

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御科学領域 腫瘍標的分子制御学 教育研究分野 氏名 高橋和久
<p>(論文題目)</p> <p>Inhibitory effects of xanthine oxidase inhibitor, topiroxostat, on development of neuropathy in db/db mice.</p> <p>(肥満 2 型糖尿病 db/db マウスにおけるキサンチン酸化酵素阻害薬トピロキソスタットの糖尿病性神経障害抑制効果について)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>背景：糖尿病性神経障害 (diabetic peripheral neuropathy、以下 DPN) の病態に炎症と酸化ストレスがある。その発症機序は、高血糖により神経細胞、血管内皮細胞が直接障害を受け、神経障害が発症するとされていた。キサンチンオキシダーゼ (xanthine oxidase、以下 XO) はプリン代謝物から尿酸産生の律速酵素である。XO 阻害薬は高尿酸血症や痛風の治療薬として実臨床で使用されている。XO は、虚血などの病的状態ではその副産物として活性酸素種 (reactive oxygen species、以下 ROS) を生成させるため、酸化ストレスの亢進により組織障害がもたらされる可能性がある。XO 阻害薬は XO を直接阻害し、ROS 産生も抑制することがわかっており、より臓器保護効果があることが期待されている。これまでに XO を阻害することにより、実験的糖尿病性腎症の改善が報告されている。XO 阻害薬であるアロプリノールが実験的 DPN を抑制することが報告されているが、その機序は明らかではない。今回、XO 阻害薬の効果、作用機序を肥満型 2 型糖尿病 db/db マウス (db) で検討した。</p> <p>方法：肥満型 2 型糖尿病モデルである雄性 db/db マウス (db) とコントロールである C57BL6 マウス (WT) を用いた。5 週齢から 8 週間、混餌にて XO 阻害薬であるトピロキソスタット (T) を 1mg/kg (dbT1)、2mg/kg (dbT2) 投与した。また対照として類薬のフェブキソスタット (F) (1mg/kg/日) も投与した。体重、HbA1c、2g/kg 経口糖負荷試験 (OGTT)、インスリン耐性試験 (ITT)、神経伝導速度 (NCV)、温熱知覚を行った。坐骨神経を摘出後、western blotting にて ERK のリン酸化を検討した。さらに活性型の汎マクロファージのマーカーである抗 Iba-1 抗体と M2 型のマクロファージのマーカーである抗 CD206 抗体を用いて神経に浸潤するマクロファージの数 (個/mm²) を病理組織学的に検討した。坐骨神経における炎症関連分子 (TNF-α、IL-1β、CCL2、iNOS) の mRNA 発現とチオバルビツール酸反応性物質 (Thiobarbituric acid reactive substances、以下 TBARS) による酸化ストレスを検討した。XO 阻害薬の効果のマクロファージ (Mϕ) 細胞株と脊椎後根神経節神経細胞で検討した。</p> <p>結果：体重はコントロール群に比し、有意に db 群で増加が見られた (p<0.01)。db 群に比し dbT2 群にて有意な体重増加の抑制が認められた (p<0.01)。HbA1c、OGTT、ITT とともに T 及び F による影響は認められなかった。db 群で遅延した NCV は dbT2 群で有意な改善が認められた (p<0.01)。Tail flick test は db 群に比し、dbT 群で容量依存性</p>	

に改善が認められた ($p<0.05$)。さらに、坐骨神経の ERK のリン酸化は db 群でコントロール群に比し亢進していたが ($p<0.05$)、dbT2 群では有意に改善されていた ($p<0.01$)。表皮内神経密度は、db 群でコントロール群に比し有意な低下を認めたが ($p<0.01$)、dbT2 群では改善されていた ($p<0.05$)。神経内に浸潤するマクロファージは、Iba-1 陽性マクロファージは、薬剤投与後 4 週で db 群に比し、dbT1 群、dbT2 群、dbF 群で有意に減少していた ($p<0.01$)。一方、CD206 陽性マクロファージは、薬剤投与後 4 週で db 群に比して dbF 群で有意に増加していたが ($p<0.01$)、薬剤投与後 8 週で db 群に比して dbF 群で有意に減少していた ($p<0.01$)。dbT1 群、dbT2 群は薬剤投与後 4 週、8 週いずれも db 群と差はなかった。in vitro では XO 阻害薬は外因性 XO による Mφ の催炎症形質への分化を抑制した。神経細胞を XO で刺激すると、有意に神経突起長が低下した。XO 阻害薬は外因性 XO による神経細胞の神経突起伸長の阻害を抑制した。NCVs と表皮内神経密度の低下が db/db マウスでみられたが、XO 阻害薬投与群、特に 2mg/kg トピロキソスタット群で、これら障害は有意に抑制された。

TBARS による酸化ストレスの検討では、薬剤投与後 4 週ではコントロール群に比し db 群で有意に亢進していた ($p<0.01$)。dbT2 群で TBARS の減少が最も大きかった ($p<0.01$)。しかしながら、8 週後では XO 阻害薬の効果は有意でなかった。

坐骨神経の炎症性分子の発現は、薬剤投与後 4 週ではコントロール群に比し db 群で有意な増加がみられた ($p<0.01$) が、8 週では TNF α のみ差が認められた。XO 阻害薬によりその発現は用量依存性に抑制された ($p<0.01$)。

db/db マウスでは坐骨神経において、催炎症性 Mφ 浸潤、炎症性分子の発現、酸化ストレスの亢進、血清の XO 活性上昇が認められたが、XO 阻害薬によりすべて抑制された。

結論： 血中 XO 活性抑制は、神経伝導速度を改善し、DPN の発症および進展を防いでいた。XO 阻害薬の効果は糖尿病の病期により異なり、XO は糖尿病早期の病態に関与している可能性がある。XO は、2 型糖尿病における早期 DPN の新たな治療標的になる可能性がある。その機序には催炎症性 Mφ の浸潤抑制、酸化ストレスの低下が考えられた。