

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12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13年3月

主任研究者 祖父江 元
(名古屋大学大学院医学研究科教授)

目 次

I. 総括研究報告書	1
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 祖父江元		
II. 分担研究報告書		
1. 高齢発症型ニューロパチーの特徴ー Charcot-Marie-Tooth 病 (PO 点変異) における軸索障害 祖父江元	7
2. ラット末梢神経系における Rho small GTPases family と pak の発現と 分子間相互関係 安田 斎	9
3. 糖尿病性神経障害の臨床像・発症進展におけるアルドース 還元酵素遺伝子多型及び赤血球同酸素量の関与 安田 斎	12
4. 後期糖化生成物 (AGE) 投与による末梢神経障害の解析 八木橋操六	16
5. HGF の神経系における発現・機能解析とその適用	19
III. 研究成果刊行に関する一覧表	22
IV. 研究成果の刊行物・別刷	28

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

高齢者ニューロパチーを2つの観点から検討した。

1つは、高齢者ニューロパチーの実態・病態を明らかにすることである。家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）、Charcot-Marie-Tooth病（CMT）および糖尿病性ニューロパチー（DMニューロパチー）について全国調査を交えて検討した。いずれも高齢発症例はその表現型、臨床徴候が若年発症例と異なっており、従来の疾患概念から外れる例が多く見られた。今後診断、診療の点で十分な注意が必要であると考えられた。

一方、高齢者に見られる病態関連因子としてAGEとシグナル伝達（Rac、Rho、cdc42、pakなど）を検討し、とくにAGE阻害剤が病態を改善することを明らかにした。またHGFは強い神経再生作用を有し高齢者ニューロパチーにも有用であると推定された。

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）

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若年者には希で高齢者に高頻度に見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、これら高齢者に見られるニューロパチーの実態を明らかにする。第2は治療的観点であり、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により、神経再生を促進する有効な治療法を探る。

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の観点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つは若年から高齢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）、Charcot-Marie-Tooth病（CMT）、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、

B. 研究方法

1) 高齢者ニューロパチーの病態実態解析

本年度は昨年度に引き続き家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）、CMTおよび糖尿病性ニューロパチーについて検討した。

a) FAP：全国3090カ所の神経内科、整形外科、脳神経外科にアンケート調査を行い、この調査結果を基に集計した。（祖父江、安田）

b) CMT：CMT患者のうち、電気生理学的に軸索障害性変化が認められ、P0蛋白遺伝子変異を認めた例について、臨床症候、家族歴、

神経学的所見, 末梢神経病理所見などについて検討した。(祖父江)

c) DM: 高齢者の糖尿病患者の神経障害の解析は平成11年度の経過外来を受診した65歳未満の227名と65歳以上の190名、計417名を対象とした。(安田) AR遺伝子及び赤血球AR蛋白質量と臨床像との解析については「Dyckの診断基準」(①神経症状②神経症候③神経伝導機能④知覚機能⑤自律神経機能の5項目のうち2項目以上が異常)に準拠して、また高齢者糖尿病の神経機能についての解析は「糖尿病性神経障害を考える会」の簡易診断基準(①足の自覚症状②アキレス腱反射③内踝振動覚の3項目うち2項目以上が異常)に準拠した。

2) 高齢者ニューロパチーの病態関連因子と治療応用

本年は、高齢ニューロパチーにおけるAGEの作用、シグナル伝達の加齢の影響、および再生促進効果としてのHGFの作用を検討した。

a) AGEの作用と阻害薬の効果: AGE投与は、4週齢の雄性ウイスターラット(体重160~180g)を用い、低用量AGE投与群(AGE-low)と高用量AGE投与群(AGE-high)とに分け、腹腔内注射にて16週間投与した。低用量群には同時に糖化抑制剤のアミノグアニジン(AG)(50mg/kg/day)を投与した(AGE+AG群)。対照群として正常ラットに低用量群投与と同量のタンパク量のBSAを連日投与した。定期的に血糖、体重をモニターし、合わせて実験終了時に神経伝導速度を測定した。実験終了時、ネブタール麻酔下に採血後、坐骨神経、腓腹神経を採取し、それぞれ生化学的にNa,K-ATPase活性の測定および形態学的検索に用いた。(八木橋)

b) シグナル伝達: 5週齢 adult SD rat における後根神経節ニューロン及び坐骨神経を用いて検討を行った。各酵素の組織局在はVectastatin ABC kitを用いて免疫染色することにより検討した。この際、Racのマウス・モノクローナル抗体とRho, cdc42及びpakの家

兎ポリクローナル抗体を用いた。pakとsmall GTPasesとの分子間相互関係はimmunoblotting法により解析した。pak酵素活性はpak抗体を用いて免疫沈降させて得られた複合物にヒストンH4とラベルしたATPを加えてin vitro kinase assayを行い、ヒストンH4とpakへの³²Pの取り込みを定量化することにより検討した。(安田)

c) HGF: 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)の作成と解析を行った。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。(船越)

C. 研究結果

1) 高齢者ニューロパチーの病態解析

a) FAPの特にTTRMet30異変を有する例は全国的な集計を行うと、50歳以上発症の高齢発症例は141例中59例を占めており、その発現型は発症時自律神経障害が軽微で、深部感覚障害を含む全感覚障害を示し、男性優位で家族歴に乏しく、3代の系代の中では我が国の2大集積地(熊本県荒尾、長野県小川村)と関連を有さず全国的に散在性に分布しているなど、昨年までの高齢発症FAPの検討結果を追認する結果が得られた。

b) CMT: 発端者の発症年齢は、平均51.0±12.9歳(35歳~65歳)であった。家族歴を全家系に認めたが、瞳孔異常のみ認め、ニューロパチーの明らかでなかった例、浸透率の低い例なども認めた。初発症状は4例で下肢遠位の感覚障害、筋力低下を認め、Adie瞳孔などの瞳孔異常を4例、難聴を3例、高CPK血症を5例に認めた。4家系でP0遺伝子エクソン3のコドン124番にスレオニンからメチオニンへのミスセンス変異(Thy124Met)を、2家系でエク

神経学的所見, 末梢神経病理所見などについて検討した。(祖父江)

c) DM: 高齢者の糖尿病患者の神経障害の解析は平成11年度の経過外来を受診した65歳未満の227名と65歳以上の190名、計417名を対象とした。(安田) AR遺伝子及び赤血球AR蛋白量と臨床像との解析については「Dyckの診断基準」(①神経症状②神経症候③神経伝導機能④知覚機能⑤自律神経機能の5項目のうち2項目以上が異常)に準拠して、また高齢者糖尿病の神経機能についての解析は「糖尿病性神経障害を考える会」の簡易診断基準(①足の自覚症状②アキレス腱反射③内踝振動覚の3項目うち2項目以上が異常)に準拠した。

2) 高齢者ニューロパチーの病態関連因子と治療応用

本年は、高齢ニューロパチーにおけるAGEの作用、シグナル伝達の加齢の影響、および再生促進効果としてのHGFの作用を検討した。

a) AGEの作用と阻害薬の効果: AGE投与は、4週齢の雄性ウィスターラット(体重160~180g)を用い、低用量AGE投与群(AGE-low)と高用量AGE投与群(AGE-high)とに分け、腹腔内注射にて16週間投与した。低用量群には同時に糖化抑制剤のアミノグアニジン(AG)(50mg/kg/day)を投与したAGE+AG群)。対照群として正常ラットに低用量群投与と同量のタンパク量のBSAを連日投与した。定期的に血糖、体重をモニターし、合わせて実験終了時に神経伝導速度を測定した。実験終了時、ネブタール麻酔下に採血後、坐骨神経、腓腹神経を採取し、それぞれ生化学的にNa,K-ATPase活性の測定および形態学的検索に用いた。(八木橋)

b) シグナル伝達: 5週令 adult SD ratにおける後根神経節ニューロン及び坐骨神経を用いて検討を行った。各酵素の組織局在はVectastatin ABC kitを用いて免疫染色することにより検討した。この際、Racのマウス・モノクローナル抗体とRho, cdc42及びpakの家

兎ポリクローナル抗体を用いた。pakとsmall GTPasesとの分子間相互関係はimmunoblotting法により解析した。pak酵素活性はpak抗体を用いて免疫沈降させて得られた複合物にヒストンH4とラベルしたATPを加えてin vitro kinase assayを行い、ヒストンH4とpakへの³²Pの取り込みを定量化することにより検討した。(安田)

c) HGF: 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)の作成と解析を行った。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。(船越)

C. 研究結果

1) 高齢者ニューロパチーの病態解析

a) FAPの特にTTRMet30異変を有する例は全国的な集計を行うと、50歳以上発症の高齢発症例は141例中59例を占めており、その発現型は発症時自律神経障害が軽微で、深部感覚障害を含む全感覚障害を示し、男性優位で家族歴に乏しく、3代の系代の中では我が国の2大集積地(熊本県荒尾、長野県小川村)と関連を有さず全国的に散在性に分布しているなど、昨年までの高齢発症FAPの検討結果を追認する結果が得られた。

b) CMT: 発端者の発症年齢は、平均51.0±12.9歳(35歳~65歳)であった。家族歴を全家系に認めたが、瞳孔異常のみ認め、ニューロパチーの明らかでなかった例、浸透率の低い例なども認めた。初発症状は4例で下肢遠位の感覚障害、筋力低下を認め、Adie瞳孔などの瞳孔異常を4例、難聴を3例、高CPK血症を5例に認めた。4家系でP0遺伝子エクソン3のコドン124番にスレオニンからメチオニンへのミスセンス変異(Thy124Met)を、2家系でエク

ソン2のコドン75番にアスパラギンからバリンへのミスセンス変異 (Asp75Val) を認めた。この変異は新たに見出されたものである。腓腹神経生検では有髄線維密度の低下と著明な軸索再生像がみとめられ、とくほぐし線維標本では軸索変性がみられた。

c) DM: 赤血球AR蛋白量の平均値は 11.0 ± 3.0 ng/mgHbで6-20 ng/mgHbの範囲にあった。これは既報 (伊藤ら) の健常者の平均値 10.2 ± 2.0 ng/mgHbと大差はない。一方、AR遺伝子多型については12種類のalleleが認められ、最も頻度が高いのはZ allele (24 dinucleotide repeats) 33.2%、Z-2 25.5%、Z+2 20.5%などであるが、特に神経障害との関連が高いalleleはなかった。さらに、9種類のgenotypeが存在したが、これも神経障害との関連が深いものはなかった。また、高齢者糖尿病患者の背景因子で65歳未満と65歳以上の両群で罹病期間は 18.2 ± 10.8 vs 14.7 ± 8.1 と65歳以上群で有意に長く、HbA1cは $7.34 \pm 1.03\%$ vs $7.12 \pm 1.02\%$ と65歳未満群で血糖コントロールは悪く、インスリン治療者は43.8% vs 28.6%と65歳未満群で有意に高頻度であった。神経症状・所見は自覚症状、アキレス腱反射、振動覚、起立時血圧低下、モノフィラメント圧閾値などで65歳以上でより高度の障害を認めた。これらの項目は罹病期間別に比較しても有意に不良な傾向があった。これらの両群間には血糖コントロールや血圧などに差はなかった。

2) 高齢者ニューロパチーの病態関連因子と治療応用

a) AGE投与による末梢神経障害への糖化阻害薬の効果: 坐骨神経運動神経伝導速度の測定では、BSA投与対照群が 50.6 ± 1.5 m/sであったのに比し、AGE-low群 45.7 ± 1.1 m/s、AGE-high群 43.1 ± 0.4 m/sとAGE投与群いずれも有意の低下を示した (いずれもBSA群に比し $p < 0.01$)。これに対し、AGE-AG群は 49.1 ± 0.6 m/sとAGE-low群に比し有意の改善を示した ($p < 0.01$)。Na,K-ATPase測定の結果と

して、AGE-low群、AGE-high群いずれもBSA群に比して、15%、25%の低下を示した。AG投与群はAGE-low群に比して有意の改善を示した。

b) 末梢神経におけるシグナル伝達への加齢の影響: ラット後根神経節及び坐骨神経においてRho small GTPases familyのRac, cdc42, Rho及びpakの蛋白発現を認めた。その発現量は脳及び小脳と比較して若干少なく、末梢神経系でも坐骨神経では後根神経節より少なかった。ラット後根神経節ではRho small GTPases及びpakは細胞質に濃染し、同様な染色性を示した。また、坐骨神経でもRho small GTPases及びpakはSchwann細胞と軸索に染色性を示し、同様の局在を呈した。Rac-pak, cdc42-pakの分子間相互関係が確認されたが、RhoAについてはpakとの分子間相互関係は認めなかった。また、後根神経節及び坐骨神経にて中枢神経系と同様にpak酵素活性を認めた。

c) 運動神経障害へのHGFの効果: 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-マウスでは、ALSの疾患進行の遅延、生命予後の延長を認めた。この際運動ニューロン死および運動神経軸索変性が改善した。HGFのALS進行遅延作用は、運動ニューロンへの直接作用に加え、グリア細胞の反応性増殖やグリア細胞でのタンパク質発現調節を介した作用を介していることが明らかとなった。

D. 考察

ニューロパチーの病態や表現型はおのおの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。FAPでは高齢発症群では若年発症群に比し、

昨年特異例として検討した結果が、今回全国調査によって普遍的なものであることが明らかになった。このことは、孤発性で感覚運動障害を有する例は集積地との関連がなくともFAP1の検索が必要であることを示している。P0変異を示す高齢発症をCMTでは、多くの例でAdie瞳孔、聴力障害、高CPK血症を認め、初発症状が下肢遠位の感覚障害を示した。腓腹神経病理所見では慢性の軸索障害性変化を認めた。従来CMT2型とされている症例の中にP0遺伝子異常が含まれている可能性が示唆され、高齢発症、下肢優位の感覚障害、難聴、瞳孔異常は特徴的なphenotypeと考えられた。このような例では、慢性炎症性脱髄性ニューロパチーとの鑑別も大切であると考えられた。

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。65歳を区切りとして同一罹病期間では高齢糖尿病患者の方が神経機能の低下が高度であった。この所見は糖尿病患者の神経機能が加齢により増悪しやすいことを示唆している可能性があるが、健常人にも観察される加齢の影響を単に反映している可能性が否定出来ず、対照健常者をも組み入れた検討が更に必要であると考えられる。さらに、赤血球AR蛋白量を糖尿病罹病期間10年未満の患者について検討すると、蛋白量に比例して糖尿病性神経障害の合併率が高く、赤血球AR量が反映するであろう神経組織AR量が神経障害の発症進展に関与していることを示唆するものと考えられる。一方、糖尿病性神経障害とAR遺伝子多型との間には一定の関連は認められなかった。動物モデルではAGE投与による末梢神経障害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。AGE投与が正常ラットに糖尿病ラット類似の神経伝導速度低下、Na,K-ATPase活性低下をもたらすことが判明し、血中AGEは加齢で上昇を示すことから、AGE高値が高齢糖尿病ニューロパチーの進行に影響を与えていることが示唆される。AGE投与は神経伝導速度の改善とともにNa,K-ATPase活性の上昇をもたらし、AGEによるニューロパチーを抑制することが証明された。今回、新しいシグナル系として、small GTPases とpakは、ラット末梢神経系において全ての後根神経節ニューロンと坐骨神経内のSchwann細胞と軸索に存在し、Rac/cdc42-pak signaling pathway が働いていることが実証された。糖尿病モデル動物などの末梢神経において、過剰なneurofilamentのリン酸化が報告されており、神経機能障害に関与していることが示唆されている。以上を考慮するとRac/cdc42-pak signaling pathway がneurofilamentなどを介して末梢神経障害の病態に関与している可能性がある。

HGFは、初め肝細胞増殖因子の本体として同定されたが、新しい神経栄養因子として注目されてきている。今回、HGF遺伝子の神経系への供給により運動ニューロン疾患の発症遅延、生命予後が改善されることが明らかとなった。HGFは、運動神経に留まらず、パーキンソン病やアルツハイマー病で重要とされる中脳ドーパミン作動性ニューロン、大脳皮質や海馬ニューロンに対して神経栄養作用をもつことから、今後これらの疾患にもHGFが貢献できることが明かとなっていくと期待される。

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。特に高齢者の糖尿病性ニューロパチーには、糖化抑制剤による予防・治療の可能性が示唆された。さらに、HGFは運動・感覚神経のみならず、

広くニューロパチーに応用される期待がもたれる。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た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Misu K, Hattori N, Ando Y, Ikeda S, Sobue G. Anticipation in early- but not late-onset familial amyloid polyneuropathy (TTR met 30) in Japan. *Neurology*. 55:451-2, 2000.
- 2) Yoshihara T, Yamamoto M, Doyu M, Misu K, Hattori N, Hasegawa Y, Mokuno K, Mitsuma T, Sobue G. Mutations in the peripheral myelin protein zero and connexin32 genes detected by non-isotopic RNase cleavage assay and their phenotypes in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mut*. 16:177-8, 2000.
- 3) Misu K, Yoshihara T, Skimima Y, Awai E, Yamamoto M, Hattori N, Hirayama M, Takegami T, Nakashima K, Sobue G. An axonal form of Charcot-Marie-Tooth disease showing distinctive features in association with mutations in the peripheral myelin protein zero gene (Thy124Met or Asp75Val). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 69:806-11, 2000.
- 4) Kato N, Mizuno K, Makino M et al.: Effects of 15 month aldose reductase inhibition with fidarestat on the experimental diabetic neuropathy in rats. *Diab Res Clin Pract* 50: 77-85, 2000
- 5) Wada R, Nishizawa Y, Yagihashi N et al.: Effects of OPB-9195 on the peripheral neuropathy in STZ-induced diabetes. *Eur J Clin Invest* (in press)
- 6) Yasuda H, Hirai A, Joko M, Terada M, Kawabata T, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A and Kikkawa R: Effect of aldose reductase

inhibitor on cutaneous nerve fiber length in diabetic patients. *Diabetes Care* 23:705, 2000.

7) Hidaka H, Terada M, Maegawa H, Kojima H, Koya D, Nishio Y, Haneda M, Yasuda H, Kashiwagi A and Kikkawa R: Evaluation of a new care system provided to diabetic patients in the outpatient clinic. *Intern Med* 39: 783-787, 2000.

8) Terashima T, Yasuda H, Terada M, Kogawa S, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A and Kikkawa R: Expression of Rho-family GTPases (Rac, cdc42, RhoA) and their association with p-21 activated kinase in adult rat peripheral nerve. *J Neurochem* (in press)

9) K. Nakamura, H. Funakoshi, K. Miyamoto, F. Tokunaga and T. Nakamura (2001) Molecular cloning and functional characterization of a scavenger receptor with C-type lectin, a novel member of a scavenger receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* (in press)

10) W. Sun, H. Funakoshi, K. Matsumoto and T. Nakamura (2000) A sensitive quantification method for evaluating the level of hepatocyte growth factor and c-met/HGF receptor mRNAs in the nervous system using competitive RT-PCR. *Brain Res Protoc* 5(2):190-7.

厚生省科学研究費補助金（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—Charcot-Marie-Tooth病（P0点変異）における軸索障害

分担研究者 祖父江 元 名古屋大学神経内科
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

P0点変異による Charcot-Marie-Tooth病（CMT）は従来脱髄型 CMT といわれてきたが，今回われわれは軸索障害型の P0点変異 CMT を 6家系で臨床病理学的に検討した結果，高齢発症例が多くみられ，また随伴症候として，下肢優位の神経症候，Adie 瞳孔，難聴，高 CPK 血症などの特徴が認められた．これらの結果は今後 CMT の genotype-phenotype 解析を行ううえで有効であると思われる．

A. 目的

Charcot-Marie-Tooth病 type2 は軸索障害型の遺伝性ニューロパチーで、遺伝子座位の明らかになったいくつかの遺伝的亜型が知られているが、原因遺伝子の同定されたものはない。最近、P0 遺伝子変異に伴う軸索障害 CMT が報告され、注目されている。これらの報告は従来の脱髄型、軸索障害型 CMT の概念を覆すものであったが、本邦ではまだ、軸索障害型を呈する P0 蛋白遺伝子変異の例は報告されていない。今回、我々は P0 蛋白遺伝子変異を認めた軸索障害型 CMT の 6家系を経験したので報告する。

B. 対象・方法

電気生理学的に軸索障害性変化が認められ、P0 蛋白遺伝子変異を認めた 6家系について、臨床症候、家族歴、神経学的所見、末梢神経病理所見などについて検討した。

C. 結果

1. 発端者の発症年齢は、平均 51.0 ± 12.9 歳

（35 歳～65 歳），男性 2 例，女性 4 例であった。

2. 家族歴を全家系に認めたが，娘に瞳孔異常のみ認め，ニューロパチーの明らかでなかった例，浸透率の低い例なども認めた。

3. 初発症状は 4 例で下肢遠位の感覚障害，筋力低下を認め，Adie 瞳孔などの瞳孔異常を 4 例，難聴を 3 例，高 CPK 血症を 5 例に認めた。

4. 4 家系が P0 遺伝子エクソン 3 のコドン 124 番にスレオニンからメチオニンへのミスセンス変異（Thy124Met）を認め，2 家系がエクソン 2 のコドン 75 番にアスパラギンからバリンへのミスセンス変異（Asp75Val）を認め，この変異は新たに見出されたものである。

5. 腓腹神経生検では有髄線維密度の低下と著明な軸索再生像がみとめられ，とくほぐし線維標本では軸索変性がみられた。

D. 考察・結論

P0 遺伝子変異は脱髄型である CMT1B, Dejerine-Sottas 病，congenital hypomyelination 病の原因となることが明らか

かにされている。しかし、最近軸索障害型 CMTにおいて、P0 遺伝子変異 (Ser44Phe, Thy124Met) が報告され、Jonghe らや Chapon らの報告した Thy124Met 変異においては高齢発症で、著明な感覚障害や難聴、瞳孔異常などの特徴的な所見が報告されている。今回、報告した6家系の特徴は比較的高齢発症、多くの例で Adie 瞳孔、聴力障害、高 CPK 血症を認め、初発症状が下肢遠位の感覚障害であった。腓腹神経病理所見では慢性の軸索障害性変化を認めた。

従来 CMT2 型とされている症例の中に P0 遺伝子異常が含まれている可能性が示唆され、高齢発症、下肢優位の感覚障害、難聴、瞳孔異常は特徴的な phenotype と考えられた。P0 蛋白遺伝子の点変異の部位と種類により、このような表現型の差を示す分子機構は不明であり、transgenic mouse などによる機能解析が今後重要であると考えられた。さらに、CMT 病の中でこのような点変異が占める頻度や phenotype-genotype 解析など今後重要と思われる。

F. 参考文献

1) Misu K, Hattori N, Ando Y, Ikeda S, Sobue G. Anticipation in early- but not late-onset familial amyloid polyneuropathy (TTR met 30) in Japan. *Neurology*. 55:451-2, 2000.

2) Yoshihara T, Yamamoto M, Doyu M, Misu K, Hattori N, Hasegawa Y, Mokuno K, Mitsuma T, Sobue G. Mutations in the peripheral myelin protein zero and connexin32 genes detected by non-isotopic RNase cleavage assay and their phenotypes in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *Human Mutation*. 16:177-8, 2000.

3) 翠健一郎, 吉原剛, 山本正彦, 服部直樹, 永松正明, 向井栄一郎, 武上俊彦, 祖父江元.

P0 蛋白遺伝性変異 (Thr124Met) を示し、Adie 瞳孔、軸索障害型ニューロパチー

を呈する高齢発症 Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT) の2家系. *臨床神経学*. 40:149-54, 2000.

4) Misu K, Yoshihara T, Skimima Y, Awai E, Yamamoto M, Hattori N, Hirayama M, Takegami T, Nakashima K, Sobue G.

An axonal form of Charcot-Marie-Tooth disease showing distinctive features in association with mutations in the peripheral myelin protein zero gene (Thy124Met or Asp75Val). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 69:806-811, 2000.

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

ラット末梢神経系における Rho small GTPases family と pak の発現と
分子間相互関係

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 寺島智也、寺田雅彦、吉川隆一

研究要旨

末梢神経における small GTPases (Rac, cdc42, RhoA)-p21-activated kinase (pak) signaling pathway の存在を明らかにすることを目的とした。immunoblot により後根神経節及び坐骨神経に Rac, cdc42, ThoA 及び pak が発現しており、immunohistochemistry により、これらの酵素が後根神経節細胞、坐骨神経軸索及びシュワン細胞に局在することが明らかとなった。さらに、co-immunoprecipitation 法により Rac 及び cdc42 と pak の分子間相互関係が in vivo で存在することが明らかとなった。さらに pak の自己リン酸化及びヒストン H4 を基質とするリン酸化が中枢神経のみならず後根神経節や坐骨神経などの末梢神経においても起こりうることを明らかとなった。これらの成績は Rac/cdc42-pak signaling pathway が末梢神経系に存在し細胞内情報系として機能していることを示唆している。

A. 研究目的

Rho small GTPases family には、主に Rac, cdc42, Rho が存在し、これらは神経系培養細胞において神経突起の伸長や退縮に関わっていることが報告されており、その細胞内情報伝達系の下流に位置すると考えられている p21-activated kinase (pak) も神経系培養細胞において NGF などの成長因子由来の神経突起の伸長に関わっていることが報告されている。一方、Rac/cdc42-pak signaling pathway は JNK(c-jun N-terminal kinase) や ERK(regulated kinase) などの MAPK(mitogen activated protein kinase) の上流に位置するとも言われており、MAPK は神経細胞骨格蛋白である neurofilament を基質とすることから、この pathway は神経細胞の形態変化や維持、さらには神経変性・再生時に重要な役割を果たしている可能性が考えられている。しかし末梢神経における in

vivo の検討は報告されていない。そこで、ラット末梢神経系における Rho small GTPases family (Rac, cdc42, RhoA) および、その下流に位置する pak の発現、局在、分子間相互関係および活性について in vivo で明らかにすることを目的とした。これらを明らかにすることにより糖尿病性神経障害などの末梢神経障害の成因究明と治療法開発の一助としたい。

B. 研究方法

5週令 adult SD rat における後根神経節ニューロン及び坐骨神経を用いて検討を行った。各酵素量の発現は western blot 法を用いて検討した。サンプルを RIPA buffer 中でホモジェナイズ後、遠沈して得た上清を SDS-PAGE で分離した。分離蛋白を polyvinylidene difluoride filter に移して各抗体とインキュベート後、二次抗体と反応させた。二次抗体は horseradish peroxidase-conjugated 抗家兎

免疫グロブリン又は抗マウス免疫グロブリンを用いた。各酵素の組織局在は4%paraformaldehyde, 0.05%glutaraldehyde, 0.5% picric acid を含むリン酸緩衝液を経心的に還流固定後、各組織を摘出しcryoprotection 後、凍結サンプルから10ミクロンの切片を薄切し、Vectastatin ABC kit を用いて免疫染色することにより検討した。この際、Rac のマウス・モノクローナル抗体と Rho, cdc42 及び pak の家兎ポリクローナル抗体を用いた。pak と small GTPases との分子間相互関係は、サンプルをホモジェナイズ遠心後の上清を各酵素の抗体でインキュベートした後、G-Sepharose を加えて更にインキュベート遠心後、煮沸遠心して得た沈降物を SDS-PAGE で分離後、相手側の抗体による immunoblotting 法により解析した。pak 酵素活性は pak 抗体を用いて免疫沈降させて得られた複合物にヒストン H4 とラベルした ATP を加えて in vitro kinase assay を行い、ヒストン H4 と pak への ³²P の取り込みを定量化することにより検討した。

C. 研究結果

1. Rho family of small GTPases 及び pak の発現

ラット後根神経節及び坐骨神経において Rho small GTPases family の Rac, cdc42, Rho 及び pak の蛋白発現を認めた。その発現量は大脳及び小脳と比較して若干少なく、末梢神経系でも坐骨神経では後根神経節において少なかった。

2. Rho family of small GTPases 及び pak の局在

ラット後根神経節では Rho small GTPases 及び pak は細胞質に濃染し、同様な染色性を示した。また、坐骨神経でも Rho small GTPases 及び pak は Schwann 細胞と軸索に染色性を示し、同様の局在を呈した。

3. Rho family of small GTPases 及び pak の分子間相互関係

ラット末梢神経系にて Rac-pak, cdc42-pak の分子間相互関係が確認されたが、RhoA については pak との分子間相互関係は認めなかった。

4. pak 酵素活性

後根神経節及び坐骨神経にて中枢神経系と同様に pak 酵素活性を認めた。

D. 考察

small GTPases と pak は、ラット末梢神経系において全ての後根神経節ニューロンと坐骨神経内の Schwann 細胞と軸索に存在し、Rac/cdc42-pak signaling pathway が働いていることが実証されたが、この pathway は神経系培養細胞で神経突起の伸長などの形態学的変化や JNK や ERK の活性化に関与していること、及び cyclin dependent kinase 5 (cdk5) と結合していることが報告されている。さらに、JNK, ERK, cdk5 などの kinase は neurofilament を基質とすることがわかっており、neurofilament は神経細胞の形態維持や軸索径の決定、軸索輸送の調節を行っていることから、Rac/cdc42-pak signaling pathway が下流の kinase や neurofilament に影響を与えることにより末梢神経の形態維持や変化に関与している可能性が推測される。さらに、糖尿病モデル動物などの末梢神経において、過剰な neurofilament のリン酸化が報告されており、神経機能障害に関与していることが示唆されている。以上を考慮すると Rac/cdc42-pak signaling pathway が neurofilamentなどを介して末梢神経障害の病態に関与している可能性がある。

E. 結論

末梢神経系において small GTPases (Rac, cdc42, RhoA)-p21-activated kinase (pak) signaling pathway が存在し機能しており、末梢神経障害の発症・進展に関与している可能性が否定出来ない。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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 system. *J Neurochem* 71: 2600-2606, 1998.

2) Terashima T, Yasuda H, Terada M, Kogawa S, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A and Kikkawa R: Expression of Rho-family GTPases (Rac, cdc42, RhoA) and their association with p-21 activated kinase in adult rat peripheral nerve. *J Neurochem* (in press)

2. 学会発表

1) 寺島智也、安田齋、小河秀郎、寺田雅彦、吉川隆一：ラット末梢神経系における small GTPases と pak の発現と分子間相互関係、第 41 回日本神経学会総会（松本）

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

糖尿病性神経障害の臨床像・発症進展におけるアルドース還元酵素遺伝子多型
及び赤血球同酵素量の関与

分担研究者 安田 斎 滋賀医科大学第三内科講師
分担協力者 真田 充、阪上 芳男、寺田 雅彦、吉川 隆一

研究要旨

糖尿病性神経障害の自然経過及び発症機序の検討のためには、標準化した診察及び検査手技に基づく定期的な経過観察が有用であり、当教室では平成8年9月より糖尿病経過外来を開設し「前向き」研究を行っている。今回、糖尿病性神経障害の成因に深く関与すると考えられるアルドース還元酵素 (AR) の遺伝子多型及び赤血球 AR 蛋白量と体性神経障害及び自律神経障害の臨床像及び発症進展との関連について検討したところ、糖尿病罹病期間10年未満の患者では同AR量高値の患者において糖尿病性神経障害の有病率が高かった。さらに、高齢者糖尿病患者の神経障害の特徴につき検討したところ、65歳以上の糖尿病患者では、それ以下の患者に比べて各種神経機能が悪化する傾向が観察され、高齢者糖尿病患者の神経機能は増悪しやすいことが示唆された。

A. 研究目的

糖尿病患者において合併症の発症を防ぐためには血糖の良好なコントロールが不可欠である。しかし高血糖に起因する直接の発症因子は解明されておらず、有効な治療方法についても開発されていないのが現状である。特に糖尿病性神経障害に関しては、自然経過の不明な点が多く、診断基準や評価の方法も施設によって異なり、定期的に神経機能を一定の基準で評価し、その発症及び進展様式について詳細に検討した報告は非常に少ない。そこで当教室では、平成8年9月より糖尿病経過外来を開設し、当科外来受診中の糖尿病患者に対して電気生理検査を含む各種生理検査、専門医により診察、生化学検査を各個人について1年に1回の間隔で施行し、糖尿病合併症の発症や進展について前向きに研究を進めている。今回は、糖尿病性神経障害の成因に深く関与すると考えられているAR遺伝子多

型及び赤血球同酵素量の糖尿病性神経障害の発症進展への関与及び高齢者の糖尿病性神経障害の臨床像と発症進展を解明する目的で糖尿病経過外来の患者を対象として解析した。

B. 研究方法

1. 対象患者

AR遺伝子及び赤血球AR蛋白量と臨床像の解析は平成10年度の糖尿病経過外来を受診した糖尿病患者のうち同意が得られた患者で、尿中CPR20g/日以上を有する2型糖尿病患者555名（男性299名、女性256名）（平均年齢 59 ± 12 歳）につき解析した。高齢者の糖尿病患者の神経障害の解析は平成11年度の経過外来を受診した65歳未満の227名と65歳以上の190名、計417名を対象とした。

2. 糖尿病経過外来の内容

1) 生化学的検査及び遺伝子検査のための採血・採尿、2) 糖尿病歴、自覚症状、治療内

容などについて所定の問診表による聴取、3) 診察(標準化された評価法に基づく一般身体所見・神経学的所見)、4) 一般生理検査、5) 神経機能検査(所定の医師が担当)① Schellong test、② 振動覚(C128音叉・C64音叉・TM31A)、③ 心拍変動(安静時、深呼吸時)、④ Semmes-Weinsteinモノフィラメントを用いた圧触覚検査⑤正中神経伝導速度(運動)などを施行。

3. 糖尿病性神経障害の診断

AR遺伝子及び赤血球AR蛋白量と臨床像との解析については「Dyckの診断基準」(①神経症状②神経症候③神経伝導機能④知覚機能⑤自律神経機能の5項目のうち2項目以上が異常)に準拠して、また高齢者糖尿病の神経機能についての解析は「糖尿病性神経障害を考える会」の簡易診断基準(①足の自覚症状②アキレス腱反射③内踝振動覚の3項目うち2項目以上が異常)に準拠した。

4. 赤血球アルドース還元酵素蛋白の定量

全血を凍結融解した検体を1段法サンドイッチ酵素免疫法(三菱ガス化学)を用いて測定した。

5. アルドース還元酵素遺伝子多型

患者末梢血白血球よりDNAを抽出しAR遺伝子ALR2の上流の2塩基(AC)繰り返し配列含む領域を既報のプライマーを用いてPCR法にて増幅し、その産物をアクリラマイド・ゲル電気泳動にて解析した。

C. 研究結果

1. 糖尿病患者の赤血球AR蛋白量とAR遺伝子多型

赤血球AR蛋白量の平均値は 11.0 ± 3.0 ng/mgHbで6-20ng/mgHbの範囲にあった。これは既報(伊藤ら)の健常者の平均値 10.2 ± 2.0 ng/mgHbと大差はない。一方、AR遺伝子多型については12種類のalleleが認められ、最も頻度が高いのはZ allele(24 dinucleotide repeats) 33.2%、Z-2 25.5%、Z+2 20.5%などであるが、特に神経障害との

関連が高いalleleはなかった。さらに、9種類のgenotypeが存在したが、これも神経障害との関連が深いものはなかった。

2. 糖尿病性神経障害の臨床像・発症進展と赤血球AR蛋白量・AR遺伝子多型との関係

年齢、糖尿病罹病期間、HbA1c、空腹時血糖との相関は認めなかった。また、振動覚(TM-31A)、モノフィラメントによる圧覚検査、正中運動神経・感覚神経伝導速度、F波潜時との相関も明らかではなかった。しかし、糖尿病罹病期間10年未満の患者群における糖尿病性神経障害の有病率はAR蛋白低値群20%(7ng/mgHb) 7-10ng/mgHb39.5%、10-13ng/mgHb41%、13-16ng/mgHb56.5%、AR蛋白高値群(>16ng/mgHb)75%と同蛋白量に比例して頻度が高くなった。この際、6群間の年齢、糖尿病罹病期間、HbA1cなどには有意差を認めなかった。

3. 糖尿病性自律神経障害の臨床像・発症進展と赤血球AR蛋白量・AR遺伝子多型との関係

起立時の収縮期血圧の低下度及び心拍変動係数(CVRR)(安静時及び深呼吸時)と赤血球AR蛋白量との相関は認めなかった。さらに、糖尿病罹病期間10年未満の患者群で、これらの自律神経機能障害の有病率と同蛋白量との関連は認めなかった。さらに、AR遺伝子多型と自律神経障害の有病率との関連も明らかではなかった。

4. 高齢者糖尿病患者の臨床像

背景因子で65歳未満と以上の両群で異なるのは罹病期間は 18.2 ± 10.8 vs 14.7 ± 8.1 と65歳以上群で有意に長く、HbA1cは $7.34 \pm 1.03\%$ vs $7.12 \pm 1.02\%$ と65歳未満群で血糖コントロールは悪く、インスリン治療者は43.8% vs 28.6%と65歳未満群で有意に高頻度であった。神経症状・所見は自覚症状、アキレス腱反射、振動覚、起立時血圧低下、モノフィラメント圧閾値などで65歳以上で不良であった。これらの項目は罹病期間別に比較

しても有意に不良な傾向があった。これらの両群間には血糖コントロールや血圧などに差はなかった。

D. 考察

糖尿病性神経障害の成因は未だ不明な点が多いが、ポリオール代謝異常などの有力な仮説が提唱されている。赤血球AR遺伝子多型と糖尿病合併症の発症については網膜症・腎症のみならず神経障害においても、ALR2遺伝子上流のAC繰り返し配列数に基づく一定のalleleにおいて合併症の発症頻度が高いとの報告がある。しかし、本研究の対象患者と同一の患者を対象とする腎症の検討では明らかな関連は認めなかった。本報告においても、神経障害と明らかなalleleやgenotypeとの関連は認めなかった。糖尿病性神経障害とAR遺伝子多型に関する報告は少なく、Heesomらは1型糖尿病において、Z+2 alleleが神経障害の患者で有意に高頻度であることを報告しているが、症例数は159名と我々の検討よりも少ない。2型糖尿病に関しては今回の検討も含めて関連を認めたとの報告はない。

一方、赤血球AR蛋白量と糖尿病合併症との関連については3大合併症全てにおいて蛋白量が高い患者で各合併症頻度が高いことが示唆されている。さらに、神経障害の重症度とAR蛋白量の相関を指摘する報告もあるが症例数は十分とは言いがたい。今回の多数例による検討では、伝導検査を含め実施した全ての神経機能検査において検査成績と蛋白量との相関は明らかではなかった。しかし、糖尿病罹病期間10年未満の患者について検討すると蛋白量に比例して糖尿病性神経障害の合併率が高く、赤血球AR量が反映するであろう神経組織AR量が神経障害の発症進展に関与していることを示唆するものと考えられる。一方、今回、65歳を区切りとして同一罹病期間では高齢糖尿病患者の方が神経機能の低下が高度であった。この所見は糖尿病患者の神経機能が加齢により増悪しやすいことを示唆

している可能性があるが、健常人にも観察されうる加齢の影響を単に反映している可能性が否定出来ず、対照健常者をも組み入れた検討が必要であると考えられる。

E. 結論

赤血球AR蛋白量が高値の糖尿病患者では糖尿病性神経障害の発症が早まる傾向がある。また、高齢者糖尿病患者では神経機能が増悪しやすい可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeda S, Haneda M, Yasuda H, Tachikawa T, Isshiki K, Koya D, Terada M, Hidaka H, Kashiwagi A and Kikkawa R: Diabetic nephropathy is not associated with dinucleotide repeat polymorphism upstream of aldose reductase (ALR2) gene but with erythrocyte ALR2 content in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 48:420-422, 1999.
- 2) Maegawa H, Shi K, Hidaka H, Iwai N, Nishio Y, Egawa K, Kojima H, Haneda M, Yasuda H, Nakamura Y, Kinoshita M, Kikkawa R and Kashiwagi A: The 3'-untranslated region polymorphism of the gene for skeletal muscle-specific glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1 in the type 2 diabetic Japanese population. *Diabetes* 48:1469-1472, 1999.
- 3) Yasuda H, Hirai A, Joko M, Terada M, Kawabata T, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A and Kikkawa R: Effect of aldose reductase inhibitor on cutaneous nerve fiber length in diabetic patients. *Diabetes Care* 23:705, 2000.
- 4) Hidaka H, Terada M, Maegawa H, Kojima H, Koya D, Nishio Y, Haneda M, Yasuda H, Kashiwagi A and Kikkawa R: Evaluation of a new care system provided to diabetic patients in the outpatient clinic. *Intern Med* 39: 783-787,

2000.

2. 学会発表

- 1) 小河秀郎、安田齋、寺田雅彦、日高秀樹、吉川隆一：当教室の「糖尿病経過外来」予備試験登録患者における糖尿病性神経障害の評価、第33回日本糖尿病学会近畿地方会（大阪）
- 2) 真田充、安田齋、寺田雅彦、前田憲吾、佐々木禎治、平出美和、平居昭紀、小河秀郎、吉川隆一：糖尿病患者における起立性低血圧の臨床像：「糖尿病経過外来」での検討、第50回日本自律神経学会総会（横浜）
- 3) 金一暁、安田齋、寺田雅彦、前田憲吾、平居昭紀、小河秀郎、真田充、寺島智也、吉川隆一：糖尿病性自律神経障害の経年的評価：「糖尿病経過外来」における検討、第51回日本自律神経学会総会（東京）
- 4) 寺島智也、安田齋、寺田雅彦、前田憲吾、平居昭紀、小河秀郎、真田充、金一暁、吉川隆一：糖尿病性自律神経障害と赤血球アルドース還元酵素（AR）蛋白量・AR遺伝子多型との関係：「糖尿病経過外来」における検討、第51回日本自律神経学会総会（東京）
- 5) 真田充、安田齋、寺田雅彦、前田憲吾、平居昭紀、小河秀郎、金一暁、寺島智也、吉川隆一：赤血球アルドース還元酵素蛋白高値患者の臨床的背景：自律神経障害との関連、第51回日本自律神経学会総会（東京）
- 6) 濱田可奈子、安田齋、寺島智也、真田充、寺田雅彦、前田憲吾、川端徹、川合寛道、金一暁、吉川隆一：糖尿病性神経障害の簡易診断基準の有用性：「糖尿病経過外来」における検討—第2法、第43回日本糖尿病学会年次学術総会（名古屋）

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

後期糖化生成物（AGE）投与による末梢神経障害の解析

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、西沢雄介、羽生智映子、山岸晋一朗

研究要旨

糖尿病神経障害の成因のひとつにタンパクの非酵素的糖化の最終産物である後期糖化生成物（AGE）の関与がいられている。AGEは加齢とともに組織内で増加することから、高齢者における糖尿病性ニューロパチーでとくに重要な因子とみなされる。今回、AGEがニューロパチーの成因的意義をもつのか、あるいは単に高血糖、加齢の結果の二次的産物かを検討する目的から、AGEを作成し、健常ラットに投与し、生化学的、生理学のおよび形態学的に末梢神経を検討した。その結果、AGE投与ラットは血中AGE高値とともに著しい神経伝導速度低下、Na,K-ATPase 活性低下を示した。糖化抑制剤のアミノグアニジン投与はこれらの異常を抑制した。以上の結果から、AGEが神経障害の成因的意義を有することが明らかとなり、高齢者糖尿病神経障害の成因としてAGEが重要な役割をもつことが明らかとなった。

A. 研究目的

高血糖の持続が糖尿病神経障害の成因として最も重要とされるが、高血糖がいかに末梢神経組織を傷害するかについてはいまだ不明な点が多い。現在のところ、高血糖の結果からのポリオール代謝の亢進、タンパクの非酵素的糖化（グリケーション）、酸化ストレス発生などがその機序としてあげられている。なかでもグリケーションの関与については、糖尿病の神経組織でグリケーション産物の過剰蓄積をみること、グリケーションの阻害薬でありアミノグアニジン（AG）や OPB-9195 を糖尿病ラットに投与することにより、神経伝導速度や形態変化の改善をみること、加齢とともにグリケーション過程が亢進すること、などの理由から、とくに高齢者における糖尿病性ニューロパチーの発生と関連が深いことが推定されている。そこで、今回グリケーションの最終産物である後期糖化生成物（advanced glycation end-products; AGE）がニューロパチーの成因的意義をもつか否か

を解決することを目的とし、AGEを作成し正常ラットに投与し、末梢神経での変化について解析を試みた。

B. 研究方法

1.65M D-グルコースと 2.3M 牛血清アルブミン(BSA)を37°Cで12週間インキュベートし、AGEを作成した。作成したAGEは励起波長370nm、測定波長440nmにて特異的蛍光を発することを確認し、かつ免疫化学的に既知のAGE構造体である carboxymethyllysine (CML)、imidazolone、carboxyethyllysine (CEL)、pyrraline と反応した。すなわち、これらのAGE構造体を含むことを確認した。作成したAGEを精製、透析し、エンドトキシンフリーの状態で、以下の投与実験に用いた。AGE投与は、4週齢の雄性ウィスターラット（体重160～180g）を用い、低用量AGE（low dose 20mg/kg/day）投与群（AGE-low）、高用量AGE（high dose 200mg/kg/day）（AGE-high）群とに分け、

腹腔内注射にて16週間投与した。低用量群には同時に糖化抑制剤のアミノグアニジン (AG) (50mg/kg/day) を投与した (AGE+AG群)。対照群として正常ラットに低用量群投与と同量のタンパク量のBSAを連日投与した。定期的に血糖、体重をモニターし、合わせて実験終了時に神経伝導速度を測定した。実験終了時、ネブタール麻酔下に採血後、坐骨神経、腓腹神経を採取し、それぞれ生化学的にNa,K-ATPase活性の測定および形態学的検査に用いた。

C.研究結果

体重、血糖はAGE投与群、BSA投与対照群いずれの間にも差はなかった。実験終了時血中AGE (CML)はAGE投与群で有意の増加を示した。AG投与は血中AGEに影響を与えなかった。

坐骨神経運動神経伝導速度の測定では、BSA投与対照群が 50.6 ± 1.5 m/sであったのに比し、AGE-low群 45.7 ± 1.1 m/s、AGE-high群 43.1 ± 0.4 m/sとAGE投与群いずれも有意の低下を示した (いずれもBSA群に比し $p < 0.01$)。これに対し、AGE-AG群は 49.1 ± 0.6 m/sとAGE-low群に比し有意の改善を示した ($p < 0.01$)。Na,K-ATPase測定の結果として、AGE-low群、AGE-high群いずれもBSA群に比して、15%、25%の低下を示した。AG投与群はAGE-low群に比して有意の改善を示した。一方、形態学的には有髄神経線維のついて画像解析を行い検討したが、各群間に有意の差をみなかった。

D.考察

今回の研究から、AGE投与が正常ラットに糖尿病ラット類似の神経伝導速度低下、Na,K-ATPase活性低下をもたらすことが判明した。血中AGEは糖尿病や慢性腎不全で高値を示すことから、AGE高値がニューロパチーの進行に影響を与えていることが示唆される。一方、AG投与は神経伝導速度の改善とともに

にNa,K-ATPase活性の上昇をもたらし、AGEによるニューロパチーを抑制することが証明された。しかしながら、AG投与は血中AGE上昇を抑制できなかったことから、AG作用はAGEによる細小血管、神経組織への生物学的作用を阻止することによってニューロパチーの進展を抑える可能性があることが示された。すなわち、糖尿病でのニューロパチー発症においては、高血糖の結果血中AGEの上昇、それによる神経細小血管への障害が関与することが考えられる。しかしながら、糖尿病においては神経組織においてもAGEが蓄積することから、糖尿病性ニューロパチーにおいてはAGEの神経組織への直接的影響もその成因の上で考慮せねばならないものと思われる。AGEの神経組織への直接的影響については、培養神経組織へのAGEの効果の検討や、神経内組織へのAGE直接注入などの実験によって明らかにされるものと思われる。

E.結論

糖尿病では血中AGEが高値となる。また、加齢、慢性腎不全等においても血中AGE高値がもたらされる。血中AGE高値は神経伝導速度低下、神経Na,K-ATPase活性低下を惹起することから、高齢者糖尿病ニューロパチーにおいて、AGEが重要な神経障害因子として作用していることが明らかとなった。

F.研究発表

1.論文発表

- 1) Kato N, Mizuno K, Makino M et al.: Effects of 15 month aldose reductase inhibition with fidarestat on the experimental diabetic neuropathy in rats. *Diab Res Clin Pract* 50: 77-85, 2000
- 2) Wada R, Nishizawa Y, Yagihashi N et al.: Effects of OPB-9195 on the peripheral neuropathy in STZ-induced diabetes. *Eur J Clin Invest* (in press)
- 3) Yagihashi S, Yamagishi S, Nishimura C:

utility of the transgenic mice in diabetes research. In; Chronic Complications in Diabetes, ed by Sima AAF, Harwood Academic Publ., Amsterdam, pp.71-96, 2000

2.学会発表

1) Yagihashi S, Nishizawa Y, Baba M, Takeuchi M: AGE-induced neuropathy in rats. J PNS 5: 174, 2000 (Abstract) Presented at 5th Diabetic Neuropathy Symposium of IDF Satellite in Costa Rica, Nov. 1-4, 2000

2) Yagihashi S, Nishizawa Y, Baba M, Takeuchi M: Slowing of motor nerve conduction velocity with reduced Na,K-ATPase activity in rats treated with AGE. 10th Neurodiabetes Meeting, Fuiggi, Italy, September 14-16, 2000