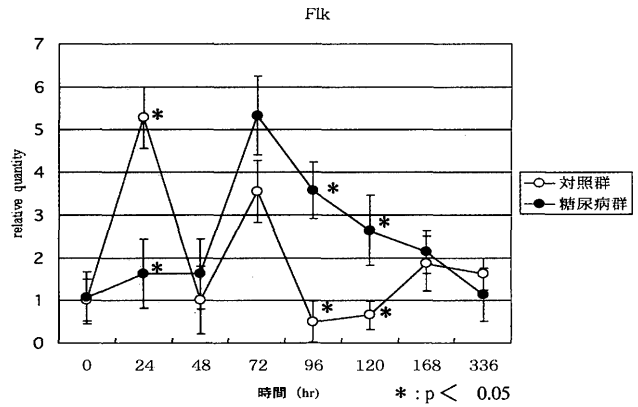


図6 対照群, 糖尿病群 Flk mRNA の発現量  
術後24時間において, 対照群の値は高値であり有意差を認める. 術後96, 120時間において, 糖尿病群の値は高値であり有意差を認める.

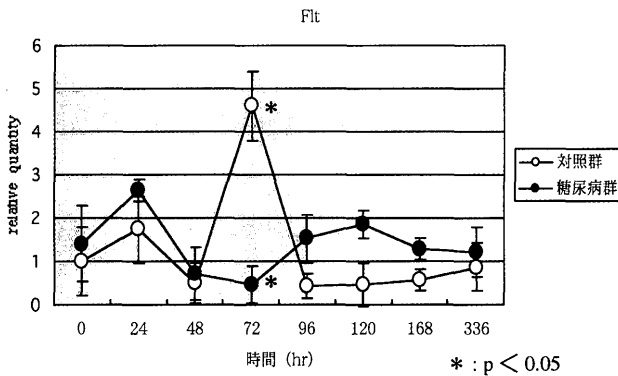


図5 対照群, 糖尿病群 Flt mRNA の発現量  
術後72時間において, 対照群の値は高値であり有意差を認める.

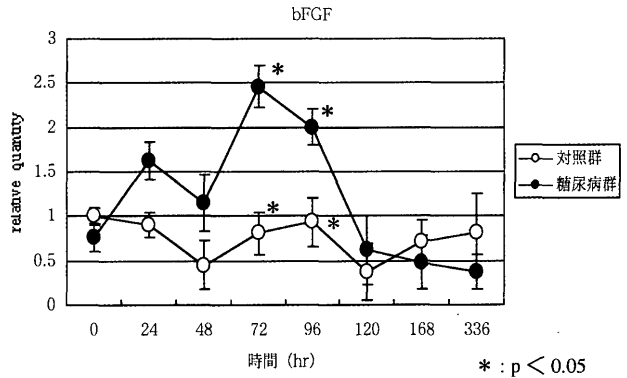


図7 対照群, 糖尿病群 bFGF mRNA の発現量  
術後72, 96時間において, 糖尿病群の値は高値であり有意差を認める.

した. 対して対照群では処置してから120時間後には, 手術創は閉鎖し, 損傷筋肉の癒合の状態も良好であり, その後の経過でも開離を認めず治癒した (図2, 3).

4. VEGF の mRNA 発現量: 糖尿病群における96時間値, 120時間値は  $2.30 \pm 0.33$ ,  $1.72 \pm 0.23$  であり, 対照群における各々  $0.71 \pm 0.20$ ,  $0.72 \pm 0.20$  と比較し高値であり有意差 ( $p < 0.05$ ) を認めた. また, 最高値は, 対照群で72時間値  $1.23 \pm 0.34$ , 糖尿病群で96時間値  $2.30 \pm 0.33$  であった. 術後96, 120時間値を除いた群間の値には, 有意差を認めなかった (図4).

5. Flt の mRNA 発現量: 値群の72時間値は  $0.27 \pm 0.44$  であり, 対照群の  $4.59 \pm 0.81$  と比較し低値であり有意差 ( $p < 0.05$ ) を認めた. また, 糖尿病群では, 72時間値で最低値となったが, 120時間まで値は上昇した. 術後72時間値を除いて群間の値には, 有意差を認めなかった (図5).

6. Flk の mRNA 発現量: 糖尿病群の24時間値は

$1.62 \pm 0.44$  であり, 対照群の  $5.28 \pm 0.72$  と比較し低値であり有意差 ( $p < 0.05$ ) を認めた. さらに, 糖尿病群の96時間値, 120時間値は  $3.58 \pm 0.66$ ,  $2.64 \pm 0.83$  であり, 対照群の  $0.50 \pm 0.48$ ,  $0.66 \pm 0.33$  と比較し高値であり有意差 ( $p < 0.05$ ) を認めた. 術後24, 96, 120時間値を除いて群間の値には, 有意差を認めなかった (図6).

7. bFGF の mRNA 発現量: 糖尿病群の72時間値, 96時間値は  $2.46 \pm 0.24$ ,  $2.0 \pm 0.20$  であり, 対照群の  $0.81 \pm 0.24$ ,  $0.93 \pm 0.27$  と比較し高値であり有意差 ( $p < 0.05$ ) を認めた. 術後72, 96時間値を除いて群間の値には, 有意差を認めなかった (図7).

8. IGF-1 の mRNA 発現量: 糖尿病群の72時間値は  $2.66 \pm 0.6$  であり, 対照群の  $1.62 \pm 0.62$  と比較し高値であり有意差 ( $p < 0.05$ ) を認めた. また糖尿病群の168時間値  $0.47 \pm 0.34$  は, 対照群の  $1.35 \pm 0.67$  より低値であり有意差を認めた. 術後, 72, 168時間値を除いて群

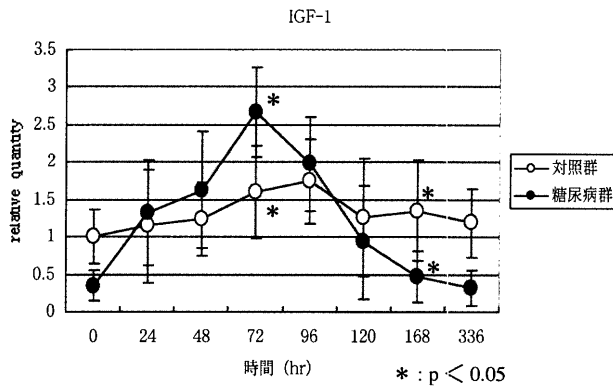


図8 対照群, 糖尿病群 IGF-1 mRNA の発現量  
術後72時間において, 糖尿病群の値は高値であり有意差を認める. 術後168時間において, 対照群の値は高値であり有意差を認める.

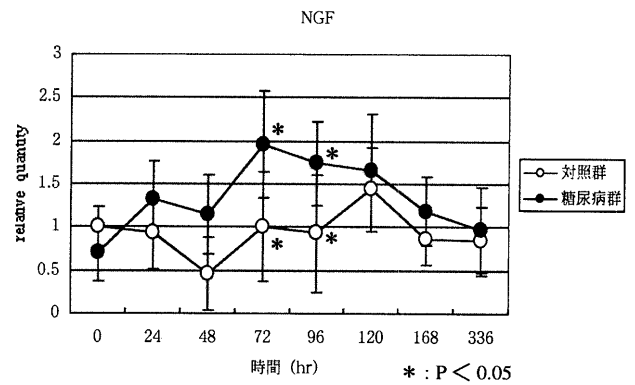


図10 対照群, 糖尿病群 NGF mRNA の発現量  
術後72, 96時間において, 糖尿病群の値は高値であり有意差を認める.

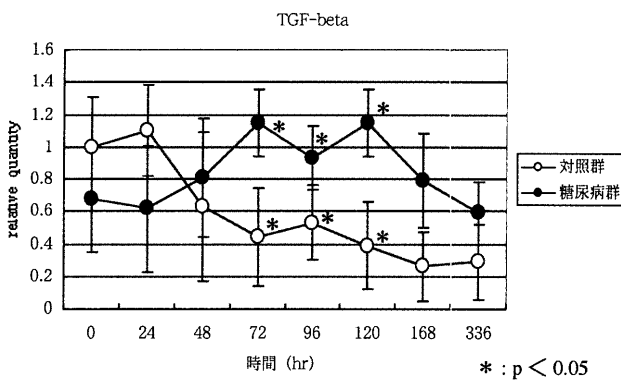


図9 対照群, 糖尿病群 TGF-beta mRNA の発現量  
術後72, 96, 120時間において, 糖尿病群の値は高値であり有意差を認める.

間の値には, 有意差を認めなかった (図8).

9. TGF-beta の mRNA 発現量: 糖尿病群の72時間値, 96時間値, 120時間値は  $1.15 \pm 0.21$ ,  $0.93 \pm 0.20$ ,  $1.15 \pm 0.21$  であり, 対照群の各々の値  $0.44 \pm 0.30$ ,  $0.53 \pm 0.23$ ,  $0.39 \pm 0.27$  と比較し高値であり有意差 ( $p < 0.05$ ) を認めた. 術後72, 96, 120時間値を除いて群間の値には, 有意差を認めなかった (図9).

10. NGF の mRNA 発現量: 糖尿病群の72時間値, 96時間値は  $1.96 \pm 0.62$ ,  $1.70 \pm 0.48$  であり, 対照群の  $1.01 \pm 0.64$ ,  $0.93 \pm 0.68$  と比較し高値であり有意差 ( $p < 0.05$ ) を認めた. 術後72, 96時間値を除いて群間の値には, 有意差を認めなかった (図10).

## 考 察

耐糖能障害を有する患者の手術の際には, 異化作用の亢進やインスリン抵抗性が顕著となり, 血糖値の上昇を招くことは, Giddings<sup>9)</sup> らにより報告され, 現在では周知の事実である. 本研究において, 対照群では, 術後血

糖値の上昇を認めないが, 糖尿病群の血糖値は, 術後120時間を最高値として上昇しており, ヒトにおける術後血糖値の変動<sup>9)</sup> に相似している.

対照群ラットの体重は, 10週齢から12週齢の2週間で約60gの体重増加があり, 同週齢の糖尿病ラットでは, 約30gの体重増加を認める<sup>10)</sup>. しかし本研究において, 糖尿病群では, 術後の体重増加を認めなかった. 術後血糖値の上昇により異化作用が亢進し, 糖尿病群で体重が増加しなかったものと推察される.

創の治癒過程を観察するには, 皮膚における観察が適切と考えられる. しかし, ラットの場合, 皮膚表面では体毛の発育が盛んであり数日間で剃毛した体毛が発育し, 実験に対して汚染因子ならびに mRNA の破壊因子<sup>11, 12)</sup> となることと, 創部をラット自身が触ることより, 正常の創治癒過程を観察するには不適切ではないかと考え, 代わりに筋組織を選択した.

一般に軟部組織損傷は, 血管, 神経, 間質組織によって修復され筋損傷部も例外ではない. 何れも単独に修復される訳ではなく, お互いに密接に関連し, 損傷組織の修復が行われる<sup>5)</sup>.

創傷治癒過程の早期の段階では, 損傷部には, 血液, 組織液の浸出および白血球こと好中球の組織に対する浸潤を認め, マクロファージにより壊死組織は清掃される. その後, 修復過程となり線維芽細胞の増殖, 血管新生, 肉芽形成が生じる. 従って創傷治癒過程の開始時には炎症性サイトカインの反応がみられ<sup>13) 14) 15) 16)</sup>, 次いで組織修復のための各種成長因子が関与する反応が続く. 近年, 血管新生, 間質組織, 神経再生の修復における成長因子の作用についての研究結果が報告されている<sup>17) 18) 19) 20)</sup>. しかし, 経時的に成長因子の動態を研究した報告はない.

糖尿病患者の創治癒は, 遅延したり治り難いことは臨

床経過中よく遭遇することであり、この現象の原因の一つに血管新生の障害が考えられる。そこで創修復過程の血管新生について解明することが、今後の糖尿病患者の創治癒の機序を理解する上で、また治療を効果的に行う上で欠くことのできない必須事項と考えて本研究を行った。

創傷治癒過程における血管新生に関する成長因子としては、VEGFとその受容体Flt、Flkが重要な役割を果たしている<sup>21, 22)</sup>。VEGFは、血管周囲の細胞から産生、分泌され血管内皮細胞に直接作用し、血管内皮細胞を特異的に増殖させ、血管透過性を亢進させる作用を有する<sup>23)</sup>。VEGFの受容体であるFltは主に静脈形成を促進することに係わり<sup>24)</sup>、Flkは、リンパ管形成を促進することに係わる<sup>25)</sup>。

bFGFは、組織中の様々な細胞から分泌され、上皮細胞や線維芽細胞に作用し様々な効果を有しているが、特に血管に関しては血管内皮細胞の活性化、増殖および遊走、管腔形成に促進作用を有する<sup>26, 27)</sup>。

IGF-1は、肝臓で産生され、新生した血管の周皮細胞の形質維持および血管形成に必要な唯一の成長因子である<sup>28, 29)</sup>。

TGF-betaは、生体内の組織中のほとんど全ての細胞で産生、分泌され、多様な作用を有しているが、血管では血管内皮細胞と血管平滑細胞、周皮細胞に対してその増殖の促進あるいは抑制に関与し<sup>30, 31)</sup>、血管周囲の細胞外基質の産生促進に関与している<sup>32, 33)</sup>。

NGFは、神経周囲の細胞から産生分泌される神経栄養因子の1つであり、神経の再生を促進する作用を有し、損傷組織治癒過程では新生血管に併走する神経の再生を促進する作用があると考えられる<sup>34)</sup>。

正常組織では、血管新生はその促進因子と抑制因子のバランスにより調節されており、通常、抑制因子が優位に作動しているため血管新生は生じないものと考えられており、組織が損傷を受けた際、促進因子と抑制因子のバランスが崩れ、血管新生促進因子が優位となり組織損傷部に血管新生が生じるものと考えられている<sup>35)</sup>。

今回の実験結果によると、VEGF値では、対照群と比較して糖尿病群では、受傷後96、120時間値が、高値であり有意差を認めた。この結果は、糖尿病群では、筋損傷組織修復に、対照群より多量のVEGFを必要とすることを示唆している。

Fltでは、対照群においてはVEGF値が上昇を開始した術後72時間で最高値を示している。しかし糖尿病群では、術後72時間のFlt値の上昇を認めない。この結果は、糖尿病群では、VEGF値上昇に対するFltの発現の障害の存在が示唆される。

Flkでは、対照群では術後24時間値と72時間値で上昇するが、その他の時間では値の上昇を認めない。しかし糖尿病群では、術後24時間値の上昇を認めないことに加え、術後72時間で最高値に達し120時間を経過しても、Flk値は高値を保持している。経時的FltのmRNAの発現量の動態は、糖尿病群での、VEGFの経時的なmRNAの発現量の動態と一致しており、FlkのmRNAの発現は正常に行われていることを示している。

以上の如く糖尿病群では、VEGF受容体の1つであるFltに発現異常を認めたが、今回の研究からは、受容体の発現量を比較しているにすぎず、各々の受容体機能活性については明らかではないので、発現異常や機能活性の詳細については、今後の検討課題である。

bFGFでは、糖尿病群では、対照群と比較して筋損傷治癒過程において72時間後と96時間後にbFGFを多量に必要とすることが示唆された。

IGF-1は、糖尿病群での術後72時間の値は、正常群の値より有意差を持って高値である。本研究結果からは、IGF-1の主な産生場所は肝臓であるが、少なくとも肝臓以外の局所で産生される可能性があることが示唆された。また、血管形成に関与するIGF-1が、肝臓産生IGF-1であるか、局所産生IGF-1であるかは、本研究結果からは明らかではない。今後の研究課題として挙げられる。

TGF-betaでは、VEGFのmRNAの組織内の発現が上昇する術後72時間から120時間までに、対照群のTGF-betaのmRNAの組織内発現量は、低下しているにもかかわらず、糖尿病群では、低下することはなかった。

NGFでは、対照群では、術後72時間より上昇し、VEGFの発現の増加とともに、術後120時間で最高値となった。糖尿病群では、VEGFの発現の増加とともに術後72、96時間において対照群と比較し高値を認めた。

以上の如く、糖尿病群では、損傷組織内の血管内皮細胞、周皮細胞、平滑筋細胞、間質組織および血管に併走する神経再生において、血管新生関連の成長因子のmRNAの発現量は、術後72時間で同時に増加していた。また、損傷筋組織の修復過程には、血管新生関連の成長因子を、多量に必要とすることが示された。

成長因子のTGF-betaは、培養線維芽細胞にTGF-betaを作用させるとVEGFの産生増加がおこることが報告<sup>36)</sup>されている。また、TGF-betaは、bFGFの活性を制御していることの報告<sup>37)</sup>もある。本研究における糖尿病群においても、TGF-betaの発現量の増加とともに、VEGFとbFGFのmRNA発現量の増加が同時期に生じており、VEGFとbFGFのmRNAの発現に影響を及ぼしている可能性を示唆している。また他の成長因子の反応も

同時期に出現することから、TGF- $\beta$ は他の成長因子に関しても影響を及ぼしている可能性もある。

このことはまた、損傷筋組織の血管新生では、血管内皮細胞ばかりでなく、血管周囲細胞外基質形成および血管伴走神経の発育に成長因子が相互に作用を及ぼしている可能性も示唆している。

本研究では、各々の成長因子における抑制因子についての検討を実施していないこと、VEGFでは受容体の発現異常が推察されたので他の成長因子においても受容体の発現異常の可能性はあるが、VEGFを除く各種成長因子の受容体の検討および組織の観察を実施していないので今後の検討課題として挙げられる。

本研究から糖尿病群では、新生血管に対する成長因子のmRNAの過剰発現にもかかわらず、損傷治癒が良好ではないことが判明した。

創傷治癒には、それぞれ必要とする成長因子の適量が設定されている可能性があるのではないか、またそれぞれの成長因子の受容体の異常が存在する可能性があるのではないか、さらに、血管以外の何らかの因子が創傷に大きく関与している可能性があるのではないかということがその理由として推察できる。

## 結 論

損傷筋組織の修復過程における血管新生に係わる成長因子のmRNAの発現量を検討した本研究から、以下のことが明らかとなった。

1) 糖尿病ラットでは、成長因子VEGF, bFGF, IGF-1, TGF- $\beta$ , NGFの分泌過剰および発現異常が存在することが示唆される。

2) 糖尿病ラットでは、VEGFの受容体の1つであるFltの発現異常が存在することが示唆される。

3) 糖尿病群では、血管新生に関する成長因子の過剰発現があるにもかかわらず、創傷治癒遅延を認めることから、VEGFの受容体以外の成長因子の受容体の異常が存在する可能性がある。

4) 糖尿病ラットでは、処置後72時間より、同時に血管新生に関連する成長因子のmRNAの発現増加を認めた。血管新生に係わる成長因子VEGF, bFGF, IGF-1, TGF- $\beta$ , NGFは、相互に作用している可能性があることが示唆された。

謝 辞 稿を終えるにあたり、御指導を賜りました獨協医科大学整形外科学教室 早乙女絃一教授に深甚なる謝意を捧げます。

本研究の一部は第18回日本整形外科学会基礎学術集会(2003年10月、北九州市)において発表した。

## 文 献

- 1) Takeshita S, et al : Therapeutic Angiogenesis, a signal intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit hind limb model. *J. Clin Invest*, **93** : 662 - 679, 1994.
- 2) Baumgartner I, et al : Constitutive expression of phVEGF after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*, **97** : 1114 - 1123, 1998.
- 3) Cohen RA. : Dysfunction of vascular endothelium in diabetes mellitus. *Circulation*, **87** (suppl V) : V67 - 76, 1993.
- 4) Reed BR, Clark RA. : Cutaneous tissue repair : practical implications of current knowledge. II. *J. Am. Acad. Dermatol*, **13** : 919 - 941, 1985.
- 5) J. Menetrey, C. Kasemkijwattana, C. S. Day, et al : Growth factors improve muscle healing in vivo. *J. Bone and Joint*, **82-B** : 131 - 137, 2000.
- 6) Melissa H. Wong, Jennifer R. Sasm, Thaddeus S. Stappenbeck, et al : Genetic mosaic analysis based on Cre recombinase and navigated laser capture microdissection. *PANS*, **97** : 12601 - 12606, 2000.
- 7) Ryuichi Wada, Cynthia J. Tiff, Richard L. Proia : Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *PANS*, **97** : 10954 - 10959, 2000.
- 8) Jennifer C. Condon, Pancharatnam Jeyasuria, Julie M. Faust, et al : A decline in the level of progesterone receptor coactivators in the pregnant uterus at term may antagonize progesterone receptor function and contribute to the initiation of parturition. *PANS*, **100** : 9518 - 9523, 2003.
- 9) Giddings AEB, Mangnall D, Rowlands BJ, et al : Plasma insulin and surgery I, early change due to operation in the insulin response to glucose. *Ann. Surg*, **186** : 681 - 686, 1997.
- 10) 柿崎正栄, 榎木尚義, 八木橋操六, 豊田隆謙, 後藤由夫 : 糖尿病性血管障害の発生とその予防に関する研究. 代謝異常治療研究基金研究業績集, **4** : 34 - 39, 1977.
- 11) Chomczynski P, Sacchi N. : Single - step Method of RNA isolation by acid Guanidinium thiocyanate - phenol - chloroform extraction. *Anal. Biochem*, **162** : 156 - 159, 1987.
- 12) Rappolee DA, Wang A, Mark D, et al : Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers



- of cells. *J Cell Biochem*, **39** : 1 - 11, 1989.
- 13) Baggiolini M. : Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, **392** : 565 - 568, 1998.
- 14) Lustet AD. : Chemokines - Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New Eng J Med*, **338** : 457 - 470, 1998.
- 15) Koch EA, Polverini PJ. : Interleukin - 8 as a Macrophage - Derived Mediator of Angiogenesis. *Science*, **258** : 1798 - 1801, 1992.
- 16) Fajardo LF, Kwan HH, et al : Dual Role of Tumor Necrosis Factor -  $\alpha$  in Angiogenesis. *Am. J. Pathol*, **140** : 539 - 544, 1992.
- 17) Noda Y. : Spatial and temporal expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietin - 1, and angiopoietin - 2 proteins during wound healing in rat skin : the relationship between vascular growth and regression. *京都府立医科大学雑誌*, **110** : 59 - 71, 2001.
- 18) Takeshita H, Kishimoto S, et al : Protein expression of fibroblast growth factor receptor - 1 in keratinocytes during wound healing in rat skin. *J Invest Dermatol*, **109** : 108 - 112, 1997.
- 19) 鈴木修身 : 損傷腱修復過程における癒痕組織形成の機序に関する実験的研究. *広島大学医学雑誌*, **48** : 37 - 51, 2000.
- 20) 小森正博 : 反回神経再生に対する神経栄養因子の効果. *耳鼻臨床*, **92** : 667 - 686, 1999.
- 21) Nicosia RF. : What is the role of vascular endothelial growth factor - related molecules in tumor angiogenesis ? *Am. J. Pathol.*, **153** : 11 - 16, 1998.
- 22) Shibuya M. : Role of VEGF - Flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Cancer Res.*, **67** : 281 - 315, 1995.
- 23) Ferrara N, Davis - Smyth T. : The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.*, **18** : 4 - 25, 1997.
- 24) Fong GH, Rossant J, Gertsentein M, et al : Role of the Flt - 1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, **376** : 66 - 70, 1995.
- 25) Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al : Failure of blood island formation and vasculogenesis in Flk - 1 - deficient mice. *Nature*, **376** : 62 - 66, 1995.
- 26) DesRosiers EA, Yahia L, Rivard CH. : Proliferative and matrix synthesis response of canine anterior cruciate ligament fibroblasts submitted to combined growth factors. *J Orthop Res*, **14** : 200 - 208, 1996.
- 27) Schmidt CC, Georgescu HI, Kwok CK, et al : Effect of growth factors on the proliferation of fibroblasts from the medial collateral and anterior cruciate ligaments. *J Orthop Res*, **13** : 184 - 190, 1995.
- 28) Hayashi K, et al : Differentiated phenotype of smooth muscle cells depends on signaling pathways through insulin - like growth factor and phosphatidylinositol 3 - kinase. *J Biol Chem*, **273** : 28860 - 28867, 1998.
- 29) Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA. : Growth hormone and the insulin - like growth factor system in myogenesis. *Endocr. Rev.*, **17** : 481 - 517, 1996.
- 30) Pertovaara L, Kaipainen A et al : Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor -  $\beta$  in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem.*, **269** : 6271 - 6274, 1994.
- 31) Passaniti A, Taylor RM, Pili R, et al : A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest.*, **76** : 519 - 528, 1992.
- 32) Myoken Y, Kan M, Sato GH, et al : Bifunctional effects of transforming growth factor -  $\beta$  on endothelial cell growth correlate with phenotypes of TGF -  $\beta$  binding sites. *Exp Cell Res*, **191** : 299 - 304, 1990.
- 33) Sankar S, Mahooti - Brooks N, Bensen L, et al : modulation of transforming growth factor -  $\beta$  receptor levels on microvascular endothelial cells during *in vitro* angiogenesis. *J Clin Invest.*, **97** : 1436 - 1446, 1996.
- 34) Mukoyama Y, Anderson DJ, et al : Sensory nerve determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell.*, **109** : 693 - 705, 2002.
- 35) O'Reilly MS, Boehm T, et al : Endostatin : An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, **88** : 277 - 285, 1997.
- 36) Nunes I, Gleizes PE, Metz CN, et al : Latent transforming growth factor -  $\beta$  binding protein domains involved in activated transglutaminase - dependent cross - linking of latent transforming growth factor -  $\beta$ . *J Cell Biol*, **136** : 1151 - 1163, 1997.
- 37) Plouet J, Gospodarowicz D. : Transforming growth factor beta - 1 positively modulates the bioactivity of fibroblast growth factor on corneal endothelial cell. *J Cell Physiol*, **141** : 392 - 399, 1989.

## Role of Growth Factors in Angiogenesis of Muscle Healing with Diabetic Rat

Naoki Imanura

*Dokkyo University School of Medicine Department of Orthopedics*

Injury to muscles and skin is very common. We have experienced that it is difficult to cure muscle injury and gangrene with Diabetes Mellitus on clinical. It is reported that vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor 1 (Flt-1), vascular endothelial growth factor receptor 2 (Flk-1), basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), nerve growth factor (NGF) are potent stimulators of angiogenesis *in vivo*. We therefore analyzed dynamic state of these growth factor in tissue of rats with lacerations of the gastrocnemius muscle by real time RT-

PCR method. Our findings showed that quantities of mRNA of VEGF, bFGF, TGF- $\beta$ , IGF-1, NGF in muscle regeneration of diabetic rats are more than control muscle. Quantity of mRNA of Flt in diabetic muscle compared abnormally with control muscle. Our results suggest that these growth factors and Flt appeared abnormally in diabetic muscle healing and may have a considerable effect on the treatment of diabetic muscle.

**Key Words :** Diabetes Mellitus, muscle injury, angiogenesis, growth factor