

令和3年度(第26回)
弘前大学医学部学術賞
奨励賞受賞論文

TAKAHASHI K, MIZUKAMI H, OSONOI S, OGASAWARA S, HARA Y, KUDOH K, TAKEUCHI Y, SASAKI T, DAIMON M, YAGIHASHI S. Inhibitory effects of xanthine oxidase inhibitor, topiroxostat, on development of neuropathy in db/db mice. *Neurobiol Dis.* 2021;155:105392.

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

八戸市立市民病院 内分泌糖尿病科・内科
弘前大学大学院医学研究科 分子病態病理学講座
高 橋 和 久

【背景】

糖尿病では合併症により予後が決定される。その合併症のうちで神経障害 (DPN) は最も早期から発症し、頻度の高いものである。その症状に足の痛み、麻痺、鈍麻があり、終局的に足の切断となり、患者の QOL を著しく低下させる。残念なことに根本的治療はいまだに確立されていない。DPN の病因は多因子であることが知られている。その発症機序は、高血糖により神経細胞、血管内皮細胞が酸化ストレスや炎症により直接障害を受け発症するとされている。キサンチンオキシダーゼ (XO) はプリン代謝物から尿酸を産生する酵素である。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 (ROS) を生成し、酸化ストレスの亢進により組織障害をもたらす可能性がある。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 阻害薬は XO を直接阻害し、ROS 産生を抑制することがわかっており、臓器保護効果が期待されている。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のみならず、XO 阻害薬であるアロプリノールは実験的 DPN を抑制することが報告されている。しかしながら、それらの機序は明らかではない。今回、DPN に対する 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。

【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 1 mg/kg (dbT1)、2 mg/kg (dbT2) を投与した。また対照として類薬のフェブキシソスタット (F) (1 mg/kg/日) を投与した。体重、HbA1c、2 g/kg 経口糖負荷試験 (OGTT)、2 U/kg インスリン耐性試験 (ITT) を評価した。投与4週後、8週後の神経伝導速度 (NCV)、温熱知覚 (Tail flick test) を評価した。血清中の酸化ストレスを TRARS 法で検討した。表皮内神経密度を病理組織学的に検討した。さらに M1 型のマクロファージ (Mφ) マーカーである抗 iNOS 抗体と M2 型の Mφ マーカーである抗 CD206 抗体を用いて坐骨神経に浸潤する Mφ 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の mRNA 発現を検討した。坐骨神経、脊髄後根神経節細胞、血清中における XOR 活性と尿酸値を検討した。

た。坐骨神経における XOR の局在を検討した。WT から単離した脊髄後根神経節細胞を XO で刺激し、神経突起を有する細胞の割合、神経突起長を検討した。さらに XO 阻害薬の効果をマクロファージ細胞株 (RAW246) と単離脊髄後根神経節細胞を用いて検討した。

【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 ともに T 及び F による影響は認められなかった。NCV はコントロール群に比し、db 群で有意に遅延した ($p<0.01$) が、dbT2 群で有意な改善が認められた ($p<0.05$)。Tail flick test は db 群に比し、dbT 群で用量依存性に改善が認められた ($p<0.05$)。酸化ストレスを TBARS 法により検討した。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 ($p<0.01$)。db T2 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。表皮内神経密度は、投与 4 週では各群で有意差は見られなかったが、投与 8 週でコントロール群に比し db 群で有意な低下を認めたが ($p<0.01$)、db T2 群では改善されていた ($p<0.05$)。坐骨神経内に浸潤するマクロファージは、M1 型 (iNOS 陽性) Mφ は、薬剤投与後 4 週でコントロール群に比し db 群で有意の増加を認めた ($p<0.01$)。db 群に比し、db T1 群 ($p<0.05$)、db T2 群 ($p<0.01$)、dbF 群 ($p<0.05$) で有意に減少していた。薬剤投与後 8 週でも、コントロール群に比し、db 群で有意に増加していた ($p<0.01$)。db T1 群に比し、db T2 群、dbF 群で有意に減少していた ($p<0.01$)。一方、M2 型 (CD206 陽性) Mφ は、薬剤投与後 4 週では各群で有意な差はみられなかったが、薬剤投与後 8 週ではコントロール群に比し、db 群で有意に減少していた ($p<0.01$)。催炎症性 Mφ である M1 型 Mφ と抗炎症性 Mφ である M2 型 Mφ の比率 (M1/M2 比) は、db 群では薬剤投与後 4 週、投与後 8 週で有意に増加していた ($p<0.05$)。db 群に比し、dbT2 群では有意に減少していた ($p<0.01$)。XOR 活性は、薬剤投与後 4 週では坐骨神経と血清中ではコントロール群に比し、db 群で有意に上昇していた ($p<0.01$) が、薬剤投与後 8 週では脊髄後根神経節細胞で有意に上昇していた ($p<0.01$)。XO 阻害薬は、坐骨神経、脊髄後根神経節細胞、血清中の XOR 活性を用量依存性に有意に抑制した ($p<0.01$)。XOR 発現の組織局在性を検討したところ、主に坐骨神経と脊髄後根神経節の第 8 因子陽性を示す血管内皮、脊髄後根神経節細胞の神経周囲や神経皮膜の微小血管に認めた。in vitro では、XO 阻害薬は外因性 XO による Mφ の催炎症性形質への分化を抑制した。XO や T は神経細胞の生存率には影響がなかった。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 ($p<0.01$)。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 ($p<0.05$)。坐骨神経の炎症性分子 (TNF- α , IL-1 β , iNOS) の発現は、薬剤投与後 4 週ではコントロール群に比し db 群で有意に上昇し ($p<0.01$)、薬剤投与後 8 週では TNF- α , iNOS の有意な上昇を認めた ($p<0.01$)。XO 阻害薬によりその発現は用量依存性に抑制された ($p<0.01$)。

【考察】

本研究では、肥満型 2 型糖尿病モデルである db/db マウスの糖尿病性神経障害に対する XO 阻害薬の抑制効果について検討した。これまでの研究における糖尿病性神経障害の発症機序は、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。今回の検討では、XO 阻害薬を投与しても血糖コントロールの改善は認められなかったため、血糖制御とは独立した機序が考えられた。マウス組織で XO は血管内皮細胞に強く発現していたことや、in vitro の結果からは血中の XO 活性がその病態に重要であると考えられた。肥満型 2 型糖尿病モデルである db/db マウスでは坐骨神経において、催炎症性マクロファージ浸潤、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。肥満型 2 型糖尿病では、①XO の血中活性が亢進し、マクロファージを刺激して催炎症性形質にする。②活性化マクロファージが坐骨神経で炎症反応、酸化

ストレスを亢進し、神経を障害する。③血中 XO が神経節細胞に直接作用し、神経突起の延長を阻害する。XO 阻害薬は血中の酵素活性を阻害することで①-③を改善し、神経伝導速度、DPN の発症および進展を防いでいることを示唆している。また今回の結果は、XO 阻害薬の効果は糖尿病の病期により異なることを示唆している。より早期の糖尿病神経障害に XO 活性が関与しており、新しい治療標的となる可能性が考えられた。

【結論】

XO 阻害薬、とくに高用量のトピロキソスタットは肥満型 2 型糖尿病モデルである db/db マウスの DPN の進展を抑制した。血中の XO 活性は、ROS 産生を促進し、直接的または間接的に末梢神経を障害する。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。XO 阻害薬は現在実臨床で使用されており、糖尿病神経障害の患者の神経障害の進展を抑制し、ドラックリポジショニングの点から糖尿病性神経障害の実臨床に寄与する可能性がある。

【文献】

- 1) Nakamura, T., et al., 2019. Effects of topiroxostat and febuxostat on urinary albumin excretion and plasma xanthine oxidoreductase activity in db/db mice. *Eur. J. Pharmacol.* 780, 224-31.
- 2) Inkster, M.E., et al., 2017. Treatment with xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, improves nerve and vascular function in diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 561, 63-71.
- 3) Honorat, J. A., et al., 2013. Xanthine oxidase mediates axonal and myelin loss in a murine model of multiple sclerosis. *PLoS One* 8, e71329.
- 4) Nomura, J., et al. 2013. Febuxostat, an inhibitor of xanthine oxidase, suppresses lipopolysaccharide-induced MCP-1 production via MAPK phosphatase-1-mediated inactivation of JNK. *Plos One* 8, e755527.
- 5) Nomura, J., et al. 2014. Xanthine oxidase inhibition by febuxostat attenuates experimental atherosclerosis in mice. *Sci. Rep.* 4, 4554.