

氏名	まえ かわ けい こ 前 川 京 子
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 679 号
学位授与の日付	平 成 14 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	糖 尿 病 性 神 經 障 害 発 症 に お け る ポ リ オ ー ル 経 路 の 病 態 生 理 学 的 意 義 に 関 する 研 究
論文調査委員	(主 査) 教 授 佐 藤 公 道 教 授 市 川 厚 教 授 川 寄 敏 祐

論 文 内 容 の 要 旨

現在我が国では40才以上の成人の少なくとも10人に1.5人が糖尿病を有すると報告されており、三大合併症である神経障害、網膜症、腎症をはじめとする多様な合併症の予防及び治療法の確立は重要な課題である。糖尿病合併症の発症機序の一つとして高血糖状態で活性化されるポリオール経路の代謝異常が挙げられる。ポリオール経路はNADPHを補酵素としてグルコースからソルビトールを生成するアルドース還元酵素(AR)及びNADを補酵素としてソルビトールからフルクトースを生成するソルビトール脱水素酵素(SDH)から構成される解糖系の副路である。ポリオール経路の亢進は、ソルビトールの細胞内蓄積による細胞内浸透圧の上昇、補酵素レベルの変化によるレドックス偏位、NADPHの減少による一酸化窒素合成系の阻害等を誘発し、これらが細胞機能を障害すると考えられる。そこで本研究において著者はポリオール経路に着目し、この経路の病態生理学的意義を解明するため、糖尿病性神経障害における本経路の関与について検討を行った。

まず、ヒトにおいて糖尿病合併症発症にARを介するポリオール経路の亢進が関与しているか否かを解明するため、バキュロウイルス-昆虫細胞系に大量発現させた組換えヒトARに対するモノクローナル抗体を作製し、この抗体を用いてヒトARの酵素免疫学的定量法(ELISA)を開発した。この測定系を用いて、ヒト生体内ではARが糖尿病合併症好発部位に多く分布することを見いだした。さらに糖尿病患者の赤血球ARタンパク量と合併症発症率との関係について検討したところ、糖尿病罹病期間10年未満の患者において、糖尿病性神経障害の発症と赤血球AR量の間に高い相関性を認めた。このことから、AR発現量の高値は糖尿病性神経障害発症の危険因子の一つであることが示唆される。

次に、高血糖状態におけるポリオール経路の亢進が糖尿病性神経障害を発症・進展させるメカニズムについて解明するため、末梢神経の機能と構造維持に関わるシュワン細胞におけるポリオール経路の動態についてラットを用いて検討を行った。まず、著者はAR及びSDH mRNAの発現を定量的に解析するための測定系の構築を試み、ノザンプロット法やRNase protection assayなどの解析法に比べて簡便で高感度であり、しかも再現性の高い競合的RT-PCR測定系を開発した。この測定系により、AR mRNAはラットにおいて、糖尿病合併症の主たる標的器官である水晶体、網膜、腎臓に多量に発現しており、ヒト組織の分布とほぼ一致していること、単離培養シュワン細胞にも発現していること、一方、SDH mRNAはすでに報告されているこの酵素の生理的役割から予測されるように、精巣及び肝臓に多量に発現していたが、シュワン細胞及び網膜ではその発現は低く、水晶体における発現量は検出レベル以下であることなどを明らかにした。これらの結果から、ARに比してSDHの発現が相対的に低いシュワン細胞及び網膜などは高血糖状態でソルビトールが蓄積しやすい組織であることが推察される。

そこで、ラット坐骨神経由来の単離培養シュワン細胞におけるAR及びSDHの発現に対するグルコース濃度の影響を解析した。高グルコース濃度(30 mM)で培養したシュワン細胞のAR及びSDH mRNAの発現量は、通常グルコース濃度(5.6 mM)培養群と同程度であり、細胞内にソルビトールは蓄積しなかった。一方、糖尿病モデルラットの坐骨神経において、神経内膜の電解質濃度が上昇し、局所的に浸透圧が変動することが報告されている。神経内膜内の浸透圧の変化がシュワン細胞のAR及びSDH mRNA発現に影響を及ぼすのではないかと考え、浸透圧物質の塩化ナトリウム(100 mM)や

ラフィノース（100-200 mM）を培地中に添加して両酵素の発現を検討した結果、細胞外浸透圧の上昇により AR mRNA の発現量は培地中のグルコース濃度に非依存的に増加することを見出した。さらに、AR mRNA の発現誘導に伴い、AR 活性が上昇し、細胞内にソルビトールが蓄積した。一方、SDH mRNA の発現量は、高浸透圧条件下でも変化せず、AR mRNA と SDH mRNA の発現量の比は、通常状態に比較して有意に増加した。以上の結果より、糖尿病状態にある末梢神経シュワン細胞において、高血糖自体は AR の発現を誘導しないが、神経内膜内の浸透圧変動が AR の発現を誘導し、その AR によるソルビトールの過剰な産生が SDH による代謝を上回るためにソルビトールが細胞内に蓄積し、神経組織に機能的・形態的变化をもたらすことが示唆される。すなわち、糖尿病状態から惹起される細胞外浸透圧の上昇等のストレスによるシュワン細胞の AR 発現調節機構の破綻が糖尿病性神経障害の発症と進展に大きく関与していると推論できる。

以上、著者は、ポリオール経路の動態をヒト及びラット由来の材料を用いて分子生物学的方法を含む手法により解析し、糖尿病性神経障害発症におけるポリオール経路の役割を明らかにした。本研究成果は、AR 阻害薬をはじめとした糖尿病合併症の予防或いは治療薬の開発及び、糖尿病患者の個々の病態に即した薬物療法の最適化のための有用な基礎的知見を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

近年罹病率が大変高くなっている糖尿病においては、神経障害、網膜症、腎症等の合併症が临床上大きな問題であり、それらの予防、治療法の確立は緊急の課題である。著者は、糖尿病合併症発症機序の一つに挙げられているポリオール経路に着目し、糖尿病性神経障害発症におけるポリオール経路の病態生理学的意義に関して検討し、以下の新知見を得た。

第一章 ヒトアルドース還元酵素（AR）タンパク定量系の開発及び糖尿病性神経障害における赤血球 AR 発現量の臨床解析

ヒト AR の酵素免疫学的定量法を構築し、ヒト生体内で AR は糖尿病合併症好発部位に多く発現していることを明らかにした。健常人並びに糖尿病患者の血液を試料に解析し、赤血球 AR の発現量には個体間で数倍の違いのあることを確認し、更に、糖尿病罹病期間10年未満の患者において、糖尿病性神経障害発症率は赤血球 AR 量増加に対応して有意に上昇することを見出し、AR 発現量増加は糖尿病性神経障害発症の危険因子の一つであることを指摘した。

第二章 非相同的 DNA 鋳型を用いた競合的 RT-PCR 法によるポリオール経路構成酵素の遺伝子発現解析

競合的 RT-PCR 法を用いた解析により、AR mRNA はラットにおいて、坐骨神経由来の単離培養シュワン細胞及び糖尿病合併症の主たる標的組織である水晶体、網膜、腎臓に多量に発現していることを明らかにした。一方、ポリオール経路のもう一つの構成酵素であるソルビトール脱水素酵素（SDH）mRNA は、シュワン細胞及び網膜ではその発現量が低く、水晶体における発現量は検出レベル以下であり、AR に比して SDH の発現が相対的に低いシュワン細胞及び網膜などは、高血糖状態で、ソルビトールを蓄積しやすい組織であることを示唆した。

第三章 ラットシュワン細胞におけるポリオール経路の動態：高グルコース及び高浸透圧刺激による影響

糖尿病時の高血糖に相当する高グルコース負荷は、単離培養シュワン細胞の AR mRNA 及び SDH mRNA の発現量に影響を与えなかった。一方、糖尿病モデルラットで報告されている神経内膜内の浸透圧変動を想定した高浸透圧負荷は、AR mRNA の発現を誘導したが、SDH mRNA の発現量を変化させなかった。その結果、高浸透圧負荷条件下では、AR mRNA 発現量/SDH mRNA 発現量の比率は、通常状態に比較して、有意に増加し、細胞内にソルビトールが蓄積してくることを明らかにした。即ち、糖尿病状態で惹起される細胞外浸透圧上昇等のストレスによるシュワン細胞の AR 発現調節機構の破綻が糖尿病性神経障害の発症と進展に大きく関与していることを示した。

本研究成果は、AR 阻害薬を始めとした糖尿病合併症の予防或いは治療薬の開発及び糖尿病患者の個々の病態に即した薬物療法の最適化のための有用な基礎的知見となるものと考えられる。

よって、本論文を博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成14年9月2日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。