

機関番号：72504

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 平成20年度 ~ 平成22年度

課題番号： 20591037

研究課題名 (和文) 虚血性末梢神経障害の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名 (英文) Ischemic neuropathy: pathogenesis and treatment

研究代表者

額田 均 ( NUKADA HITOSHI )

(財)額田医学生物学研究所 副理事長

研究者番号： 20164642

研究成果の概要 (和文)：

- 1) 高血圧が糖尿病性神経障害の発症・進展に関与していることは、大規模疫学調査から証明されたが、高血圧自体が末梢神経障害を惹起するかは不明だった。今回、高血圧ラットを用いた実験において、高血圧自体が末梢神経障害を起こすことが明らかになった。また、高血圧ラットの末梢神経では、糖尿病性神経に認められたのと同様に、虚血・再灌流傷害に対して形態学的・電気生理学的に脆弱性を認める。
- 2) 糖尿病性神経障害の発症機序は解明されていない。糖尿病ラットを用いて、神経内鞘マクロファージの活性化が、その発症に関与していることが証明された。
- 3) 末梢動脈閉塞症に伴う痛み・灼熱感、血行再建術後に出現するしびれなどの感覚障害に対しては早急な治療法の確立が望まれる。HGF 遺伝子の逆行性神経内導入により感覚障害の改善が認められた。本法は虚血再灌流障害に対する有効な治療法となりうると思われた。

研究成果の概要 (英文)：

- 1) In diabetes, hypertension compounds and greatly increases the risk of microvascular complications. Hypertension directly damages the microvasculature. However, it is uncertain whether hypertension, *per se*, causes neuropathy, and how hypertension affects diabetic neuropathy. We have found neuropathic abnormalities in hypertensive rats, and also demonstrated that the severity of neuropathy in diabetes with hypertension was greater than neuropathy in non-hypertensive diabetes. Uncontrolled hypertension could cause neuropathy, and hypertension enhances the severity of diabetic neuropathy. In addition, we have shown that increased susceptibility to ischemia and reperfusion in hypertensive rats.
- 2) Ischemic vulnerability in diabetic nerve plays a paramount role in the development of diabetic neuropathy, yet little is known of the underlying mechanism. We conclude that macrophage proliferation and activation occur in STZ-diabetic nerves. The acute inflammatory response after a short period of ischemia was intensified in diabetic nerves. Activation of resident macrophages and infiltration by recruited macrophages could be casually linked to ischemic susceptibility in diabetic nerve.
- 3) Treatment of sensory symptoms in ischemic limbs resulting from peripheral artery disease is still unsatisfactory. We have found that HGF gene treatment improved sensory symptoms and blood flow in acute ischemic and reperfusion injury of rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成21年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成22年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：末梢神経障害

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：虚血性末梢神経障害、糖尿病性末梢神経障害、虚血・再灌流傷害、高血圧、マクロファージ、HGF 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 虚血性末梢神経障害は糖尿病をはじめとする生活習慣病の増加と共に近年著しく増加している。更に動脈硬化性末梢動脈疾患の増加もあり、虚血性神経障害への対策が急がれる。糖尿病合併症は従来、動脈硬化性疾患の大血管症と細小血管症に分け、それぞれの病態機序、治療について研究が進められてきた(図1)。しかし、欧州での糖尿病合併症の大規模調査で、従来は大血管症の危険因子とされた高血圧、高脂血症、肥満、心血管疾患の存在などが末梢神経障害発症の危険因子であることが証明された(N Eng J Med 2005;53:341)。さらに動脈硬化および糖尿病性細小血管障害の発症に血管内皮細胞機能障害という共通の因子が証明された(図2)。

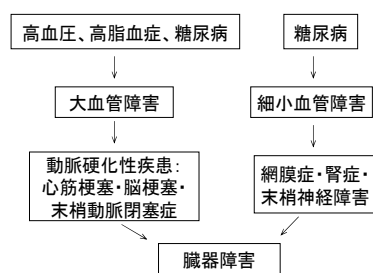


図1: 糖尿病性血管合併症の病態: 従来の経路

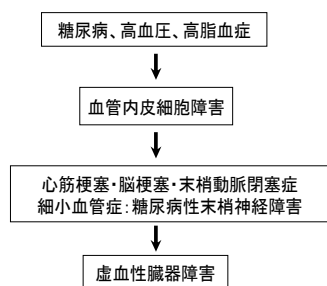


図2: 本研究での糖尿病性神経障害の病態機序

(2) 虚血性末梢神経障害発症に関与する再灌流傷害では、血管内皮細胞における「急性炎症反応」と「酸化ストレス」が病態発症の中心的役割を果たす。再灌流とともに組織内のレジデント細胞(マクロファージ、マスト細胞など)、好中球・単球、ケモカインなどが活性化され、血管内皮細胞の炎症反応が始まる。血管内皮細胞の「炎症反応」と「酸化ストレス」は動脈硬化性疾患での血管内皮細胞障害の原因もしくは促進因子でもあり、炎症反応・酸化ストレスに共通する因子としてのマクロファージ(再灌流傷害では炎症初期の活性化マクロファージ)およびケモカインの動態解明はこれらの発症機序解明につながる。

(3) 虚血・再灌流傷害に対する治療法については、実験的には抗酸化薬などの効果が報告されているが、臨床的にはいまだに決定的なものがないのが現状である。動脈硬化性末梢動脈閉塞症(PAD)に伴う痛み・灼熱感などや、血行再建術後に出現するしびれなどの感覚障害に対しては早急な治療法の確立が望まれる。血管内皮細胞をターゲットとした血管新生療法はPADによる重症虚血肢や虚血性心疾患に対する新しい治療法として注目を集めており、虚血性末梢神経障害においても血管内皮細胞障害を考慮した血管新生療法の適応が考慮され、既存の治療法との組み合わせで新しい有効な治療法としてその効果が期待される。

2. 研究の目的

(1) 高血圧と末梢神経障害との関連：高血圧自然発症ラット(SHR)を用い、a)高血圧のみ、b)高血圧+虚血・再灌流傷害、c)高血圧+糖尿病、d)高血圧+糖尿病+虚血・再灌流傷害の各病態における末梢神経の電気生理学

的・病理学的変化について検討し、基礎疾患としての高血圧の存在の影響を明らかにする。さらに血管内皮細胞機能、特にEPC(血管内皮前駆細胞)について追求する。

(2) 虚血・再灌流傷害の急性炎症反応におけるマクロファージ・ケモカインの動態：再灌流傷害時の急性炎症反応について、神経束内活性化マクロファージの由来が組織マクロファージか循環血液中の単球かを明らかにし、さらにケモカインのレセプターノックアウトマウスを用いて検討する。

(3) 虚血・再灌流傷害に対するHGF遺伝子治療：虚血・再灌流傷害時の知覚障害、特に痛覚過敏・痛み、および傷害神経線維の種類に対するHGF遺伝子導入の効果を検討する。8週齢ラットを用いた予備実験にてアロディニアの回復は、2時間虚血で4週間後、4時間虚血で8週間後であることから、虚血4時間後、再灌流1,2,3週間の計3回の遺伝子導入を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 高血圧自然発症ラット(SHR)について、SHRでの末梢神経障害、大血管障害として虚血・再灌流傷害を惹起、さらにSHRにSTZ糖尿病を合併した各モデルについて末梢神経の電気生理学的・病理学的検討を行った。SHR(SHR/NCr1Cr1j)および対照群として同週齢のWKYラット(WKY/NCr1Cr1j)を用いた。血圧はラット用非観血血圧計(MK-1030、室町機械)を用い尾動脈から測定。神経伝導検査は坐骨結節・膝窩・足首部で坐骨・脛骨神経を電気刺激、足底筋で複合筋活動電位(CMAP)を導出する運動神経伝導速度と、腓腹神経の感覚伝導速度を測定した。血圧および神経伝導速度は生後2,6か月に検討した。糖尿病合併ラットでは、SHR生後48時間以内にSTZ腹腔内注射により糖尿病を惹起した。

(2) STZ-DMラット(DM8-9週)を用い、右後肢の支配動脈である腹部大動脈・右総腸骨動脈・右大腿動脈および右浅腸骨回旋動脈に、近位部の腹部大動脈から血管クリップ(microvascular clip, TKS-1 40g, ベアームディック社製)をかけ、右後肢に虚血を惹起し、90分間の虚血後、遠位部の大腿動脈分枝からクリップを外して再灌流を起こした。本モデルでは大腿中部から膝部にかけて、最も高度な虚血が起こる。再灌流後6,24,48,72時間および7日後に、右後根神経節(L4-6)、右坐骨・脛骨・腓腹神経について、マクロファージ(Iba-1をマーカーとして使用)に対する免疫染色を含めて病理学的検討を行った。

(3) ラット右後肢に4時間の重症虚血を惹

起した1週間後、100 $\mu$ gのhuman HGF遺伝子を組み込んだHVJ-リボソームベクターを前脛骨筋内に経皮的に注射して逆候性に神経内へ導入した。導入は1週毎に繰り返して合計3回行った。治療の評価は行動学的評価として感覚閾値の定量評価、生理学的評価として電気生理学的検査に加え、神経線維別知覚閾値検査による線維ごとの疼痛評価、後肢の血流量及び皮膚温を測定した。さらに疼痛の分子学的評価として、侵害受容体であるadenosine tri phosphate (ATP)のサブタイプであるP2X, P2Yを用いて神経、後根神経節、脊髄におけるmRNAの発現をRT-PCRで評価することにより神経線維ごとについて行動学的評価と相関性についても検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 高血圧と末梢神経障害

① SHR群の血圧は対照群に比し有意に高い。生後6か月でSHR群：198 $\pm$ 20/130 $\pm$ 20、対照群：139 $\pm$ 11/81 $\pm$ 15 mmHg (SBP, DBPともに $p < 0.0001$ )。SHR群では心拍数も対照群に比し有意な増加を示した。神経伝導速度は生後2か月では両群間に有意差を認めない(MNCVはSHR群：42.9 $\pm$ 3.2、対照群：43.4 $\pm$ 2.3 m/sec、 $p > 0.05$ 、SNCVはSHR群：53.4 $\pm$ 3.2、対照群：47.6 $\pm$ 3.7 m/sec、 $p > 0.05$ )。しかし、生後6か月ではMNCV、SNCVともにSHR群が有意な遅延を示した。すなわち、MNCVはSHR群(n=13)：54.1 $\pm$ 5.7、対照群(n=13)：61.1 $\pm$ 4.3 m/sec ( $p = 0.0092$ )、SNCVはSHR群：55.4 $\pm$ 4.5、対照群：58.8 $\pm$ 3.7 m/sec ( $p = 0.0106$ ) (図3)。病理学的には生後6か月で坐骨・脛骨・腓腹神経に軸索萎縮像を呈した。有髄神経線維の密度についてはSHR群と対照群に有意差はなく、神経線維の脱落は見られない。

【結論】SHRでは、生後6ヶ月で後肢運動神経・感覚神経ともに伝導速度の有意な遅延を認める。高血圧は末梢神経障害発症のリスクファクターであり、コントロール不良な高血圧例では、潜在性末梢神経障害を認める可能性がある。

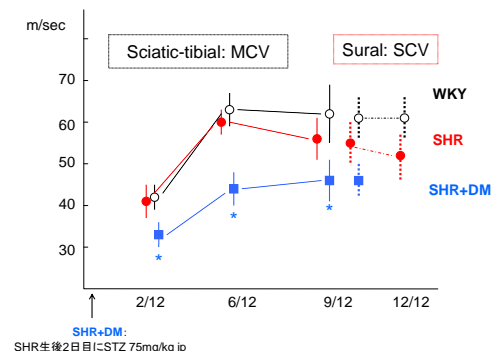


図3：高血圧ラット(SHR)、高血圧合併糖尿病ラット(SHR+DM)およびコントロールの坐骨・腓骨神経(MCV)、腓腹神経(SCV)の神経伝導速度。SHRで神経伝導速度の遅延を認めるが、SHR+DMではさらに伝導速度が遅延している。

② 糖尿病合併SHRでは、生後6か月でSCV(腓腹神経)が、高血圧を合併していない糖尿病ラットに比し、有意に低下した：高血圧合併糖尿病ラット  $46.5 \pm 4.0$  m/sec、高血圧を合併しない糖尿病ラット  $52.3 \pm 3.4$  m/sec,  $p=0.0027$ 。

【結論】高血圧合併糖尿病では、高血圧を合併しない糖尿病より、末梢神経障害が重症である。この結果から、高血圧が糖尿病性神経障害発症・進展のリスクファクターであることが実験的に証明された。

③ SHRラット(DM8-9週)に虚血・再灌流傷害を惹起し、下肢末梢神経の電気生理学的、形態学的に検討し、150分虚血・再灌流傷害に対し、SHRは異常を示すが、コントロールには見られない(図4)。

【結論】高血圧の末梢神経は虚血・再灌流傷害に対し脆弱性を認める。しかし、その閾値となる虚血時間は、糖尿病神経に比し(75分)長時間である。

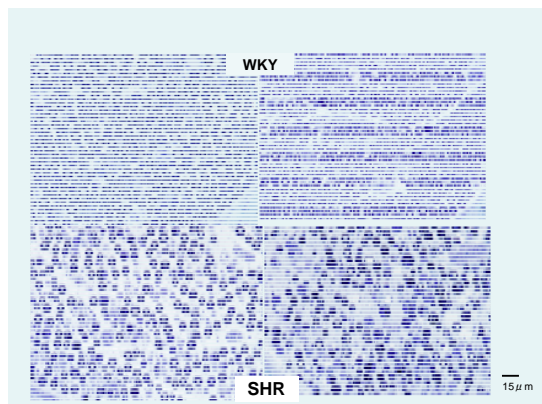


図4：SHR(下段)とコントロールラット(上段)。150分虚血・7日間再灌流後の坐骨神経の病理像。SHRでは軸索変性、浮腫などを認めるが、コントロールに明らかな病理学的変化は認められない。

(2) STZ(75 mg/kg)注射8週間後のDMラットの右坐骨・脛骨神経では、対照群に比しIba-1陽性神経内鞘マクロファージ数が有意に増加した(mean ± SD、DMラット：大腿部  $42.9 \pm 2.9$ 、膝部  $44.3 \pm 3.5$ 、腓腹部  $30.8 \pm 2.1$  /mm<sup>2</sup>；対照群：大腿部  $34.0 \pm 2.6$ 、膝部  $26.7 \pm 3.8$ 、腓腹部  $21.9 \pm 1.9$  /mm<sup>2</sup>。DM群 vs. 対象群：各レベルにおいて  $p < 0.05$ ) (図

5)。これらのマクロファージは紡錘形を呈するものが多いが、一部は肥満化を示しBrdUとの二重染色陽性で活性化マクロファージと思われる。なお、BrdUはS-100との二重染色は陰性。90分間虚血・6時間再灌流後のDM神経のエポソ包埋ブロックでの光顕的検索では病理学的変化はみられないが、Iba-1陽性神経内鞘マクロファージ数がDMラットの坐骨神経大腿部で虚血前に比し有意に増加した(DM神経大腿部：虚血前  $42.9 \pm 2.9$ 、再灌流6時間後  $57.6 \pm 2.6$  /mm<sup>2</sup>,  $p < 0.05$ ) (図6)。神経内鞘マクロファージは、再灌流24時間後には坐骨・脛骨神経大腿および膝部で再灌流6時間後に比し、再灌流48時間後には坐骨・頸骨神経の全レベルにおいて再灌流24時間後よりさらに有意に増加し(DM神経大腿部：再灌流後24時間  $71.5 \pm 2.7$ 、再灌流48時間後  $109.0 \pm 3.4$  /mm<sup>2</sup>,  $p < 0.05$ )、形態学的に膨張・肥満化を示した。一方、対照群では虚血・再灌流後のこのような神経内鞘マクロファージ数の有意な増加は認めない。48時間再灌流後のDM神経にはempty axon、浮腫など明らかな病理学的変化が見られ、一部のマクロファージにはphagocytosisを認めた。90分間虚血・7日間再灌流後、DM神経は軸索変性・脱髄など著明な変化を示したが、対照群の末梢神経は形態学的に正常。

【結論】STZ-DMの末梢神経では持続する高血糖から神経内鞘マクロファージ数が増加し<sup>6</sup>、一部には活性化マクロファージを認める。虚血・再灌流後早期から神経内鞘マクロファージがさらに増殖し、これらのマクロファージは虚血後の時間的経過から、活性化したレジデントマクロファージの可能性がある。レジデントマクロファージおよび遊走単球の増殖・活性化はDM神経の虚血・再灌流傷害に対する病理学的脆弱性の発症に関与していると思われる。

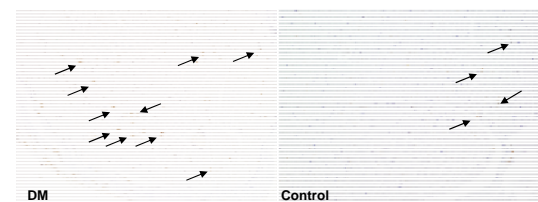


図5：STZ-糖尿病ラット(左)とコントロール(右)の坐骨神経での神経内鞘Iba-1陽性マクロファージ。糖尿病神経にはコントロールに比し多くのマクロファージを認める。



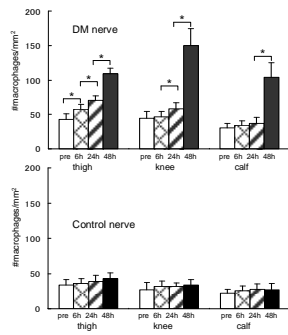


図 6 : STZ-糖尿病ラット(上段)とコントロール(下段)の、坐骨・脛骨神経大腿・膝・足関節レベルでの神経内鞘 Iba-1 陽性マクロファージ数 (/mm<sup>2</sup>)。糖尿病では虚血・再灌流後にマクロファージが有意に増加している。

(3) HGF 遺伝子の定期的な導入により、感覚障害は HGF 導入後 2 週目より有意 ( $p < 0.01$ ) に改善した(図 7)。また、1 週目から足底の血流量及び皮膚温は有意 ( $p < 0.05$ ) に増加し、電気生理学的検査は 3 週目から有意 ( $p < 0.05$ ) に改善した(図 8)。A $\beta$  線維を反映すると考えられる P2Y1、C 線維を反映すると考えられる P2X3 の mRNA および、各々の線維に対応する神経線維別知覚閾値検査でも導入後 1 週で有意 ( $p < 0.05$ ) に改善した。

【結論】HGF 遺伝子の逆行性神経内導入により感覚障害の改善が認められた。と ATP の関連した回復を示したことより、本法は虚血再灌流障害に対する有効な治療法となりうると考えられた。

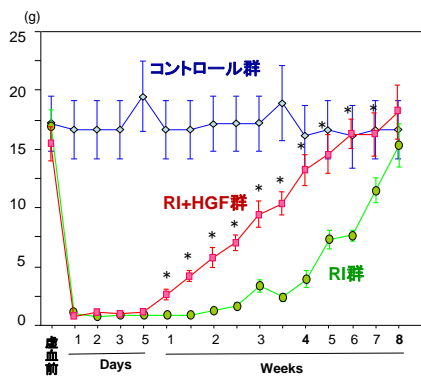


図 7 : 機械刺激性圧触覚閾値。再灌流ラットの HGF 治療群 (RI+HGF)、未治療群 (RI) およびコントロール群。虚血(4 時間)・再灌流傷害により、痛覚の閾値は 1/10 程度と過敏となった。HGF 遺伝子を導入することにより、HGF 群導入群の痛覚は、導入後 1 週から有意な改善傾向を示した。

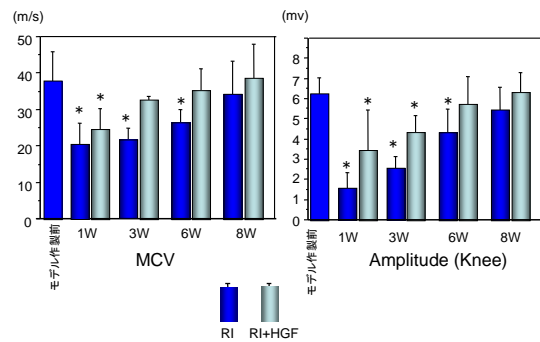


図 8 : 坐骨・脛骨神経の伝導速度。虚血(4 時間)・再灌流後、MCV は 1/2 程度、amplitude は 1/4 程度と伝導障害を認めた。HGF 群は、導入後 3 週から有意な改善傾向を示した。

### 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 11 件)

額田 均: 糖尿病性末梢神経障害の新しい展開: 血管障害と糖尿病性神経障害 - 早期神経障害を中心に。Diabetes Frontier 査読無、2009;20:68-73

Hale L, Nukada H, du Plessis LJ, Preebles KC : Validating a clinical test of autonomic dysfunction in adults with multiple sclerosis. Physiother Res Int 査読有 2009;14:42-55

額田 均: 肘部管症候群の鑑別診断: 内科的疾患について。末梢神経 査読無、2009;20:131-4

額田 均, 馬場正之、小笠原早織、八木橋操六: 高血圧と末梢神経障害: 高血圧自然発症ラット末梢神経の虚血の対する脆弱性。末梢神経 査読無、2009;20:172-3

八木橋操六、安田 斉、佐藤 譲、馬場正之、額田 均ら: 簡易診断基準をベースにした糖尿病多発神経障害の臨床病期分類作成の試みと前向き疫学調査初年度における実態。末梢神経 査読無、2009;20:159-61

Yagihashi S, Mizukami H, Ogasawara S, Yamagishi S, Nukada H, Kato N, Hibi C, Chung S, Chung S: The role of the polyol pathway in acute kidney injury caused by hindlimb ischaemia in mice. J Pathol 査読有、2010;220:530-41

Nukada H, McMorran PD, Baba M, Ogasawara S, Yagihashi S: Increased susceptibility to ischemia and macrophage activation in STZ-diabetic rat nerve. Brain Res 査読有、2011;1373:172-82

〔学会発表〕(計 17 件)

額田 均、八木橋操六、馬場正之：虚血・再灌流、炎症からみた末梢神経障害、第 23 回日本糖尿病・肥満動物学会、シンポジウム「糖尿病合併症の成因解明へのアプローチ」、平成 21 年 2 月、岡山

土原豊一、額田 均、根本孝一：ラット末梢神経虚血・再灌流傷害モデルにおける感覚障害。第 52 回日本手の外科学会、平成 21 年 4 月、東京

額田 均、馬場正之、Denise McMorran、八木橋操六：高血圧と虚血性末梢神経障害：高血圧ラットでの検討。第 50 回日本神経学会総会、平成 21 年 5 月、仙台

額田 均、馬場正之、Denise McMorran、八木橋操六：高血圧と虚血性末梢神経障害：高血圧ラットでの検討。第 52 回日本糖尿病学会、平成 21 年 5 月、大阪

Nukada H、Baba M、Ogasawara S、McMorran PD、Yagihashi S：Ischaemic susceptibility in hypertensive nerve. 2009 Peripheral Society Meeting, 平成 21 年 7 月、Germany, Wurzburg

額田 均、馬場正之、小笠原 早織、Denise McMorran、八木橋操六：高血圧と末梢神経障害：高血圧自然発症ラット末梢神経の虚血に対する脆弱性、第 20 回日本末梢神経学会、平成 21 年 9 月、大宮

Nukada H、Baba M、Ogasawara S、McMorran PD、Yagihashi S：Hypertension and neuropathy: ischaemic susceptibility in SHR nerves, ISDN/NEURODIAB Meeting, IDF Satellite Symposium, 平成 21 年 10 月、Canada, Toronto

額田 均：高血圧と末梢神経障害：高血圧自然発症ラット末梢神経の虚血に対する易傷害性、第 32 回日本高血圧学会総会、平成 21 年 10 月、大津

額田 均：糖尿病性末梢神経障害の成因：IGT の関与を含めて、「シンポジウム：慢性合併症の臨床：神経障害」、第 44 回糖尿病学の進歩、平成 23 年 3 月、大阪

額田 均：虚血・再灌流、「シンポジウム、糖尿病性神経障害と免疫・炎症」、第 16 回糖尿病性神経障害を考える会、平成 21 年 8 月、東京

額田 均、馬場正之、小笠原 早織、Denise McMorran、八木橋操六：糖尿病ラット末梢神経の虚血・再灌流傷害に対する形態学的脆弱性とマクロファージ活性化、第 21 回日本末梢神経学会、平成 22 年 9 月、仙台

土原豊一、額田 均、根本孝一：ラット末梢神経虚血・再灌流傷害モデルにおける感覚障害：治療法の確立に向けて。第 21 回日本末梢神経学会、平成 22 年 9 月、仙台

額田 均：高血圧の糖尿病性末梢神経障害へのインパクト、「シンポジウム：神経障害の成因」、第 25 回糖尿病合併症学会、平成 22 年 10 月、大津

〔図書〕(計 3 件) 分担執筆

額田 均：糖尿病性末梢神経障害の成因：IGT の関与を含めて、日本糖尿病学会編 糖尿病学の進歩 2010、第 44 集、平成 21 年、228-233 頁

額田 均：多巣性運動ニューロパチー、今日の治療指針 2010、医学書院、平成 21 年、808 頁

Nukada H：Ischemia and diabetic neuropathy. In Zochodne D, Malik R (eds) Handbook of Neurology: diabetic complications, Elsevier, (in Press)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔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)

(財)額田医学生物学研究所 副理事長

研究者番号：20164642

### (2) 研究分担者

八木橋 操六 (YAGIHASHI SOROKU)

弘前大学医学系医学科 教授

研究者番号：40111231

### (3) 連携研究者

馬場 正之 (BABA MASAYUKI)

青森県立中央病院 神経内科

土原 豊一 (TSUTIHARA TOYOKAZU)

防衛医科大学校 整形外科

根本 孝一 (NEMOTO KOUICHI)

防衛医科大学校 整形外科

成瀬 桂子 (NARUSE KEIKO)

愛知学院大学 内科

中村 二郎 (NAKAMURA JIRO)

名古屋大学 内科

Marcus Mueller (マルカス・ミュラー)

Muenster 大学 神経内科

### (4) 研究協力者

小笠原 早織 (OGASAWARA SAORI)

弘前大学第一病理

辻井 麻里 (TSUJI MARI)

弘前大学第一病理

Denide McMorran (デニース・マックラク

ラン)

オタゴ大学内科