

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	下重 幸則
論文題目	糖尿病ラット末梢神経障害発症因子としてのアルドースリダクターゼに関する薬理学的研究		
(論文内容の要旨)			
<p>糖尿病性神経障害には複数の発症メカニズムが提唱されておりそれらが複雑に関与しているが、そのなかでもポリオール代謝経路の活性亢進は大きな部分を占めていると考えられている。ポリオール代謝経路とはグルコースを、ソルビトールを介してフルクトースへ代謝する経路であり、律速酵素はグルコースをソルビトールへ変換するaldose reductase (AR) である。高血糖下ではARで代謝されるグルコースが増加し、細胞内へのソルビトールの蓄積、補酵素であるNADPH/NADP⁺バランスの崩壊などが惹起され、末梢神経障害発症の一因になると考えられている。Zenarestatは臨床および前臨床において有効性が認められたキナゾリン骨格を有するAR阻害薬である。本研究ではzenarestatを用いて、ARを介した糖尿病性神経障害の発症メカニズムを検討した。</p> <p>第一章 Zenarestatのaldose reductase阻害様式とstreptozotocin誘発糖尿病ラットにおける糖尿病性神経障害に対する作用</p> <p>Zenarestatはラット、ウサギおよびウシ由来ARに対して阻害作用を示し、streptozotocin誘発糖尿病ラット (以下、STZラット) における神経機能異常を改善することが報告されているが、ヒト由来ARに対する作用は確認されておらず、糖尿病性末梢神経障害に対する作用メカニズムには不明な点が多い。そこでまずzenarestatのAR阻害プロファイルを明らかにするとともに、STZラット後根神経節 (dorsal root ganglia, DRG) における細胞骨格タンパク質および神経栄養因子受容体mRNA発現に対する作用を検討した。ZenarestatはヒトリコンビナントARに対して非競合阻害を示すとともに、解糖系などに属する酵素に比して優れたAR特異性を有することが判明した。また、zenarestatはSTZラットの末梢神経およびDRGにおけるソルビトール蓄積を水晶体などの他組織と比較して低用量で抑制した。さらにDRGにおけるmRNA発現量解析では、STZラットにおいてTrk-C、neurofilament HおよびTα1 α-tubulinの各mRNA発現量に有意な異常が認められ、これらのうちzenarestatはTrk-C mRNA発現上昇を是正することを見出した。以上の結果から、特異的AR阻害剤であるzenarestatを用いた検討により、糖尿病性神経障害ではDRGにおけるTrk-C mRNA発現上昇がポリオール代謝経路活性亢進により誘発され、病態発症へ至るものと考えられた。</p> <p>第二章 Zucker diabetic fattyラットの末梢神経機能障害に対するzenarestatの作用</p> <p>臨床における糖尿病はインスリン抵抗性を示す2型糖尿病が多数を占めているにもかかわらず、モデル動物を用いた多くの研究はインスリン依存性を示す1型糖尿病動物を用いて報告がなされている。そこで2型糖尿病モデル動物であるZucker diabetic</p>			

fattyラット（ZDFラット）を用いて末梢神経障害の存在およびAR関与の有無を検討した。ZDFラットでは対照群であるleanラットと比較して観察期間を通じて高血糖が認められた。またその末梢神経において著しいソルビトール蓄積が認められ、末梢神経伝導速度の遅延が観察された。これらの異常に対してzenarestatは体重および血糖値に影響を与えることなく末梢神経ソルビトール蓄積を抑制し、末梢神経伝導速度遅延改善作用を示した。以上の結果から、糖尿病性末梢神経障害にはインスリン依存性の有無に関わらずポリオール代謝経路活性亢進により神経内にソルビトールが蓄積し、末梢神経障害が発症していることが考えられた。

第三章 慢性STZ誘発糖尿病ラットの後根神経節形態異常に対するzenarestatの作用

糖尿病性末梢神経障害は糖尿病罹病期間の延長に伴い末梢側から中枢側へ病変部位が進行することが報告されている。そこで、DRGにまで形態異常が認められることが報告されている糖尿病誘発1年後のSTZラットにおける腓腹神経およびDRG形態異常に対するARの関与を検討した。STZラットでは腓腹神経における神経線維密度上昇および神経線維萎縮が認められるとともに、DRGにおいて神経細胞体が萎縮していることが確認された。また、zenarestatを1年間投与することにより腓腹神経異常のみならずDRGにおける神経細胞体萎縮が改善することが判明した。これらの結果から、糖尿病ラットにおいても糖尿病罹病期間の延長に伴い病変部位が末梢神経遠位部から末梢神経近位部へ向かい進行することが確認され、この進行はポリオール代謝経路活性亢進を持続的に抑制することにより遅延することが示された。

以上、糖尿病性末梢神経障害には、糖尿病態におけるインスリン依存性に関わらず高血糖に基づくポリオール代謝経路の活性亢進が大きく関与しており、その影響はこれまで研究の焦点であった末梢神経遠位部のみならず、脊柱内に存在する末梢神経近位部にまで及び、さらに糖尿病発症急性期では遺伝子発現異常として、慢性期では神経細胞形態異常として現れることが明らかとなった。本研究成果は、糖尿病性末梢神経障害に関与するAR活性化の病態形成メカニズムを詳細に明らかにし、新たな糖尿病治療薬の創製に有用な基礎的知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

糖尿病性神経障害には複数の発症メカニズムが提唱されておりそれらが複雑に関与しているが、そのなかでもポリオール代謝経路の活性亢進は大きな部分を占めていると考えられている。ポリオール代謝経路とはグルコースを、ソルビトールを介してフルクトースへ代謝する経路であり、律速酵素はグルコースをソルビトールへ変換するaldose reductase (AR) である。高血糖下ではARで代謝されるグルコースが増加し、細胞内へのソルビトールの蓄積、補酵素であるNADPH/NAD⁺バランスの崩壊などが惹起され、末梢神経障害発症の一因になると考えられている。Zenarestatは臨床および前臨床において有効性が認められたキナゾリン骨格を有するAR阻害薬である。本研究で申請者はzenarestatを用いて、ARを介した糖尿病性神経障害の発症メカニズムを検討した。

第一章 Zenarestatのaldose reductase阻害様式とstreptozotocin誘発糖尿病ラットにおける糖尿病性神経障害に対する作用

Zenarestatはラット、ウサギおよびウシ由来ARに対して阻害作用を示し、streptozotocin誘発糖尿病ラット（以下、STZラット）における神経機能異常を改善することが報告されているが、ヒト由来ARに対する作用は確認されておらず、糖尿病性末梢神経障害に対する作用メカニズムには不明な点が多い。そこで申請者はまずzenarestatのAR阻害プロファイルを明らかにするとともに、STZラット後根神経節 (dorsal root ganglia, DRG) における細胞骨格タンパク質および神経栄養因子受容体 mRNA発現に対する作用を検討した。ZenarestatはヒトリコンビナントARに対して非競合阻害を示すとともに、解糖系などに属する酵素に比して優れたAR特異性を有することが判明した。また、zenarestatはSTZラットの末梢神経およびDRGにおけるソルビトール蓄積を水晶体などの他組織と比較して低用量で抑制した。さらにDRGにおけるmRNA発現量解析では、STZラットにおいてTrk-C、neurofilament HおよびT α 1 α -tubulinの各mRNA発現量に有意な異常が認められ、これらのうちzenarestatはTrk-C mRNA発現上昇を是正することを見出した。以上の結果から、特異的AR阻害剤であるzenarestatを用いた検討により、糖尿病性神経障害ではDRGにおけるTrk-C mRNA発現上昇がポリオール代謝経路活性亢進により誘発され、病態発症へ至るものと考えられた。

第二章 Zucker diabetic fattyラットの末梢神経機能障害に対するzenarestatの作用

臨床における糖尿病はインスリン抵抗性を示す2型糖尿病が多数を占めているにもかかわらず、モデル動物を用いた多くの研究はインスリン依存性を示す1型糖尿病動物を用いて報告がなされている。そこで申請者は2型糖尿病モデル動物であるZucker diabetic fattyラット (ZDFラット) を用いて末梢神経障害の存在およびAR関与の有無を検討した。ZDFラットでは対照群であるleanラットと比較して観察期間を通じて高血

糖が認められた。またその末梢神経において著しいソルビトール蓄積が認められ、末梢神経伝導速度の遅延が観察された。これらの異常に対してzenarestatは体重および血糖値に影響を与えることなく末梢神経ソルビトール蓄積を抑制し、末梢神経伝導速度遅延改善作用を示した。以上の結果から、糖尿病性末梢神経障害にはインスリン依存性の有無に関わらずポリオール代謝経路活性亢進により神経内にソルビトールが蓄積し、末梢神経障害が発症していることが考えられた。

第三章 慢性STZ誘発糖尿病ラットの後根神経節形態異常に対するzenarestatの作用

糖尿病性末梢神経障害は糖尿病罹病期間の延長に伴い末梢側から中枢側へ病変部位が進行することが報告されている。そこで、申請者はDRGにまで形態異常が認められることが報告されている糖尿病誘発1年後のSTZラットにおける腓腹神経およびDRG形態異常に対するARの関与を検討した。STZラットでは腓腹神経における神経線維密度上昇および神経線維萎縮が認められるとともに、DRGにおいて神経細胞体が萎縮していることが確認された。また、zenarestatを1年間投与することにより腓腹神経異常のみならずDRGにおける神経細胞体萎縮が改善することが判明した。これらの結果から、糖尿病ラットにおいても糖尿病罹病期間の延長に伴い病変部位が末梢神経遠位部から末梢神経近位部へ向かい進行することが確認され、この進行はポリオール代謝経路活性亢進を持続的に抑制することにより遅延することが示された。

以上、糖尿病性末梢神経障害には、糖尿病態におけるインスリン依存性に関わらず高血糖に基づくポリオール代謝経路の活性亢進が大きく関与しており、その影響はこれまで研究の焦点であった末梢神経遠位部のみならず、脊柱内に存在する末梢神経近位部にまで及び、さらに糖尿病発症急性期では遺伝子発現異常として、慢性期では神経細胞形態異常として現れることが明らかとなった。本研究成果は、糖尿病性末梢神経障害に関与するAR活性化の病態形成メカニズムを詳細に明らかにし、新たな糖尿病治療薬の創製に有用な基礎的知見を提供するものである。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成25年8月20日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。