

高齢者のニューロパチーの病態と治療に 関する総合的研究

(H11-長寿-018)

平成11年度厚生科学研究費補助金長寿科学総合研究事業
研究成果報告書

平成12年3月

主任研究者 祖父江 元

(名古屋大学医学部教授)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

高齢者のニューロパチーの病態と治療に関する総合的研究

主任研究者 祖父江 元（名古屋大学大学院医学研究科神経内科・教授）

研究要旨

高齢者のニューロパチーには若年者から高齢者に至るまで発症がみられ、高齢発症型の病像が若年発症とは大きく異なっているものがあり、家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）と慢性炎症性脱髄性ニューロパチー（CIDP）があげられる。前者では解離性感覚障害と自律神経障害が目立たず、後者では緩徐進行性で感覚障害優位であることが高齢発症型の特徴であった。また、特に加齢に伴って発症が増加する糖尿病性ニューロパチーの病態の解明のため、糖尿病ラットを用い末梢神経での糖化、軸索再生を検討した。糖化生成物AGEの生成阻害薬であるアミノグアニジン（AG）、OPB-9195（OPB）がNa,K-ATPase活性と神経伝導速度を改善した。PGE1はJNK/c-jun, cAMPの変化を是正し軸索再生を促進した。さらに、我が国で同定されたHGFが神経生存、神経再生を促すことが明らかとなり、高齢者のニューロパチーへの応用が期待された。

分担研究者

安田 斎（滋賀医科大学第三内科・講師）
八木橋操六（弘前大学医学部病理学第一・教授）
船越 洋（大阪大学大学院医学系研究科
バイオメディカル教育研究センター腫瘍
生化学・助手）

A. 研究目的

高齢者ニューロパチーを次の2つの観点から検討する。第1は高齢者のニューロパチーの病像・病態を明らかにすることである。高齢者のニューロパチーには2つのタイプが存在し、1つは若年者から高齢者に至るまで発症が見られ、高齢発症者の病像が若年発症者とは大きく異なっているものである。この代表として、家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）と慢性炎症性脱髄性ニューロパチー（CIDP）が上げられる。他の1つは、加齢に伴って発症が増加するニューロパチーで、糖尿病

性ニューロパチー、慢性感覚失調性ニューロパチー、異ガンマグロブリン血症に伴うニューロパチーが含まれる。このようなニューロパチーは高齢者の中に高頻度にみられるものであるが、病像・病態などその実態は明らかにされていない。まず、これら高齢者にみられるニューロパチーの実態を明らかにし、第2の観点として、高齢者のニューロパチーに特徴的な病態修飾因子や病態発現調節因子を解析することは、神経再生を促進する有効な治療法を探る上で重要である。

B. 研究方法

1) 高齢者ニューロパチーの病態解析
a) CIDP137例（2歳-90歳、男89例、女48例）を高齢群：65歳以上と非高齢群：65歳未満に分け、1年-12年のfollow up期間で発症初期の進展度、病型（運動障害優位、運動感覚障害、感覚障害優位）、機能評価（Rankin's scale）、髄液蛋白、腓腹神経病理所見、電気生理所見、

合併症の有無を検討した。

b) 50歳以上発症のFAP I (Met 30) 35家系 (2世代以上にわたり長野県小川村, 熊本県荒尾市に関連がない) について性差、遺伝的背景、地理的分布、臨床症候(神経学的所見、自律神経症候)、髄液所見、電気生理所見、腓腹神経生検病理所見、剖検所見を検討した。

2) 高齢者ニューロパチーの病態関連因子と治療応用

a) ヒトの糖尿病神経において、非蛍光型のAGEであるNe-carboxymethyllysine (CML) に対する抗体を用い、AGEの局在を検討した。また、ストレプトゾトシン(STZ)による糖尿病ラットにAGEの生成阻害薬であるアミノグアニジン (AG)、OPB-9195 (OPB; (±)-2-Isopropylidene

hydrazono-4oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide) を投与し、脛骨神経運動神経伝導速度(MNCV)、Na,K-ATPase活性を測定した。

b) 糖尿病ラットの坐骨神経挫滅モデルを作成し、後根神経節(DRG)において、抗リン酸化JNK抗体、抗リン酸化c-jun抗体を用いたイムノブロットおよびRLAによるcAMP含量測定を行なった。また、PGE1製剤に対する感覚神経の再生能を評価した。

c) HGFとその受容体c-Metの発現調節に関して、坐骨神経損傷モデルを作成し、RNase protection assay、RT-PCR、ELISA、免疫組織染色、In situハイブリダイゼーションを用いて解析した。また、コンベンショナルとテトラサイクリン調節系を用いた神経特異的HGF発現トランスジェニックマウス(NS-HGF-Tg-マウス/Tet-HGF-Tg-マウス)を作成し、ニューロパチーモデルマウスと交配した。

C. 研究結果

1) 高齢者ニューロパチーの病態解析

a) CIDP: 緩徐進行型は高齢群86%、非高齢群80%で、高齢群に多い傾向があり、感覚障害優位型は高齢群32%、非高齢群8%で、感覚

障害優位型が高齢群で有意に高かった。

Rankin's scaleは最重症時では高齢群 3.21 ± 1.22 、非高齢群 3.37 ± 0.89 、長期経過時では高齢群 2.54 ± 1.35 、非高齢群 1.71 ± 0.87 であった。最重症時では両群に差はなかったが、長期経過時では高齢群で有意に機能障害が強かった。また、再発は高齢群9%、非高齢群35%で、高齢群が有意に低く、糖尿病合併率は高齢群10.5%、非高齢群3.0%で高齢群により高い傾向があった。一方、有髄神経線維密度は高齢群 $5014 \pm 1923/\text{mm}^2$ 、非高齢群 $6254 \pm 2271/\text{mm}^2$ であり、腓腹神経SMAPも高齢群 $8.2 \pm 12.1 \mu\text{V}$ 、非高齢群 $15.7 \pm 11.7 \mu\text{V}$ となり、両者ともに高齢群に低下がみられた。

b) FAP I: 発端者の発症年齢は52-80歳で平均 62.7 ± 6.6 歳であり、男:女=32:3と圧倒的に男性に多かった。家族歴は11家系のみを確認され浸透率が低い傾向を認め、地理的分布は集積地を持たず日本全国に分布していた。初発症状は下肢の異常感覚で発症することが多く、病初期には自律神経症候が軽くADLが阻害されることが少なかった。下位脳神経症状は5例において認めた。感覚障害はほとんどの例で全感覚障害を認め、解離性感覚障害を認めることは少なかった。末梢神経伝導検査所見では下肢は誘発されない例が多く、腓腹神経所見では高度の有髄線維密度低下($79-3466/\text{mm}^2$)を認めたが、無髄神経密度低下は高齢発症例では若年発症例に比し軽度であった。アミロイド沈着は腓腹神経、後根神経節および交感神経節において、若年例に比し比較的軽い傾向を認めた。一般臓器においては、心筋重量の大きい例において刺激伝導系、心筋ともに高度に沈着を認めた。

2) 高齢者ニューロパチーの病態関連因子と治療応用

a) 糖尿病ラットへの糖化阻害薬の効果: まず、ヒト糖尿病神経では、CML-AGEは神経周膜、神経内血管内皮、周皮、基底膜、神経内膜内有髄神経、無髄神経線維、間質線維芽細胞いずれの部位にも分布し、神経線維につ

いては有髄神経軸索、シュワン細胞質にみられた。これらのAGE反応は非糖尿病神経に比し、糖尿病神経で明らかに強い陽性所見を呈し、有髄神経線維の脱落の度合いとAGE陽性度が有意な相関を示した。また、糖尿病ラットでは、MNCVは正常対照群に比して18-25%の低下を示したが、AG投与/OPB投与によりそれぞれ56%/65%の改善を認めた。一方、ウアバイン感受性Na,K-ATPase活性は糖尿病ラットで正常対照ラットの43%までの低下を示し、AG群/OPB群では73%/50%まで回復を示した。

b) 糖尿病ラットの神経再生能とプロスタグランジンE₁ (PGE₁)の治療効果：坐骨神経挫滅7日後の感覚神経再生距離は対照ラットに比し糖尿病ラットで有意に短く、これはPGE₁製剤投与により有意に改善した。day 1では糖尿病ラットのDRGではTUNEL法により38%の神経細胞にアポトーシスを認めた。DRG cAMP含量は、対照ラットに比し糖尿病ラットで有意に少なくこの減少はPGE₁製剤の7日間治療により有意に改善した。また、JNK/c-junのリン酸化はday 1では全てのラットのDRGにおいて有意に亢進し、糖尿病ラットではday 7まで遷延した。

c) HGFによる神経再生の促進：坐骨神経損傷モデルにおいて脊髄ではc-Metが、またその標的である筋肉でHGFが発現調節を受けることを明らかにした。神経特異的にHGFを発現するマウスを作成し、HGF発現部位を解析した。またこのマウスとALSモデルTg-マウスの交配によるHGF-ALS-ダブルTg-マウスの作成を開始した。ALSモデルTg-マウスにおいて、HGFが発症過程の筋肉で発現誘導を受けること、更に脊髄で誘導を受け中でも発症末期における誘導が非常に強いこと、またHGFは運動神経に対する生存促進活性が強いことから、HGFはALSの発症・進行を遅延させる内在性因子である可能性を示唆した。HGFとc-Metが神経系でダイナミックな発現調節を受けることやin vitroで神経生存、突起伸長、細胞運

動促進活性を示すことが明らかになった。

D. 考察

ニューロパチーの病態や表現型はおのこのニューロパチーについて検討されてきているが、高齢者ではその病態がどのようなになっているのかは従来あまり注目されてこなかった。最近の人口の高齢化に伴って、高齢者では表現型や病態が若年例とは大きく異なる例が存在することが知られるようになってきた。家族性アミロイドポリニューロパチーでは、若年発症例は解離性感覚障害と自律神経障害が前景に立ち、高浸透率を示す常染色体優性遺伝形式を示すが、高齢発症例では一見孤発性で深部感覚障害も高度で、自律神経障害が目立たなかった。また、高齢者の慢性炎症性脱髄性ニューロパチーでは緩徐進行性、感覚障害優位、長期機能予後不良、高い糖尿病合併率、低い再発率などが特徴であると考えられた。今後、高齢者ニューロパチーに特徴的な病態の修飾因子や発現調節因子は明らかにし、発症に関連する遺伝要因・環境要因の検討がニューロパチーの予防や治療にとって重要であると思われる。

高齢者社会の到来とともに糖尿病患者の爆発的増加とそれに伴う合併症管理が重大な医療上の問題となっている。特に糖尿病性ニューロパチーはもっとも頻度の高い合併症であり、その予防・管理が困難なものである。糖尿病性ニューロパチーが高齢者糖尿病になぜ起こりやすいのか、またそれをいかに予防・治療するかへの対策が必要とされている。糖尿病ラットを用いることによって、蛋白の非酵素的糖化(グリケーション)の亢進、シグナル伝達系の異常が糖尿病性ニューロパチーの病態に深く関与することが明らかになった。神経内でのAGEの存在はミエリン蛋白、軸索骨格のチュブリン、ニューロフィラメント、アクチンなど過剰糖化を示し、糖化により神経線維自身が脱髄、軸索変性に陥ることを示唆している。OPBはAGよりもAGE生成抑制効果

が4倍強いことが示されている。今回のOPB投与では糖尿病ラットにおいて65%のMNCV改善がみられており、AGあるいはアルドース還元酵素阻害薬投与実験での改善効果よりも優れていた。さらに、糖尿病ラットでは坐骨神経挫滅後の軸索再生能が低下していた。これには、JNK/c-jun系のリン酸化の遷延やcAMPの増加不良が関連していた。これらのシグナル系の異常はPGE1投与により是正され、PGE1は血管以外にも神経細胞を直接標的として作用すると思われた。

HGFは、初め肝細胞増殖因子の本体として同定されたが、神経にc-Met/HGF受容体が発現しており、ダイナミックな発現調節を受けることが明らかとなった。初代培養神経細胞、神経節でHGFは各種神経栄養活性（神経生存、神経突起伸長、神経細胞運動促進）を示すことから、神経系の発生・維持に必須な因子の1つと考えられた。さらに末梢神経損傷モデルや難治性神経変性疾患において発現制御をうけることから、これらの疾患の神経細胞死を阻止、神経再生を促進できる可能性が示唆される。

E. 結論

高齢者のニューロパチーには、若年者とは異なる特有の臨床病態がみられた。特に糖尿病性ニューロパチーには、糖化抑制剤やPGE1による予防・治療の可能性が示唆され、HGFは広くニューロパチーに応用される期待がもたれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Misu K, Hattori N, et al. Late-onset familial amyloidotic polyneuropathy type I (transthyretin Met 30 associated familial amyloidotic polyneuropathy) unrelated to endemic focus in Japan : Clinicopathologic and genetic features. *Brain* 122: 1951-62, 1999.
- 2) Hattori N, Ichimura M, et al.

Clinicopathologic features of Churg-Strauss syndrome-associated neuropathy. *Brain* 122: 427-39, 1999.

3) Wada R, Sugo M, et al. Only limited effects of aminoguanidine treatment on peripheral nerve function, (Na⁺,K⁺)-ATPase activity and thrombomodulin expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 42: 743-747, 1999.

4) Kogawa S, Yasuda H, et al. Apoptosis and impaired axonal regeneration of sensory neurons after nerve crush in diabetic rats. *Neuroreport* (in press)

5) Sun W, Funakoshi H, et al. Differential expression of hepatocyte growth factor and its receptor, c-Met in the rat retina during development. *Brain Res.* 851: 46-53, 1999.

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

高齢発症型ニューロパチーの特徴—慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチー—

分担研究者 祖父江 元 名古屋大学医学部神経内科 教授
研究協力者 服部直樹，翠 健一郎，森恵子，小池春樹，
山本正彦，市村みゆき，吉原剛

研究要旨

慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチー（CIDP）は各年齢層に発症し、その臨床像、治療反応性、検査所見には多様性がみられる。CIDP124例を若年群（20歳未満）、成人群（20～69歳）、高齢群（70歳以上）に分けて検討した。亜急性進行型は若年群に有意に高く、感覚障害優位型は高齢群で有意に高かった。機能障害では最重症時では各群とも有意差はなかったが、長期経過時では高齢群で有意に不良だった。高齢者では腓腹有髄神経線維の脱落が目立ち、電気生理検査では神経伝導速度が比較的保たれている一方、CMAPとSNAPの低下が目立った。これらの所見が長期予後に影響を与えていると考えられた。

A. 目的

CIDPは臨床像、治療反応性、検査所見に多様性がみられ¹⁾、単一疾患として捉えるには困難な場合がある。若年性のCIDPには発症初期に亜急性の進行をみるものが多く、長期予後が良いとされている^{2) 3)}。一方、高齢発症CIDPの検討は少ない⁴⁾。発症年齢は本症の多様性を規定する因子の一つと考えられるため、CIDPの多数例を各年齢階層別に分け、臨床病理学的所見の検討を行った。

B. 対象・方法

CIDP124例（2歳-90歳、男81例、女43例）を若年群：20歳未満（21例）、成人群：20歳以上70歳未満（82例）、高齢群：70歳以上（21例）に分け、1年-12年のfollow up期間で以下の検討を行った。

（1）発症初期の進展度を2群に分類した。亜急性進行型：発症時期が日単位で特定できるぐらい明確で、急速な進行があり、2ヶ月以降は緩徐進行となる。緩徐進行型：発症時期が不明確で、2ヶ月以上に亘り、緩徐に進行

する。

（2）病型を3群に分類した。A：運動障害主体で、感覚障害はないか、あっても軽微。B：運動感覚障害がみられるが、運動障害が優位。C：感覚障害が優位。

（3）機能評価はRankin's scale⁵⁾を用い、最重症時、長期経過後の各時点で評価した。評価項目は6段階（0-5）で、5は最重症で全介助を必要とし、0は無症状。

（4）髄液蛋白、腓腹神経病理所見、電気生理所見、合併症の有無

C. 結果

（1）性比（M/F）は全体で1.88で、若年群1.63、成人群1.93、高齢群2.0で、各群に有意差はなかった。（2）亜急性進行型は若年群52.3%、成人群10.9%、高齢群9.5%で、若年群に有意に高かった。（3）運動障害型は若年群62%、成人群21.3%、高齢群17.6%。運動障害優位型は若年群38.1%、成人群57.4%、高齢群35.3%。感覚障害優位型は若年群0%、成人群21.3%、高齢群47.1%。運動障害型は

若年群において、感覚障害優位型は高齢群で有意に高かった。(4) R-scaleは最重症時で若年群 3.90 ± 0.85 、成人群 3.06 ± 0.86 、高齢群 3.25 ± 1.3 、長期経過時で若年群 1.65 ± 0.93 、成人群 2.00 ± 0.98 、高齢群 2.8 ± 1.6 だった。最重症時では若年群でむしろ機能障害が強かったが、長期経過時では高齢群で機能障害が強かった。(5) 髄液蛋白は若年群 95.3mg/dl 、成人群 131.7mg/dl 、高齢群 83.9mg/dl 、髄液蛋白の異常上昇は若年群 63%、成人群 81%、高齢群 68%で各群間で有意差はなかった。

(6) 腓腹神経有髄神経線維密度は若年群 $8194/\text{mm}^2$ 、成人群 $5592/\text{mm}^2$ 、高齢群 $4169/\text{mm}^2$ で成人群、高齢群で有意の低下がみられた。神経内鞘直下の浮腫率は若年群 $13.2 \pm 4.7\%$ 、成人群 $10.7 \pm 3.6\%$ 、高齢群 $7.7 \pm 4.0\%$ で高齢群で有意に低値を示した。(7) 正中神経 MCV は若年群 28.3m/s 、成人群 37.6m/s 、高齢群 38.1m/s と若年群低い傾向にあった。脛骨神経 MCV では誘発されない例が若年群 6%、成人群 14%、高齢群 17%と高齢群に多い傾向にあった。(8) 正中神経 SCV は若年群 38.3m/s 、成人群 42.2m/s 、高齢群 41.8m/s と若年群がより異常、腓腹神経 SCV は若年群 36.7m/s 、成人群 39.7m/s 、高齢群 34.0m/s で高齢群がより異常だった。

(9) 糖尿病合併率は若年群 0%、成人群 4.8%、高齢群 9.5%で高齢群により高い傾向があった。

D. 考察

(1) 緩徐進行型、感覚障害優位型、長期機能予後不良、高い糖尿病合併率などは高齢群 CIDP の特徴と考えられる。(2) 高齢者 CIDP の腓腹神経生検では有髄神経の脱落が目立ち、また電気生理検査では神経伝導速度が比較的保たれている一方、CMAP と SNAP の低下が目立った。これらの所見が長期予後に影響を与えていると考えられた。

E. 結論

CIDP は各年齢層群間で発症形式、病型、長期機能予後、病理所見、電気生理所見で差があり、発症年齢は病態を考える上で重要な要因と考えられた。今後、治療方針を考える指標となりうる。

F. 参考文献

- (1) McCombe P et al. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy A clinical and electrophysiological study of 92 cases. *Brain* 110: 1617-1630, 1987.
- (2) Hattori N et al. Clinicopathological features of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy in childhood. *J Neurol Sci* 154: 66-71, 1998.
- (3) Simmonds Z et al. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy in children: II. Long term follow-up, with comparison to adults. *Muscle Nerve* 20:1569-1575, 1997.
- (4) 山本浩二ら：高齢発症の慢性炎症性脱髄性多発根神経炎 (CIDP) 臨床神経学 (会) 37:1308, 1997.
- (5) Hattori N et al. Clinicopathologic features of Churg- Strauss syndrome-associated neuropathy. *Brain* 122:427-439, 1999

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

高齢発症型ニューロパチーの特徴—家族性アミロイドポリニューロパチー

分担研究者 祖父江 元 名古屋大学医学部神経内科 教授
研究協力者 翠 健一郎、服部直樹、森 恵子、小池春樹、
山本正彦、市村みゆき、吉原 剛

研究要旨

集積地と3世代以上にわたり関連のない50歳以上発症の家族性アミロイドポリニューロパチー1型（FAP TTR Met30）35家系について臨床病理・遺伝学検討を行った。その結果、性差、家族歴を有する頻度、地理的分布、病初期の自律神経症候の程度、病理所見（腓腹神経所見の無髄神経密度、後根神経節及び交感神経節における神経細胞の脱落とアミロイド沈着の程度、一般臓器（腎臓、甲状腺等）へのアミロイド沈着の程度、心筋重量）に差異を認めた。以上より高齢発症型 FAP TTR Met30が全国に散在性に見られ、若年発症例と比べ臨床病理及び遺伝的特徴が異なっていることが明らかになった。同じ遺伝子異常を有しながら表現型が異なる要因（遺伝、環境要因）の検討が必要であると考えられた。

A.研究目的

家族性アミロイドポリニューロパチー1型（FAP TTR Met 30）は常染色体性優性遺伝疾患であり、長野県小川村、熊本県荒尾市に2大集積地を持ち、20—40歳に下肢優位の解離性感覚障害を伴う sensorimotor neuropathy、著明な自律神経機能不全症状などにて発症する。一方で遺伝子診断の普及と共に自律神経症候が軽く一見孤発性の高齢発症 FAP TTR Met 30例が報告されて来ている。2大集積地と関連を認めない高齢発症 FAP TTR Met30 35家系の臨床病理学及び遺伝学的特徴につき若年発症群と対比し検討した。

B.方法

3世代以上にわたり長野県小川村、熊本県荒尾市に関連のない50歳以上発症の FAP TTR Met 30 35家系について性差、遺伝的背景、地理的分布、臨床症候（神経学的所見、自律神

経症候）、髄液所見、電気生理所見、腓腹神経生検病理所見を検討した。また3例については剖検所見（脊髄、前根、後根、後根神経節、自律神経節、坐骨神経、脛骨神経、腓腹神経、および心、腎など一般臓器の剖検病理所見）を併せて検討した。

C.結果

1. 発端者の発症年齢は52—80歳で平均62.7±6.6歳であった。男：女=32：3と圧倒的に男性に多かった。2. 家族歴は11家系のみを確認され、浸透率が低い傾向を認めた。同胞内発症者は25例認め、2例を除き51—85歳と高齢発症で19：6と男性に多く、臨床症状も類似していた。無症候キャリアは36例認め、13：23と女性に多く、18例が50歳以上であった。3. 地理的分布は集積地を持たず日本全国に分布していた。4. 初発症状は下肢の異常感覚で発症することが多く、病初期には自律神経症候が軽くADLが阻害されることが少なかった。

下位脳神経症状は5例において認められた。感覚障害はほとんどの例で全感覚障害を認め、解離性感覚障害を認めることは少なかった。またCIDPと診断され、PSL、血漿交換などにて治療された例を認められた。5. 髄液蛋白は10例において上昇を認められた。6. 末梢神経伝導検査所見は下肢は誘発されない例が多く、誘発された例においては低電位で軸索障害型を示した。また、一部の例で伝導速度低下を認められた。7. 腓腹神経所見では高度有髄線維密度低下(79-3466/mm²)を認められたが無髄神経密度低下は高齢発症例では若年発症例に比し軽度であった。アミロイド沈着は腓腹神経においては一般に軽度で、坐骨神経など近位神経幹において高度であった。8. 剖検所見では後根神経節及び交感神経節における神経細胞の脱落とアミロイド沈着の程度が、若年例に比し比較的軽度である傾向を認められた。中枢神経系では高齢発症群と若年発症群において差異は認めずくも膜下腔、脈絡叢血管周囲への沈着を認められたが実質への沈着は認めなかった。一般臓器においては高齢発症群では若年発症群に比し腎臓、甲状腺への沈着が軽度であり、心筋重量が重かった。また、心筋重量の大きい例において刺激伝導系、心筋ともに高度に沈着を認められた。

D. 考察、結論

我が国の2大集積地に見られる若年型とは別に、高齢発症型FAP TTR Met30が全国的に散在性に存在することが明らかになった。高齢発症型FAP TTR Met30は、若年発症例に比べ、家族歴を有する頻度、浸透率、男女比、病初期の自律神経症状の程度、病理所見に差異を認められた。病理所見の特徴は臨床症候(自律神経症候が軽度であることなど)の特徴と対応していると考えられた。アミロイド沈着にはMet 30の他に何らかの遺伝要因、環境要因が関与していると考えられる。今後、発症に関連する遺伝・環境要因の検討が重要であると考えられた。

参考文献

- 1) Ikeda S, Hanyu N, Hongo M, Yoshioka J, Oguchi H, Yanagisawa N, et al. Hereditary generalized amyloidosis with polyneuropathy: clinicopathological study of 65 Japanese patients. *Brain* 1987; 110: 315-37.
- 2) Misu K, Hattori N, Nagamatsu M, Ikeda S, Ando Y, Nakazato M, et al. Late-onset familial amyloidotic polyneuropathy type I (transthyretin Met 30 associated familial amyloidotic polyneuropathy) unrelated to endemic focus in Japan : Clinicopathologic and genetic features. *Brain* 1999; 122: 1951-62.
- 3) Takahashi K, Sakashita N, Ando Y, Suga M, Ando M. Late onset type I familial amyloidotic polyneuropathy; presentation of three autopsy cases in comparison with 19 autopsy cases of the ordinary type. *Pathol Int* 1997; 47: 353-9.

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

糖尿病ラットの神経再生能と神経細胞アポトーシスの発症機序と
プロスタグランジンE1の治療効果 cAMP及びMAPkinaseの関与

分担研究者 安田 斎 滋賀医科大学第三内科 講師
研究協力者 小河秀郎 前田憲吾 寺田雅彦 吉川隆一

研究要旨

糖尿病ラットの坐骨神経挫滅後の軸索再生能及び後根神経節（DRG）neuronのapoptosis誘導におけるDRG内p-JNK/p-c-jun・cAMP含量の変化の関与及びPGE1の効果について検討した。軸索再生距離は対照群（C）、糖尿病PGE1治療群（P）に比し糖尿病非治療群（DM）で有意に減少していた。apoptosisは挫滅後のDMでのみ認められた。cAMPは、C、Pでは挫滅前（d0）と比べd7でのみ増加したが、DMでは変化しなかった。p-JNK/p-c-junは全群でd0に比しd1で増加したがd7ではDMでのみ増加した。以上よりDMのDRG neuronは軸索障害によりapoptosisを起こしやすく、軸索再生能はJNK/c-jun, cAMPの変化に起因して低下しているがPGE1により是正されると考えられる。

A. 研究目的

糖尿病の末梢神経では神経線維の脱落に加えて後根神経節（DRG）神経細胞脱落が観察される。また、糖尿病動物では軸索障害後の再生能が低下していることが知られている。しかし、糖尿病動物の神経細胞が軸索障害に対して脆弱性を示すか否かについての報告はない。また、培養神経細胞ではJNK/c-junの活性化の調節及び細胞内cAMP含量が細胞生存と軸索伸長に関与していることが報告されているが、糖尿病動物の末梢神経細胞における軸索障害時のこれらの情報伝達系の変化についての報告もない。そこで、我々はストレプトゾシン（STZ）糖尿病ラットを用いて、1) 坐骨神経挫滅後の軸索再生能及びDRG神経細胞のアポトーシスの有無、2) DRGにおけるJNK/c-junリン酸化及びcAMP含量の変化と神経再生及び神経細胞のアポトーシスとの関連について検討すると共に、糖尿病性神経障害に有効とされるプロスタグランジン

ンE1（PGE1）製剤の1）、2）に対する効果についても検討を行った。

B. 研究方法

1. 糖尿病ラットの作製；6週齢SD系ラットにSTZ 55mg/kgを静脈内投与し作製した。一部の糖尿病ラットには糖尿病作製後21日目よりPGE1製剤（OP-1206）10 μ g/kg/日を14日間経口投与した。
2. 坐骨神経挫滅；糖尿病作製後28日目に麻酔下で右坐骨神経を露出し鑷子にて挫滅を行い挫滅部位を9-0 ナイロン糸でマーキングした。
3. 知覚神経再生能評価；挫滅後7日目に麻酔下で右坐骨神経を露出し35mm遠位より鑷子にて0.5mmずつ近位にずらしながらつまみ下肢近位筋の反射的収縮より軸索再生先端を同定し再生距離を求めた。
4. イムノプロット法；坐骨神経挫滅前（day 0）、挫滅後1日（day 1）、7日（day 7）に

各群ラット6匹ずつを断頭し、L4、L5 DRGを採取し、これをRIPAバッファーにて可溶化した。蛋白50 μ gをSDS-PAGEにて分離後PVDF膜に転写し、抗総JNK抗体、抗リン酸化JNK抗体、抗リン酸化c-jun抗体を用いてブロットした。

5. cAMP含量測定；3.と同様に採取したL4、L5 DRGを0.1M HCl内で破碎し15分ボイル後15000 rpmで20分遠心分離した上清を測定に用いた。cAMP含量測定はラジオイムノアッセイキットを用いて行った。

6. 免疫組織化学；day 0、1、7に各群ラット3匹ずつを4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定しL5 DRGを採取し凍結包埋後cryostatにて作製した10 μ m厚の切片に各抗体を用いて免疫染色を行った。DRG神経細胞のアポトーシスはTUNEL法を用いて検討した。

C.研究結果

1. 坐骨神経挫滅7後の知覚神経再生距離は対照ラットに比し糖尿病ラットで有意に短く、これはPGE1製剤投与により有意に改善した。

2. day 0では全群のDRGにおいてアポトーシスを認めなかった。day 1では糖尿病ラットのDRGで38%の神経細胞にアポトーシスを認めたのに対して他のラットでは認めなかった。day 7でも糖尿病ラットのDRGでは34%のアポトーシス細胞を認めたが他のラットでは認めなかった。

3. DRG cAMP含量は、day 0では対照ラットに比し糖尿病ラットで有意に少なくこの減少はPGE1製剤の7日間治療により有意に改善した。day 1では3群間に有意な差を認めず、いずれの群でもday 0と比

べて有意な変化を認めなかった。day 7では対照ラットおよびPGE1ラットではday 0に比し有意な増加を認めたのに対し糖尿病ラットでは有意な増加を認めなかった。

4. day 1では全てのラットのDRGにおいてday 0に比しJNK/c-junのリン酸化が有意に亢進していた。しかし、day 7では、糖尿病

ラットではday 1と同様なリン酸化の亢進を認めたのに対し、他のラットではday 0と同レベルまで回復していた。これらのリン酸化JNK/c-junは主に核内で確認された。

D.考察

糖尿病ラットでは坐骨神経挫滅後の軸索再生能が低下していた。また、坐骨神経挫滅により対照ラットではDRGのアポトーシスは認めなかったのに対し、糖尿病ラットでは挫滅1日後よりDRGの一部にアポトーシスが認められた。また、糖尿病ラットにおけるこのような知覚神経細胞の脆弱性はPGE1製剤治療により改善された。挫滅1日後では全てのラットのDRGにおいてJNK/c-junのリン酸化が亢進しておりアポトーシスは糖尿病ラットのみに認められたことからJNK/c-junリン酸化のみではアポトーシス誘導を説明するには不十分と考えられた。また、挫滅7日後では糖尿病ラットでのみJNK/c-junの遷延するリン酸化が認められたことよりむしろ軸索再生にJNK/c-junの脱リン酸化が重要であると考えられた。一方、DRG cAMP含量は挫滅1日後では3群間に有意な差はなく挫滅前と比較してもいずれの群でも有意な変化は認めなかったことから、これもDRG神経細胞のアポトーシス誘導との関連は否定的であった。挫滅7日後では対照ラットおよびPGE1ラットで挫滅前と比較して有意に増加しており糖尿病ラットでは増加していなかったことよりcAMP含量の増加は軸索再生に重要であることが示唆された。本実験では糖尿病ラットにおける坐骨神経挫滅後DRG神経細胞アポトーシス誘導の機序を明確にすることは出来なかったが、PGE1の血流増加作用を考慮すると、神経細胞への血流供給の低下がアポトーシスに何らかの影響を与えている可能性があると考えられる。

E. 結論

糖尿病ラットの末梢知覚神経細胞は軸索障

害によりアポトーシスに陥りやすく軸索再生能も低下していた。これらの異常はPGE1 製剤により改善されることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Terada M, Yasuda H and Kikkawa R: Delayed Wallerian degeneration and increased neurofilament phosphorylation in sciatic nerves of rats with streptozocin-induced diabetes. *J Neurol Sci* 155:23-30, 1998.

2) Terada M, Yasuda H, Kogawa S, Maeda K, Haneda M, Hidaka H, Kashiwagi A and Kikkawa R: Expression and activity of cyclin-dependent kinase 5/p35 in adult rat peripheral nervous system. *J Neurochem* 71:2600-2606, 1998.

3) Yasuda H, Terada M, Taniguchi Y, Sasaki T, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A and Kikkawa R: Impaired regeneration and no amelioration with aldose reductase inhibitor in crushed unmyelinated nerve fibers of diabetic rats. *Neuroreport* 10: 2405-2409, 1999.

4) Hirai A, Yasuda H, Joko M, Maeda T, Kikkawa R: Evaluation of diabetic neuropathy through quantitation of cutaneous nerves. *J Neuro Sci* (in press)

5) Kogawa S, Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kikkawa R: Apoptosis and impaired axonal regeneration of sensory neurons after nerve crush in diabetic rats. *Neuroreport* (in press)

2. 学会発表: 1) 小河秀郎、安田斎、寺田雅彦、吉川隆一 糖尿病ラットの末梢神経再生能に対する PGE1 製剤の効果: 接着因子の関与、第 40 回日本神経学会総会 (東京)

2) 小河秀郎、安田斎、寺田雅彦、前田憲吾、川端徹、吉川隆一: 糖尿病ラットの末梢神経再生能低下に対するプロスタグランジン E1 製剤の効果—cAMP と c-jun N-terminal kinase の関与について—、第 14 回日本糖尿病合併症学会 (大津)

3) Kogawa S, Yasuda H, Terada M, Kikkawa R: Amelioration of impaired regeneration through increasing cAMP and decreasing JNK activity with PGE1 analogue in STZ-induced diabetic rats. 10 th Japan-Korea symposium on diabetes mellitus (Kumamoto)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

糖化抑制剤による実験的糖尿病ニューロパチーの予防の試み

分担研究者 八木橋操六 弘前大学医学部 病理学第一講座 教授
共同研究者 和田龍一 杉本一博 西沢雄一

研究要旨

本研究では、ヒト糖尿病の末梢神経での糖化の実体を明らかにすること、糖化を防ぐことにより糖尿病での特徴的な神経機能および生化学的異常が防止されるかを、糖尿病ラットを用い検討した。その結果、糖尿病では末梢神経内に糖化生成物の最終産物であるAGEが過剰な蓄積を示すこと、その蓄積が神経線維脱落と密接な相関を示すことを見いだした。さらに、糖尿病ラットを用い、AGE生成阻害薬であるアミノグアニジン(AG)あるいはOPB-9195(OPB)を投与した結果、有意に神経伝導速度の遅延を予防、さらには生化学的にもNa,K-ATPase活性低下を防止できた。このことから、高齢者糖尿病性ニューロパチーの発生の予防あるいは進展の防止にAGやOPBなどの糖化阻害薬の開発が必要とされることが明らかとなった。

A. 研究目的

高齢者社会の到来とともに糖尿病患者の爆発的増加とそれに伴う合併症管理が重大な医療上の問題となっている。とくに糖尿病性ニューロパチーはもっとも頻度の高い合併症であり、その予防・管理が困難なものである。糖尿病性ニューロパチーが高齢者糖尿病になぜ起こりやすいのか、またそれをいかに予防・治療するかへの対策が必要とされている。高齢者糖尿病にニューロパチーがみられやすい大きな原因として蛋白の非酵素的糖化（グリケーション）の関与がいられている。本研究では、蛋白の非酵素的糖化の糖尿病性ニューロパチーの成因への関与の追究と、それを抑制することによる糖尿病性ニューロパチーの治療への指針を探る。

B. 研究方法

1. ヒト糖尿病神経でのAGE局在

検索材料として、ヒト2型糖尿病患者から生検によってあるいは剖検時に得られた腓腹神経5例を用いた。対照には糖尿病以外の原因で死亡した剖検例および下肢切断により

得られた5例を用いた。神経生検については、生検の目的、危険性、その解析方法等について十分な説明に基づくインフォームドコンセントを得た上で組織採取した。組織採取は弘前大学医学部倫理委員会の承認を得た上で行った。

採取神経組織は、4%パラホルムアルデヒド固定(0.1Mリン酸緩衝液、pH7.4)の後、ショ糖加緩衝液で置換したうえでイソペンタン内で凍結し、クリオスタットにより切片を作成した。

これらの神経組織については予めオスミウム酸後固定、エポン包埋神経横断準薄切切片のフェニレンジアミン染色を画像解析装置を用いて有髄神経線維密度を算定した。

AGEの免疫染色は、非蛍光型のAGEであるNε-carboxymethyllysine (CML)に対する抗体を用い、SAB法を用いて行った。すなわち、神経凍結切片を過酸化水素、ウサギアルブミンにて非特異的反応を除去後、CMLモノクローナル抗体（熊本大学生化学堀内正公教授提供）を48時間反応させた。次に二次ピオチン化抗

マウス抗体、およびペルオキダーゼ結合抗ストレプトアビジンを反応させた。発色はジアミノベンチジンにて行った。陽性反応は、神経内血管壁、神経周膜、間質、神経内神経線維成分の反応をそれぞれ陰性0、弱陽性1、陽性2、強陽性3点とスコア化し、定量化した。

2.糖尿病ラットへの糖化阻害薬の効果

8週齢の正常雄性ラットを用い、ストレプトゾトシン(STZ)(Sigma)(50mg/kg,i.v.)により糖尿病ラットを作成した。血糖は尾血管からの採血により、簡易血糖測定器で測定した。1週後空腹時血糖300mg/kg以上のものを糖尿病ラットと判定し、経口(飲料水に1g/Lの割合に含有)にてアミノグアニジン(AG)(Wako)を8週間投与した。この場合飲水量の計算から、平均AG投与量は370mg/kg/日となった。また、1群はprotamine-zinc insulinを0-9単位/日、尿糖、血糖に合わせ朝11時の随時血糖が150-250mg/kgとなるよう投与した。比較対照に正常ラット群を用いた。

さらに新しい糖化阻害薬であるOPB-9195(以下OPB)(\square -2-Isopropylidenehydrazono-4oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide(大塚製薬、藤井記念研究所)の効果を見る目的から、同様に8週齢糖尿病ラットにOPBを連日50mg/kg経口にて24週間投与し、非投与糖尿病ラット群、正常ラット群と比較した。

いずれの実験ラット群についても、経時的に血糖、体重を測定し、また実験終了時には脛骨神経運動神経伝導速度(MNCV)を測定した。さらに、ネンプタール麻酔下で採血、坐骨神経を採取した。血管内皮細胞傷害マーカーとしての血清トロンボモジュリン(TM)を酵素免疫法(ELISA)にて測定した。神経の生化学的指標として坐骨神経でのNa,K-ATPase活性についてGreeneらの方法に準じて測定した。さらに長期投与実験については血中AGE量をELISA法にて測定した。

動物実験については、弘前大学医学部動物

実験規則および倫理規定に準拠して行った(実験登録番号M99064)

C. 研究結果

1.ヒト糖尿病神経でのCML-AGE局在

CML-AGEは神経周膜、神経内血管内皮、周皮、基底膜、神経内膜内有髓神経、無髓神経線維、間質線維芽細胞いずれの部位にも分布していた。神経線維については有髓神経軸索、シュワン細胞質いずれにもみられた。これらのAGE反応は非糖尿病神経に比し、糖尿病神経で明らかに強い陽性所見を示した(図1)。

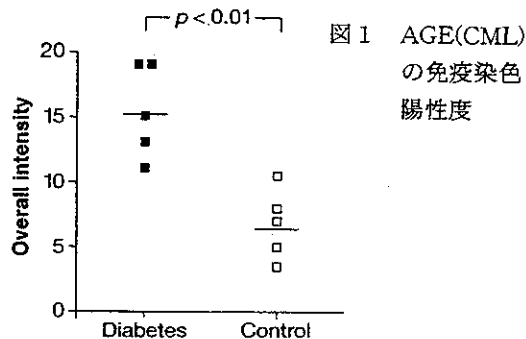


図1 AGE(CML)の免疫染色陽性度

これらの免疫反応の強度と年齢、糖尿病罹病期間、有髓神経線維密度との相関をみると、有髓神経線維の脱落の度合いとAGE陽性度が有意な相関を示すことが証明された(図2)。

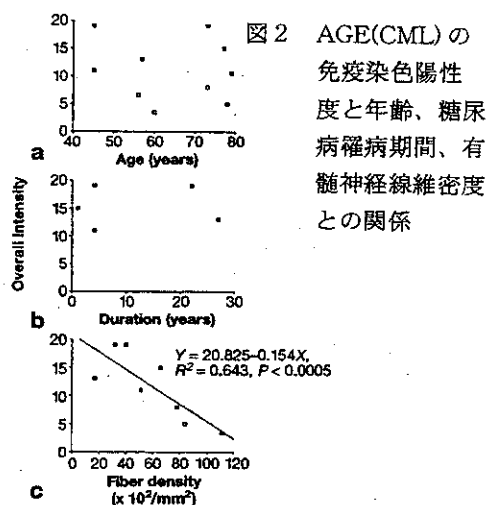
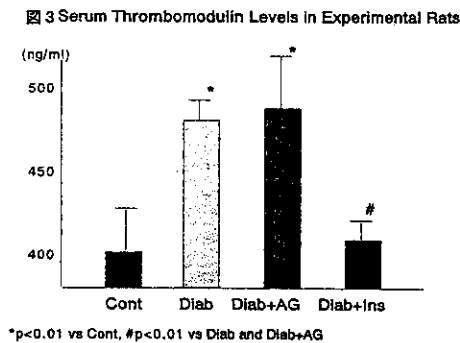


図2 AGE(CML)の免疫染色陽性度と年齢、糖尿病罹病期間、有髓神経線維密度との関係

2.糖尿病ラットへの糖化阻害薬の効果

1) アミノグアンジン (AG)8 週投与効果

糖尿病ラットは対照正常ラットに比し、体重増加がみられず、32%の減少を示した。空腹時血糖は正常の5倍に上昇した。AG投与により糖尿病ラットでは体重、血糖は有意の変化を示さなかった。これに比し、インスリン治療群では体重の有意の増加、血糖の改善をみた。血管内皮傷害マーカーのトロンボモジュリン(TM)は正常ラットに比し糖尿病ラットで著しい高値を示したが、AG投与群では影響を受けなかった(図3)。これに比し、インスリン投与群ではTM値は正常化した。



MNCVは正常対照群に比して糖尿病ラットで25%低下を示した。AG投与により、MNCVは56%の改善を認めた。これに対しインスリン投与群では85%の改善を示した。一方、ウアバイン感受性Na,K-ATPase活性は糖尿病ラットで正常ラットの43%までの低下を示した。AG群では73%まで、インスリン投与群では86%までの回復を示した(図4)。

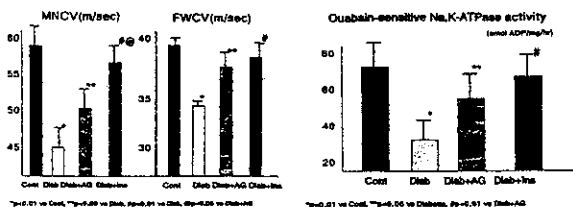


図4 アミノグアンジン(AG)の糖尿病ラット脛骨神経神経伝導速度(MNCV)、F波伝導速度(FWCV)およびNa,K-ATPase活性への効果

2) OPB24週投与効果

実験終了時の体重は正常ラットで621±30 (mean±SD)、糖尿病ラット群350±36、OPB

投与糖尿病ラット群352±46とOPB投与により体重は影響を受けなかった。血糖は正常ラット73±12mg/dlに対し糖尿病ラット412±125、OPB投与群382±89とOPB投与により有意な変化はみられなかった。また糖尿病ラットで上昇した糖化ヘモグロビンもOPBで影響を受けなかった。血清TM値も糖尿病ラットで上昇を示したが、OPB投与で変化はなかった。これに対しMNCVは糖尿病ラットで18%の低下を示したが、OPB投与群では65%の改善を示した。一方、Na,K-ATPase活性はOPB投与群で糖尿病群で減少して活性を約50%改善させた。血中AGEは糖尿病ラット群で約20%の増加をみた。OPB投与によりこの上昇は65%抑制された(図5)。

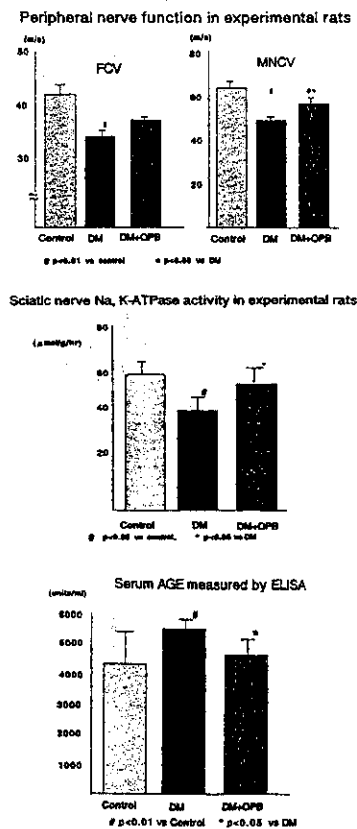


図5 OPB9195の末梢神経機能(FCV、MNCV)(上段)、Na,K-ATPase活性(中段)、血中AGE(下段)への効果

D. 考察

今回の研究からヒト糖尿病の末梢神経内で

高度のAGE蓄積がみられた。またこのAGE蓄積は有髄神経線維脱落という神経障害の重症度を示す指標と関連することが示された。このことから、糖化およびAGE蓄積が高齢者糖尿病患者でみられるニューロパチーの成因、進展のうえで重要な因子として関与していることが考えられる。しかしながら、AGEの局在は必ずしも神経線維の病変分布とは一致しないことから、AGEの神経障害誘発機構はAGEの直接的毒性によるもののみならず二次的な過程によることも考慮する必要がある。

神経内でのAGEは神経内血管内皮細胞や周皮細胞内で不規則な細胞内凝集物として蓄積することが電顕観察にて確かめられている。また有髄神経および無髄神経においても軸索およびシュワン細胞質内にも同様の蓄積を認めている。生化学的研究から、糖尿病ではミエリン蛋白、軸索骨格のチューブリン、ニューロフィラメント、アクチンなど過剰糖化を起こすことが確かめられている。このことは、糖化により神経線維自身が脱髄、軸索変性に陥ることを示唆するものである。一方、神経内血管壁糖化からは血流異常、血管硬化がもたらされ、神経内虚血、透過性亢進に陥り、それによる神経変性過程もニューロパチーの進展に寄与するものであろう。

今回のAG投与実験から、糖化機構がいかに糖尿病ラットで神経伝導速度低下をもたらすかを検討した。その結果、糖尿病ラットでは血管内皮の障害が生じていることが確認された。インスリン投与による血糖コントロールの改善では確かに伝導速度の正常化とともにNa,K-ATPase活性の上昇、さらに血中TM値の正常化をみたものの、AGでは血中TMは影響を受けなく、神経伝導速度およびNa,K-ATPase活性の改善も部分的であった。このことから、血管内皮傷害は部分的にニューロパチーの進展に関与することが示された。また、AGでは完全なニューロパチーの進展を阻止することは困難であることも示された。

OPBはAGよりもAGE生成抑制効果が4倍

強いことが示されている。今回のOPB投与による24週投与の結果糖尿病ラットでは65%のMNCV改善がみられており、以前試みたAGの長期投与実験あるいはアルドース還元酵素阻害薬投与実験でのMNCV改善効果よりも優れていた。またOPB投与群においてはAG投与と同じく血中TM値に影響を与えず、血中AGE値を減少させた。従って、今後内皮細胞傷害をも防ぐようなさらなる薬剤の開発も糖尿病ニューロパチーの治療には必要と考えられる。

E. 結論

高齢者糖尿病ニューロパチーの神経内ではAGEの過剰蓄積がみられ、ニューロパチーの進展に大きく関与することが考えられた。糖化は神経線維自体と神経内血管細小血管への作用を通じてニューロパチーを起こす可能性が考えられた。今後、高齢者糖尿病ニューロパチーの治療に糖化抑制薬の開発が極めて重要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Wada R, Sugo M, Nakano M, Yagihashi S: Only limited effects of aminoguanidine treatment on peripheral nerve function, (Na⁺,K⁺)-ATPase activity and thrombomodulin expression in streptozotocin-induced diabetic rats.

Diabetologia 42: 743-747, 1999

2) Wada R, Koyama M, Mizukami H, Odaka H, Ikeda H, Yagihashi S: Effects of long-term treatment with α-glucosidase inhibitor on the peripheral nerve function and structure in Goto-Kakizaki rats: a genetic model for type 2 diabetes. Diabetes Metab Res Rev 15: 332-337, 1999

3) Sugimoto K, Kasahara T, Yonezawa H, Yagihashi S: Peripheral nerve structure and function in long-term galactosemic dogs. Acta

Neuropathol 97: 396-376, 1999

- 4) 八木橋操六、笠島浩行：ポリオール経路と糖尿病合併症—その新しい概念と治療に向けて—。医学のあゆみ 188：557-562, 1999
- 5) 八木橋操六：AGEと神経障害。糖尿病 42：9-11, 1999
- 6) 八木橋操六：糖尿病性神経障害の発症機序と治療。糖尿病学の進歩'99, 第33集、日本糖尿病学会編、診断と治療社、東京、39-45、1999
- 7) 八木橋操六：糖尿病合併症の成因—実験病理学的立場から。ホルモンと臨床 47 (増刊号)、120-126, 1999
- 8) 八木橋操六：糖尿病性神経障害。臨床栄養 95：412-416, 1999
- 9) 山岸晋一郎、八木橋操六：糖尿病性神経障害の成因。内分泌・糖尿病科 8：400-407, 1999
- 10) 山岸晋一郎、八木橋操六：糖尿病性神経障害の臨床像とその対策。ポリニューロパチー発症メカニズム・糖尿病と血管 4：19-28, 1999

2. 学会発表

- 1) Nishizawa Y, Wada R, Ishikawa S, Yasumura K, Yagihashi S: Effets of OPB-9195, a new anti-glycation agent, on STZ-induced experimental diabetic neuropathy. Peripheral Nerve Society, La Jolla, CA, USA, July 21-25, 1999
- 2) Yagihashi S, Yamagishi S, Wada R, Tanaka M, Aze Y: Autonomic neuropathy in chronic hyperglycemic versus hypoglycemic rats. Peripheral Nerve Society, La Jolla, CA, USA, July 21-25, 1999
- 3) Wada R, Sugo M, Nishizawa Y, Yagihashi S: Effects of OPB-9195, a new anti-glycation agent, on STZ-induced experimental diabetic neuropathy. 9th Neurodiabetes Meeting, Maastricht, Sept. 25-27, 1999

G. 知的所有権の取得状況
特になし

HGFの神経系における発現・機能解析とその適用

分担研究者 船越 洋 大阪大学大学院医学系研究科腫瘍生化学研究部 助手

研究要旨

HGFは各種神経細胞に対しin vitro で神経栄養活性を示すことに加え、神経損傷時や神経変性患で発現調節を受けることが明かとなった。HGFは神経疾患に作用する新しい神経栄養因子として期待される。

A. 研究目的

HGFは初め肝細胞再生の本体として精製・ローニングされたが、神経系において特異的な発現パターンを示し、In vitroで神経栄養作用を示すことが明かとなってきた。本研究では、HGFおよびその受容体（c-Met）の発現を解析するとともに、HGFの神経栄養作用をin vitro /in vivoで解析することによりHGFおよびHLP(HGF-like protein)とその遺伝子変異体による神経疾患治療への適用性について解析する。

B. 研究方法

- (1) 末梢神経系（座骨神経）損傷時におけるHGFとその受容体c-Metの発現調節の解析。
 - (2) コンベンショナルとテトラサイクリン調節系を用いた神経特異的HGF発現トランスジェニックマウス（NS-HGF-Tg-マウス / Tet-HGF-Tg-マウス）の作成と解析。
 - (3) ALSモデルトランスジェニックマウス（ALSモデルTg-マウス）におけるHGFおよびc-Metの発現と疾患進行過程との相関関係の解析。
 - (4) HGFとc-Metの神経系における発現調節：発生過程（大脳皮質、網膜）に注目した解析。
- (**) 解析には ;RNase protection assay法,

RT-PCR法, ELISA法, Western Blot法, Southern Bot法, 免疫組織染色法, In situハイブリダイゼーション法, 初代神経細胞, 神経節 & 神経組織片培養法, 各種生化学, 遺伝子工学的的手法, 各種運動機能解析法を用いた。

C. 研究結果

- (1) 座骨神経損傷モデルにおいて脊髄ではc-Metが、またその標的である筋肉でHGFが発現調節を受けることを明らかにした。
- (2) 神経特異的にHGFを発現するマウスを作成し、HGF発現部位を解析した。またこのマウスとALSモデルTg-マウスの交配によるHGF-ALS-ダブルTg-マウスの作成を開始した。
- (3) ALSモデルTg-マウスにおいて、HGFが発症過程の筋肉で発現誘導を受けること、更に脊髄で誘導を受け中でも発症末期における誘導が非常に強いこと、またHGFは運動ニューロンに対する生存促進活性が強いことから、HGFはALSの発症・進行を遅延させる内在性因子である可能性を示唆した。
- (4) HGFとc-Metが発生過程が大脳皮質や網膜系でダイナミックな発現調節を受けること、またin vitroで神経生存、突起伸長、細胞運動促進活性を示すことを明らかにした。

D. 考察

HGFは、初め肝細胞増殖因子の本体として同定されたが、成体および発生過程の神経にc-Met/HGF受容体とともに発現しており、さらにダイナミックな発現調節を受けることが明かとなった。また初代培養神経細胞、神経節およびスライスでHGFは各種神経栄養活性（神経生存、神経突起伸長、神経細胞運動促進）活性を示すことから、HGFは神経系の発生・維持に必須な因子の1つと考えられた。さらに末梢神経損傷モデルや難治性神経変性疾患（ALS等）において発現制御をうけることから、これらの疾患の神経細胞死を阻止、神経再生を促進できる可能性が示唆される。現在HGFのin vivoにおける機能解析を進めている。

E. 結論

HGFは様々な神経栄養作用を通して神経層構造形成過程等発生過程で重要な機能を果たすことが示唆された。更にHGFは神経損傷や変性疾患で発現調節を受けることから、神経疾患に対する新しい神経栄養因子として期待される。

F. 研究発表

I. 論文発表

- 1)W. Sun, H. Funakoshi and T. Nakamura (1999) Brain Res. 851, 46-53.
- 2)K.Kosai, K.Matsumoto, H.Funakoshi et al, (1999) Hepatology, 30, 151-159.
- 3)H. Funakoshi et al, (1998) Proc Natl Acad Sci USA. 95(9):5269-74.
- 4) 船越 洋他、(1999)日本臨床、821-826、.
- 5) 船越 洋他、(1999) 脳の科学、21、537-542、.
- 6) 船越 洋他、(1998)医学のあゆみ209-213.
- 7) 船越 洋(1998)HGFの分子医学. 61-67.

II. 学会発表

- 1)H. Funakoshi, et al, (1999)北米神経科学会.

会.

- 2)W.Sun, H.Funakoshi et al,(1999) 北米神経科学会.
- 3)Y.Kishi, H.Funakoshi et al,(1999)北米神経科学会.
- 4)W.Sun, H.Funakoshi et al, (1999)日本生化学大会.
- 5)W.Sun, H.Funakoshi et al,(1999)日本神経科学会.
- 6) 船越 洋 (1999) ALS夏のシンポジウム.

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑書名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Nuclear Inclusions of the androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy. Ann Neurol , 44(2): 249-254	1998	The American Neurological Association	Li M, Miwa S, Kobayashi Y, Merry D E, Yamamoto M, Tanaka F, Doyu M, Hashizume Y, Fischbeck K H, Sobue G
Nonneural nuclear inclusions of androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy. Am J Pathol , 153(3): 695-701	1998	American Society for Investigative Pathology	Li M, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Merry D E, Tanaka F, Doyu M, Mitsuma T, Hashizume Y, Fischbeck K H, Sobue G
Tissue-specific somatic mosaicism in spinal and bulbar muscular atrophy is dependent on CAG-repeat length and Androgen receptor-gene expression level. Am J Hum Genet , 65:966-973	1999	The American Society of Human Genetics	Tanaka F, Reeves M F, Ito Y, Matsumoto M, Li M, Miwa S, Inukai A, Yamamoto M, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Terao S, Mitsuma T, Sobue G
Late onset familial amyloid polyneuropathy type I (transthyretin Met-30-associated familial amyloid polyneuropathy) unrelated to endemic focus in Japan. Clinicopathological and genetic features. Brain , 122: 1951-1962,	1999	Oxford University Press	Misu K, Hattori N, Nagamatsu M, Ikeda S, Ando Y, Nakazato M, Takei Y, Hanyu N, Usui Y, Tanaka F, Harada T, Inukai A, Hashizume Y, Sobue G
Clinicopathological features of Churg-Strauss syndrome-associated neuropathy. Brain , 122: 427-439	1999	Oxford University Press	Hattori N, Ichimura M, Nagamatsu M, Li M, Yamamoto K, Kumazawa K, Mitsuma T, Sobue G
Apoptosis and impaired axonal regeneration of sensory neurons after nerve crush in diabetic rats. NeuroReport , in press	1999	Lippincott Williams & Wilkins	Kogawa S, Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kikkawa R