

平成30年7月31日現在

機関番号：72504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09367

研究課題名(和文)末梢神経の加齢現象とサルコペニア発症への関与の解明

研究課題名(英文)Nerve ageing and sarcopenia

研究代表者

額田 均(Nukada, Hitoshi)

公益財団法人額田医学生物学研究所・その他部局等・その他(移行)

研究者番号：20164642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、従来の末梢神経加齢変化の研究が大径神経線維に限られてきたのに対し、小径神経線維をもターゲットにし、新しい観点からアプローチした。高齢者・超高齢者において小径神経線維の脱落を認めた。また早期老化モデルマウスでは、後根神経節および大径有髄神経線維の著明な軸索萎縮を認めた。この結果、末梢神経の「生理的老化」での小径神経線維と大径神経線維の脱落を病理学的指標に基づいて証明した。またサルコペニアの発症については、末梢神経の加齢性変化の役割が考えられる。本研究の成果は末梢神経老化現象の解明のみならず、さらに老化と生活習慣病と末梢神経障害の関連という新しい概念を提唱する可能性を持つ。

研究成果の概要(英文)：Peripheral nerve ageing has been studied in large myelinated nerve fibers. However, ageing of small myelinated and unmyelinated nerve fibers are unknown. We have found a loss of small nerve fibres in subjects over 85 y.o. using the new techniques of skin biopsy. We have also observed severe nerve atrophy of large nerve fibres in the accelerated ageing mouse model. These results suggested that small nerve fibres are affected by ageing as well as large nerve fibres.

As the super-ageing society approaches, the understanding of ageing including the peripheral nervous system, is a societal need.

研究分野：神経内科

キーワード：末梢神経 加齢現象 サルコペニア Klotho マウス

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の到来により老化現象のもたらす負の影響は早急に解明すべき課題である。末梢神経の加齢変化を明確にし、それがもたらす負の影響である「病的老化」の抑制、特に寝たきり高齢者を減らし健康寿命を維持することの意義は大きい。末梢神経の加齢に伴う普遍的な「生理的老化」として、下肢の振動覚・位置覚の低下・消失、アキレス腱反射低下・消失、運動・感覚神経伝導速度の低下を認める(J Anat 1999;195:563, J Peripher Nerv Syst 2000; 5:191)。これらの現象はすべて大径神経線維の加齢変化であり、小径神経線維の加齢変化については不明である。これは従来、小径神経線維の評価が困難であったためだが、近年、小径神経線維についての検査が可能となった。小径神経線維の加齢性変化が解明されて初めて末梢神経における「生理的老化」の全容が明らかになる。またこの「生理的老化」が高齢者の慢性疾患に伴う「病的老化」に及ぼすインパクトについての検討はない。このため虚弱高齢者の主な病態であるサルコペニアの発症に末梢神経の関与が示唆されているが、末梢神経の「生理的老化」の関与は明らかでない。更に、老齢期に末梢神経の維持機構に関わるメカニズムの可塑性を喪失する臨界の存在が予想され、加齢動物はこの点を明らかにするために重要なツールとなる。

### 2. 研究の目的

本研究は高齢・超高齢者および動物モデルを用いて、まず末梢神経の「生理的老化」について解明し、次いで「病的老化」としてサルコペニア発症との関連について追究する。末梢神経の「生理的老化」として、大径有髄神経線維についてはアキレス腱反射消失、神経伝導速度の低下、下肢の振動覚・位置覚の低下が知られている。しかし小径神経線維の加齢に伴う病態は明らかでなく、小径神経線維の「生理的老化」について解明する。また超高齢社会を迎え、サルコペニアの成因解明、早期診断・介入が急がれるが、末梢神経の「生理的老化」とサルコペニアとの関連について生理学的、分子病態学的、病理学的に統合的に検討する。末梢神経の「生理的および病的老化」に対し、その対策を講じるためのトランスレーショナルリサーチである。

### 3. 研究の方法

課題：末梢神経の小径神経線維の「生理的老化」  
自立した高齢(65~84歳)・超高齢者(85歳以上)において大径・小径神経線維についての臨床的・生理学的・形態学的検討を行い、大径・小径神経線維の変化について比較相関した。またこの結果確立した末梢神経の「生理的老化」と、サルコペニアの発症・進展・程度について比較検討する。動物実験では、

-Klotho K0 マウスを用い、神経伝導速度、皮膚生検および脊髄・神経節・末梢神経の形態学変化を経時的に観察した。

#### 1) 臨床的検討

対象は(公財)額田医学生物学研究所附属病院外来および稲毛地区の自立した高齢者(65歳以上)および超高齢者(85歳以上)である。自立度については、ADLが自立しているか、障害高齢者の日常生活自立度判定基準のランクJ(厚労省、平成3年)、または認知症高齢者の日常生活自立度判定基準のランクIおよびII(厚労省、平成5年)を含む。但し、サルコペニア、耐糖能異常・糖尿病、その他に末梢神経障害の原因となりうる原疾患を合併する例は除外した。サルコペニアとの関連については、上記課題1)の対象である自立した高齢者(65歳以上)および超高齢者(85歳以上)に加えて、障害高齢者の日常生活自立度判定基準のランクA、B、Cの高・超高齢者も含めた。ただし、認知症高齢者の日常生活自立度判定基準のランクIIIおよびIVは除外した。サルコペニアの診断：サルコペニアの診断は、日本老年医学会(Geriatr Gerontol Int 2014;14,suppl S1:93)のサルコペニア簡易診断基準を用いた。すなわち、握力と下腿径の測定による。普通の歩行速度、BMI等、他の診断基準での必要項目も記録した。

これらの対象について、下記の検査を行った。神経学的所見を含めた身体的現症：身長、体重、BMI、血圧(朝食前、就寝前)。認知機能(HDS-R、MMSE等)、握力、下腿径、歩行速度の評価を行った。血液検査：血糖、HbA1C、血清脂質、蛋白、アルブミン、肝・腎機能など生化学一般、血算、75gOGTT。神経伝導検査：運動神経伝導速度(motor conduction velocity, MCV)は上肢の正中および尺骨神経、下肢の脛骨および腓骨神経でF波を含めて測定し、感覚神経伝導速度(sensory conduction velocity, SCV)は上肢の正中および尺骨神経、下肢の腓腹神経で測定した。測定にはNeuropack MEB-9102(日本光電)を用い、測定方法は通常の方法である。皮膚生検：表皮内神経線維密度(intraepidermal nerve fiber density)：下肢腓腹部で3mmパンチ皮膚生検を行い、採取された皮膚をザンボーニ液にて固定後、抗protein gene product (PGP)9.5抗体の免疫染色により観察し、PGP9.5陽性の表皮内神経線維密度(IENFD)を測定した。この観察は共焦点レーザー顕微鏡で行い、神経線維長・分枝度についても形態計測を行う。なお、生検皮膚の一部はホルマリン固定した。定量的感覚検査：表皮内神経線維末端痛覚閾値(pain threshold of intraepidermal nerve terminal, PINT)検査：近年、馬場らにより開発されたPINT試験用微小電流刺激装置検

査装置(PNS-7000、日本光電)を用いて、定量的感覚検査を行った。下肢遠位部の短趾伸筋上の皮膚を標準部位とし、10回の電気刺激(持続時間2.2msの三連矩形波)で5回以上痛みを感じた最小の刺激強度を最小 PINT 値とした。

統計学的処理：得られたデータは、年齢分布による回帰解析のみならず、各評価項目間での解析を行った。

## 2) 動物モデルによる検討

動物モデル：早期老化モデルマウスである -Klotho 遺伝子ノックアウト(-Klotho K0)マウスを用いて、生後4, 6, 8, 10週毎にフオンフライ検査、温熱刺激検査を行い、神経伝導速度を測定した。更に後肢足底部から皮膚を採取し、皮膚病理所見を検討し、その後、採血、脊髄・後根神経節・末梢神経を採取し、コントロール群(野生型およびC57BL/6)と比較検討した。

-Klotho K0 マウスは、C57BL/6系を背景とする標的遺伝子組換えによる -Klotho 遺伝子の K0 系統で、生後3週までは野生型と同様に成長するが、3週を超えると成長が止まり、成長障害・早期死亡、平均寿命60日。動脈硬化、骨密度の低下、卵巣・子宮・精巣の顕著な萎縮、皮膚萎縮等、ヒトの老化症状に類似した変異を多く含んでいる。また、単なる内分泌障害、栄養障害ではないこと、また、離乳期までは正常に発育することから発生異常でないことも確認され、早期老化モデルマウスと評価されている。

神経伝導速度：坐骨・脛骨神経の運動神経伝導検査(motor conduction velocity, MCV)は、単極針電極により坐骨結節・膝窩・足首の各部位で超最大刺激を与え、足底筋から複合筋活動電位を導出。腓腹神経の感覚神経伝導検査(sensory conduction velocity, SCV)は、足首の部位で刺激し坐骨結節部位にて神経活動電位を導出した(Neuropack MEB-9102、日本光電)(Muscle Nerve 2006;33:350)。後肢皮膚温は34-35℃に維持。

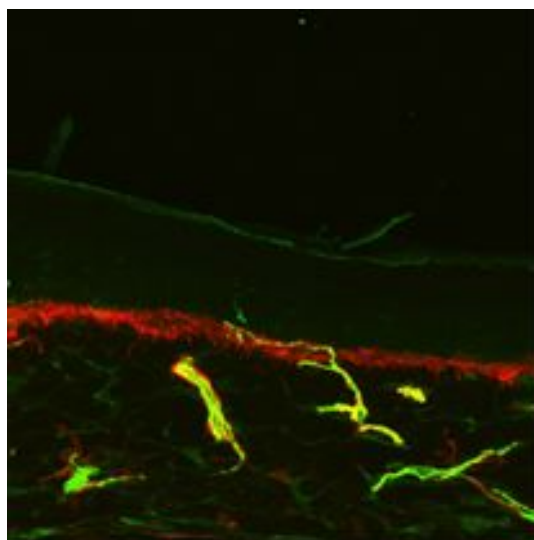
表皮内神経線維密度(intraepidermal nerve fiber density, IENFD)：後肢足底でパンチ皮膚生検を行い IENFD 等を測定した。固定・染色・観察過程は上記課題1)に同じ。

病理学的検討：脊髄はパラフィン包埋のみ。右側後根神経節(L4-6)はエポン包埋とパラフィン包埋。右後肢末梢神経(坐骨・脛骨・腓腹神経)はエポン包埋と、パラフィン包埋または神経線維ときほぐしを近位部から交互に行い、特に坐骨・脛骨神経については骨盤内から足関節レベルまで三次元的解析を行った。また光顕および電顕的に大径・小径神経線維および神経内血管の形態学的計測を行った。左後肢の末梢神経は desheath 後凍結保存(-80度)し、今後の分子病態学的解析に備えた。

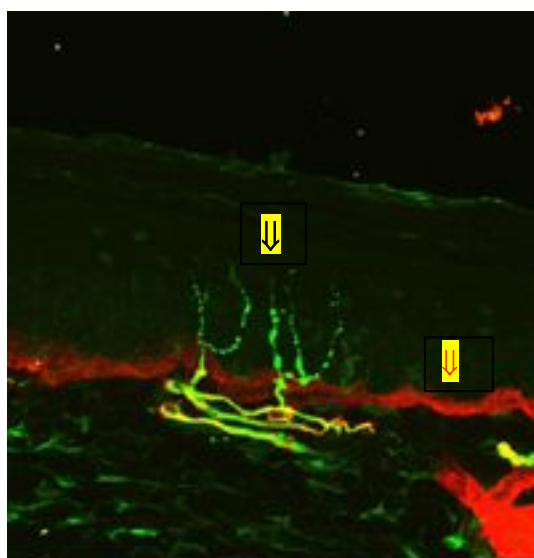
## 4. 研究成果

### 課題1：末梢神経の小径神経線維の「生理的老化」

(公財)額田医学生物学的研究所附属病院外来通院患者で、自立した高齢者(65歳以上、85歳未満)4例および超高齢者(85歳以上)5例から皮膚生検を行った。サルコペニア、耐糖能異常・糖尿病、その他に末梢神経障害の原因となりうる原疾患を合併する例は除外した。下腿腓腹部より採取された皮膚を抗 PGP9.5 抗体の免疫染色により観察し、PGP9.5 陽性の表皮内小径神経線維密度(IENFD)を測定した。85歳以上の超高齢者では、65-85歳の高齢者に比し、IENFDが優位に低下していた(超高齢者  $2.5 \pm 0.3$ 、高齢者  $6.5 \pm 2.5$ 、 $p < 0.001$ )。



1A



1B

図1：101歳女性(A)と66歳女性(B)の皮膚生検所見。PGP9.5陽性の表皮内小径神経線維(黒の矢印)は超高齢者では広範囲に脱落している(IENFDの低下)。基底膜は赤色にラベル(赤の矢印)。

近年、糖尿病性神経障害の重症度の把握や病態進行の解析のため、下肢の皮膚生検により表皮内小径神経線維を観察する方法が確立された。この皮膚生検は、従来の腓腹神経生検に比べて侵襲が少なく容易であり、再現性も確立され、腓腹神経の神経線維密度と相関する。このため小径神経線維の評価法として感受性の高い検査法である (Curr Opin Neurol 2008;21:563, 2012;25: 542)。IENFD の低下は前糖尿病状態である耐糖能異常の時期に既に見られ、糖尿病の診断前から既に小径神経線維の変性過程が進展し、治療により改善する。このため糖尿病性神経障害を小径線維異常として捉え、新しい成因解析、治療評価の方向が生まれてきた。馬場らは、表皮内神経線維末端痛覚閾値 (pain threshold of intraepidermal nerve terminal、PINT)検査装置を開発し、神経障害の自覚症状のない無症候性糖尿病患者で、最小 PINT 値が健常人に比し有意に上昇していることを認めた。この最小 PINT 値と皮膚生検 IENFD には負の相関がみられ、IENFD 脱落高度例で最小 PINT 上昇が顕著であった (糖尿病 2014;57:595)。これらの結果から、IENFD および PINT 値は表皮内小径神経線維の評価に有用である。しかし現時点では、A 線維終末の評価であり、C 線維閾値の測定は出来ない。また今回の研究のように高齢者が対象である場合には、電気刺激に対する反応のばらつきが大きく最小 PINT 値の判断に苦慮することが多かった。このように、高齢者ではその反応の再現性が乏しいという点も浮き彫りになった。

今回の研究では「末梢神経の加齢現象」解明に向けて、従来評価が困難であった小径神経線維について、近年開発された手段を用いて検討した。その結果、小径神経線維の脱落が加齢現象としても認められることが明らかになった。高齢者では、大径神経線維の脱落とともに小径神経線維数も低下する。どちらが先に低下するかについては次の動物モデル等を用いて今後の検討が必要である。サルコペニアとの関連については、今後さらに症例数を増やして検討する必要がある。

## 2)動物モデルによる検討

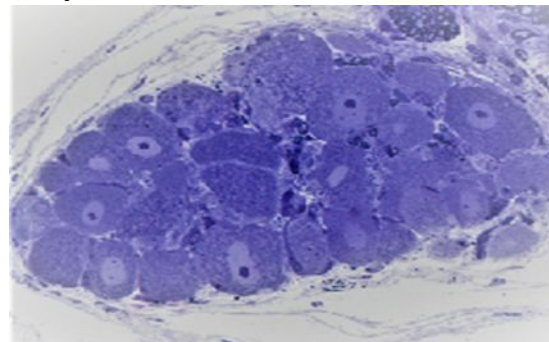
-Klotho K0 マウスを用いて、生後 4,6,8,10 週毎にフォンフライ検査を行い、神経伝導速度(運動・感覚)を測定した。その後、採血、脊髄・後根神経節・末梢神経を採取し、コントロール群(C57BL/6)と比較検討した。

-Klotho K0 マウスでは、生後 4 週の神経伝導速度でコントロールに比し運動・感覚伝導速度の遅延を認め、フォンフライ刺激検査にて閾値の低下を認めた。

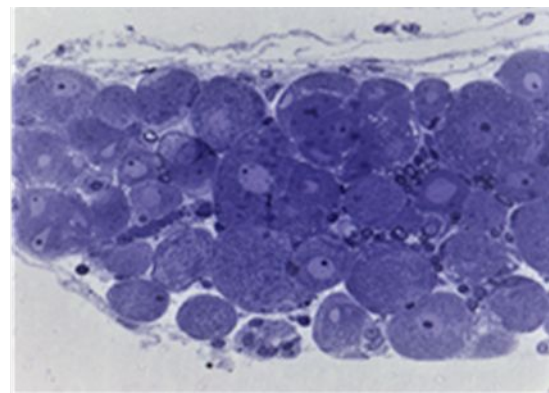
-Klotho K0 マウス 10 週齢の後根神経節および末梢神経(坐骨・脛骨・腓腹神経)では後根神経節細胞の萎縮、軸索の萎縮が認められた。この細胞萎縮、軸索萎縮は形態計測にて

確認された。

図 2: 生後 10 週齢の -Klotho K0 マウスの後根神経節 (2A)と同週齢コントロールマウスの後根神経節 (2B)の横断像。 -Klotho K0 では神経細胞体が小さく、細胞変性が散在する。

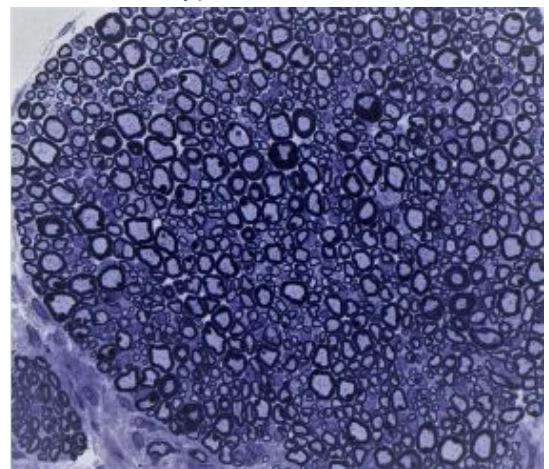


2A

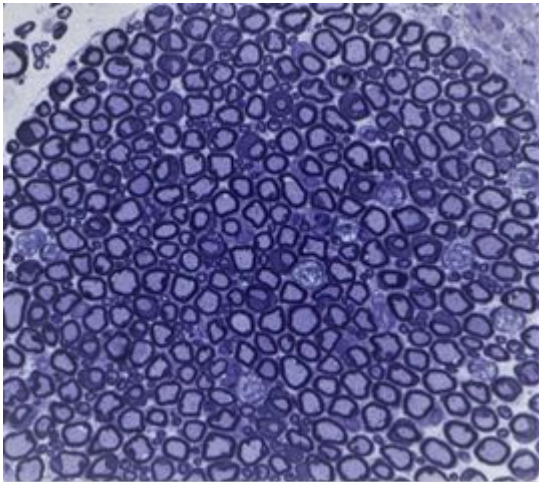


2B

図 3: 生後 8 週齢の -Klotho K0 マウスの後根神経 (3A)と同週齢コントロールマウスの後根神経 (3B)の横断像。 -Klotho K0 では神経線維が小さく、大径神経線維径の減少が著明である。対してコントロールでは大径・小径神経線維が認められる。また神経線維の横断面が、 -Klotho K0 マウスでは、コントロールに見られる正円をなしていない神経線維が多い。これは形態計測的に正円率(index of circularity)の低下として認められた。

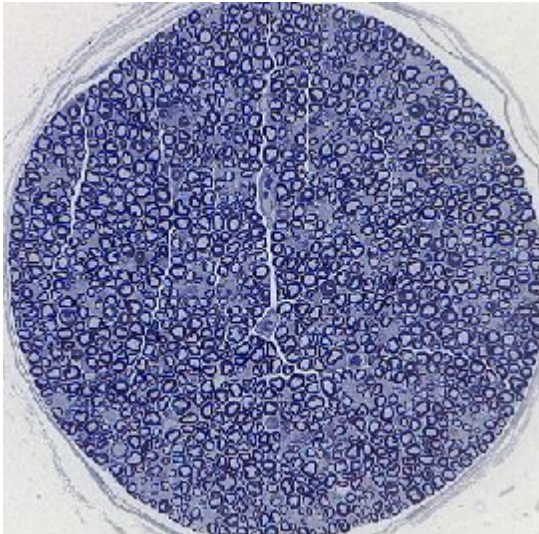


3A

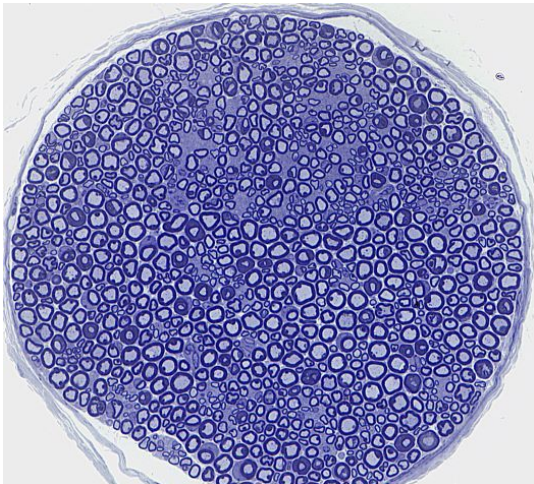


3B

図4: 生後8週齢の  $-Klotho$  KO マウスの腓腹神経(4A)と同週齢コントロールマウスの腓腹神経(4B)の横断像。後根神経と同様に、 $-Klotho$  KO では、コントロールに対して有髄神経線維が小さく、大経有髄神経線維径の減少が著明である。また有髄神経線維の正円率が、 $-Klotho$  KO マウスでは、コントロールに比し低下している。



4A



4B

これらの所見から、 $-Klotho$  KO マウスでは有髄神経線維の軸索萎縮が起こることが認められ、ヒトにおける「末梢神経の生理的加齢現象」と一致する。なお、早期老化モデルマウスと評価されている  $-Klotho$  KO マウスでは離乳期までは正常に発育することから発生異常でないといわれている。この点については末梢神経においても発達障害を除外する確認が必要である。現在、詳細な形態計測的検討が進行中であり、結果は本年度末までには判明する。

また、 $-Klotho$  KO マウスにおける末梢神経の早期老化が、正常マウスの生理的老化と異なるかという点については、現在正常マウスの2年間フォローアップをしており、この正常な老化との比較検討が必要である。ことも確認され。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計9件)

1. Kobori M, Yagihashi S, Shiina N, Shiozawa N, Haginoya A, Ojima M, Douguchi S, Tamasawa A, Saitou M, Baba M; Osonoi T. Four-year sequential nerve conduction changes since first visit in Japanese patients with early type 2 diabetes. *J Diabetes Invest*, 査読有 8:369-76, 2017
2. Yagihashi S. Diabetes and pancreas size, does it matter?. *Diabetes and pancreas size, does it matter? Diabetes and pancreas size, does it matter? J Diabetes Invest*, 査読有 8:413-5, 2017
3. Xin A, Mizukami H, Inaba W, Yoshida T, Takeuchi YK, Yagihashi S. Pancreas Atrophy and Islet Amyloid Deposition in Patients With Elderly-Onset Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metabolism*, 査読有. 102:3162-71, 2017
4. Yagihashi S. Glucotoxic Mechanisms and Related Therapeutic Approaches. [Review], *International Review of Neurobiology*. 査読有. 127:121-49, 2016
5. Yagihashi S, Iaba W, Mizukami H. Dynamic pathology of islet endocrine cells in type 2 diabetes: beta-Cell growth, death, regeneration and their clinical implications. *J Diabetes Invest*, 査読有, 54:756-62, 2016
6. Nukada H, Baba M, Ogasawara S, McMorran D, Yagihashi S. Neuropathy in the spontaneously hypertensive rat: An electrophysiological and histological study. *Muscle Nerve*. 査読有. 54:756-62, 2016

7. Kobayashi T, Aida K, Fukui T; Jimbo E, Shimada A, Mori Y, Fujii T, Yagihashi S. Pancreatic ductal hyperplasia/ ysplasia with obstructive chronic pancreatitis: an association with reduced pancreatic weight in type 1 diabetes. Diabetologia. 査読有. 59(4):865-7, 2016

8. Omi M, Hata M, Nakamura N, Miyabe M, Ozawa S, Nukada H, Tsukamoto M, Sango K, Himeno T, Kamiya H, Nakamura J, Takebe J, Matsubara T, Naruse K. Transplantation of dental pulp stem cells improves long-term diabetic polyneuropathy together with improvement of nerve morphometrical evaluation. Stem Cell Research Therapy. 査読有.8:279,2017

9. Adachi Y, Ono N, Imaizumi A, Muramatsu T, Andou T, Shimodaira Y, Nagao K, Kageyama Y, Mori M, Noguchi Y, Hashizume N, Nukada H. Plasma Amino Acid Profile in Severely Frail Elderly Patients. 査読有. International of Gerontology, 査読有. <https://doi.org/10.1016/j.ijge.2018.03.003>

〔学会発表〕(計9件)

1. Nukada H. Diabetic neuropathy. International Cardiometabolic Course (招待講演) Tokyo, Japan, 2017.5

2. Nukada H, Hotta R, Baba M, Ogasawara S, Yagihashi S. Adjuvant effects of diabetes on hypertensive neuropathy in spontaneously hypertensive rats. The 9th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, Nagoya, Japan, 2017.5

3. Nukada H, Hotta R, Baba M, Ogasawara S, Yagihashi S. Adjuvant effects of diabetes on hypertensive neuropathy in spontaneously hypertensive rats. NeuroDiab 2017, the European Association for the Study of Diabetes (EASD), Madrid, Spain, 2017.10

4. 堀田亮太郎、額田 均、八木橋操六、馬場正之. 高血圧性末梢神経障害に対する糖尿病の影響：高血圧自然発症ラット(SHR)での検討. 平成 29 年度糖尿病性神経障害を考える会, 東京、2017.9

5. Nukada H, Hotta R, Kamimura T, Hiraga Y. Whole-body cryotherapy in rat. Cryomedicine 2017.9, Kamogawa, Chiba

6. 堀田亮太郎、額田 均、八木橋操六、馬場正之. 高血圧性末梢神経障害に対する糖尿病の影響：高血圧自然発症ラット(SHR)での検討. 第 40 回日本高血圧学会, 松山、愛媛、2017.10

7. Nukada H, Hotta R, Kamimura T. Whole-body cryotherapy and serum CK in rat. 第 45 回日本低温医学学会総会、幕張、千葉、2018.8

8. 額田 均、堀田遼太郎、神村 岳. 実験的全身冷却療法, 第 73 回日本体力医学会、福井、2018.9

9. 越智健介, 加藤博之、堀内行雄、額田 均. 「くびれ」を伴う末梢神経障害 -特発性前/後骨間神経麻痺と Neuralgic Amyotrophy に着目して, 第 29 回日本末梢神経学会、下関、2018.9

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

額田 均(NUKADA, Hitoshi)

公益財団法人 額田医学生物学研究所理事長

研究者番号：20164642

(2)研究分担者

八木橋操六(YAGIHASHI, Soroku)

弘前大学特任教授

公益財団法人 額田医学生物学研究所所長  
研究者番号：40111231

(3)研究協力者

堀田亮太郎(HOTTA, Ryoutarou)

公益財団法人額田医学生物学研究所  
研究者番号：50747897