

学位論文題名

NGF 増加を介したアルドース還元酵素阻害薬による
糖尿病創傷治癒遅延の改善効果

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

糖尿病神経障害は糖尿病の三大合併症(細小血管症)の一つとして知られている。アルドース還元酵素(AR)はポリオール経路においてグルコースがソルビトールに変換される際の律速酵素であり、アルドース還元酵素阻害薬(ARI)はアルドース還元酵素を阻害することにより、ソルビトールやフルクトースの蓄積を防ぎ神経障害を改善させる。これまで糖尿病患者に見られる皮膚難治性潰瘍では神経線維の減少が報告されており、この末梢神経線維減少が糖尿病患者の創傷治癒遅延と関係している可能性が示唆されている。その機序としてのポリオール代謝と創傷治癒の関連についての報告はなく、ARI投与が創傷治癒期間にどのような影響を及ぼすかという報告もこれまでにない。そこで我々は創傷の修復におけるARIの効果を明らかにすることを目的に、糖尿病マウスの背部に創傷を作成し、ARI混餌投与することにより糖尿病による創傷治癒遅延が改善しうるかどうかを検討した。

【材料と方法】

1.糖尿病マウスの作製と創傷作成

生後8週オスのC57BL/6Jに対しストレプトゾトシン(STZ)を20mg/kg腹腔内投与し、1週間後の血糖値が360mg/dl以上となった個体を糖尿病群とし、I.control群、II.DM群、III.ARI群、IV.DM+ARI群とし、各群8匹の4群に群分けした。更にNGF高親和性レセプターであるTrkAレセプター拮抗薬のK252aをDM+ARI群、ARI群、control群各4匹ずつに皮下投与し、還元型グルタチオン(GSH)拮抗薬であるBSOを同様にDM+ARI群、ARI群、control群各4匹ずつに皮下投与した。ARI投与群にはエパルレストアットをSTZ投与時から試験終了まで0.04%混餌投与を継続とした。STZ投与12週後にBIOPSY PUNCHを用いて皮筋を含む皮膚全層欠損創(径6mm)を1匹あたり2個作成した。K252aは50 μ g/kgで創傷作成時より毎日皮下注射にて創部局所投与し、BSOも4mmol/kgをK252aと同様に創部局所投与とした。2日毎に創傷面積を観察し比較検討した。

2.肉眼的観察法

創傷作成より2日毎に創の形状をマーキングし、デジタルカメラを用いて創部を撮影した。創の面積はスキャナーで取り込み、NIH image 1.61(USA)で測定した。

3.免疫蛍光染色法

創傷作成時、作成7日後、14日後に創部と創部周囲を含む組織を採取し、一次抗体としてウサギモノクローナル抗NGF抗体を4 $^{\circ}$ C, over nightにて反応させ、二次抗体として抗ウサギIgG Alexa Fluor 594抗体を遮光室温にて60分反応させ、LAS4000 image readerにて撮影し解析した。

4.real time PCR 法

創傷作成時、作成7日後、14日後に創部組織を採取し、RNA抽出まで-80 $^{\circ}$ Cの冷凍庫に保存した。Total RNAの抽出はRibopure RNA抽出キットを用いた。1 μ gのtotal RNAをoligo dTプライマーおよびReverse Transcriptaseを用いて逆転写反応を行い、生成されたcDNAを鋳型とし各種プライマーを用いて増幅した。

[結果]

1. 創傷治癒観察

創傷作成時より創傷面積を継続観察したところ、9日後以降からDM群において創傷治癒の有意な遅延が認められた($p<0.05$)。11日後での評価では、DM+ARI群においてDM群で認められた創傷治癒遅延の有意な改善が認められた($p<0.01$)。

2. 創傷治癒に関連する成長因子発現の検討

創傷治癒に関連する成長因子として、既報の成長因子について創傷作成時、創傷作成7日後、創傷作成14日後での創傷皮膚病変部における発現変化をreal time PCRを用いて検討した。創傷作成14日後においてNGF発現についてcontrol群と比較してDM群での55%の有意な発現低下($p<0.05$)と、ARI投与による有意な発現の回復を認めた($p<0.001$)。

3. 創傷皮膚におけるNGFの局在変化の検討

ウサギモノクローナル抗NGF抗体を用いた創傷作成7日後の創傷部皮膚免疫蛍光染色では、mRNA発現と同様にDM+ARI群の表皮有棘層において蛍光強度の上昇が認められた。

4. NGF拮抗薬を用いた創傷治癒遅延の変化

DM+ARI+K252a群においてDM+ARI群と比較し有意な創傷治癒遅延が認められ($p<0.05$)、DM+ARI+BSO群においても有意な創傷治癒の遅延が認められた($p<0.05$)。また各群におけるNGF発現をreal time PCRを用いて比較検討したところ、DM+ARI+BSO群ではDM+ARI群と比較し有意差は認めないものの低下傾向であり、DM+ARI+K252a群はNGF発現の有意な低下を認めた($p<0.001$)。

[考察]

創傷治癒過程の観察においてARIの投与により糖尿病マウスの創傷治癒期間が有意に改善し、ARIの糖尿病創傷治癒遅延に対する改善効果が今回初めて示された。そこでどのような機序でARIが創傷治癒遅延を改善させたのかを明らかにするため我々は創傷治癒に関連する成長因子に注目した。今回の検討においては神経成長因子であるNGFの発現以外にはARI投与による有意な変化は認められなかった。NGFは神経栄養因子ニューロトロフィンであり、皮膚刺激や創傷治癒の過程で上皮細胞や線維芽細胞から産生され細胞損傷時の修復作用にあたる。またSTZ投与糖尿病マウスでは末梢組織におけるNGFの低下が認められ、NGFの局所投与が糖尿病マウスの血管形成回復を刺激し、局所の血管内皮細胞のアポトーシスを抑制したと報告されている。本研究におけるNGFのmRNA発現と免疫染色の結果より、ARIの創傷治癒遅延改善効果におけるNGFの関与が推測された。そのARIとNGFとの関連について糖尿病神経障害の一機序であるペントースリン酸経路を介したNGFの回復が予想されたため、NGF作用抑制目的に2種類の拮抗薬を用い、更に創傷治癒やNGFへの影響を観察したところ、ARIによる創傷治癒改善効果の抑制とNGF発現の低下が確認された。しかし今回の結果からは他の経路を介したNGFの作用増強もあることが示唆された。今回の検討から糖尿病状態で低下した創傷部位におけるNGFの発現をARIが増加させることにより創傷治癒を促進させ、糖尿病末梢神経障害の治療薬としてだけでなく、糖尿病における潰瘍や壊疽の治療効果も期待できることが示唆された。

[結論]

1. アルドース還元酵素阻害薬(ARI)投与により糖尿病マウスの創傷治癒遅延の改善が認められた。
2. ARI投与による創傷治癒遅延改善の機序として、創傷部におけるnerve growth factor (NGF)の増加作用があることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 清 水 宏

副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

NGF 増加を介したアルドース還元酵素阻害薬による 糖尿病創傷治癒遅延の改善効果

アルドース還元酵素 (AR) はポリオール経路においてグルコースがソルビトールに変換される際の律速酵素であり、アルドース還元酵素阻害薬(ARI)はアルドース還元酵素を阻害することにより、ソルビトールやフルクトースの蓄積を防ぎ糖尿病神経障害を改善させる。これまでの研究ではアルドース還元酵素阻害薬投与により創傷治癒期間が改善されたとの報告はこれまでにない。そこで、我々は創傷の修復における ARI の効果とその機序を明らかにすることを目的に、糖尿病マウスの背部にパンチバイオプシーにて創傷を作成し、ARI を混餌投与することによって創傷治癒期間が改善しうるかどうかが検討した。I.非糖尿病群、II糖尿病群、III.非糖尿病+ARI 投与群、IV.糖尿病+ARI 投与群の4群にマウスを群分けし、マウス背部に創傷を2個作成し、創部の閉鎖まで創傷面積を観察し解析を行った。day9～day11においてDM群の創傷治癒が有意に遅延していた。day11での評価では、DM+ARI群においてDM群で見られた創傷治癒遅延の有意な改善が認められた。ARI投与による創傷治癒遅延改善の機序解明を目的に、成長因子に着目し、real time PCRにて創傷部の mRNA 発現量を検討したところ、神経成長因子 NGF が DM 群で有意に低下し、DM+ARI 群にて、control 群レベルまで回復していたことが明らかになった。そこで NGF 拮抗薬である K252a と BSO の投与を行ったところ、DM+ARI 群において NGF 発現回復の有意な抑制と ARI による創傷治癒遅延改善効果の消失が認められた。創傷治癒過程の観察において ARI の投与により糖尿病マウスの創傷治癒期間が有意に改善し、ARI の糖尿病創傷治癒遅延に対する改善効果が今回初めて示された。そこで我々は創傷治癒に関連する成長因子に注目した。今回の検討においては神経成長因子である NGF の発現以外には ARI 投与による有意な変化は認められなかった。NGF は神経栄養因子ニューロトロフィンであり、また STZ 投与糖尿病マウスでは末梢組織における NGF の低下が認められると報告されている。本研究における NGF の mRNA 発現と免疫染色の結果より、ARI の創傷治癒遅延改善効果における NGF の関与が推測された。その ARI と NGF との関連についてペントースリン酸経路を介した NGF の回復が予想されたため、NGF 作用抑制目的に2種類の拮抗薬を用いたところ、ARI による創傷治癒改善効果の抑制と NGF 発現の低下が確認された。結論としてアルドース還元酵素阻害薬(ARI)投与により糖尿病マウスの創傷治癒遅延の改善が認められ、ARI 投与による創傷治癒遅延改善の機序として、創傷部における nerve growth factor (NGF)の増加作用があることが示唆された。

その後副査吉岡教授より①ARI の作用機序、②NADPH の消費がすすむと細胞が生存できない状況になるのではないかと、③臨床での ARI の効果や使用法についての質問があった。次いで副査清水教授より④糖尿病モデルマウスを使用した実験系ですが、こんなに早期に糖尿病合併症出るのか?⑤method で、STZ 注射で糖尿病にするとのことだが、すべてのマウ

スが糖尿病になるのか？ 個体差はなぜ起こるのか？ ⑥STZ で糖尿病にしたら、ずっと高血糖になっているのか？ について質問があった。次いで主査小池教授より⑦創傷治癒遅延のメカニズムには NGF だけではなく他の成長因子の相互作用も関連していると思うが治癒過程の前のタイミングの段階ではそれぞれの成長因子の発現はどうか？ ⑧技術的な問題だが、パンチで傷をつけたあとの処置は？ ⑨これを参考にキネダックの臨床研究やるとしたらどうするか？ ⑩NGF での治療のデータはあるか？ ⑪キネダックを局所投与法は？ などの質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は実験データや既報の論文を引用し、①NDH, Glucose, AR のアロステリック結合に作用する。②創傷のある局所で起こっていることで、全身的なものではない。③糖尿病神経障害の早期にのみきく。症状の発現をおさえる予防的な使い方。④神経障害に限らず腎症も短期で発症してくる。⑤マウスでは腹腔内投与が一般的、発症率は 50-60% 程度である。尾静脈からの iv では 80~90% の発症率である。⑥β細胞機能は戻らないのでずっと高血糖になっている。⑦個体差はβ細胞障害の程度による。⑧清潔操作で行い、感染しないようテガダームで保護した。失敗例では感染を起こしたこともあった。⑨ヒトでこのように傷をつけるのは難しい。次段階としては大きい動物（チンパンジーなど）を用いた実験がよいかと思われる。⑩マウスに NGF 投与し創傷治癒遅延が改善したデータがある。⑪ヒトでは内服、実験でもエサにまぜて結果が出たので内服でよいと思うと回答した。質疑応答の時間は約 15 分であった。なお、出席者はおよそ 70 名であった。この論文は、ARI が糖尿病創傷治癒を改善する点で高く評価され、今後の臨床応用が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。