

200/00186A

# 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13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14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

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

名古屋大学大学院医学研究科神経内科 祖父江 元…… 1

## II. 分担研究報告書

1. 本邦におけるFAP TTR Met30の臨床・遺伝学的検討  
—高齢発症例と若年発症例の対比—

名古屋大学大学院医学研究科神経内科 祖父江 元…… 6

2. 糖尿病性神経障害の発症進展と危険因子に関する検討：アルドース還元酵素と  
加齢の関与

滋賀医科大学第三内科 安田 斎…… 8

3. 末梢神経の細胞内情報伝達系と細胞死・神経再生に関する検討：特に糖尿病性  
神経障害について

滋賀医科大学第三内科 安田 斎…… 12

4. 「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」  
—糖尿病性神経障害の成因にかかわるポリオール代謝の意義—

弘前大学医学部病理学第一講座 八木橋操六…… 16

5. 神経系におけるHGFの機能解析と新しいスカベンジャー受容体の同定  
—高齢者の神経再生治療をめざして—

大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野 船越 洋…… 19

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 21

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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と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）及び糖尿病性ニューロパチー（DN）について全国調査を交えて検討した。二大集積地と関連しない高齢発症のFAP TTR Met30の一群を報告し、高齢発症と若年発症の臨床症状は大きく異なり、前者は日本全国に散在性に分布していることを証明した。DNの cross sectional study 及び longitudinal study では、加齢がその発症に関与し、高齢者群では神経機能は低下していた。今後の予防、診断、治療の点で十分な注意が必要であると思われた。

一方、高齢者にみられる病態関連因子として、ポリオール代謝と神経栄養因子に注目した。末梢神経では、ポリオール代謝動態が神経線維成分と血管成分とでは異なり、ARの高発現がDNの発症に関与していた。また、HGFは強い軸索障害阻止作用を有し、新規スカベンジャー受容体とともに、高齢者ニューロパチーにおいて重要な機能を持ち治療的な展望が示唆された。

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）

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若年者には稀で高齢者に高頻度で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、これら高齢者にみ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

高齢者の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）、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

B. 研究方法

1) 高齢者のニューロパチーの実態と病態の解析

家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）及び糖尿病性ニューロパチー（DN）について検討した。

a) FAP：TTR Met30に関する全国アンケート調査を施行した。全国3098の病院・施設に

FAP TTR Met30の確定もしくは疑われる症例の有無について一次調査票を送付した。TTR Met30の診断は厚生省アミロイドーシス研究班の診断基準に基づいて行った。発症年齢が50歳未満の例を若年発症とし、50歳以上を高年齢発症とした。臨床症状、二大集積地との関連の有無を少なくとも過去2代までさかのぼって調査した(祖父江)。

b) DN: 417例のDM患者を対象として、神経障害に対する加齢の関与、単一の神経症状・機能の異常に対する加齢の関与、高齢者と若年者の神経症状・機能の比較を横断的に行なった。また、縦断的研究として、114例を対象として、神経機能の経年変化に対する加齢の関与と神経機能の年齢別経年変化を調査した。年齢別に30歳以上55歳以下の中年群38例、56歳から64歳までの中高年群40例、65歳以上の高齢者群36例に分けて、神経機能の経年的変化量(2000年-1996年)及び変化率(2000年-1996年/1996年(%))を群間比較した(安田)。

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ポリオール代謝および神経再生促進効果としてのHGFの作用を検討した。

a) ポリオール代謝: ヒト糖尿病患者剖検例15例、非糖尿病患者剖検例16例から、死後可及的速やかに坐骨神経および一部では腓腹神経を採取し、免疫組織化学用に10%ホルマリン固定、パラフィンブロックを作成した。また、一部ではARの蛋白発現、定量を目的として新鮮材料として凍結保存した。ARおよびSDHの免疫組織化学では、モノクローナルヒトAR抗体およびポリクローナルSDH抗体を用いてSAB法にて行った。AR蛋白の定量はELISA、ウエスタンブロット法にて行った(八木橋)。なお、ヒト剖検材料の使用に関しては日本病理学会剖検組織利用のガイドラインに準拠し、蛋白検討に限った。

b) HGF: 神経特異的HGF発現トランスジェニックマウス(HGF-Tg)と変異SOD1発現ト

ランスジェニックマウス(ALS-Tg)を交配し、ダブルTgマウスを作成、寿命、運動機能、神経細胞死、軸索変性、免疫組織染色、ウエスタンブロットや行動解析法を用いて解析した。さらに、ヒト胎盤cDNAライブラリーから新規スカベンジャー受容体を常法に従ってクローニングした(船越)。

## C. 研究結果

1) 高齢者ニューロパチーの実態と病態の解析

a) FAP: 1505施設からの返答があり、これらの施設に臨床情報とDNA診断に関する二次調査表を送付した。最終的に164家系のFAP患者が登録された。そのうちの141家系がMet30 transthyretin変異を有していた。検討する患者は1家系につき1人とした。若年発症群は82例で平均年齢は31.9歳、高齢発症群は59例で平均年齢は62.5歳であった。これらの症例につき男女比は若年発症群が1.56:1(男:女)、高齢発症群が4.36:1であった。家族歴は若年発症群で94%、高齢発症群では48%に認められた。二大集積地との関連は若年発症群は82%が有したのに対し、高齢発症群では10%で認めるのみで、出身地は日本全国に散在していた。初発症状は若年発症群では末梢神経障害が57%、自律神経症候が48%、体重減少が5%であったのに対し、高齢発症群ではそれぞれ81%、10%、0%であった。感覚は表在覚が深部覚より優位に障害された例(解離性感覚障害)が若年発症群で76%であったのに対し高齢発症群では31%であり、他の例は全感覚の障害を認めた。

b) DN:

1. 横断的研究

1) 年齢、罹病期間、臥位収縮期血圧でF値は4以上を示したが、DN危険因子としての関与は有意ではないと思われた。

2) 各単一神経症状・機能の指標に対しても年齢、罹病期間などがF値4以上を示したが相関係数は低値であり、神経機能の間の相関は強

くないと考えられた。

3)患者背景は2群間で、罹病期間は高齢者群で有意に長く、HbA1c及びインスリン治療者の比率は高齢者群で有意に高かった。自覚症状、アキレス腱反射、振動覚、Schellong test、モノフィラメント圧検査は高齢者群で有意に不良であった。

## 2. 縦断的研究

対象患者全体の4年間のHbA1c及び神経機能の推移は、HbA1cは比較的良好であり、各神経機能は観察期間前後で有意差はないもののSchellong test、CVR-R、正中MCV、F波潜時などは悪化傾向へ、正中SCV、モノフィラメント圧閾値は改善傾向を示した。また、神経機能の変化率・変化量の経年変化との相関は全てF値4以下を示し独立危険因子と考えられるものはなかった。

神経機能の年齢別経年変化では収縮期圧のみ高齢者群で有意な上昇を認めた。観察開始時における各群での糖尿病性神経障害の有病率及び各種神経機能は全体では36%で高齢者群で神経障害の頻度が高かった。各神経機能別ではSchellong test、CVR-R、MCV、F波潜時、SCVについては加齢に伴って悪化する傾向にあった。一方、神経機能の経年的変化量・変化率では、正中運動神経伝導は全ての群で悪化を認めたが、変化量は3群間で差を認めなかった。正中感覚神経伝導は全ての群で改善を認めたが、変化量は3群間で差を認めなかった。

### 2) 高齢者ニューロパチーの病態関連因子と治療応用

a) ポリオール代謝：免疫組織化学的にARは神経束内有髄神経線維シュワン細胞に一致して局在を示した。また、神経束内神経内血管壁での周皮細胞成分にも陽性を示した。神経周膜細胞の外側に強く陽性所見を示した。神経外の外膜動脈の平滑筋細胞にも強くARの陽性所見を認めた。

一方、SDHは神経束内では軸索、神経内血管周皮細胞、弱くシュワン細胞に局在を示

した。神経外膜では神経外膜動脈平滑筋に強く陽性を示した。

糖尿病患者神経では、合併症の強い症例では高度の神経線維の脱落や、神経内血管壁の肥厚像を認めるが、ARの反応はシュワン細胞、軸索膜、血管壁周皮細胞に強くみられた。ウエスタンブロットによる検討では、坐骨神経組織でAR抗体と反応する単一バンドを非糖尿病、糖尿病神経いずれでも認め、糖尿病例で反応亢進を認めた。ELISAでは、腎皮質、坐骨神経において、AR蛋白が糖尿病群で非糖尿病群に比し有意の増加を示した。

b) HGF：ALS-TgとHGF-Tgを交配すると、ALS-Tgの運動ニューロン死が抑制され、運動機能の改善、寿命延長効果が得られた。HGFは運動ニューロンへのカスパーゼ-1とiNOSの誘導を抑制し、アストロサイトにおけるグルタミン酸トランスポーター(EAAT2)のレベルを維持した。筋肉特異的プロモーターを用いてHGF発現Tgマウスを作成したところ、HGFレベルは骨格筋で非常に高く、心筋でも有意に高かったものの、他の組織ではコントロールと同等であった。

ヒト胎盤からレクチンドメインをもつ新しいタイプのスカベンジャー受容体(SRCL:SRCLI/II)をクローニングした。引き続きマウスよりSRCLホモログのクローニングに成功した。SRCLはスカベンジャー受容体として細菌結合能を示し、神経変性疾患に重要な分子と結合能をもつことを明らかとした。

## D. 考察

本邦において従来から報告されている二大集積地におけるFAP TTR Met30は50歳未満の発症、高い浸透率、病初期から高度な自律神経症状、表在覚優位の障害が大多数の症例に認められたのに対し、全国に散在するFAP TTR Met30は50歳以上の発症、低い浸透率、病初期には目立たない自律神経症状、全知覚低下を特徴としていた。同じMet30 transthyretin変異で若年発症例と高齢発症が

大きく異なる原因としては環境因子、遺伝学的因子等が考えられるが、解明には今後の研究が待たれる。

DNの検討においては、1996年の糖尿病経過外来に関するcross sectional studyでは簡易診断基準によって診断したDNの危険因子として年齢が弱い相関を示したものの有意とは断定しがたかった。また4年間のlongitudinal studyにおいても各神経機能の変化に対する年齢の寄与についてstepwise regression analysisでは明らかではなかった。そこで、3群に分けて年齢別に神経機能の変化を比較したが、概ね高齢者群で変化量及び変化率共に小であり、高齢者では神経機能の進展度が若年者に比べて低い可能性があるが、症例を重ねて検討する意義はあるかも知れない。今回、神経機能の経年変化に対する年齢の寄与や年齢別の神経機能の変化が群間で明らかではなかったことの一因として、4年間の観察期間が短いことが上げられる。観察患者全体では多くの神経機能は緩やかではあるが悪化の方向に動く一方、正中感覚神経伝導速度やモノフィラメント圧閾値はむしろ改善の方向に動いており、血糖コントロールレベルが神経障害の増悪または改善の境界値になっている可能性がある。

ポリオール代謝では、主要酵素ARがヒト末梢神経組織に局在し、糖尿病神経で蛋白発現の亢進がみられることが証明された。ARの局在は神経束内有髄神経シュワン細胞、神経内血管周皮細胞にみられた。神経内ではSDH反応は僅かであり、高血糖では容易にソルビトール蓄積が起こることが推測された。また、神経外での神経外膜動脈の平滑筋層ではAR、SDH双方の発現がみられ、ポリオール代謝も神経線維と血管壁では異なった動態にあるものと考えられる。ヒト糖尿病での神経ではAR発現の亢進および蛋白量の増加を認め、合併症の強い例で発現の亢進がみられた。神経障害では神経支配の血流障害や細小血管障害が虚血、透過性亢進をもたらす、末梢神経の

機能的、形態学的異常をもたらす可能性もあることから、血管壁ではAR、SDHで触媒されるポリオール代謝の二つのステップが重要であることを示している。また、最近のヒトARを過剰発現するトランスジェニックマウスやARノックアウトマウスの研究から、AR発現がDNの成因的役割をもつことが明らかになっている。

HGFがALSの病因遺伝子を発現するALS-Tgに対する治療効果をもつことを、神経特異的HGF-Tgを用い明らかとした。HGFを長期間ALS-Tg神経細胞へ供給すると、ALS-Tgマウスの運動神経細胞死と軸索変性が抑制され、寿命が延長した。この効果はヒトに換算すると約6年に相当した。一方、ミクログリアに発現する新しいスカベンジャー受容体(SRCL)のクローニングに成功し、末梢神経障害において重要な機能をもつことが示唆された。

## E. 結論

高齢者ニューロパチーのうち、FAPでは若年者とは異なる特有の臨床病態と患者分布がみられた。DNでは重症度は加齢に伴って高度になるが、血糖コントロールの影響は神経機能の種類により異なり、さらに検討を要する。また、DNの発症・進展にはAR発現の亢進や細胞種特異的なポリオール代謝の活性化が関与すると考えられた。HGF及び新規スカベンジャー受容体関連分子は軸索障害を抑制し、高齢者末梢神経損傷・ニューロパチーの治療薬として期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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. 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* 1999; 122: 1951-1962.
2. 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* 2000; 55: 451-452.
  3. Hidaka H, Terada M, Maegawa H, Kojima H, Koya D, Nishio Y, Haneda M, Yasuda H, Kashiwagi A, Kikkawa R. Evaluation of a new care system provided to diabetic patients in the outpatient clinic. *Intern Med* 2000; 39: 783-787.
  4. Koike H, Mori K, Misu K, Hattori N, Ito H, Hirayama M, Sobue G. Painful alcoholic polyneuropathy with predominant small-fiber loss and normal thiamine status. *Neurology* 2001; 56: 1727-1732.
  5. Koike H, Misu K, Hattori N, Ito S, Ichimura M, Ito H, Hirayama M, Nagamatsu M, Sasaki I, Sobue G. Postgastrectomy polyneuropathy with thiamine deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 71: 357-362.
  6. Mori K, Koike H, Misu K, Hattori N, Ichimura M, Sobue G. Spinal cord magnetic resonance imaging demonstrates sensory neuronal involvement and clinical severity in neuronopathy associated with Sogren's syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 71: 488-492.
  7. Maeda S, Haneda M, Guo B, Koya D, Hayashi K, Isshiki K, Yasuda H, Kashiwagi A, Kikkawa R. Dinucleotide repeat polymorphism of matrix metalloproteinase -9 gene is associated with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2001; 60: 1428-1434.
  8. Kasajima H, Yamagishi SI, Sugai S, Yagihashi N, Yagihashi S. Enhanced in situ expression of aldose reductase in peripheral nerve and renal glomeruli in diabetic patients. *Virchows Arch* 2001; 439: 46-54.
  9. Yagihashi S, Yamagishi SI, Wada R, Baba M, Hohman TC, Yabe-Nishimura C, Kokai Y. Neuropathy in diabetic mice overexpressing human aldose reductase and effects of aldose reductase inhibitor. *Brain* 2001; 124: 2448-2458.
  10. Funakoshi H, Nakamura T. Identification of HGF-like protein as a novel neurotrophic factor for avian dorsal root ganglion sensory neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 606-612.
  11. Nakamura K, Funakoshi H, Tokunaga F, Nakamura T. Molecular cloning of a mouse scavenger receptor with C-type lectin (SRCL)(1), a novel member of the scavenger receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1522: 53-58.
  12. Nakamura K, Funakoshi H, Miyamoto K, Tokunaga F, Nakamura T. Molecular cloning and functional characterization of a human scavenger receptor with C-type lectin (SRCL), a novel member of a scavenger receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 1028-1035.
  13. Mori K, Hattori N, Sugiura M, Koike H, Misu K, Ichimura M, Hirayama M, Sobue G. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy presenting with features of GBS. *Neurology* in press.
  14. Funakoshi H, Yonemasu T, Nakano T, Matsumoto K, Nakamura T. Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons. *J Neurosci Res* in press.
  15. Kishi YA, Funakoshi H, Matsumoto K, Nakamura T. Molecular cloning, expression and partial characterization of Xksy, a Xenopus member of the Sky family of receptor tyrosine kinases. *Gene* in press.

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）

分担研究報告書

本邦における FAP TTR Met30 の臨床・遺伝学的検討

－ 高齢発症例と若年発症例の対比 －

分担研究者 祖父江 元 名古屋大学大学院医学研究科神経内科 教授  
研究協力者 小池春樹、翠 健一郎、飯島正博、杉浦 真、森 恵子、  
服部直樹、山本正彦

研究要旨

家族性アミロイドポリニューロパチー I 型 (FAP TTR Met30) は従来、本邦においては長野県小川村と熊本県荒尾市の二大集積地との関連で報告されてきた。二大集積地での FAP TTR Met30 は、若年 (20-30 歳代) での発症、高い浸透率、高度な自律神経症状、表在覚優位の障害を特徴としている。我々は、二大集積地と関連しない高齢発症 (50 歳以上) の FAP TTR Met30 の一群を報告し、集積地以外にも FAP TTR Met30 が散在性に存在することを明らかにした。さらに、全国規模のアンケート調査を施行し、本邦における FAP TTR Met30 の臨床・遺伝学的検討を行い、高齢発症例と若年発症例の臨床症状は大きく異なり、前者は日本全国に散在性に分布し、後者は二大集積地に集積していることを証明した。

A. 研究目的

家族性アミロイドポリニューロパチー I 型 (FAP TTR Met30) は従来、本邦においては長野県小川村と熊本県荒尾市の二大集積地との関連で報告されてきた。二大集積地での FAP TTR Met30 は、若年 (20-30 歳代) での発症、高い浸透率、高度な自律神経症状、表在覚優位の障害を特徴としている。我々は、二大集積地と関連しない高齢発症 (50 歳以上) の FAP TTR Met30 の一群を報告し、集積地以外にも FAP TTR Met30 が散在性に存在することを明らかにした。さらに、全国規模のアンケート調査を施行し、本邦における FAP TTR Met30 の臨床・遺伝学的検討し、高齢発症例と若年発症例の対比をする。

B. 研究方法

FAP TTR Met30 に関する全国アンケート調査を施行した。全国 3098 の病院・施設に FAP TTR Met30 の確定もしくは疑われる症例の有無について一次調査票を送付した。FAP TTR Met30 の診断は厚生省アミロイドーシス研究

班の診断基準に基づいて行った。1505 施設からの返答があり、これらの施設に臨床情報と DNA 診断に関する二次調査表を送付した。最終的に 164 家系の FAP 患者が登録された。そのうちの 141 家系が Met30 transthyretin 変異を有していた。検討する患者は 1 家系につき 1 人とした。発症年齢が 50 歳未満の例を若年発症とし、50 歳以上を高齢発症とした。若年発症群は 82 例で平均年齢は 31.9 歳、高齢発症群は 59 例で平均年齢は 62.5 歳であった。これらの症例につき臨床症状、二大集積地 (長野県小川村、熊本県荒尾市) との関連の有無を少なくとも過去 2 代までさかのぼって調査した。

C. 研究結果

男女比は若年発症群が 1.56 : 1 (男 : 女)、高齢発症群が 4.36 : 1 であった。家族歴は若年発症群で 94%、高齢発症群では 48% に認められた。二大集積地との関連は若年発症群は 82% が有したのに対し、高齢発症群では 10% で認めるのみで、出身地は日本全国に散在していた。初発症状は若年発症群では末梢神経障害

が57%、自律神経症候が48%、体重減少が5%であったのに対し、高齢発症群ではそれぞれ81%、10%、0%であった。神経症状に関しては、両群とも対称性で下肢優位の多発神経炎を呈した。感覚は表在覚が深部覚より優位に障害された例（解離性感覚障害）が若年発症群で76%であったのに対し高齢発症群では31%であり、他の例は全感覚の障害を認めた。

集積地と関連した症例は大多数が若年発症群に属したが、6例は50歳以上の発症であった。この一群は1例の男性と5例の女性からなり、4例は家族歴を有した。初発症状は2例が末梢神経障害、3例が自律神経症状、1例が眼症状であった。解離性感覚障害を4例に認め、5例で重度の自律神経症状を認めた。心臓ペースメーカー埋め込みの既往を3例で認めた。

#### D. 考察

本邦において従来から報告されている二大集積地におけるFAP TTR Met30は50歳未満の発症、高い浸透率、病初期から高度な自律神経症状、表在覚優位の障害が大多数の症例に認められたのに対し、全国に散在するFAP TTR Met30は50歳以上の発症、低い浸透率、病初期には目立たない自律神経症状、全知覚低下を特徴としていた。同じMet30 transthyretin変異で若年発症例と高齢は症例が大きく異なる原因としては環境因子、遺伝学的因子等が考えられるが、解明には今後の研究が待たれる。

#### E. 結論

全国規模のアンケート調査を施行し、本邦におけるFAP TTR Met30の臨床・遺伝学的検討を行なった。従来の若年発症例では二大集積地が認められるのに対し、高齢発症例は全国に散在性に分布していた。臨床症状も両群の間には大きな差異が認められた。

#### G. 研究論文発表

1. 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. 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*. 1999; 122: 1951-1962

2. 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*. 2000; 55: 451-452.

3. Sobue G, Nakao N, Murakami K, Yasuda T, Sahashi K, Mitsuma T, Sasaki H, Sasaki Y, Takahashi A. Type I familial amyloid polyneuropathy. A pathological study of the peripheral nervous system. *Brain*. 1990; 113: 903-19.

5. Koike H, Mori K, Misu K, Hattori N, Ito H, Hirayama M, Sobue G. Painful alcoholic polyneuropathy with predominant small-fiber loss and normal thiamine status. *Neurology*. 2001; 56: 1727-1732.

6. Koike H, Misu K, Hattori N, Ito S, Ichimura M, Ito H, Hirayama M, Nagamatsu M, Sasaki I, Sobue G. Postgastrectomy polyneuropathy with thiamine deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001; 71: 357-362.

7. Mori K, Koike H, Misu K, Hattori N, Ichimura M, Sobue G. Spinal cord magnetic resonance imaging demonstrates sensory neuronal involvement and clinical severity in neuropathy associated with Sogren's syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001; 71: 488-492.

8. Mori K, Hattori N, Sugiura M, Koike H, Misu K, Ichimura M, Hirayama M, Sobue G. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy presenting with features of GBS. *Neurology* in press.

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発症進展と危険因子に関する検討：アルドース還元酵素と加齢の関与

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、藤谷昌司、平居昭紀、阪上芳男、前田憲吾、  
寺田雅彦、柏木厚典、吉川隆一

### 研究要旨

糖尿病性神経障害の発症進展に対するアルドース還元酵素(AR)の遺伝子多型・赤血球AR蛋白量及び加齢の影響について糖尿病経過外来受診患者を対象に検討した。糖尿病罹病期間10年未満の患者ではAR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、真皮神経長は赤血球AR蛋白高値の患者が低値の患者に比べて有意に短くであり、ARが神経病変の発症進展にかかわっていることを示唆するものと考えられた。一方、神経障害発症に対する加齢の影響を検討するため、横断的及び縦断的検討を行い、DNは加齢に伴って、重症化するが、経年的な進展は年齢の影響を受けにくいことが示唆された。さらに、血糖コントロールがHbA1cで7.1%強では4年間の観察で神経機能は悪化するものと改善するものが存在した。

### A. 研究目的

糖尿病患者数は現在も増加の一途を辿っているが、糖尿病治療の進歩に伴い患者寿命の延長が推測される。これは高齢化社会の到来と相俟って高齢者糖尿病患者の増加を意味し、高齢者における治療法の確立が今後ますます重要となることを示唆している。特に、神経障害は罹病期間や血糖コントロール以外に加齢がその発症・伸展に深く関与していると思われるが、高齢糖尿病患者の神経障害の実態については明らかではない。そこで、当教室において標準化した方法で経年的に実施している糖尿病経過外来受診患者を対象に、まず糖尿病性神経障害(DN)の発症進展につき、特に加齢の影響について包括的に検討した。さらに、DNの成因に深く関与すると考えられているアルドース還元酵素(AR)の役割を臨床的に検証するためAR遺伝子多型、赤血球同酵素量及び皮膚神経線維長とDN発症進展への関与につき検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 糖尿病性神経障害の発症進展に対する加齢の影響

##### 1) cross sectional study

1999年に当科で経年的に実施している

「糖尿病経過外来」を1999年に受診した417例の糖尿病患者を対象とした。まず、年齢を含む危険因子になりうると思われる因子13項目に関してDNの有無(簡易診断基準を用いた)への関与につきStepwise regressionを用いて解析した。次に、神経症状・機能の各項目(自覚症状、振動覚、アキレス腱反射、起立時血圧変化、CV-RR、神経伝導検査(正中神経CMAP、SNAP、F-wave))とDNの有無につきStepwise regressionを用いて解析した。さらに、65歳未満(若年者群)と以上(高齢者群)の2群間で自覚症状、アキレス腱反射、振動覚、モノフィラメント(MF)圧、CVR-R、Schellong test、正中神経伝導検査(神経伝導検査、F波最短潜時、F波出現率)などにつき比較検討した。

##### 2) longitudinal study

1996年度から2000年度までの4年間継続して「糖尿病経過外来」を受診した2型糖尿病患者のうち降圧薬及びAR阻害薬(ARI)を服用していない114例を対象とした。まず、正中神経伝導速度(MCV, SCV)、F波潜時及びCVR-Rの4年間の変化量・変化率における加齢を含む13項目の独立危険因子としての役割をStepwise regression

analysis で解析した。次に、対象患者を年齢別に 30 歳以上 55 歳以下中年(M)群 38 例、56 歳から 64 歳までの中高年(MO)群 40 例、65 歳以上の高年(O)群 36 例に分けて神経機能の経年的変化量(2000 年-1996 年)及び変化率(2000 年-1996 年/1996 年(%))を群間比較した。

## 2. 糖尿病性神経障害の発症進展に対する AR の関与

尿中 CPR20g/日以上を有する 2 型糖尿病患者 481 名につき解析。DN の診断は Dyck の診断基準に準拠。赤血球 AR 蛋白は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を用いて測定。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、その産物を電気泳動にて解析した。また、糖尿病患者 32 人と健常者 12 人の腓腹部皮膚生検して処理した切片を PGP9.5 1 次抗体とビオチン化 2 次抗体、さらに ABC キットを加えて反応させ、DAB または FITC にて発色。レーザードップラー顕微鏡を用いて IBAS-1 にて形態計測した。

### C. 結果

#### 1) Cross sectional study

年齢、罹病期間、臥位収縮期血圧で F 値は 4 以上を示したが、相関係数は低く DN 危険因子としては有意ではないと思われた。各単一神経症状・機能に対しても年齢、罹病期間などが F 値 4 以上を示したが回帰分析による相関係数は低く神経機能との相関は強くないと考えられた。年齢別比較では罹病期間は高齢者群で有意に長く、HbA1c 及びインスリン治療者の比率は高齢者群で有意に高かった。自覚症状、アキレス腱反射、振動覚、Schellong test、Mf 圧検査は高齢者群で有意に不良であり、これらの項目は罹病期間を 10 年未満、10-20 年、20 年以上に分けて比較しても、概ね高齢者群で不良であり、各項目共少なくとも 1 つの罹病期間では高齢者で有意に不良であった。

#### 2) longitudinal study

対象患者全体の 4 年間の HbA1c 及び神経機能の推移は、HbA1c は 7.3%から 7.1%と

安定して比較的良好であり、各神経機能は観察期間前後で有意差はないものの Schellong test、CVR-R、正中 MCV、F 波潜時などは悪化傾向へ、正中 SCV、Mf 圧閾値は改善傾向を示した。検討した因子には神経機能の変化率・変化量の経年変化との相関は全て F 値 4 以下を示し独立危険因子と考えられるものはなかった。神経機能の年齢別経年変化の比較において、観察開始時(1996 年度)の背景因子としては収縮期圧のみ 0 群で有意な上昇を認めたが、各群間で糖尿病罹病期間、血糖コントロール、網膜症、腎症などに差は認めなかった。観察開始時における DN の有病率は 0 : MO : M 群 = 44% : 38% : 26% であり、高齢者で高頻度であり、各神経機能別でも、Mf 圧で高齢者で有意な閾値上昇を認め、Schellong test、CVR-R、MCV、F 波潜時、SCV についても加齢に伴って悪化する傾向にあった。神経機能の経年変化の比較では、正中 MCV は全ての群で悪化を認めたが変化量(変化率)共に 3 群間で差を認めなかった。一方、正中 SCV 全ての群で改善を認めたが変化量(変化率)は 3 群間で差を認めなかった。正中運動神経 F 波潜時変化量(変化率)は M 群及び MO 群で延長を、0 群で短縮を認めたが 3 群間で有意差は認めなかった。その他、CVR-R は 3 群共に悪化の傾向、Schellong test、Mf 圧閾値は概ね改善の傾向を示したが、3 群間では差を認めなかった。

## 2. 糖尿病性神経障害の発症進展に対する AR の関与

赤血球 AR 蛋白量の平均値は  $11.0 \pm 3.0$  ng/mgHb で 6-20 ng/mgHb の範囲にあった。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 48.8%、Z-2 53.7%、Z+2 45.3% などであり、9 種類の genotype のうち Z/Z+2 が 33.9% と特に低い頻度を示した。DN の臨床像と赤血球 AR 蛋白量・AR 遺伝子多型との関係については明らかではなかったが、糖尿病罹病期間 10 年未満の患者群における DN の有病率は同蛋白量に比例して頻度が高くなった。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 遺伝子多型との関連は明らかではなかった。赤血球 AR 蛋白高値群 (>10.8 ng/mgHb) では

低値群 (<10.8) に比べて真皮神経長は値を示した。

#### D. 考察

今回の検討においては、cross sectional study では DN の危険因子として年齢が弱い相関を示したものの有意とは断定しなかった。また4年間の longitudinal study においても各神経機能の変化に対する年齢の寄与について stepwise regression analysis では明らかではなかった。そこで、3群に分けて年齢別に神経機能の変化を比較したが、概ね高齢者群で変化量及び変化率共に小であり、高齢者では神経機能の進展度が若年者に比べて低い可能性があるが今回の検討では有意差を示すまでには至らずさらに症例を重ねて検討する意義はあるかも知れない。

今回、神経機能の経年変化に対する年齢の寄与や年齢別の神経機能の変化が群間で明らかではなかったことの一因として4年間の観察期間が短いことが上げられるかも知れない。さらに、この期間の平均 HbA1c は各群共に 7%強であり、概ねコントロール良好と考えられ、この血糖コントロールレベルでは神経機能の変化が起こりにくい可能性がある。実際、観察患者全体では多くの神経機能は緩やかではあるが悪化の方向に動く一方、正中感覚神経伝導速度やモノフィラメント圧閾値などはむしろ改善の方向に動いており、この程度の血糖コントロールが神経障害の進展に増悪または改善の境界値になっている可能性があると考えられる。DN の成因において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。実際、他の合併症のみならず神経障害の発症については、ALR2 遺伝子上流の AC 繰り返し配列数に基づく一定の allele において発症頻度が高いとの報告があり、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。本報告においては Z(Z+2) genotype の頻度が 33.9%と他より低かった。この意義については不明な点が多いが、DN と AR 遺伝子多型に関する報告は少なく、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。

#### E. 結論

DN の重症度は加齢に伴って高度になるが、進展速度は加齢の影響は余り受けないと考えられる。また、血糖コントロールの神経機能に与える影響は神経機能の種類により異なることが示唆されたがさらに検討を要する。糖尿病性神経障害の発症進展の指標として赤血球 AR 蛋白量が有用であると考えられる。

#### 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. Hirai A, Yasuda H, Joko M, Maeda T, Kikkawa R: Evaluation of diabetic neuropathy through the quantitation of cutaneous nerves. *J Neurol Sci* 172:55-62, 2000.

4. Suzuki E, Kashiwagi A, Hidaka H, Maegawa H, Nishio Y, Kojima H, Haneda M, Yasuda H, Morikawa S, Inubushi T, Kikkawa R: H- and P-magnetic resonance spectroscopy and imaging as a new diagnostic tool to evaluate neuropathic foot ulcers in type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 43:165-172, 2000.

5. Suzuki E, Kashiwagi A, Nishio Y, Kojima H, Maegawa H, Haneda M, Yasuda H, Morikawa S, Inubushi T and Kikkawa: Usefulness of waveform analysis of popliteal artery in Type II diabetic

patients using gated magnetic resonance 2D-cine-PC imaging and 31P spectroscopy. *Diabetologia* 43:1031-1038, 2000.

6. Yasuda H, Hirai A, Joko M, Terada M, Kawabata T, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A, 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. 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.

9. Maeda S, Haneda M, Guo B, Koya D, Hayashi K, Isshiki K, Yasuda H, Kashiwagi A and Kikkawa R: Dinucleotide repeat polymorphism of matrix metalloproteinase-9 gene is associated with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 60:1428-1434, 2001.

## 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）

7. 阪上芳男、安田齋、濱田可奈子、前田憲吾、川合寛道、真田充、寺島智也、金一暁、藤田昌司、吉川隆一：高齢者糖尿病患者における糖尿病性神経障害の特徴、第37回日本糖尿病学会近畿地方会（京都）

8. 藤田昌司、安田齋、阪上芳男、前田憲吾、吉川隆一：高齢糖尿病患者の神経機能の特徴：経年的変化の解析、第38回日本糖尿病学会近畿地方会（大阪）

末梢神経の細胞内情報伝達系と細胞死・神経再生に関する検討：特に糖尿病性神経障害について

分担研究者 安田齋、滋賀医科大学第三内科講師

分担協力者 寺島智也、小河秀郎、寺田雅彦、柏木厚典、吉川隆一

## 研究要旨

末梢神経障害の病態を検討するため、末梢神経の細胞内情報系としての small GTPases (Rac, cdc42, RhoA)-p21-activated kinase (pak) signaling pathway の存在を明らかにし、さらに糖尿病性神経障害における神経再生能と糖尿病における傷害に対する神経細胞の被侵襲性及び、これらに対する MAP kinase の関与とプロスタグランジン E1 (PGE1) 製剤の治療効果について糖尿病ラットを用いて検討した。前者の検討では後根神経節神経細胞及び坐骨神経軸索及びシュワン細胞に Rac, cdc42, RhoA 及び pak が発現しており、Rac 及び cdc42 と pak の分子間相互関係が *in vivo* で存在すること、さらに pak のリン酸化が末梢神経においても起こっていることを明らかにした。また、糖尿病性神経障害における坐骨神経挫滅後の神経線維の伸長は糖尿病で遅延し、これは PGE1 製剤により改善した。同時に糖尿病群の後根神経節で低下した cAMP 含量と亢進した JNK 活性は同剤投与により是正された。一方、挫滅後、糖尿病群で観察された神経細胞のアポトーシスも PGE1 治療で阻止された。

## A. 研究目的

Rac, cdc42, RhoA は Rho small GTPases family に属し、神経培養細胞の突起の伸長や退縮に関わっていると考えられ、その細胞内情報伝達系の下流に位置すると考えられる p21-activated kinase (pak) も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 neurofilament の基質となる MAPK (mitogen activated protein kinase) の上流に位置するとも言われており、この pathway は神経細胞の形態変化や維持のみならず神経変性・再生時に重要な役割を果たしている可能性が考えられるが、末梢神経での *in vivo* の検討は報告されていない。

一方、糖尿病モデル動物を用いた研究では糖尿病において軸索障害後の再生能が低下していることが示されている。しかし、糖尿病モデル動物の神経細胞が軸索障害にたいして

脆弱性を持つか否かの検討はない。そこで、ストレプトゾシン (STZ) 糖尿病ラットの坐骨神経挫滅障害で後根神経節細胞 (DRG) に細胞死が起こるか、軸索再生能が低下するか否かについて検討を行った。更に、糖尿病性神経障害 (DN) に有効とされるプロスタグランジン E1 (PGE1) 製剤の坐骨神経挫滅後 DRG の細胞死及び軸索再生能に対する有効性についても検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. Rho small GTPases と pak の局在と意義

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

キューベート後、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 $\mu$ m 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。

## 2. 糖尿病ラット坐骨神経挫滅後の神経細胞死と神経再生

6 週齢 SD 系ラットに STZ 55mg/kg を尾静脈内投与し糖尿病ラットを作製した。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 10  $\mu$ g/kg/日を毎日経口投与した。糖尿病作製後 28 日目にペントバルビタール 35mg/kg 麻酔下で右坐骨神経を露出し鑷子にて 30 秒間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。坐骨神経挫滅後 7 日目にペントバルビタール 35mg/kg 麻酔下で右坐骨神経を露出し pinch reflex を用いて知覚神経軸索再生先端を決定し、挫滅部位と軸索再生先端との距離を再生距離とした。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 匹ずつをエーテル麻

酔後断頭したのち L4、L5 DRG を採取し、これを RIPA バッファーにて可溶化した。それぞれの蛋白 50  $\mu$ g を SDS-PAGE にて分離し PVDF 膜に転写した。この膜を抗総 JNK (c-jun N-terminal kinase) 抗体、抗リン酸化 JNK 抗体、抗リン酸化 c-jun 抗体を用いてプロットした。一方、L4、L5 DRG を 0.1M HCl 内で破碎しこれを 15 分ボイルし 15000 rpm で 20 分遠心分離した上清を測定に用いた。サイクリック AMP 含量測定はラジオイムノアッセイキット (ヤマサ醤油) を用いて行った。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経心室灌流固定し L5DRG を採取した。これを Tissue-tek 内に凍結包埋し cryostat にて 10  $\mu$ m 厚の切片を作製し各抗体を用いて免疫染色を行った。DRG 細胞死は TUNEL 法を用いて検討した。

## C. 研究結果

### 1. Rho small GTPases と pak の局在と意義

ラット DRG 及び坐骨神経において Rho small GTPases family の Rac, cdc42, RhoA 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 DRG において少なかった。組織学的には、DRG の Rho small GTPases 及び pak は細胞質に濃染し、同様な染色性を示した。坐骨神経の 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。一方、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。さらに、DRG 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。

### 2. 糖尿病ラット坐骨神経挫滅後の神経細胞死と神経再生

坐骨神経挫滅後 7 日間の知覚神経再生距離は対照ラットに比し DM 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 0 では対照ラット、DM ラット、PGE1 ラッ

トいずれの DRG においても細胞死を認めなかった。day 1 では糖尿病ラットの DRG で  $38.1 \pm 3.2\%$  の神経細胞細胞死を認めたのに対して他のラットでは細胞死を認めなかった。day 7 でも DM ラットの DRG では  $34.1 \pm 1.8\%$  の細胞死を認めたが他のラットでは認めなかった。DRGcAMP 含量は、day 0 では対照ラットに比し DM 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 DM ラットでは有意な増加を認めなかった。全てのラット DRG において day 1 では day 0 に比し有意に JNK/c-jun のリン酸化が亢進していた。しかし、day 7 では、DM 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

本研究により small GTPases と pak は、ラット末梢神経系において全ての DRG 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。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 (NF) を基質とすることがわかっており、NF 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 NF 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、DM モデル動物などの末梢神経において、過剰な NF 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 NF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。

一方、DM 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 の細胞死は認めなかったのに対し、DM ラットでは挫滅 1 日後より DRG の一部に細胞死が認められたが、PGE1 製剤治療により改善された。in vitro では JNK/c-jun の活性化の調節が神経細胞死および軸索の延長に重要であることが示されているが、今回の検討では、挫滅 1 日後では全てのラット DRG において JNK/c-jun のリン酸化が亢進しているのに対し細胞死は DM ラットのみ認められたことから、JNK/c-jun リン酸化のみでは細胞死を誘導しないと考えられた。また、挫滅 7 日後では DM 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推測された。一方、神経細胞 cAMP は神経細胞の生存、軸索延長に重要とされているが、今回の検討では、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 DRGcAMP 含量も DRG 細胞死誘導とは関連していないと考えられた。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 DM 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。本実験より DM ラットにおける坐骨神経挫滅後 DRG 細胞死誘導の機序は明らかにはならなかったが、PGE1 は血流増加作用が良く知られており、神経細胞への血流供給と細胞死との関連についても今後検討が必要である。

#### 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あると考えられた。糖尿病ラットの末梢知覚神経細胞は軸索障害により細胞死に陥りやすく軸索再生能も低下していた。これらの異常はプロスタグランディン E1 製剤により改善されることが明らかとなった。

## 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) 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* 11:663-667, 2000.

5) 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* 77:986-992, 2001.

### 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) 寺島智也、安田斎、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）

3) 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ディン 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）

4) 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

「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」  
--糖尿病性神経障害の成因にかかわるポリオール代謝の意義--

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	山岸晋一郎	弘前大学医学部病理学第一講座・助手
共同研究者	和田 龍一	弘前大学医学部病理学第一講座・助手

#### 研究要旨

糖尿病患者剖検例から末梢神経を採取し、非糖尿病患者とポリオール代謝の主要酵素である AR、SDH の発現について比較検討した。AR は末梢神経束内の有髄神経シュワン細胞、神経内血管周皮細胞、神経外膜動脈平滑筋に発現し、SDH は神経束内では軸索、血管周皮、神経外膜動脈平滑筋に局在をみた。糖尿病神経では、AR の発現亢進がみられ、ウエスタンブロット、ELISA による検討でも有意の増加を示した。これに比し、SDH は発現は糖尿病、非糖尿病神経間で明らかな差を認めなかった。以上の結果は、末梢神経において神経線維成分と血管成分とは異なるポリオール代謝動態が作動していることを示し、糖尿病では、AR の高発現が末梢神経障害の発症、進展に関与していることを示唆するものである。

#### A. 研究目的

糖尿病患者の増大により合併症の管理・治療が重要な問題となっている。神経障害の頻度はなかでも最も高く、持続する高血糖が大きな因子となっている。しかしながら、高血糖からいかに末梢神経での機能的、形態学異常がもたらされるのかは解決されていない。ポリオール代謝はもっとも古くから研究されてきた糖尿病合併症の成因のひとつで、アルドース還元酵素(AR)を介したグルコースからソルビトール生成、ソルビトール脱水素酵素(SDH)によるソルビトールからフルクトースへの代謝過程からなっている。この僅か2つのステップのポリオール経路が糖尿病性神経障害の発症に関わっていることが明らかとされ、臨床的にもアルドース還元酵素阻害薬 (ARI) が上梓されている。ARI の臨床評価はいまだ論議を呼んでおり、ポリオール代謝のヒト糖尿病神経障害への関与へのより詳細な知識が必要とされている。そこで筆者らは、ヒト糖尿病神経における AR およびの SDH 発現を検討した。

#### B. 研究方法

ヒト糖尿病 (2 型) 患者剖検例 15 例、非糖尿病患者剖検例 16 例から、死後可及的速やかに坐骨神経および一部では腓腹神経を採取し、免疫組織化学用に 10%ホルマリン固定、パラフィンブロックを作成した。また、一部では AR の蛋白発現、定量を目的として新鮮材料として凍結保存した。

AR および SDH の免疫組織化学では、モノクローナルヒト AR 抗体 (三菱ガス化学、新潟) およびポリクローナル SDH 抗体 (大阪大学、谷口教授より供与) を用いて、SAB 法にて行った。

一方、AR 蛋白の定量は酵素免疫法(ELISA)、ウエスタンブロット法にて行った。

なお、ヒト剖検材料の使用に関しては日本病理学会剖検組織利用のガイドラインに準拠し、蛋白検討に限った。

#### C. 研究結果

免疫組織化学的に AR は神経束内有髄神経線維シュワン細胞に一致して局在を示した。また、神経束内神経内血管壁での周皮

細胞成分にも陽性を示した。神経周膜細胞の外側に強く陽性所見を示した。神経外の外膜動脈の平滑筋細胞にも強く AR の陽性所見を認めた。

一方、SDH は神経束内では軸索、神経内血管周皮細胞、弱くシュワン細胞に局在を示した。神経外膜では神経外膜動脈平滑筋に強く陽性を示した。

糖尿病患者神経では、合併症の強い症例では高度の神経線維の脱落や、神経内血管壁の肥厚像を認めるが、AR の反応はシュワン細胞、軸索膜、血管壁周皮細胞に強くみられた。これに比し、SDH 反応については糖尿病神経と非糖尿病で明らかな差を見出さなかった。

ウエスタンブロットによる検討では、坐骨神経組織で AR 抗体と反応する 36K の部分に単一バンドを非糖尿病、糖尿病神経いずれでも認め、糖尿病例で若干の反応亢進を認めた。

これに対し SDH 抗体では、糖尿病、非糖尿病いずれでも 42K に同程度の単一バンドをみた。ELISA での検討では、腎髄質、肝では糖尿病、非糖尿病高濃度の AR 蛋白をみたが、両群間に差を認めなかった。しかしながら、腎皮質、坐骨神経では AR 蛋白が糖尿病群で、非糖尿病群に比し有意の増加を示した。

#### D. 考案

今回の研究から、ポリオール代謝の主要酵素である AR がヒト末梢神経組織に局在し、糖尿病神経で蛋白発現の亢進がみられることが証明された。AR の局在は神経束内有髄神経シュワン細胞、神経内血管周皮細胞にみられた。神経内では SDH 反応は僅かであり、高血糖では容易にソルビトール蓄積が起こることが推測された。また、神経外での神経外膜動脈の平滑筋層では AR、SDH 双方の発現がみられ、ポリオール代謝も神経線維と血管壁では異なった動態にあるものと考えられる。

ヒト糖尿病での神経では AR 発現の亢進および蛋白量の増加を認めた。とくに合併症のレベルの高い例で発現の亢進がみられる傾向をみた。これに対し SDH 発現に変化

はみられなかった。このことから、糖尿病ではポリオール代謝のなかで AR が主に神経障害発症に関与している可能性が高い。すなわち、ポリオール代謝のグルコースからソルビトールの最初のステップが神経線維の直接的な異常をもたらす可能性が考えられる。一方、神経障害には神経支配の血流障害や細小血管障害が虚血、透過性亢進をもたらし、末梢神経の機能的、形態学的異常をもたらす可能性もある。このことから、血管壁では AR、SDH で触媒されるポリオール代謝の二つのステップが重要であることを示している。

近年の研究から、血管壁細胞で AR が酸化ストレスによるアルデヒドや TNF- $\alpha$  などにより誘導されることが分かってきた。このことは、AR が高血糖による細胞障害の結果、二次的に発現した可能性もある。この場合、誘導された AR が細胞障害性に働くアルデヒドなどに対し解毒性に作用することから AR 阻害薬が細胞死へと作用することも考えられる。しかしながら、AR 発現の意義に関しては、最近のヒト AR を過剰発現するトランスジェニックマウスの研究が糖尿病合併症の成因的役割をもつことが明らかになっている。すなわち、同程度の高血糖状態でも、ソルビトール過剰蓄積とともに、末梢神経での神経伝導速度の遅延や、Na,K-ATPase 低下、Protein kinase C 異常がヒト AR を発現しないマウスに比し、ヒト AR 発現トランスジェニックマウスで障害が高度であることが分かってきた。一方、AR をノックアウトマウスでは、糖尿病状態にしても神経伝導速度遅延が軽度にとどまる。このことから、AR が糖尿病神経障害の成因の主要な原因になっていることが示唆される。

#### E. 結論

ヒト糖尿病患者末梢神経では AR 発現が亢進し、ポリオール代謝が神経支配血管、神経線維それぞれで異なった機構で活性化し、神経障害の発症・進展に関与することが考えられた。

#### F. 研究発表

## 1. 論文発表

- 1) Kasajima H, Yamagishi SI, Sugai S, Yagihashi N, Yagihashi S: Enhanced in situ expression of aldose reductase in peripheral nerve and renal glomeruli in diabetic patients. *Virchows Arch* 2001; 439: 46-54
- 2) Yagihashi S, Yamagishi SI, Wada R, Baba M, Hohman TC, Yabe-Nishimura C, Kokai Y: Neuropathy in diabetic mice overexpressing human aldose reductase and effects of aldose reductase inhibitor. *Brain* 2001 ; 124: 2448-2458

## 2. 学会発表

- 1) Yagihashi S: Pathogenesis of diabetic neuropathy. 61th American Diabetes Association, Breakfast Symposium on diabetic neuropathy. June 26, Philadelphia, 2001
- 2) Yagihashi S, Yamagishi S, Wada R, Hanyu C : Polyol-AGE interplay in diabetic complications: Clue from animal models. Presented at 8th International Workshop on Lessons from Animal Diabetes, Tokyo, July 24-26, 2001 (*Internl' J Exp Diab Res* 2: 259, 2001)
- 3) Yamagishi SI, Sugai S, Masuta N, Okamoto K, Yagihashi S: Reduced protein kinase C in the peripheral nerve of diabetic mice overexpressing human aldose reductase. Presented at 8th International Workshop on Lessons from Animal Diabetes, Tokyo, July 24-26, 2001 (*Internl' J Exp Diab Res* 2: 289, 2001)
- 4) Yagihashi S, Yamagishi SI, Sugai S: Altered pain sensation and reduced protein kinase C activities in peripheral nerve of diabetic mice transgenic for human aldose reductase. Presented at 11th Neurodiabetes meeting, Aberdeen, September 7-9, 2001
- 5) Yagihashi S, Yamagishi SI, Masuta N,, Okamoto K: Altered protein kinase C activities in peripheral nerve of diabetic mice transgenic for human aldose reductase. Presented at 5th Peripheral Nerve Society Meeting, Tyrol, September 8-12, 2001
- 6) Wada R, Nishizawa Y, Yagihashi N, Takeuchi M, Ishikawa Y, Yasumura K, Nakano M, Yagihashi S: Inhibition of the development of experimental diabetic neuropathy by

suppression of AGE formation with a new anti-glycation agent. 7th Internatl Symposium on the Maillard Reaction, Kumamoto, Oct. 29-Nov. 1, 2001

7) Yagihashi S: Role of glycation in the diabetic neuropathy. Satelltite Syposium on Diabetic complications, 7th International Symposium on the Maillard Reaction, Otsu, Nov. 12, 2001