

氏 名	山 川 勇
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 6 5 7 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 4 年 3 月 9 日
学 位 論 文 題 目	Inactivation of TNF $\alpha$ Ameliorates Diabetic Neuropathy in Mice  (TNF $\alpha$ の不活性化はマウスにおける糖尿病性神経障害を改善する)
審 査 委 員	主 査 教 授 竹 内 義 博 副 査 教 授 小 笠 原 一 誠 副 査 教 授 安 藤 朗

論文内容要旨

*整理番号	662	(ふりがな) 氏名	やまかわ いさむ 山川 勇
学位論文題目	Inactivation of TNF $\alpha$ Ameliorates Diabetic Neuropathy in Mice (TNF $\alpha$ の不活性化はマウスにおける糖尿病性神経障害を改善する)		

【目的】糖尿病末梢神経障害は進行性で難治性の代表的な糖尿病合併症である。その病因に対しては慢性的な高血糖により細胞外では局所的な低酸素血症・虚血や神経栄養因子の欠乏またTNF $\alpha$ やIL-6などのサイトカインが、細胞内では活性酸素やポリオール代謝の活性化・最終糖化産物(AGE)やその特異的受容体(Receptor for AGE)の上昇・プロテインキナーゼC(PKC)の活性化・マイトーゲン活性化プロテインキナーゼ(MAPK)、誘導型NO合成酵素(iNOS)などの様々な関与が言われている。またその治療として抗酸化剤やプロスタグランジンやアルドース還元酵素阻害薬、PKC阻害薬が使用されてきたが、糖尿病性神経障害を改善させる薬剤は少ない。最近高血糖状態でCD45陽性の異常な骨髄細胞が肝臓や後根神経節や末梢神経に融合しプロインスリン・TNF $\alpha$ を分泌し、融合した機能障害やアポトーシスを来しやすいことが報告されており、このために糖尿病性神経障害発症におけるTNF $\alpha$ が強く関与している可能性を考えた。本研究では糖尿病性神経障害のモデルとしてストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病マウス(I型糖尿病モデル)を用い、TNF $\alpha$ ノックアウトマウスを対照とし糖尿病性神経障害の発症におけるTNF $\alpha$ の重要性を再確認し、さらにTNF $\alpha$ の分子標的薬であるinfiximabを用いて、糖尿病末梢神経障害に対する治療効果を検討した。

【方法】8週齢の雌性C57BL/6マウスおよびTNF $\alpha$ ノックアウトマウスを用いSTZ 170mg/kgおよびbufferのみを投与し、それぞれのマウスにおいて糖尿病群と非糖尿病群を作成した。STZ投与前、および投与8週間後に神経伝導速度の測定とtail flick testによる反応潜時を測定し、また後根神経節に対してNF- $\kappa$ Bとcaspase 3による染色、足底の皮膚においてPGP9.5による染色で皮膚の神経密度を測定した。更に、同様に作成したC57BL/6マウスの糖尿病群・非糖尿病群に対しSTZ投与後8週後からinfiximab (10 $\mu$ g/g)の腹腔内投与を行った。Infiximab投与開始後2,4週間後に神経伝導速度と反応潜時の測定を行い、また後根神経節に対しNF- $\kappa$ Bとcaspase 3の染色、後根神経節におけるTNF $\alpha$ ・iNOS・IL-6のmRNAの定量、TNF $\alpha$ の血中濃度、足底の皮膚においてPGP9.5による染色で皮膚の神経密度を測定した。

【結果】C57BL/6の糖尿病群はSTZ投与後8週において有意なtail flick testの潜時延長ならびに神経伝導速度の低下を認めたが、TNF $\alpha$ ノックアウトマウスではSTZ投与後8週においても伝導速度の低下や痛覚閾値の悪化は認めなかった。後根神経節に対するNF- $\kappa$ Bとcaspase 3による染色ではC57BL/6マウスの糖尿病群マウスにおいて優位な上昇を認めたが、TNF $\alpha$ ノックアウト群では糖尿病・非糖尿病群ともに上昇を認めなかった。またC57BL/6では糖尿病群において皮膚の神経密度の低下を認めたが、TNF $\alpha$ ノックアウトマウスでは糖尿病・非糖尿病群にも関わらず神経密度は低下していた。

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

(続 紙)

更にC57BL/6マウスの糖尿病群に対しinfiximab投与を行った所、投与開始後4週間で神経伝導速度と痛覚閾値の改善が有意に認められ、後根神経節に対してNF- $\kappa$ Bとcaspase 3による染色ではinfiximabを投与しなかった糖尿病群において優位な上昇を認めたが、infiximabを投与した群では上昇を認めなかった。また皮膚の神経密度はinfiximab投与を行った糖尿病群でも低下しなかった。さらに血清のTNF  $\alpha$  はinfiximabを投与しなかった糖尿病群で上昇したが、infiximab投与した糖尿病群では上昇は認めなかった。また後根神経節のTNF  $\alpha$   $\cdot$  IL-6  $\cdot$  iNOSのmRNA定量ではinfiximabを投与しなかった糖尿病群では上昇を認めたが、infiximab投与した糖尿病群では上昇は見られなかった。

【考察】本研究はまず糖尿病性神経障害においてTNF  $\alpha$  が重要であることをTNF  $\alpha$  ノックアウトマウスにおいて検討をおこなった。糖尿病・非糖尿病群ともに神経伝導速度の低下は見られず、また後根神経節での検討でもTNF  $\alpha$  の下流に存在するNF- $\kappa$ Bとcaspase 3の発現は上昇を認めなかった。しかし、tail flick testまた皮膚の神経密度はTNF  $\alpha$  ノックアウトマウスにおいて糖尿病・非糖尿病で変化は見られなかったが、糖尿病群・非糖尿病群ともにtail flick testでは反応潜時の延長をまた皮膚の神経密度は低下を認めた。TNF  $\alpha$  は無髄神経の髄鞘形成に重要であり、TNF  $\alpha$  ノックアウトマウスにおいて熱に対する反応潜時が延長する報告があり、今回の結果はその報告と合致すると考えた。しかし神経伝導速度は有髄線維由来であり、これまでのTNF  $\alpha$  ノックアウトマウスの報告でも低下はなく、糖尿病群でも変化がなかったことから、TNF  $\alpha$  が糖尿病性神経障害に対して重要な役割を果たしていると考えた。

さらにC57/BL6マウスの糖尿病群に対してinfiximabの投与で神経伝導速度・tail flick testは改善し、皮膚の神経密度は低下を認めなかった。またTNF  $\alpha$  の下流に位置するNF- $\kappa$ Bとcaspase 3は後根神経節において抑制されていた。これらからinfiximabは糖尿病性神経障害に有効である可能性が考えられた。infiximabはまた後根神経節におけるmRNAにおいてはTNF  $\alpha$  だけでなく糖尿病性神経障害に関与する報告があるiNOSまたIL-6も発現が抑制され、TNF  $\alpha$  との関連が示唆された。

【結論】DNの発症機序においてTNF $\alpha$ の重要性を確認した。またinfiximabの投与が有効な治療戦略となる可能性があると考えられた

## 学位論文審査の結果の要旨 (記載例)

整理番号	662	氏名	山川 勇
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>糖尿病性神経障害には確立した治療法はない。本研究では糖尿病性神経障害における TNF<math>\alpha</math> の役割に焦点を当て TNF<math>\alpha</math> 阻害薬の治療薬としての可能性について検討を行い、以下の結果を得た。</p> <p>1) STZ 誘発糖尿病 wild type マウス (C57BL/6) では、STZ 投与後 8 週において神経伝導速度の低下、tail flick test における潜時の有意な延長、表皮内神経密度の低下、後根神経節でのリン酸化 NF-<math>\kappa</math>B と cleaved caspase3 の発現の増加を認めたが、STZ 誘発糖尿病 TNF<math>\alpha</math> ノックアウトマウスでは STZ 投与後 8 週においても神経障害に伴う上記の変化を認めなかった。</p> <p>2) STZ 誘発糖尿病 wild type マウス (C57BL/6) に対し TNF<math>\alpha</math> 阻害薬である infliximab 投与を行ったところ、投与開始後 4 週間で、神経伝導速度と痛覚閾値の改善、後根神経節リン酸化 NF-<math>\kappa</math>B と cleaved caspase3 の発現の正常化が観察された。さらに infliximab は血清の TNF<math>\alpha</math> 値、後根神経節の TNF<math>\alpha</math>・IL-6・iNOS の mRNA の発現を正常化させた。</p> <p>本論文は、糖尿病性神経障害の発症機序における TNF<math>\alpha</math> の役割と infliximab による治療の可能性について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 592 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 24 年 1 月 23 日)</p>			

### 最終試験の結果の要旨 (記載例)

整理番号	662	氏名	山川 勇
論文審査委員			
<p>(最終試験の結果の要旨)</p> <p>最終試験において以下の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 非糖尿病マウスにおける神経伝導速度の低下について</li> <li>2. TNF<math>\alpha</math>の種差について</li> <li>3. ヒト TNF<math>\alpha</math>に対するモノクローナル抗体(Infliximab)がマウスに作用する機序について</li> <li>4. マウス TNF<math>\alpha</math>に対するモノクローナル抗体を用いた実験系について</li> <li>5. ヒト TNF<math>\alpha</math>に対するモノクローナル抗体の有効期間について</li> <li>6. アポトーシスと caspase 3 について</li> <li>7. I型糖尿病と2型糖尿病における末梢神経障害について</li> <li>8. 末梢神経障害以外の糖尿病合併症における TNF<math>\alpha</math>の役割について</li> <li>9. 血中 TNF<math>\alpha</math>の測定方法について</li> <li>10. 末梢神経障害をきたす TNF<math>\alpha</math>の由来について</li> <li>11. 後根神経節が産生するサイトカインについて</li> <li>12. TNF<math>\alpha</math>のシグナル伝達系について</li> <li>13. insulin resistance における TNF<math>\alpha</math>の役割について</li> <li>14. TNF<math>\alpha</math>阻害薬の中樞神経系への影響について</li> <li>15. TNF<math>\alpha</math>が関連する内科的疾患について</li> <li>16. 神経伝導速度に影響する因子について</li> </ol> <p>上記いずれの質問に対しても的確な解答が得られた。</p> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;">(平成 24年 1月 23日)</div>			