

- 一. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 2010 年 5 月 27 - 29 日 岡山市
11. 太田敬之、巽 邦浩、高木伴幸、松野正平、川嶋弘道、中川貴之、下村裕子、中野好夫、若崎久生、古田浩人、中尾大成、西 理宏、佐々木秀行、南條輝志男：ケトアシドーシスに黒色食道が併発した 1 型糖尿病の 2 例. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 2010 年 5 月 27 - 29 日 岡山市
12. 山岡博之、太田敬之、山崎 浩、下村裕子、中野好夫、若崎久生、古田浩人、西 理宏、中尾大成、佐々木秀行、南條輝志男：原因不明の体幹部搔痒感は自律神経症状と強く関連する. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 2010 年 5 月 27 - 29 日 岡山市

2010年度分担研究報告

分担研究者 出口 尚寿

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院 神経内科 助教

1. 分担研究：糖尿病多発神経障害の病期分類の確立と病期に基づいた治療ガイドラインの作成

分担研究者施設ではこれまでに合計 55 症例を登録し、初年度登録した 33 症例中、32 症例については 3 年目のデータを、2 年目に登録した 13 症例について 2 年目のデータを取得した。登録済み症例については経年的に神経伝導検査を実施し、神経学的所見と併せて客観的な評価を行った。なお、糖尿病神経障害を有する後期高齢者については、神経学的な特徴を別途検討し、臨床病期や足病変との関連を検討中である。

2. 糖尿病性神経障害に関する研究

1) 糖尿病多発神経障害の病期分類と皮膚生検所見の検討

分担研究者らは、昨年度弘前大学大学院杉本准教授、八木橋教授らの指導により PGP9.5 免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡による皮膚生検組織の観察手技を習得した。本年度より当施設でも表皮内神経密度(IENFD)の検討が可能となり、同意の得られた 12 症例について、腓腹部皮膚生検を施行し IENFD の検討を行った。これまでに合計 36 症例について解析を終了し、IENFD と臨床病期、神経伝導検査所見との間に一定の相関を見いだしている。

2) 多巣性糖尿病神経障害と治療後痛性神経障害に関する臨床的検討

分担研究者施設では、いわゆる一般的な糖尿病多発神経障害に分類されない特殊な病型、とくに多巣性糖尿病神経障害（躯幹神経障害、糖尿病性筋萎縮症）と治療後痛性神経障害(posttreatment painful neuropathy; PPN)に着目し症例を蓄積している。多巣性糖尿病神経障害症例については、免疫グロブリン大量療法(IVIg)など免疫療法の有効例と急速な血糖コントロール後に、いわゆる PPN として発症した症例を経験しており、その臨床的特徴について検討し *Diabetes Journal* 誌に報告した。現在、多巣性神経障害と PPN の関連について皮膚生検所見も併せて検討中である。

【論文および学会発表】

論文

1. 出口尚寿, 安田 齋. その他話題の糖尿病合併症「消化器機能障害」 糖尿病性細小血管症 (第二版) - 発症・進展制御の最前線. 日本臨床増刊号 68 (Suppl 9):656-660, 2010
2. 堂地ゆかり, 堀之内秀治, 平川 愛, 新名清成, 出口尚寿, 有村公良. 前立腺癌の治療中に高血糖を来し, エチニルエストラジオール投与により深部静脈血栓症を発症し

た 1 例. 糖尿病 53(9):691-694, 2010

3. 出口尚寿. 糖尿病性神経障害の治療 3 対症療法. 月刊糖尿病 3(3): 77-87, 2011
4. 出口尚寿, 有村愛子, 堂地ゆかり, 中村友紀, 宇都 正, 奥 寛子, 堀之内秀治, 有村公良, 高嶋 博. 糖尿病性軀幹神経障害 6 症例の臨床像. Diabetes Jpurnal 39(1): 16-20, 2011

学会発表

1. 堂地ゆかり, 堀之内秀治, 山口直喜, 長濱さゆり, 有村愛子, 宇都 正, 奥 寛子, 出口尚寿, 有村公良: 高齢化率 40%地域における後期高齢糖尿病患者の臨床的特徴と問題点. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 2010.5.27 岡山
2. 堀之内秀治, 出口尚寿, 堂地ゆかり, 米澤智子, 新名清成, 有村愛子, 宇都 正, 奥 寛子, 有村公良: 糖尿病神経障害の初期病変としての手根管症候群の意義. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 2010.5.27 岡山
3. 有村愛子, 出口尚寿, 宇都 正, 奥 寛子, 堂地ゆかり, 堀之内秀治, 高嶋 博: 表皮内神経密度の高度な低下を認めた治療後有痛性神経障害の 1 例. 第 48 回日本糖尿病学会九州地方会 2010.10.29 大分
4. 亀之原佑介, 堂地ゆかり, 堀之内秀治, 新名清成, 藤原 修, 森岡康祐, 有村愛子, 宇都 正, 奥 寛子, 出口尚寿: ひきこもり生活により悪化を来した糖尿病足病変の 1 例. 第 48 回日本糖尿病学会九州地方会 2010.10.29 大分
5. 出口尚寿, 宇都 正, 有村愛子, 中村友紀, 堂地ゆかり, 堀之内秀治, 橋口照人, 有村公良, 高嶋 博: 糖尿病多発神経障害の臨床病期と血管内皮増殖因子 (VEGF). 「難治性ニューロパチーの診断技術と治療法の開発に関する研究班」2010.12.2, 東京
6. 出口尚寿: 糖尿病神経障害～最近の知見から～. 第 192 回日本神経学会九州地方会ラウンドセッション 2010.12.11 鹿児島
7. 高口 剛, 樋口雄二郎, 林 大輔, 市來征仁, 有村愛子, 宇都 正, 東 桂子, 出口尚寿, 高嶋 博: 高度な起立性低血圧を伴った治療後有痛性神経障害の 1 例. 第 292 回日本内科学会九州地方会 2011.1.29, 福岡

2010 年度分担研究

分担研究者 麻生好正
獨協医科大学越谷病院内科教授

1. 分担研究：糖尿病性多発神経障害の病期分類のためのプロスペクティブ・スタディ
昨年度登録した 30 症例の 1 年後の追跡調査中にある。4 例が転居(3 例)あるいは死亡(1 例)のため、追跡不能になっているが、残り 26 例に関しては、確実に症例をフォローアップし、2 年後、3 年後の症例の追跡率を高めていきたい。

2. 糖尿病性心自律神経障害に関する研究

1) 糖尿病性多発神経障害の病期分類と心自律神経障害との関連

独自に本病期分類と心自律神経障害との関連性を検討している。2 型糖尿病患者を対象に、心電図にて記録された 5 分間の連続した R-R 間隔をサンプリングして、高速フーリエ変換により心拍変動パワースペクトル(PSA)を解析している。PSA により、low frequency power (LF; 交感・副交感神経両活性)、high frequency power (HF; 副交感神経活性)、LF/HF 比(交感・副交感神経バランス)を算出し、それぞれ心自律神経活性の指標として、この定量的心自律神経機能検査と本研究グループにより定義された糖尿病性多発神経障害の病期分類の重症度との相関関係を検討している。

2) 糖尿病性神経障害の重症度を反映する新たなバイオマーカーの探索

すでに、いくつか有望なバイオマーカーが得られ、断面的および横断的研究により、その特異度・信頼度などを検討している。平成 22 年度においては、糖尿病性起立性低血圧症と血清高分子量アディポネクチン濃度との関連について、新たな所見を見出し、英国糖尿病学会誌 *Diabetic Medicine* に論文を投稿し、受諾された。

論文

1. 麻生好正. 糖尿病と神経障害. 糖尿病性自律神経障害の治療. **月刊糖尿病** 2011; 3: 69-104
2. Aso Y, Wakabayashi S, Terasawa T, Naruse R, Hara K, Suetsugu M, Takebayashi K, Inukai T: Elevation of serum high molecular weight adiponectin in patients with type 2 diabetes and orthostatic hypotension: association with arterial stiffness and hypercoagulability. **Diabet Med** (in press)

2010 年度分担研究報告

分担研究者 中村 二郎

名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学 准教授

研究題目：糖尿病性合併症の発症・進展と前駆細胞機能に関する検討

研究概要とその成果：

糖尿病性神経障害の成因として、神経栄養血管における細小血管障害による血流障害が重要であると考えられている。血管および血流障害の成因の根幹をなすのが血管内皮細胞の機能障害であり、内皮細胞機能障害は大血管障害のみならず細小血管障害においても重要な役割を担っていると考えられている。

血管内皮前駆細胞を含めた各種の前駆細胞は末梢血中にも存在し、内皮細胞障害の修復および虚血組織における血管新生に重要な役割を果たしている。我々は、糖尿病ラットにおける神経機能障害が血管内皮前駆細胞移植による血管新生療法により改善されることを明らかにしてきたが、前駆細胞を用いた新たな治療ストラテジーの臨床応用に向けては、糖尿病患者の各種前駆細胞機能とそれに影響を及ぼすと考えられる液性因子、さらには糖尿病性合併症との関連を明らかにする目的で以下の検討を行った。また、ポリオール代謝の律速酵素であるアルドース還元酵素（AR）発現量と合併症との関連性が報告されていることから、末梢血単核球の AR 発現量と合併症との関連性についても検討を行った。

外来通院中の糖尿病患者から血液および尿を採取し、以下の項目を測定する。1) 血管内皮前駆細胞数および単核球数および ARmRNA 発現量、2) 血管内皮前駆細胞の遊走能、3) アディポサイトカイン(adiponectin、resistin、leptin)、炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、IL-8)、bFGF、HGF、VEGF、insulin、C-peptide、4) 接着因子(ICAM-1、VCAM-1 等)、5) 酸化ストレスマーカー(8-OHdG、8-isoproten 等)、6) HbA1c。

また、糖尿病性合併症について以下の項目を前向きに評価する。1) 動脈硬化症(ABI、脈波伝導速度、頸動脈エコー)、2) 糖尿病性神経障害(振動覚閾値、アキレス腱反射、末梢神経伝導速度)、3) 糖尿病性腎症(血清 BUN/Cr、尿中アルブミン、eGFR)、4) 糖尿病網膜症(眼底検査)。

糖尿病患者における血管内皮前駆細胞数および機能についてのこれまでの検討では、糖尿病患者の血糖値が血管内皮前駆細胞数と逆相関することが明らかとなった。また、血管内皮前駆細胞数は年齢と逆相関していた。血管内皮前駆細胞機能については、コロニー形成数および遊走能を検討したところ、血糖コントロールの悪い糖尿病患者では、

コロニー形成能および遊走能が低下しており、血糖値が血管内皮前駆細胞数のみならず、機能にも大きく影響していることが明らかとなった。

末梢血単核球の ARmRNA 発現量は、2型糖尿病患者において頸動脈内膜中膜肥厚と正の相関を示し、ABI とは負の相関を示したが、非糖尿病患者では相関が認められなかった。

糖尿病患者の血管内皮前駆細胞機能障害および単核球における ARmRNA 発現量は、動脈硬化病変の発症・進展に関連し、糖尿病性大血管障害の治療薬として AR 阻害薬が有用である可能性が示唆された。現在、神経障害、腎症および網膜症と ARmRNA 発現量の関連について検討中である。

2010年 業績

英文論文

1) Hotta N, Nakamura J, Iwamoto Y, Ohno Y, Kasuga M, Kikkawa R, Toyota T. Causes of death in Japanese diabetics: A questionnaire survey of 18,385 diabetics over a 10-year period *Journal of Diabetes Investigation* 1: 66-76, 2010

2) Nakashima E, Watarai A, Tsukahara T, Hamada Y, Naruse K, Kamiya H, Kato J, Kato N, Tomita M, Oiso Y, Nakamura J
Association of resistin polymorphism, its serum levels and prevalence of stroke in Japanese type 2 diabetic patients. *J Diabetes Invest* 1: 154-158, 2010

日本語論文 (総説)

3) 中村二郎. 糖尿病多発神経障害治療の大規模研究 up-to-date. 糖尿病 vol53 no.2、pp.82-85、2010

4) 中村二郎. 2型糖尿病薬物療法の UPDATE. 一宮医報 no.176、pp.7-8、2010.2

5) 柴田大河、中村二郎. 神経障害を伴う場合のリハビリテーションの実際. 特集. 糖尿病のリハビリテーション実践マニュアル. MB Medical Rehabilitation No.117 増大号、pp.92-98、2010.4

6) 中村二郎. 糖尿病性神経障害. III章 糖尿病合併症と専門医との連携 2. 慢性合併症. 糖尿病診療 2010 第139巻 特別号(2)、pp.268-271、2010.10

- 7) 成瀬桂子、中村二郎. 細胞移植療法 III 糖尿病性神経障害 治療. 糖尿病性細小血管症 (第 2 版) —発症・進展制御の最前線—. 日本臨床 68 巻増刊 9 号 pp.627-631、2010.11
- 8) 中村二郎. 代謝因子. III 糖尿病性神経障害 病態生理・機能異常. 糖尿病性細小血管症 (第 2 版) —発症・進展制御の最前線—. 日本臨床 68 巻増刊号 9 pp.556-561、2010.11
- 9) 中村二郎. 神経障害. 慢性合併症の診かた. medicina vol.47 no.12、pp.1936-1939、2010.11
- 10) 神谷英紀、中村二郎. IGT neuropathy. DIABETES JOURNAL (糖尿病と代謝) vol.38 no.4、pp.40-43. 2010.12

日本語論文 (著書)

- 11) 中村二郎.
有痛性神経障害の特徴と対応 セミナー 3 病期からみた糖尿病合併症対策
糖尿病 UP・DATE 賢島セミナー 対糖尿病戦略のイノベーション・成因から管理、治療まで (堀田 饒、清野 裕、門脇 孝、柏木厚典、中村二郎 編)
時事通信社 pp.214-221、2010.6
- 12) 中村二郎.
糖尿病性神経障害 新しい糖尿病の治療 完全なる目標達成を目指したこれからの管理・治療のあり方 (加来浩平 編). 新興医学出版社 pp.115-120、2010
- 13) 中村二郎. 糖尿病神経障害のエビデンス. 第 4 章 疫学・EBM. 糖尿病ナビゲーター 第 2 版 (門脇 孝編). メディカルレビュー社 pp.302-303、2010.9
- 14) 中村二郎. 糖尿病性神経障害. レクチャー 糖尿病療養指導に必要な知識 3 糖尿病学の療養指導 2010 —療養指導士を育てるために— 第 44 回糖尿病学の進歩 (日本糖尿病学会 編)、診断と治療社、pp.65-69、2010
- 15) 中村二郎. 糖尿病患者の死因と死亡率. 第 2 章 糖尿病とは B. 糖尿病の疫学. 糖尿病研修ノート (永井良三シリーズ総監修 門脇 孝責任編集 加来浩平、花房俊昭、羽田勝計、稲垣暢也、出雲博子 編). 診断と治療社、pp.111-114、2010

学会発表 : 国内学会

- 1) 中村二郎. 第 44 回糖尿病学の進歩 2010.3.5-6 大阪 レクチャー。

糖尿病性神経障害.

- 2) 山本祐歌、中嶋祥子、岡田由紀子、平野美穂、神谷英紀、尾崎信暁、中村二郎、大磯ユタカ. 第 81 回日本糖尿病学会中部地方会 2010.4.17 金沢
口演: メルカゾール内服後に発症したインスリン自己免疫症候群の一例
- 3) 神谷英紀、尾崎信暁、中村二郎、大磯ユタカ: 全身性インスリンアレルギーに対しインスリングルリジンを使用し得た一例. 第 81 回日本糖尿病学会中部地方会 2010.4.17 金沢
- 4) 塚原丘美、中島英太郎、渡会敦子、大磯ユタカ、中村二郎. 2 型糖尿病患者の大血管障害と apolipoprotein M SNP-778T>C の関連. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 2010.5.27-30 岡山
- 5) 姫野龍仁、神谷英紀、柴田大河、近藤正樹、鈴木淳也、加藤二郎、成瀬桂子、濱田洋司、大磯ユタカ、磯部健一、中村二郎. Mouse embryonic stem cell (ES 細胞)由来初期中胚葉系細胞(Flk1 陽性細胞)移植による糖尿病性神経障害治療効果の検討. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 2010.5.27-30 岡山
- 6) 濱田洋司、河村孝彦、金井彰夫、長崎 弘、鈴木淳也、近藤貴昭、中村二郎、大磯ユタカ. メタボリックシンドロームにおける血清遊離脂肪酸およびセラミド濃度の検討—病態および脂質摂取との関連について. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 2010.5.27-30 岡山
- 7) 神谷英紀、姫野龍仁、中村二郎. シンポジウム. インクレチンと神経障害 第 25 回日本糖尿病合併症学会 2010.10.8-9 大津
- 8) 秦 正樹、成瀬桂子、小林泰子、小島規永、中村信久、戸崎貴博、中村二郎、尾澤昌悟、田中貴信、松原達昭. 糖尿病性神経障害の治療における歯髄幹細胞の有効性. ワークショップ、第 25 回日本糖尿病合併症学会 2010.10.8-9 大津
- 9) 大川哲司、神谷英紀、姫野龍仁、加藤二郎、近藤正樹、成瀬桂子、Cheng Zhao、伊藤佐知子、大磯ユタカ、磯部健一、中村二郎. マウス iPS 細胞由来 p75 陽性細胞移植の糖尿病性多発神経障害に対する治療効果の検討. ワークショップ、第 25 回日本糖尿病合併症学会 2010.10.8-9 大津
- 10) 姫野龍仁、神谷英紀、成瀬桂子、尾崎信暁、柴田大河、清野祐介、近藤正樹、加藤二郎、大川哲司、大磯ユタカ、中村二郎. Exendin-4 の糖尿病性多発神経障害に対する治療効果の検討. ワークショップ、第 25 回日本糖尿病合併症学会 2010.10.8-9 大津

11) 中嶋祥子、尾崎信暁、中村二郎、大磯ユタカ. 持続血糖モニタリングを用いて低血糖予防法を検討したインスリン自己免疫症候群の1例. 第82回日本糖尿病学会中部地方会 2010.10.30 岐阜

国際学会

12) Naruse K, Shibata T, Nakamura N, Kobayashi Y, Oiso Y, Murohara T, Nakamura J, Matsubara T. Therapeutic neovascularization using stem/progenitor cells for diabetic complication; a new strategy for diabetic neuropathy. XXth World Congress of the International Society for Heart Research(ISHR). 2010.5.13 京都

13) Naruse K, Kobayashi Y, Nakamura N, Nakashima E, Oiso Y, Nakamura J, Matsubara T. mRNA Expression Levels of Aldose Reductase in Peripheral Blood-Derived Mononuclear Cells Influences Intima-Media Thickness in Type 2 Diabetic patients. The 70th the American Diabetes Association Scientific Sessions 2010.6.25-29 Orlando, USA

14) Kondo M, Kamiya H, Shibata T, Naruse K, Tosaki T, Himeno T, Suzuki J, Kato J, Okawa T, Hamada H, Oiso Y, Nakamura J. The Therapeutic Efficacy of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells on Diabetic Polyneuropathy Depend on Their Age. The 70th the American Diabetes Association Scientific Sessions 2010.6.25-29 Orlando, USA

15) Himeno T, Kamiya H, Suzuki H, Kito T, Naruse K, Shibata T, Kondo M, Kato J, Okawa T, Isobe K, Oiso Y, Nakamura J. Transplantation of Flk1-Positive Mesodermal Cells Derived from Mouse Embryonic Stem Cells Improves Diabetic Polyneuropathy in Mice. The 70th the American Diabetes Association Scientific Sessions 2010.6.25-29 Orlando, USA

16) Himeno T, Kamiya H, Naruse K, Ozaki N, Tosaki T, Shibata T, Seino Y, Kondo M, Kato J, Okawa T, Oiso Y, Nakamura J. Exendin-4 Improves Neuropathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. The 70th the American Diabetes Association Scientific Sessions 2010.6.25-29 Orlando, USA

鹿児島大学から 37 例（男性 26 例、女性 11 例）、青森県立中央病院から 32 例（男性 22 例、女性 10 例）および弘前大学医学部附属病院から 21 例（男性 15 例、女性 6 例）の糖尿病症例から皮膚検体を採取し解析を行った（合計 90 例；男性 63 例、女性 27 例、平均年齢 55 ± 12 （標準偏差）歳）。また、糖尿病を指摘されたことのない非糖尿病症例 35 例（全例男性、平均年齢 39 ± 8 歳）からも皮膚検体を採取して解析を行った。

糖尿病症例の表皮内神経線維密度（IENFD）の平均値は 7.6 ± 7.3 本/mm に対して、非糖尿病症例では 14.4 ± 4.0 本/mm であった。糖尿病および非糖尿病症例ともに、年齢と IENFD との間に有意な相関を認めなかった。

インスリン治療中の 2 型糖尿病患者におけるインスリン投与量と IENFD との関連を解析した結果を示す（図 1）。インスリンを 1 日 20 単位以上投与されていた全例で著明な IENFD の低下を認めた。治療後神経障害のような急性の神経障害の悪化を示していない症例でも、過剰なインスリン投与が 2 型糖尿病症例の神経線維脱落を悪化させ得る可能性を示唆する結果と考える。既報^{1,3)}と同様に、本解析でも糖尿病症例の IENFD 低下と A1c 値には相関を認めなかったことから、たとえインスリン投与が糖尿病患者の血糖コントロールを改善しても、そのインスリン投与が過剰（例えば、1 日 20 単位以上）であれば神経障害の抑制には貢献しない可能性がある。

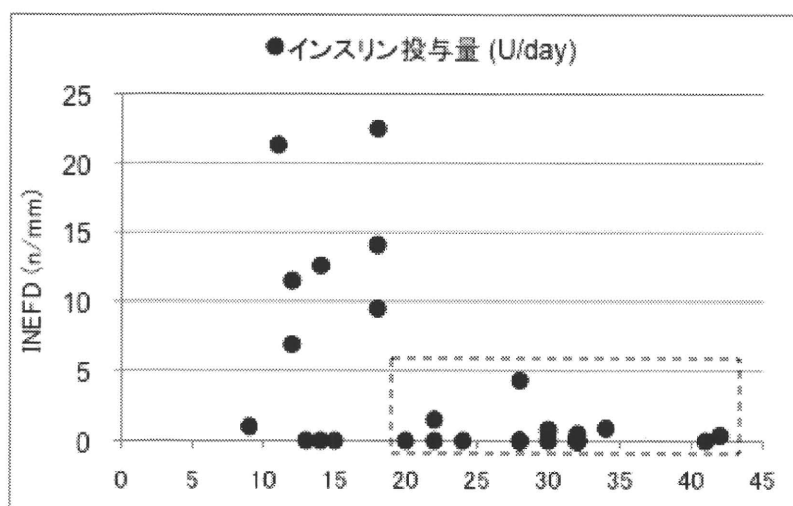


図1 インスリン治療中の2型糖尿病患者における表皮内神経線維密度 (IENFD) とインスリン投与量との関連性

1日のインスリン投与量が20単位以上の患者(点線で囲まれた枠内)では全例が著明なIENFDの低下を示す。

文献

1. Loseth S, Stalberg E, Jorde R, Mellgren SI: Early diabetic neuropathy: thermal thresholds and intraepidermal nerve fibre density in patients with normal nerve conduction studies. *J Neurol* **255**, 1197-1202 (2008)
2. Quattrini C, Tavakoli M, Jeziorska M, Kallinikos P, Tesfaye S, Finnigan J, et al.: Surrogate markers of small fiber damage in human diabetic neuropathy. *Diabetes* **56**, 2148-2154 (2007)
3. Shun CT, Chang YC, Wu HP, Hsieh SC, Lin WM, Lin YH, et al.: Skin denervation in type 2 diabetes: correlations with diabetic duration and functional impairments. *Brain* **127**, 1593-1605 (2004)

論文

1. Y. Yamamoto-Watanabe, M. Watanabe, M. Jackson, H. Akimoto, K. Sugimoto, M. Yasujima, Y. Wakasaya, E. Matsubara, T. Kawarabayashi, Y. Harigaya, A.R. Lyndon, M. Shoji. Quantification of cystatin C in cerebrospinal fluid from various neurological disorders and correlation with G73A polymorphism in CST3. *Brain Res* 1361: 140-145 (2010)
2. S. Yagihashi, H. Mizukami, K. Sugimoto. Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go? *J Diabetes Invest* 2(1): 18-32 (2011)
3. K. Sugimoto, K. Kojima, M. Baba, M. Yasujima. Olmesartan ameliorates peripheral nerve dysfunction in Zucker diabetic fatty rats. *J Hypertens* (in press)
4. 杉本一博、保嶋実：弘前大学医学部医学科における臨床検査医学教育の現状と課題：なぜ、誰が教育するのか？. *臨床病理* 58(3) : 267-274、2010
5. 斉藤順子、井上文緒、小島佳也、杉本一博、保嶋実：弘大病院中央採血室におけるトランプルについて. *臨床病理* 58(6): 577-580, 2010
6. 蔦谷昭司、澤田知香、小山有希、中田良子、對馬絵理子、杉本一博、保嶋実：Gitelman症候群の診断と病態解析. *臨床病理* 58(12) : 1219-1220、2010
7. 四釜佳子、原悦子、齋藤慶子、杉本一博、保嶋実：生理検査室におけるインシデント分析. *臨床病理* 58(12) : 1233、2010
8. 杉本一博：糖尿病性神経障害の成因:代謝性因子. *月刊糖尿病* 3(3): 26-32、2011

発表

1. 杉本一博、八木橋操六、馬場正之、保嶋実：7ヶ月間の少量インスリン持続投与が非糖尿病ウイスターラットの痛覚反応および神経伝導速度に与える影響. 第53回日本糖尿病学会年次学術集、岡山全日空ホテル、平成22年5月29日
2. 杉本一博、小島佳也、保嶋実：少量インスリン持続投与が非糖尿病ウイスターラットの末梢神経機能および形態に及ぼす影響. 第57回日本臨床検査医学会学術集会、京王プラザホテル、平成22年9月10日
3. K. Sugimoto, K. Kojima, M. Baba, M. Yasujima. Effects of long-term administration of moderate amounts of insulin on small and large peripheral nerve fiber function and structure in non-diabetic Wistar rats. 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Stockholm, Sweden. September 20-24, 2010

4. 杉本一博：Young Investigator Award 受賞講演「糖尿病性神経障害の成因に関する基礎的研究：インスリン作用異常の役割」 第 25 回日本糖尿病合併症学会，びわ湖ホール，平成 22 年 10 月 22 日
5. 杉本一博、齋藤慶子、小島佳也、蔦谷昭司、保嶋実：シンポジウム「検査部のあり方と将来展望」弘前大学医学部附属病院における医療支援部門としての検査部の現状と課題. 第 34 回日本臨床検査医学会東北支部例会，コラッセふくしま，平成 22 年 10 月 30 日
6. 杉本一博：糖尿病患者の神経線維は何故脱落するのか？-インスリン代謝異常との関連性について-。郡山糖尿病合併症研究会 2010、ホテルハマツ、郡山、平成 22 年 11 月 18 日

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yagihashi S, Mizukami H, Sugimoto K.	Mechanism of diabetic neuropathy. Where are we now and where to go?	J Diabetes Invest	2(1)	18-32	2011
Mizukami H, Ogasawara S, Yamagishi S, Takahashi K, Yagihashi S.	Methylcobalamin effects on diabetic neuropathy and nerve protein kinase C in rats	Eur J Clin Invest	41(4)	442-50	2011
Nukada H, Morran PD, Batty M, Ogasawara S, Yagihashi S.	Increased susceptibility to ischemia and macrophage activation in STZ-diabetic rat nerve.	Brain Res	1373	172-182	2011
Satoh J, Yagihashi S, Baba M, Suzuki M, Arakawa A, Yoshiyama T, Shoji S	Efficacy and safety of pregabalin for treating neuropathic pain associated with diabetic peripheral neuropathy: a 14 week, randomized, double-blind, placebo-controlled trial.	Diabet Med	28(1)	109-116	2011
Yasuda H, Hotta N, Nakao K, Kasuga M, Kashiwagi A, Kawamori R	Superiority of duloxetine to placebo in improving diabetic neuropathic pain: Results of a randomized controlled trial in Japan.	J Diabetes Invest	2(2)	132-139	2011
麻生好正	糖尿病と神経障害. 糖尿病性自律神経障害の治療.	月刊糖尿病	3(3)	69-104	2011
杉本一博	糖尿病性神経障害の成因:代謝性因子	月刊糖尿病	3(3)	26-32	2011
Hotta N, Nakamura J, Iwamoto Y, Ohno Y, Kasuga M, Kikkawa R, Toyota T	Causes of death in Japanese diabetics: A questionnaire survey of 18,385 diabetics over a 10-year period	J Diabetes Invest	1	66-76	2010
出口尚寿, 有村愛子, 堂地ゆかり, 中村友紀, 宇都正, 奥寛子, 堀之内秀治, 有村公良, 高嶋博.	糖尿病性脳幹神経障害6症例の臨床像.	Diabetes Journal	39(1)	16-20	2011

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go?

Soroku Yagihashi^{1*}, Hiroki Mizukami¹, Kazuhiro Sugimoto²

ABSTRACT

Neuropathy is the most common complication of diabetes. As a consequence of longstanding hyperglycemia, a downstream metabolic cascade leads to peripheral nerve injury through an increased flux of the polyol pathway, enhanced advanced glycation end-products formation, excessive release of cytokines, activation of protein kinase C and exaggerated oxidative stress, as well as other confounding factors. Although these metabolic aberrations are deemed as the main stream for the pathogenesis of diabetic microvascular complications, organ-specific histological and biochemical characteristics constitute distinct mechanistic processes of neuropathy different from retinopathy or nephropathy. Extremely long axons originating in the small neuronal body are vulnerable on the most distal side as a result of malnutritional axonal support or environmental insults. Sparse vascular supply with impaired autoregulation is likely to cause hypoxic damage in the nerve. Such dual influences exerted by long-term hyperglycemia are critical for peripheral nerve damage, resulting in distal-predominant nerve fiber degeneration. More recently, cellular factors derived from the bone marrow also appear to have a strong impact on the development of peripheral nerve pathology. As evident from such complicated processes, inhibition of single metabolic factors might not be sufficient for the treatment of neuropathy, but a combination of several inhibitors might be a promising approach to overcome this serious disorder. (*J Diabetes Invest*, doi: 10.1111/j.2040-1124.2010.00070.x, 2010)

KEY WORDS: Diabetic neuropathy, Novel treatment, Pathogenesis

INTRODUCTION

Peripheral neuropathy is the most common and intractable complication of diabetes^{1,2}. It involves somatic sensory and motor nerves, as well as autonomic nerves. In fact, the prevalence of diabetic neuropathy ranges from 7% within 1 year of diagnosis to 50% for those with diabetes for >25 years³. If patients with subclinical levels of neuropathic disturbances are included, the prevalence might exceed 90%⁴. The presence of cardiovascular autonomic neuropathy dramatically shortens the patients' longevity and increases the mortality^{5,6}. Loss of feeling in the lower limbs is a high risk for limb amputation, which occurs in 1–2% of diabetic patients and necessitates extreme cost^{4,7}.

Despite efforts to make an early diagnosis and to halt the progression of diabetic neuropathy, currently there is no effective treatment available at a global level, except for tight control of blood glucose. This might be as a result, at least in part, of insufficient clarification of the pathogenesis of diabetic neuropathy, complicated clinical pictures that do not necessarily reflect proper progression of the disease, or inadequate design of clinical trials. There might also be a possibility that the development

of a candidate drug might not be based on genuine inciting factors. To overcome this serious disorder, it is therefore essential to explore the precise role of causative factors in nerve fiber dysfunction and fiber loss. The present review summarizes the most up-to-date considerations on the pathogenesis of diabetic neuropathy and discusses the direction of its treatment.

RISK FACTORS FOR PROGRESSION OF NEUROPATHY

The duration of diabetes and glycated hemoglobin levels have been well associated with a high incidence of neuropathy^{8,9}. Classically, the Diabetes Control and Complications Trials (DCCT) confirmed the beneficial effects of meticulous control of blood glucose on the incidence of chronic complications in 1441 type 1 diabetic patients¹⁰. In that study, intensive insulin treatment for 6.5 years lowered HbA_{1c} levels (average 7%) by 2% compared with a conventionally treated group (average 9%) and successfully decreased the incidence of neuropathy by 60% (13 vs 5%)¹⁰. More striking are the so-called 'legacy effects' (glucose memory) of tight blood glucose control for the suppression of new development of neuropathy during a post-trial observation period for 8 years¹¹. In type 2 diabetic patients, the Kumamoto study showed that intensive insulin treatment for 7 years improved nerve conduction velocity (NCV) and the vibration perception threshold (VPT) compared with those conventionally treated¹². In contrast, the UK prospective diabetes

Departments of ¹Pathology and Molecular Medicine and ²Laboratory Medicine, Hirosaki University Graduate School of Medicine, Hirosaki, Japan
*Corresponding author. Soroku Yagihashi Tel: 81-172-39-5025 Fax: 81-172-39-5026
E-mail address: yagihasi@cc.hirosaki-u.ac.jp
Received 28 July 2010; revised 16 August 2010; accepted 17 August 2010

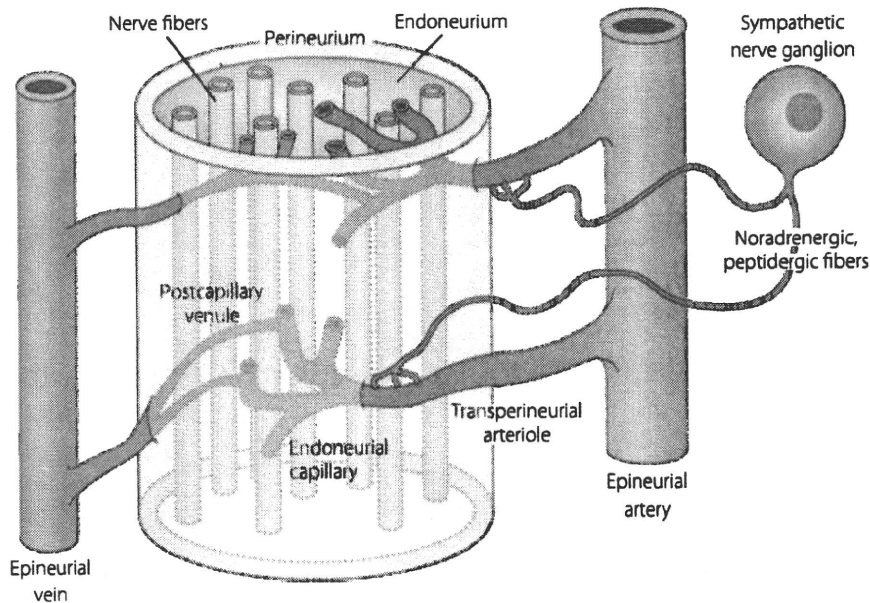


Figure 1 | Vascular supply of the peripheral nervous system is sparse and transperineurial arteriole penetrates into endoneurium. Autonomic nerve endings contact with the wall of arterioles, but vascular autoregulation is lacking in peripheral nerves as a result of sparse innervations. In diabetes, autonomic nerve endings to the arteriole are likely to be lost and therefore vasoregulation is further impaired (modified from *Pathology of Diabetes Mellitus for Clinicians* by Soroku Yagihashi, Shindan-to-Chiryō Co., Tokyo, 2004, page 110).

study (UKPDS) on 3867 type 2 diabetic patients did not find the effects of glucose control (to the extent of a 0.9% decrease in HbA_{1c}) on the prevalence of neuropathy, whereas there was a significant reduction in the risk for retinopathy and nephropathy¹³. Tesfaye *et al.* in the EURO-Diab group reported that blood glucose control, duration of diabetes, hypertension, hyperlipidemia and smoking were all significant risk factors for the development of neuropathy in type 1 diabetic patients¹⁴. The impact of hyperlipidemia has also been emphasized by a follow-up study of the DCCT trial¹⁵. However, this trend is different in cohorts of other countries, because Japanese studies could not find a significant influence of the blood concentrations of triglyceride or cholesterol on the prevalence of neuropathy¹⁶. It is clear after all that high blood glucose leads to peripheral nerve injury through a downstream metabolic cascade. The following section will concentrate on how hyperglycemia leads to peripheral nerve injury.

ANATOMY AND VASCULAR SUPPLY OF PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM

Anatomical characteristics of the peripheral nervous system might explain why the pathogenesis of neuropathy is distinct from other microvascular complications^{17,18}. Peripheral nerves are covered by perineurium, where only a few transperineurial arterioles penetrate into the endoneurium (Figure 1). The vascular supply in peripheral nerves is sparse and blood flow is likely to be compromised and lacks autoregulation¹⁹. This system makes peripheral nerves vulnerable to ischemia. Endoneurial microvessels are tightly connected with endothelial cells on their

inner surface, but when destroyed they are leaky and affect the endoneurial tissue components²⁰. Leaky vessels are mainly located in the ganglion with fenestrated vessels, and nerve terminals on the distal side are directly exposed to environments not covered by perineurium and are susceptible to traumatic injury.

Innervation of epineurial microvessels is involved in diabetes, resulting in impaired blood supply in diabetic nerves^{21,22}. Endoneurial microvessels show thickened and multilayered basement membranes, cell debris of pericytes, as well as disrupted endothelial cells, and thus constitute salient structural changes in diabetic nerves.

Independent of vascular supply, three dimensions of neuronal architecture specific to the peripheral nervous system might account for the reason why the most distal side is susceptible in diabetes. Ganglion cells have extensively long axons covered by Schwann cells. The neuronal cell body is relatively small compared with the extremely long distance of axonal neurites, and thereby distal axons are innately too weak to support themselves for the long transport of nutrients, nerve trophic factors, as well as other signals.

PATHOLOGICAL BACKGROUND OF NEUROPATHY

Most characteristic findings of the peripheral nervous system in diabetic patients are distal and sensory predominant nerve fiber degeneration, axonal loss and endoneurial microangiopathy^{23,24}. Both large and small caliber sizes of nerve fibers are affected. Based on this anatomical condition, Dyck *et al.* proposed that microvascular injury is the most probable factor for focal fiber loss and its summation appears to be the cause of diffuse fiber

loss of distal predominant axonal neuropathy in diabetes^{25,26}. However, this explanation is too simplistic and does not explain why hyperglycemia and duration of diabetes are crucial for its occurrence. There also emerges a controversy as to whether there is any predominance for the involvement of small fibers in early diabetic neuropathy. Questions on this issue were further raised by the report that the focality of nerve fiber loss was not universally demonstrated, indicating that microangiopathy does not always account for the fiber loss²⁷. Nevertheless, vascular influence on the development of neuropathy was further supported by subsequent studies on humans. Malik *et al.* showed that patients who did not have clinically evident neuropathy at the time of nerve biopsy, but who showed high-grade microangiopathic changes of endoneurial microvessels later, developed overt neuropathy, whereas the patients without microvessel changes did not develop neuropathy²⁸. The extent of microangiopathic changes correlated well with subsequent nerve fiber loss in diabetic nerves²⁹. We ourselves found a correlation between the thickness of the basement membrane of endoneurial microvessels and reduced myelinated fiber density³⁰.

The most distal axons of small fibers distribute in the epidermis of the skin, sensing pain or pricking. Currently, punched skin biopsy immunostained with protein gene product (PGP)-9.5 is widely used for the evaluation of peripheral neuropathy³¹. The method is simple and minimally invasive, but requires the equipment of confocal laser scan microscopy and skills for the staining and measurement. Usually, skin over the calf muscle is used, but other sites might also be added. In diabetes, the nerve fibers in the epidermis of the skin are significantly affected, resulting in distortion, twisting, focal swelling or beading, and finally, disappearance of nerve fibers³²⁻³⁴ (Figure 2). The reduction was found even in subjects of impaired glucose tolerance (IGT) and the extent of fiber loss was marked in established diabetic patients^{35,36}. The nerve fiber loss in the skin was associated with fiber loss in the nerve trunk of the sural nerve, thus in keeping with the presence of clinically evident neuropathy³². In relation to the alteration of epidermal innervation, a non-invasive method using corneal confocal microscopy has now been developed for the evaluation of neuropathy^{37,38}. With this method, small nerve fibers distributed in the cornea can be observed without tissue sampling in live conditions^{38,39}. Diabetic patients showed significant loss of nerve fibers, twisting and increased branching on the cornea^{38,39}. Taking advantage of non-invasiveness, it is easy to follow by repeated observations and to evaluate the treatment effects on neuropathy by this method. In fact, the recovery of nerve fibers by regeneration was detected in long-standing type 1 diabetic patients 6 months after pancreas transplantation⁴⁰. To understand the cause and the development of neuropathy, spatial and temporal changes of nerve pathology and their clinical significance should be explored in more detail.

To compensate for the paucity of information on human materials, animal models have served the basis of functional and biochemical changes that might be translated into human

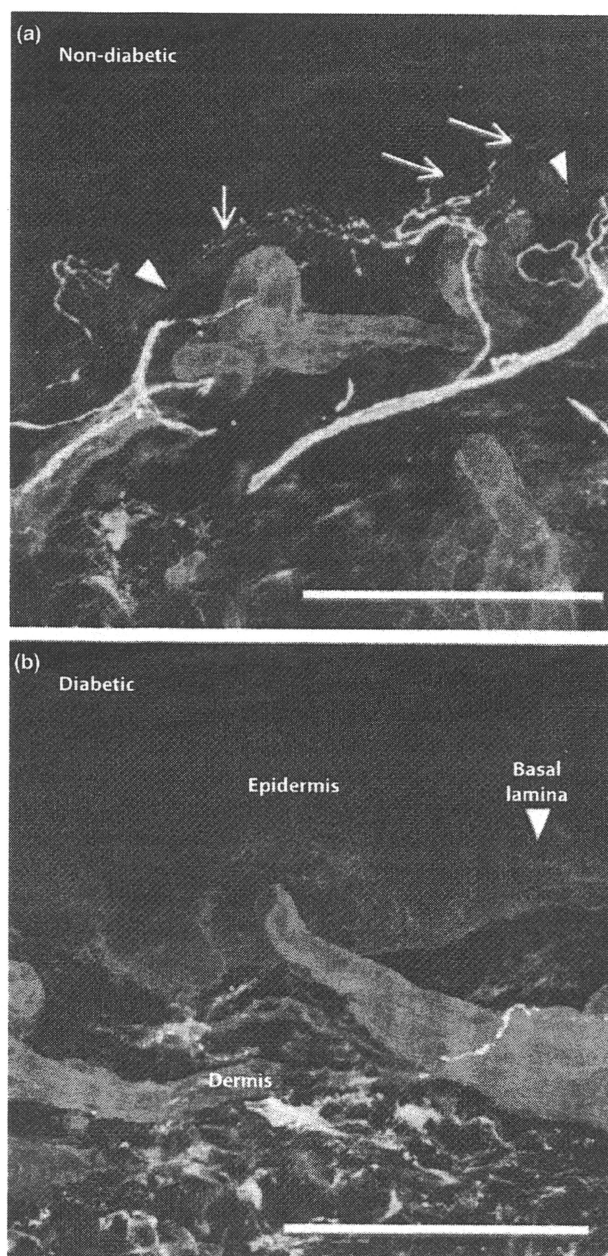


Figure 2 | Epidermal innervation in diabetic patients as shown by immunostaining with PGP9.5. (a) In a normal subject (a 32-year-old man), small branching fibers (arrows) penetrating to basal lamina (arrowhead) derived from dermis distribute diffusely and end in the surface of the epidermis of the skin. (b) In contrast, in a type 2 diabetic subject with symptomatic neuropathy (a 52-year-old woman with 15 years duration of diabetes), fibers in the epidermis are completely lost. Only a few fibers are sparsely left in the dermis. Vascular systems also develop in the upper dermis (red color of tortuous structure). Bar, 100 μ m.

diabetic neuropathy. Unfortunately, diabetic animal models did not show the pathological features in the peripheral nerves trunk observed in human diabetic patients. However, recent studies

have overcome this discrepancy by showing significant nerve fiber loss in the skin of diabetic animal models^{41,42}. It is therefore now possible to search in more detail for the contribution of possible factors to the loss of nerve fibers of the skin by studying animal models. More importantly, it provides us a great tool for the exploration of effective compounds to inhibit nerve fiber loss and promote nerve fiber regeneration^{43,44}.

Unlike human diabetic subjects, distinct pathological changes of endoneurial microvessels are not consistently shown in animal models, although reduced nerve blood flow is reproducibly shown^{45,46}. In streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats, there was only a modest dilatation of vascular lumina, but no reduction of microvessel density or thickening of basement membranes in the peripheral nerve⁴⁷⁻⁴⁹. Although some studies reported reduced microvessel density in diabetic animals that reverted to normal by intervention with vascular endothelial growth factor (VEGF) or other angiogenic factors, the recovery of nerve blood flow by these agents might be explained by functional improvement of endoneurial vessels rather than robust angiogenesis in the endoneurium.

HOW DOES HYPERGLYCEMIA LEAD TO PERIPHERAL NERVE INJURY?

Polyol pathway

Increased polyol flux regulated by aldose reductase (AR) activation has been studied most extensively and there is no doubt that this metabolic cascade contributes to the development of neuropathy. With this premise, numerous AR inhibitors (ARI) have been developed, but clinical trials have mostly been unsuccessful, in part due to the adverse effects or insignificant improvement at the clinical end-point. Currently, epalrestat (ONO2235) is the only one licensed in Japan. It was approved after a 3-month double-blinded trial⁵⁰, which showed improvement of symptoms and nerve function. Further extended 3-year double-blinded randomized trials confirmed that ARI treatment significantly suppressed the progressive delay of nerve conduction⁵¹. The ARI effects were more marked in patients with early neuropathy and modestly elevated levels of glycated hemoglobin⁵². Another challenge of a new ARI will be expected to succeed in future trials, because other mechanisms do not simply replace the polyol pathway hypothesis^{53,54}.

Despite a long history of preclinical studies, the detailed mechanism of how the polyol pathway is involved in neuropathy remains elusive. Earlier studies proposed the osmotic theory in which increased polyol flux caused intracellular hyperosmolarity by an accumulation of impermeable sorbitol in the cytoplasm, resulting in the expansion of cells and cell lysis^{55,56}. Although this theory might be applied to the genesis of diabetic cataracts^{55,56}, there is no consistent evidence of nerve edema or swollen cells in diabetic nerve tissues⁵⁷. Following the osmotic hypothesis, Greene raised the poor energy utilization theory as the surrogate of osmotic theory^{58,59}. With an accumulation of sorbitol, other osmolytes of *myo*-inositol, taurine and adenosine were depleted in the cytoplasm. In turn, *myo*-inositol deficiency

caused phosphatidyl-inositol depletion and then poor production of adenosine triphosphate (ATP), leading to reduced Na,K-ATPase activity and protein kinase C (PKC) activity^{58,59}. In this process, however, there is no confirmative data of *myo*-inositol depletion in diabetic nerves⁶⁰. In addition, clinical application of *myo*-inositol was not successful⁶¹.

Consistent with the data from human IGT subjects, it was shown that *ob/ob* mice revealed neuropathic changes represented by NCV delay and increased oxidative stress-induced damage⁶². High-fat diet fed mice that showed typical glucose intolerance also showed neuropathic changes⁶³. In these mice, postprandial hyperglycemia itself exerted increased flux of the polyol pathway in the peripheral nerve tissues.

The advent of transgenic technology has greatly advanced the polyol pathway story. Transgenic mice that overexpress human AR developed severe neuropathy when they were fed galactose, which is also the substrate of AR⁶⁴. Thus, without hyperglycemia or insulin deficiency, increased flux of the polyol pathway in fact caused peripheral nerve dysfunction and myelinated fiber pathology, similar to those found in diabetic animal models⁶⁴. The study was extended to the STZ-induced diabetic condition in this model, which showed more severe NCV delay and reduced Na,K-ATPase activity with an accumulation of sorbitol and fructose, compared with those in non-transgenic diabetic mice, despite comparable levels of hyperglycemia⁶⁵. The functional changes were accompanied by more severe structural changes in peripheral nerves and alterations of neuropeptide expressions in dorsal root ganglia (DRG)⁶⁶. Concurrently, transgenic mice with hyperglycemia-induced activation of the polyol pathway showed endoneurial reduction of PKC activity with decreased membranous expression of PKC α and a relative increase in PKC β isoform (Figure 3). The neuropathic changes were improved by giving diabetic transgenic mice ARI. In contrast, studies using targeted mice lacking the AR gene showed that AR-deficient mice were protective against neuropathy through the preservation of glutathione and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)⁶⁷.

Although these studies confirmed the critical role of AR in diabetic neuropathy, clinical experience of ARI trials⁵⁰ showed that the polyol pathway cannot completely account for the development of neuropathy. Indeed, when blood glucose is poorly controlled, severe hyperglycemia can cause neuropathic changes, even in AR-deficient diabetic mice⁶⁸. A pathway independent of AR is yet to be determined and further studies are required for the complete prevention or intervention of the progression of diabetic neuropathy.

The implications of AR in ischemia/reperfusion injury have now revitalized the polyol pathway theory for vascular events, not only in diabetic patients but non-diabetic patients as well (Figure 4). Ischemia/reperfusion causes polyol activation, leading to severe tissue injury against which ARI is preventive⁶⁹⁻⁷⁵. In experimental studies, ARI alleviated the pathological lesions in infarction of the brain, the heart, as well as the kidney or retina^{71,75,76}. Because diabetic nerves are susceptible to