

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18001

研究課題名（和文）糖尿病性神経障害を軽減させるコンドロイチン硫酸合成抑制の作用機序解明

研究課題名（英文）Research about the relationship between diabetic neuropathy and chondroitin sulfate

研究代表者

石黒 創（Ishiguro, Hajime）

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：10826283

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病性神経障害の発症には、細胞外基質であるコンドロイチン硫酸の関与が指摘されているが、詳細は不明である。コンドロイチン硫酸の主要合成酵素であるCSGalNAcT1ノックアウトマウス（T1KOマウス）を用いて検討したところ、このT1KOマウスでは糖尿病性神経障害の進行が抑制されることが判明した。そのメカニズムとして、コンドロイチン硫酸が発現している、血管周囲のペリサイトという細胞が深く関係していることが示唆された。現在はそのメカニズムの解明を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性神経障害は、疼痛や壊疽などを引き起こす深刻な合併症であるが、その進展抑制に有効な特異的薬物は存在せず、厳格な血糖管理と対処療法しか治療法が存在しない。糖尿病性神経障害とコンドロイチン硫酸との関連が明らかになれば、コンドロイチン硫酸の異常を検知する検査を行うことで糖尿病性神経障害の進展予防、治療につながる可能性があり、リスクの高い患者に効果的に治療介入をおこなうことが可能となる。またコンドロイチン硫酸の異常を是正する薬剤の開発が成功すれば糖尿病性神経障害の治療に結び付く可能性があり、患者のQOLの改善が期待できる。また糖尿病性神経障害に起因する下肢切断などの医療費の削減も予想される。

研究成果の概要（英文）：The involvement of chondroitin sulfate, a major extracellular matrix, has been pointed out in the development of diabetic neuropathy. However, the details are unknown. We examined using CSGalNAc T1 knockout mice (T1KO mice), which are the major synthases of chondroitin sulfate. The progression of diabetic neuropathy was suppressed in these T1KO mice. It was suggested that the mechanism is deeply related to cells called pericytes around blood vessels, which express chondroitin sulfate.

Currently, we are continuing the research to elucidate the mechanism.

研究分野：糖尿病学

キーワード：糖尿病性神経障害 細胞外基質 ペリサイト

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は初期はほとんど無症状ながら、数多くの合併症を生じ、患者の生命や QOL を著しく脅かす疾患である。糖尿病の合併症のうち、糖尿病性神経障害は、細小血管障害のなかでも最も早期に出現しやすく、温痛覚障害や自律神経障害による症状、疼痛、壊疽などが問題となる糖尿病性合併症である。糖尿病性神経障害はその進展抑制に有効な特異的薬物は現在のところなく、厳格な血糖管理と対処療法くらいしか治療法が存在しない。そのため、予防法や治療法の開発が強く期待されている。糖尿病性神経障害の発症には、ポリオール系の亢進や酸化ストレスなどに加えて、細胞外基質の関与が指摘されている。

細胞外基質の構成成分にはフィブロネクチン、ラミニン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸などの種類がある。長らく単なる細胞接着の支持組織として考えられてきた細胞外基質であるが、最終的な終末糖化産物の蓄積状況によって神経障害を起こすことがフィブロネクチンやラミニンにおいて報告されている。ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸に関しては、長い糖鎖を介して多数の分子間相互作用が可能なプロテオグリカンを構成するため、神経障害との関連が強く示唆されるものの、これまでその関連を解明した研究はほとんどみられない。

このような状況の中で、新潟大学医学部 神経生化学教室の五十嵐道弘らは、コンドロイチン硫酸の主要合成酵素である CSGalNAcT1 ノックアウトマウス(T1KO マウス)を作成し、本マウスにおいて脊髄損傷に対して著しい神経再生能を有していることを報告した (Takeuchi K, Igarashi M, et. al, Nature Communications. 2013)。本研究により代謝が遅く、静的と考えられたコンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸が神経再生においては動的かつダイナミック変化することで再生に関与していることが証明された。以上より、コンドロイチン硫酸などの細胞外基質に着目することで、糖尿病性神経障害においてもその進展予防と機序の解明が可能であるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

糖尿病にした T1KO マウスを解析し、糖尿病性神経障害と、コンドロイチン硫酸との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)糖尿病性神経障害の発症の評価

【実験方法】6 週齢のオスの T1KO マウスにストレプトゾトシン (50mg/kgBW を 5 日間連続) を投与し、1 型糖尿病モデルを作成した。投与後 4 日目で随時血糖の測定を行い、250mg/dl 以上で糖尿病と規定した。

また、糖尿病性神経障害の評価法として、ストレプトゾトシン投与 3 週間後に radiant heat test を行った。radiant heat test とはマウスの足底に熱刺激を与え、熱さによる逃避行動(足を急激に引っ込めるなど)を行うまでの時間を測定する試験であり、知覚の評価と

して用いた。(radiant heat test では糖尿病性神経障害において温覚鈍麻のため、同一の熱刺激を与えても逃避行動を生じるまでの時間が有意に延長することが報告されている。)

(2)マウス表皮の病理学的評価

【実験方法】ストレプトゾトシン投与 3 週間後に、糖尿病モデルマウスの足底の皮膚を摘出し、Tuj-1 抗体を用いて免疫染色を行い表皮内神経線維 (intraepidermal nerve fiber:IENF)の数を評価した。IENF は糖尿病にすることで数が低下し、それが原因で糖尿病神経障害が発症すると考えられている。

(3)坐骨神経の病理学的評価

【実験方法】ストレプトゾトシン投与 3 週間後に、糖尿病モデルマウスの坐骨神経を摘出し、エポンプロックを作成して薄切しトルイジンブルーで染色し、坐骨神経の軸索の直径を測定した。糖尿病性神経障害では、坐骨神経の軸索の直径が縮小することが報告されている。

(4)神経伝達物質の評価

【実験方法】神経細胞の集合体である後根神経節 (DRG) において、免疫染色を行い、温度痛覚伝導を司る Calcitonin-gene related peptide (CGRP) 陽性細胞割合を検討した。

(5)神経細胞における遺伝子発現の測定

【実験方法】神経細胞の集合体である後根神経節 (DRG) において、アポトーシスや炎症関連の遺伝子についてリアルタイム PCR を行った。

(6)神経細胞における遺伝子発現の網羅的な解析

【実験方法】DRG において RNA sequence 法を用いて、コンドロイチン硫酸が分子発現に及ぼす影響を検討した。

4 . 研究成果

(1)糖尿病性神経障害の発症の評価

【結果】Wild type ではストレプトゾトシン投与にて、糖尿病性神経障害を発症し heat radiant test の時間が延長し高度の知覚鈍麻が認められた。一方、T1KO マウスでは知覚鈍麻の発症が軽度であり、Wild type と比べ有意に heat test の時間が短縮していた。T1KO マウスでは糖尿病性神経症の進展が抑制されていることが推察された。

(2)マウス表皮の病理学的評価

【結果】Vehicle 群では IENF の数は Wild type と T1KO マウスで同程度認められた。糖尿病群では Wild type では IENF が著減していたが、T1KO マウスでは IENF の数が保たれていた。T1KO マウスでは糖尿病性神経症の進展が抑制されていることが病理学的にも確認できた。

(3)坐骨神経の病理学的評価

【結果】Vehicle 群では軸索の直径は Wild type と T1KO マウスで同程度であった。糖尿病群では Wild type では軸索の直径が縮小していたが、T1KO マウスでは保たれていた。T1KO マウスでは糖尿病性神経症の進展が抑制され、それは表皮という神経の末梢のみならず、より近位である坐骨神経のレベルでも認められることが判明した。

(4)神経伝達物質の評価

【結果】糖尿病群において野生型では CGRP 陽性細胞割合が低下していたが、T1KO 群では CGRP 陽性細胞割合が保たれていた。このことは、上記 A の実験では T1KO マウスでは温痛覚が比較的保たれていることを反映していると推察した。

(5)神経細胞における遺伝子発現の測定

【結果】アポトーシスに關与する Caspase3 及び Caspase9 が、糖尿病群の T1KO 群で野生型より有意に低下していた。神経障害の進行が抑えられる一つのメカニズムであると考えられた。

(6)神経細胞における遺伝子発現の網羅的な解析

【結果】糖尿病群の Wild type マウスは T1KO マウスに比べて、TGF- β やその下流の遺伝子の発現が有意に上昇していた。これが、神経障害に關与していることが強く示唆された。

以上の結果より、コンドロイチン硫酸の減少した T1KO マウスは、糖尿病性神経障害の発症が軽減していることが示された。そしてそのメカニズムとして、T1KO マウスでは神経細胞においてアポトーシスが抑制されており、また TGF- β シグナルが軽減していることが明らかになった。

本研究結果をもとにさらに詳細な検討をすすめ、糖尿病性神経障害の病態の理解や新たな治療法の開発の基盤としたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ishiguro H
2. 発表標題 Reduced Chondroitin Sulfate Prevents Diabetic Neuropathy Progression in Mice by Protecting Pericytes
3. 学会等名 81th American Diabetes Association Scientific Sessions (ADA) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	五十嵐 道弘 (igarashi Michihiro) (50193173)	新潟大学・医歯学総合研究科・教授 (13101)	
研究協力者	三五 一憲 (Sango Kazunori) (50291943)	公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・プロジェクトリーダー	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------