

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591260

研究課題名(和文) 糖尿病性多発神経炎の神経再生治療の基礎的検討

研究課題名(英文) Basic study of neuroregenerative therapy for diabetic polyneuropathy

研究代表者

村上 龍文 (MURAKAMI, Tatsufumi)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30330591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性多発神経炎(DPN)の血管内皮増殖因子(VEGF)遺伝子治療での改善機序を解明するため、この治療が著効するSTZ糖尿病マウスのDPNについて検討した。その結果このマウスでは糖尿病初期から無髄線維が選択的に萎縮しており、有髄線維は成長・発達障害があることが明らかとなった。また坐骨神経ではVEGFシグナル系の遺伝子発現が亢進し、PGE2含量の低下が認められた。ラットと異なりマウスではVEGFの逆行性軸索輸送は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the neuroregenerative effect of VEGF gene therapy, we examined sensory neuropathy in STZ diabetic mice. We found that both impaired maturation of myelinated fibers and atrophy of unmyelinated fibers simultaneously occur in the early stage of diabetes in these mice. In sciatic nerves, increased gene expression in VEGF signaling pathways, and reduction of PGE2 contents were observed. Retrograde transport of VEGF was not recognized in the mice.

研究分野：医歯薬学

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：糖尿病性多発神経炎 神経再生治療 血管内皮増殖因子

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性末梢神経障害は糖尿病の3大合併症の一つで最も頻度が高く糖尿病患者の半数が罹患しているといわれている。病型では感覚障害優位の多発神経炎(DPN)を呈することが多く、原疾患の治療にもかかわらず治療抵抗性のことが多く、最悪の場合は足潰瘍や感染で下肢切断が必要になることがある。血糖コントロールが唯一の有意な治療法で、その他は対処療法が行われているにすぎない。DPNの成因には代謝性、血管性、神経栄養性など多くの因子が関わっているといわれている。

研究開始当初 DPN の遺伝子治療で血管内皮増殖因子(VEGF)プラスミドを筋注する第2相無作為臨床試験の結果が発表され、神経障害が改善することが報告された(Ropper AH, et al. *Ann. Neurol.* 65, 386-392, 2009)。とくに疼痛の程度と感覚障害の範囲が改善していた。この論文では VEGF の遺伝子治療を行った根拠として、DPN を有する糖尿病動物で VEGF 遺伝子治療の前臨床実験を行った3つの論文が引用されており、我々の論文 (Murakami T, et al. *J. Gene Med.* 8, 773-781, 2006) も引用されていた。

VEGF の遺伝子治療は DPN の成因としての微小血管障害があり VEGF により虚血を改善しようという目的で行われるが、我々が2006年の論文で明らかにした事は「DPN を有する糖尿病マウス下肢に VEGF 遺伝子を導入しても坐骨神経で血管新生は生じでならず、DPN の改善機序として感覚神経に直接神経保護的に作用しているのではないか」という点である。

我々はさらに研究を進め、糖尿病マウス DPN の改善には3種類の VEGF 受容体のうち感覚神経細胞に存在するニューロピリン1受容体(NP-1)が必須であることや、糖尿病マウス表皮内で減少している自由神経終末が、VEGF 関連分子である胎盤成長因子2(PIGF2)での遺伝子治療で再生することを証明した (Murakami T, et al. *Exp. Neurol.* 2011)。一方糖尿病ラットの筋肉で発現した VEGF が、坐骨神経で逆行性軸索輸送され後根神経節(DRG)に到達することが報告された (Pawson EJ, et al. *Diabetes* 59, 509-518, 2010)。

## 2. 研究の目的

本研究で研究代表者らが発見した、糖尿病性多発神経炎(DPN)の血管内皮増殖因子(VEGF)遺伝子治療での改善機序が単なる血管新生ではなく直接神経細胞に作用し再生させているという知見を、さらに解明することを目的とした。

計画している具体的な研究項目は次の2つを挙げた。

(1) VEGF の逆行性軸索輸送についてマウスで解析する。

(2) ニューロピリン1受容体(NP-1)を介した神経再生機序を解明する。

VEGF の感覚神経細胞への逆行性軸索輸送が DPN の改善機序に関与しているのか、末梢神経系で VEGF NP-1 受容体 PGE2 の系が DPN の改善に動いているのかを解明しようとした。

## 3. 研究の方法

### (1) VEGF の逆行性軸索輸送の解析

マウス VEGF164 とマウス PIGF2 の C 末端に Flag のアミノ酸配列を付加し、pCAGGS ベクターに組み込む。正常マウス前脛骨筋に上記プラスミドを 50 µg 筋注し、電気穿孔法で遺伝子導入を行い発現させる。導入1週後に筋での発現を組織化学染色で確かめる。

上記マウスの DRG を遺伝子導入1週後に採取し、プラスミドの有無を PCR で調べる。免疫組織化学染色で抗 Flag 抗体を用いて実際に逆行性軸索輸送が生じ DRG に VEGF-Flag が存在するかを確認する。

正常マウスの前脛骨筋に同様に遺伝子導入を行い、1週後に坐骨神経中間部を結紮し逆行性輸送蛋白を蓄積させ、結紮24時間後に坐骨神経を取り出し、抗 Flag 抗体を用いた免疫組織化学染色と ELISA 法を施行し逆行性軸索輸送を確かめる。

### (2) NP-1 受容体を介した神経再生機序の解明 電気生理学的、行動薬理学的、病理学的解析

我々が糖尿病性感覚ニューロパチーのモデルマウスとして用いているストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病マウスでは、STZ 投与6週後に足背の痛覚閾値の上昇と尾部感覚神経伝導速度の低下が、9週後に足底表皮内自由神経終末の減少が認められる。このニューロパチーの NP-1 を介した神経再生機序を解明するためには、逆に感覚ニューロパチーが STZ 投与後どのようにして生じるかを明らかにすることが不可欠である。

まずこの糖尿病マウスの神経障害が STZ 投与後何週から見られるかを尾神経伝導検査、痛覚閾値検査、それから坐骨神経の有髄神経、無髄神経の病理学的検査で検討する。

具体的には8週齢の ddy 系雄性マウスに STZ 200mg/kg を腹腔内に投与し糖尿病マウスを作成した。この糖尿病マウス(n=13)を用い STZ 投与0~9週後(8~17週齢)まで毎週尾神経で感覚神経伝導検査(順行性)を施行し、同

じ週齢の正常マウス(n=7)と比較して神経障害の発現を調べた。また、paw-pressure testで侵害受容閾値を測定した。さらに17週齢の糖尿病マウス(n=6)と正常マウス(n=5)、8週齢の正常マウス(n=5)の坐骨神経を採取し、エポン包埋後、有髄神経と無髄神経線維の面積、直径、密度、数、有髄神経の髄鞘面積を測定し評価した。

尾部感覚神経伝導検査は尾部末端遠位部に刺激電極を、近位部に導出電極をおき、両者の距離を6cmとした。最大上刺激で刺激し20回加算し、感覚誘発電位の陰性波偪時と頂点間電位を測定した。尾部の温度は $27 \pm 0.2$ で一定に保温した。

#### 生化学的、分子生物学的解析

糖尿病マウスでVEGFシグナル系が坐骨神経のmRNAレベルでどう変化しているかを検討した。糖尿病マウスと正常マウスの坐骨神経よりmRNAを抽出し、VEGF signaling PCR array (Qiagen)でプロトコールに従いVEGFシグナル系に關与する84遺伝子の発現を定量した。

正常マウスおよび痛覚鈍麻が確認された糖尿病マウスより坐骨神経を摘出し、mRNAを抽出した。各RNAよりcDNAを合成し、各PCR反応の鋳型とした。各セマフォリン分子を特異的に増幅するプライマーを用いてPower SYBR StepOneリアルタイムPCRシステムで定量化した。内部標準としてGAPDH遺伝子を用いた。

STZ投与2、6週後の糖尿病マウスの痛覚閾値をpaw-pressure testで測定し、痛覚鈍麻を確かめた。痛覚鈍麻が確認された糖尿病マウスと正常マウスの坐骨神経を取り出しプロスタグランジンE2 (PGE2)量をELISA測定キット(カイマン社)で定量した。

#### 4. 研究成果

##### (1) VEGFの逆行性軸索輸送について

マウス心臓cDNA libraryより、PCRでマウスVEGF-FlagとマウスPIGF2-Flag cDNAを得て、pCAGGSベクターに組み込み、塩基配列をdirect sequenceで確認した。

この2種類のプラスミドを各々正常マウス前脛骨筋に筋注射し(50  $\mu$ l, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l)、エレクトロポレーションを施行し遺伝子を導入した。1週間後に筋を抽出し、パラフィン包埋し、切片を作成、HE染色にて観察したところ、新生血管の増生と単核球の浸潤が認められVEGFやPIGF2が発現していることが示唆された。

次にマウスVEGF-Flagプラスミドを正常マ

ウス前脛骨筋に遺伝子導入したあと1週間後にL4, L5, L6(マウスはL6まで)各々の後根神経節(DRG)DNAを抽出し導入プラスミドの有無をPCRで調べたが検出されなかった。従ってpCAGGSベクターそのものが逆行性軸索輸送で運ばれたのではないと推測された。またVEGF-FlagのDRGでの存在を証明するためDRGの免疫組織化学染色を抗Flag抗体で施行したが有意なシグナルは得られなかった。

さらにVEGFの逆行性軸索輸送については正常マウスでの坐骨神経結紮モデルで、VEGF-Flag発現ベクターを前脛骨筋に導入し坐骨神経を調べたが、免疫組織化学染色とELISA法ではVEGF-Flagは観察されなかった。このベクターは遺伝子を導入した筋では発現しており、ラットと異なりマウスではVEGFの逆行性軸索輸送は生じていないが、これら検出法の検出限界以下の可能性が示唆された。

##### (2) ニューロピリン1受容体(NP-1)を介した神経再生機序について

電気生理学的、行動薬理学的、病理学的検討

STZ糖尿病マウスのニューロパチーの成因をさぐるため、尾神経伝導検査と坐骨神経の病理学的検査で検討した。

その結果、(a)正常マウスでは感覚神経伝導速度は13週齢まで上昇しその後定常状態となったが、糖尿病マウスでは8週齢からわずかな上昇が観察されるのみであった。(b)paw-pressure testではSTZ投与5週後より痛覚閾値の上昇(痛覚鈍麻)が明らかとなった。(c)感覚神経伝導速度と痛覚閾値は負の相関関係が認められた( $r^2 = 0.2668$ )。(d)STZ糖尿病マウスの感覚神経伝導速度の増加の遅延や痛覚閾値の上昇はインスリン徐放剤の移植により予防可能であり高血糖が原因であった。(e)有髄神経線維と髄鞘の面積は17週齢正常マウスでは8週齢正常マウスと比較すると有意な増加が認められ、17週齢糖尿病マウスと比較しても有意に増大していた。(f)無髄神経線維の面積は17週齢正常マウスでは8週齢正常マウスに比し増加傾向にあったが、17週齢糖尿病マウスでは両マウス群に比して有意に減少していた。(g)坐骨神経内膜血管には形態学的異常は認められなかった。

これらの結果からこのマウスでは糖尿病初期から無髄線維が選択的に萎縮しており、有髄線維は成長・発達障害があることが明らかとなった。このマウスは温痛覚がより障害される糖尿病性ニューロパチー(small fiber neuropathy)の病態を反映しており、表在覚の神経再生の治療薬のスクリーニングに有用で

あると推察された。また NP-1 は DRG 小径感覚神経細胞に発現しており VEGF 治療によるこのマウスでの著明な痛覚鈍麻の改善は NP-1 を介していることが示唆された。

#### 生化学的、分子生物学的検討

VEGF は糖尿病性神経障害を有意に改善・再生させることから、VEGF シグナル系に関する 84 遺伝子の発現を、糖尿病マウス坐骨神経と正常マウス坐骨神経で比較した。その結果 VEGF シグナル系は遺伝子発現レベルでは全般的に糖尿病で増加傾向にあり、特に Akt & Pi-3-kinase signaling (Akt1, Akt3, Pik3ca, Pik3cd, Pik3r1, Pik3r2, Pik3r3) や Protein kinase C (Prkca, Prkcb) の pathway の亢進が観察された。 また VEGFA の遺伝子発現は、糖尿病で 1.99 倍ほど増加していた。

In vitro では VEGF や PlGF2 は、NP-1, NP-2 受容体において、SEMA 分子と競合している。そこで痛覚鈍麻を有する糖尿病神経障害モデルマウスと正常マウスの坐骨神経から mRNA を抽出し、6 種の SEMA 遺伝子発現レベルについてリアルタイム RT-PCR 法で調べた。今回検討した結果ではいずれの遺伝子発現も統計学的に有意な変化は認められなかったが、SEMA3A と SEMA3F は上昇傾向が認められた。 また本実験では SEMA 分子の受容体である NP-1, NP-2 は正常マウス群に比し発現レベルに有意差は認められなかった。

VEGF や PlGF2 は感覚神経培養細胞では NP-1 を介してプロスタグランジン 2 (PGE2) を増加させ神経再生に関与していることが報告されている。そこで糖尿病神経障害モデルマウスの坐骨神経における PGE2 含量を経時的に検討した。坐骨神経での PGE2 含量は STZ 投与 2 週後の DM 群は正常マウス(control)群と有意差はなかったが、投与 6 週後の DM 群では  $1.0 \pm 0.4$  pg/ $\mu$ g tissue protein (n = 6)、control 群では  $2.0 \pm 0.8$  pg/ $\mu$ g tissue protein (n = 6) となり、DM 群において有意な減少を認めた。痛覚鈍麻を有する糖尿病神経障害モデルマウスでの PGE2 含量の低下は初めての知見である。 VEGF や PlGF2 はこの疾患モデルマウス治療実験でも NP-1 を介して PGE2 を増加させ神経を再生させ痛覚鈍麻を改善させている可能性が示唆された。

#### 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 4 件)

T. Murakami, Y. Shimada, Y. Imada, A. Nakamura, Y. Sunada. Vascular endothelial growth factor electro-gene therapy

improves functional outcome in a mouse model of ALS. *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.* 査読有, 13, 2013, 107-111.

DOI: 10.2174/1871522211313020004

T. Murakami, Y. Kutoku, H. Nishimura, M. Hayashi, A. Abe, K. Hayasaka, Y. Sunada. Mild phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease type 4B1. *J. Neurol. Sci.* 査読有, 334, 2013, 176-179.

DOI: 10.1016/j.jns.2013.08.001

T. Murakami, T. Iwanaga, Y. Ogawa, Y. Fujita, E. Sato, E. Yoshitomi, Y. Sunada, A. Nakamura. Development of sensory neuropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Brain Behav.* 査読有, 3, 2013, 35-41.

DOI: 10.1002/brb3.111

T. Murakami, Y. Sunada. Plasmid DNA gene therapy by electroporation: principles and recent advances. *Curr. Gene Ther.* 査読有, 11, 2011, 447-456.

DOI: 10.2174/156652311798192860

[学会発表](計 5 件)

村上龍文、砂田芳秀、中村明弘、 VEGF とその関連分子を用いた糖尿病性ニューロパチーの遺伝子治療の研究、第 19 回糖尿病性神経障害を考える会(招待講演)、2013 年 8 月 31 日、都市センターホテル(東京)

T. Murakami, T. Iwanaga, Y. Ogawa, Y. Fujita, E. Sato, E. Yoshitomi, Y. Sunada, A. Nakamura. Development of sensory neuropathy in streptozotocin-induced diabetic ddY mice. 第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 20 日、名古屋国際会議場(名古屋)

村上龍文、小川芳尚、岩永崇志、藤田吉明、佐藤英治、吉富博則、中村明弘、砂田芳秀、 ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスのニューロパチーの検討：小径線維障害について、第 53 回日本神経学会総会、2012 年 5 月 25 日、東京国際フォーラム(東京)

T. Murakami, Y. Fujita, E. Sato, H. Yoshitomi, Y. Sunada, A. Nakamura. Placental growth factor-2 gene transfer by electroporation improves diabetic sensory neuropathy in mice. *American Society of Gene & Cell Therapy, 15<sup>th</sup> Annual Meeting,* 2012 年 5 月 18 日、Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, USA)

村上龍文、岩永崇志、小川芳尚、藤田吉明、佐藤英治、吉富博則、中村明弘、砂田芳秀、 ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスでのニューロパチー発現機序の検討：神経成熟・成長障害の関与について、第 22 回日本末梢神経学会、2011 年 9 月 3 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/neurology/wiki.cgi?page=%B8%A6%B5%E6%A4%CE%A4%B4%BE%D2%B2%F0>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

村上 龍文 (MURAKAMI, Tatsufumi)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30330591

### (2)研究分担者

砂田 芳秀 (SUNADA, Yoshihide)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00240713