

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21590609

研究課題名（和文） 糖尿病多発神経障害における表皮内神経線維脱落の進行様式と分子機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of time course and molecular mechanism of intraepidermal nerve fiber loss in diabetic polyneuropathy

研究代表者

杉本 一博 (SUGIMOTO KAZUHIRO)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：70271799

研究成果の概要（和文）：皮膚生検による表皮内神経線維（IENF）解析は有痛性感覚神経障害の診断・評価に用いられる新規検査法である。近年、この皮膚生検を用いた解析により、前糖尿病状態である耐糖能障害（IGT）患者においても初期糖尿病神経障害患者と同様に IENF の脱落を伴う有痛性感覚神経障害を発症することが示されている。IGT はインスリン抵抗性に関連する代謝異常の重複したメタボリックシンドロームの構成要素の一つである。有痛性感覚神経障害患者では正常者に比し、インスリン抵抗性に伴う血清インスリン値の上昇が示されており、インスリン代謝異常と小径線維機能異常との関連性が示唆される。しかしながら、インスリン抵抗性 2 型糖尿病に合併する神経障害の各病期において、どのように IENF 脱落が進行し、いかなるインスリンシグナル関連遺伝子の発現変化が生じているのかは未だ解明されていない。本研究では、2 型糖尿病 ZDF ラットに認められる神経障害の進行に伴う IENF 密度の経時変化と末梢神経内インスリンシグナルの解析を行った。明らかな高血糖を示す前の 8-10 週齢の ZDF ラットは、代償性の高インスリン血症と共に温痛覚過敏を示した。また、代償性の高インスリン血症が消失し高血糖を示す 18 週齢以降では、機械的痛覚過敏の発症と温痛覚過敏から温痛覚鈍麻への進行を認めた。これらの侵害受容反応の異常の出現にもかかわらず、23 週齢および 39 週齢の ZDF ラットの IENF 密度に低下は認められなかった。一方、10 週齢の ZDF ラットでは同週齢のやせ形ラットの比し、統計学的に有意ではないものの 26% の IENF 密度の上昇を認めた。免疫蛍光染色では、23 週齢の ZDF ラットの後根神経節神経細胞におけるインスリン受容体およびリン酸化インスリン受容体の免疫活性が有意に低下していた。また、ウエスタンブロット解析では、ZDF ラットの坐骨神経におけるインスリン受容体および Akt 蛋白含量がそれぞれ 70% および 25% 低下していたが、p44 および p42MAP キナーゼのリン酸化比率はそれぞれ 33% および 52% 上昇していた。以上、本研究の結果から、ZDF ラットは進行性の侵害受容反応の異常と末梢神経内インスリンシグナル異常を示すが、39 週齢まで皮膚神経支配の低下はないことが示された。2 型糖尿病に合併する IENF 脱落の研究にこのラットモデルを用いるのは適切でない可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Skin biopsies for analysis of intraepidermal nerve fibers (IENFs) represent a recently introduced technique for assessment of patients with suspected painful sensory neuropathy. Recent studies using skin biopsy specimen have indicated that the pre-diabetic state of impaired glucose tolerance (IGT) is associated with painful sensory neuropathy that is indistinguishable from the typical phenotype of early diabetic neuropathy, showing loss of IENFs. IGT is one component of metabolic syndrome, which consists of a constellation of specific metabolic derangements associated with insulin resistance (IR). It is reported that patients with painful sensory neuropathy have significantly higher serum insulin with greater IR than control subjects, indicating a linkage between insulin dysmetabolism and small fiber dysfunction. However, time course

and molecular mechanism of IENF loss at different stages of severity of neuropathy associated with insulin resistant type 2 diabetes remain to be explored. In the present study, we characterized longitudinal trends in IENF density and alterations in peripheral nerve insulin signaling at the specific stages of neuropathy in type 2 diabetic Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. ZDF rats at 8-10 weeks of age showed compensatory hyperinsulinemia and developed thermal hyperalgesia prior to the onset of overt hyperglycemia. These animals also exhibited progression from thermal hyperalgesia to hypoalgesia and developed mechanical hyperalgesia after 18 weeks of age when hyperglycemia was no longer accompanied by compensatory hyperinsulinemia. Despite the abnormal nociceptive behaviors, the IENF density was unaltered at 23 and 39 weeks of age, whereas it insignificantly increased by 26% at 10 weeks of age in ZDF rats, compared with age-matched lean rats. Immunofluorescence studies revealed significant decreases in insulin receptor and phosphorylated insulin receptor immunoreactivities in dorsal root ganglion neurons in 23 week-old ZDF rats compared with age-matched lean rats. In western blot analyses, insulin receptor and Akt protein levels were reduced by 70 % and 25%, respectively, whereas the phospho/total p44 and p42 MAP kinase ratios were increased by 33% and 52%, respectively, in the sciatic nerves of diabetic animals. In summary, the present study demonstrated progressive nociceptive dysfunction and aberrant peripheral nerve insulin signaling with preserved skin innervation up to 39 weeks of age in ZDF rats. ZDF rats may not be an appropriate animal model for studying IENF loss associated with type 2 diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1040,000
2010年度	1400,000	420,000	1820,000
2011年度	1100,000	330,000	1430,000
年度			
年度			
総計	3300,000	990,000	4290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：(1) 糖尿病 (2) 神経障害 (3) 表皮内神経線維 (4) 3次元画像解析 (5) 痛覚 (6) 病期分類 (7) インスリンシグナル異常

1. 研究開始当初の背景

糖尿病多発神経障害 (DPN) は下肢の感覚異常やしびれ、痛みを引き起こし、患者の QOL を低下させるだけでなく、進行すると痛覚鈍麻から下肢潰瘍、更には非外傷性下肢切断の主要な原因ともなっている。これまで DPN の病期や重症度、あるいは治療介入を行った際の効果判定のための客観的評価法として、

アキレス腱反射や振動覚などの理学検査、神経伝導速度検査および腓腹神経生検による有髄神経線維の病理学的検査が用いられてきた。しかしながら、これらのいずれの検査によっても、感覚異常やしびれの原因となる小径感覚神経線維の異常 (小径感覚神経障害) を客観的に評価することが困難であった。近年、腓腹神経生検に比し侵襲性が低く、定

量性・再現性、小径感覚神経障害診断に対する特異性および予後予測、更には他の大径神経線維障害との指標との相関性にも優れた検査法として皮膚生検による表皮内神経線維密度 (IENFD) の測定が着目されている。

2. 研究の目的

(1) これまで我々は、2型糖尿病 Zucker diabetic fatty (ZDF) ラットモデルでは生後8-10週齢の時点で温痛覚過敏を示し、生後16週齢以降になると温痛覚鈍麻と機械的痛覚過敏を合併することを見出している。このラットモデルの足底部の IENFD の経時的変化の特徴を明らかにする。

(2) このモデルの温痛覚過敏から温痛覚鈍麻に至る過程において、末梢神経内インスリンシグナルにいかなる変化が生じているのか明らかにする。

3. 研究の方法

実験動物：実際の臨床では2型糖尿病患者が大多数 (>95%) を占めていることを鑑みて、本研究では2型糖尿病ラットモデルを用いて実験を行った。2型糖尿病ラットモデルとして、雄性 ZDF ラットを用いる。対照として、性と週齢を合わせたやせ型正常ラットを用いる。

検体採取：初期痛覚異常として温痛覚過敏を示す10週齢 ZDF ラット、後期症状として温痛覚鈍麻と機械的痛覚過敏が出現し始める23週齢 ZDF ラット、そして更にこれらの痛覚異常が進行し悪化を示す39週齢 ZDF ラットから、後肢足底の皮膚 (直径3ミリ) および坐骨神経を採取する。週齢を合わせた同数例のやせ型正常ラットからも同様に皮膚、腰部後根神経節および坐骨神経を採取する。

(1) IENFD の定量的解析：各ラットから採取した皮膚をザンボニ固定液 (2%パラホルムアルデヒド+15%飽和ピクリン酸) にて4°Cで一晩固定する。凍結保護のため、更に一晩20%シュクロース含有PBSにて4°Cで震盪する。液体窒素で凍結後50 μ m厚の凍結切片を作成し、PGP9.5および4型コラーゲンに対する特異抗体を用いて二重免疫蛍光染色を行った。染色後の切片より共焦点顕微鏡システムを用いて取得した30 μ 厚分の三次元処理画像について、ヨーロッパ連合神経学会 (Eur J Neurol. 2005; 12: 747-58) の定める方法に則り IENFD の定量的解析を行った。

(2) 末梢神経内インスリンシグナル解析：各ラットから採取した腰部後根神経節より凍結切片を作成し、インスリン受容体 (IR) およびリン酸化インスリン受容体 (p-IR) に対する特異抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。また、坐骨神経より総蛋白を抽出し、特異1次抗体を用いた免疫ブロット法により IR、MAP キナーゼおよび AKT のリン酸化の発現について解析を行った。

4. 研究成果

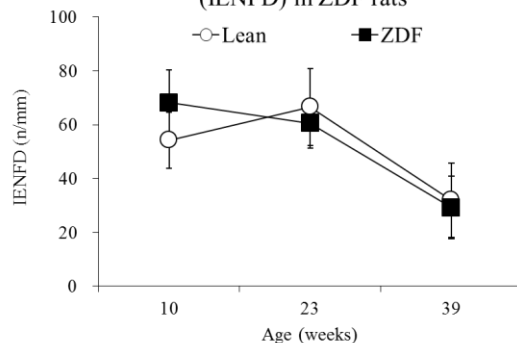
(1) IENFD の定量的解析：図1に10週齢、23週齢および39週齢のやせ形正常ラットおよび ZDF ラットの足底皮膚 IENFD を示す。解析したやせ形正常ラットおよび ZDF ラットの数はそれぞれ、10週齢で5匹と6匹、23週齢で6匹ずつ、そして39週齢で8匹と7匹となった。

10週齢の ZDF ラットは同週齢のやせ形ラットに比し、IENFD が上昇傾向 ($p=0.0742$) を示したが、その他の週齢では両ラット間の IENFD に有意な差異を認めなかった。やせ形ラットは10週齢 ($p=0.0031$) および23週齢 ($p<0.0001$) に比し、39週齢で有意な IENFD の低下を認めた。同様に、39週齢の ZDF ラットは10週齢および23週齢の ZDF ラットに比し、有意に ($p<0.0001$) IENFD が低下していた。Brussee らは4ヶ月齢の ZDF ラットにおいて IENFD が正常ラットの約5分の1に低下すると報告している (Diabetes. 2008;57(6):1664-73)。しかしながら、本研究においては、より長期の10ヶ月齢近い ZDF ラットを含む経時的な解析において、統計学的に有意な IENFD 低下を指摘することが出来なかった。すなわち、著明な高血糖と痛覚異常を示す ZDF ラットにおいては、有意な末梢神経線維の脱落を示さないという結果となった。以上のことより；

- ① ZDF ラットに出現する神経障害の自然経過を解析するだけでは、糖尿病患者に認められる末梢神経線維脱落の成因を探索することは困難と考えられる。
- ② ZDF ラットに認められる慢性高血糖は末梢神経線維の脱落を引き起こさない。

以上の2点が示唆された。

図1. Time course of changes in intraepidermal nerve fiber density (IENFD) in ZDF rats



本研究のように、ZDF ラットの皮膚神経支配について長期間に亘って解析を行った報告は過去に無く、今後本研究の成果を公表することにより、ZDF ラットを用いた神経障害研究の結果をよりよく理解することに貢献できると期待される。

(2) 末梢神経内インスリンシグナル解析：図2に23週齢のやせ形正常ラット (図2a, c) および ZDF ラット (図2b, d) の腰部後根神経節における IR (図2a, b) および p-IR (図

図2 腰部後根神経節における蛍光免疫染色像

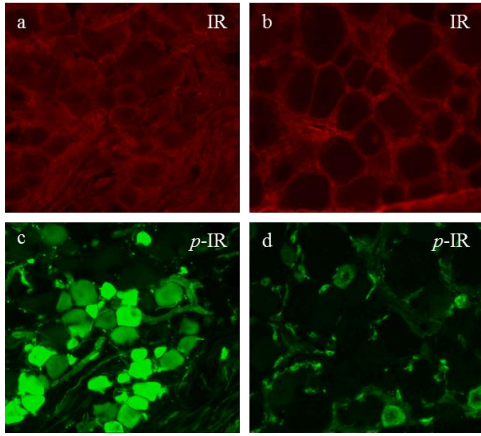


図3 Insulin receptor immunoreactivity

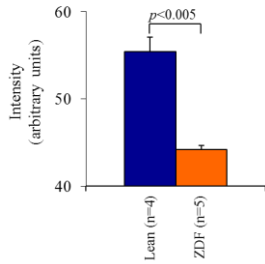
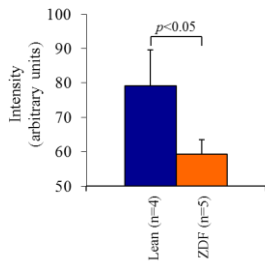


図4 phosphorylated insulin receptor immunoreactivity



2c, d) の免疫蛍光染色像を示す。

後根神経節の一次感覚神経細胞における IR および p-IR の免疫活性は、ZDF ラットで減弱して観察された。Image J を用いた免疫活性強度の定量解析では、やせ形ラットに比し ZDF ラットにおいて、一次感覚神経細胞における IR (図 3) および p-IR (図 4) の免疫活性強度が有意に低下していた。

図 5 に坐骨神経における IR 蛋白発現の解析結果を示す。23 週齢の ZDF ラットの坐骨神経では、同週齢のやせ形ラットに比し IR 蛋白発現が 70% 有意に低下していた。

坐骨神経におけるリン酸化 p44 および p42MAP キナーゼ蛋白発現の解析結果をそれぞれ図 6 および図 7 に示す。23 週齢の ZDF ラットの坐骨神経では、同週齢のやせ形ラットに比しリン酸化 p44 および p42MAP キナーゼ蛋白発現がそれぞれ、32% および 52% 増加していた。

坐骨神経における Akt 蛋白発現を図 8 に、リン酸化 Akt 蛋白発現を図 9 に示す。23 週齢の ZDF ラットの坐骨神経では、同週齢のやせ形ラットに比し Akt 蛋白発現が 25% 有意に減少していたが、リン酸化 Akt 蛋白発現には統計学的に有意でない 17% の減少を認め

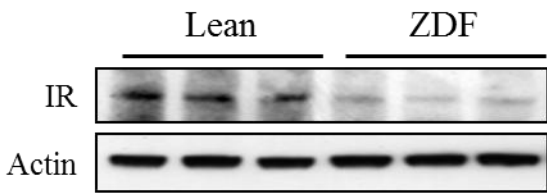
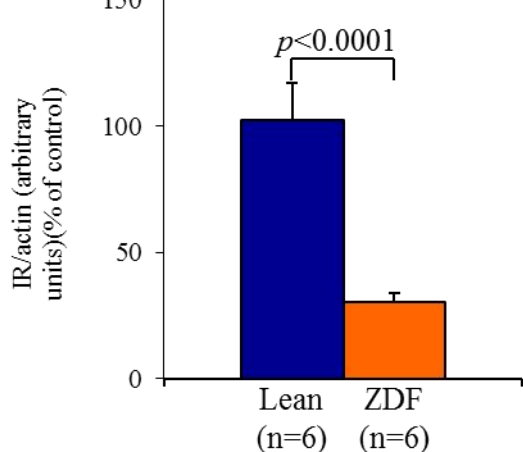


図5 坐骨神経におけるインスリン受容体蛋白発現



以上、23 週齢の ZDF ラットは同週齢のやせ形ラットに比し；

- ① 一次感覚神経細胞における IR および p-IR 蛋白の減少
- ② 坐骨神経における IR および Akt 蛋白の減少とリン酸化 MAP キナーゼ蛋白の増加を認める結果となった。

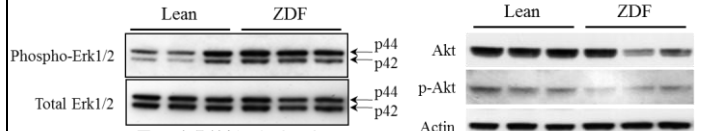


図6 坐骨神経におけるリン酸化p44 MAPキナーゼ発現

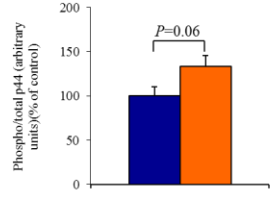


図7 坐骨神経におけるリン酸化p42 MAPキナーゼ発現

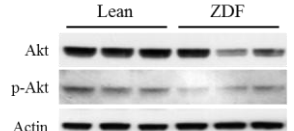
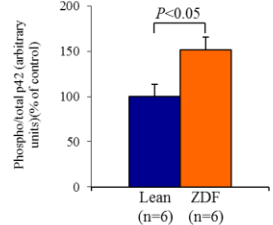


図8 坐骨神経におけるAkt蛋白発現

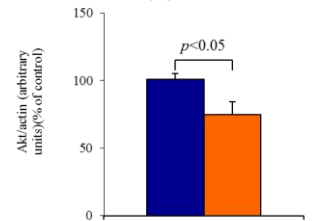
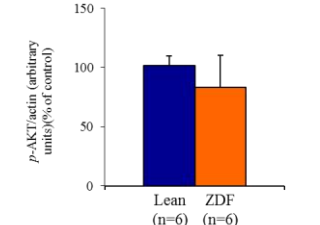


図9 坐骨神経におけるリン酸化Akt蛋白発現



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 13 件)

1. K. Sugimoto, K. Kojima, M. Babab, M Yasujima. Olmesartan ameliorates peripheral nerve dysfunction in Zucker diabetic fatty rats. J Hypertens 29(7):1337-46, 2011、査読有
2. 杉本一博：第 46 回欧州糖尿病学会年次学術集会「学会報告」：特にヘモグロビン A1c の運用について. 日本臨床化学会東北支部会誌 20(1):38-42, 2011、査読無
3. 杉本一博、齋藤慶子、小島佳也、蔦谷昭司、保嶋実：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の現状と課題. 臨床病理 59(9):870-878, 2011、査読無
4. 杉本一博：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. 糖尿病合併症 25(1):14-21, 2011、査読無
5. 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、査読有

6. 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、査読有
 7. 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、査読無
 8. 齊藤順子、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ブルについて. *臨床病理* 58(6): 577-580, 2010、査読無
 9. 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、査読無
 10. 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、査読無
 11. 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、査読無
 12. 杉本一博: 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. *弘前医学* 61(3): 65-68, 2010、査読無
 13. 杉本一博: 糖尿病多発神経障害研究の展開 Up-to-date. *糖尿病* 53(2): 86-89, 2010、査読無
- [学会発表] (計 19 件)
1. 杉本一博、馬場正之、八木橋操六、保嶋実: 血糖値に影響を与えない少量のインスリン投与がストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの末梢神経インスリンシグナルに与える影響. 第54回日本糖尿病学会年次学術集、札幌プリンスホテル、平成23年5月19日
 2. 村上宏、杉本一博、村上洋、山下真紀、松木恒太、田辺壽太郎、松井淳、玉澤直樹、保嶋実、八木橋操六、須田俊宏: 日常的な糖尿病性神経障害の検査法と皮膚生検による表皮内神経線維密度との関連性. 第54回日本糖尿病学会年次学術集、札幌プリンスホテル、平成23年5月19日
 3. Sugimoto K, Baba M, Yagihashi S, Yasujima M. Low-dose insulin deactivates p44/42 MAPK and ameliorates peripheral sensory nerve

dysfunction in rats with streptozotocin-induced diabetes. 71th Scientific sessions of the American Diabetes Association, San Diego, USA, June 24-28, 2011

4. 杉本一博、小島佳也: 少量のインスリン投与がストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの Erk 活性化に伴う感覚神経障害を改善する. 第58回日本臨床検査医学会学術集会、岡山コンベンションセンター、平成23年11月18日
5. 赤崎友美、小山有希、四釜佳子、原悦子、杉本一博: 2型糖尿病患者の総頸動脈内膜中膜複合体厚の経時変化. 第58回日本臨床検査医学会学術集会、岡山コンベンションセンター、平成23年11月18日
6. 蔦谷昭司、杉本一博、保嶋実: 高血圧におけるサイアザイド感受性 Na-Cl 共輸送体 (SLC12A3) 遺伝子のプロモーター領域多型の検討. 第58回日本臨床検査医学会学術集会、岡山コンベンションセンター、平成23年11月20日
7. 杉本一博: シンポジウム糖尿病神経障害臨床の最前線「経障害の新しい評価法としての皮膚生検」. 第46回糖尿病学の進歩、岩手県公会堂、平成24年3月2日
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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

13. 杉本一博: 第14回弘前大学医学部学術賞受賞記念講演-学術特別賞「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147回弘前医学会例会、弘前大学医学部コミュニケーションセンター、平成22年1月29日
14. 杉本一博、八木橋操六、馬場正之、保嶋実: 長期間の少量インスリン投与が非糖尿病ウイスターラットの末梢神経機能に与える影響. 第24回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、ホテルコスモスクエア国際交流センター、大阪、平成22年1月23日
15. 杉本一博、保嶋実: シンポジウム「医学教育における臨床検査医学の重要性とその貢献」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. 第33回日本臨床検査医学会東北支部例会、フォレスト仙台、平成21年11月14日
16. Sugimoto K, Baba M, Yasujima M. Angiotensin II type-1 receptor blocker olmesartan increases neuronal expression of angiotensin II receptors in dorsal root ganglia and ameliorates diabetic peripheral neuropathy in Zucker diabetic fatty rats. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Vienna, Austria. September 30-October 2, 2009
17. 杉本一博、小島佳也、保嶋実: ピオグリタゾン[®]は2型糖尿病ZDFラットモデルの痛覚異常を改善する. 第56回日本臨床検査医学会学術集会、札幌コンベンションセンター、平成21年8月28日
18. Sugimoto K, Yasujima M: Effects of Treatment with Angiotensin II Type-1 Receptor Blocker on Peripheral Nerve Dysfunction in Zucker Diabetic Fatty Rats. 69th Scientific sessions of the American Diabetes Association, New Orleans, USA, June 5-9, 2009
19. 杉本一博、保嶋実: アンジオテンシン III 型受容体拮抗薬オルメサルタンの2型糖尿病ZDFラット末梢神経障害に対する投与効果. 第52回日本糖尿病学会年次学術集、大阪国際会議場、平成21年5月22日

〔図書〕(計2件)

1. 杉本一博、八木橋操六: 糖尿病神経障害. (編集)山田勝士、小高賢一、大井一弥、

丸山徹、高村徳人、伊藤由紀、(監修・編集)横田千津子、池田宇一、大越教夫、病気と薬パーフェクト BOOK 2011、p. 710-715、南山堂、東京、2011

2. 杉本一博: 糖尿病神経障害. (編集)須田俊宏、臨床内分泌・代謝学改訂第2版、p. 371-378、弘前大学出版会、弘前、2011

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

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

杉本 一博 (SUGIMOTO KAZUHIRO)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 70271799

(2) 研究分担者

保嶋 実 (YASUJIMA MINORU)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 90142934
*2009年~2010年

(3) 連携研究者

()

研究者番号: