

氏名・(本籍) 小河 秀 郎 (山口県)  
学位の種類 博士 (医学)  
学位記番号 博士第340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12年3月27日  
学位論文題目 Apoptosis and impaired axonal regeneration of sensory neurons after nerve crush  
in diabetic rats  
(糖尿病ラットにおける神経挫滅後の知覚神経細胞のアポトーシスと軸索  
再生障害)

審査委員 主査 教授 陣 内 皓之祐  
副査 教授 工 藤 基  
副査 教授 吉 川 隆 一

## 論文内容の要旨

### 【目 的】

糖尿病の末梢神経では神経線維の脱落に加えて後根神経節 (DRG) 神経細胞脱落が観察される。また、糖尿病動物では軸索障害後の再生能が低下していることが知られている。しかし、糖尿病動物の神経細胞が軸索障害に対して脆弱性を示すか否かについては検討されていない。また、培養神経細胞では JNK/c-jun の活性化の調節および細胞内 cAMP 含量が生存および軸索の伸長に重要である事が報告されているが、糖尿病動物の末梢神経細胞において軸索障害時にこれらの情報伝達系がどのように変化するかについての報告もない。そこで、我々はストレプトゾシン (STZ) 糖尿病ラットを用いて、1) 坐骨神経挫滅後の軸索再生能および DRG 神経細胞のアポトーシスの有無、2) DRG における JNK/c-jun リン酸化および cAMP 含量の変化と神経再生および神経細胞のアポトーシスとの関連について検討を行った。更に、糖尿病性神経障害に有効とされるプロスタグランジン E1 (PGE1) 製剤が1)、2) に対してどのような効果を示すかについても検討を行った。

### 【方 法】

1. 糖尿病ラットの作製; 6週齢 SD系ラットに STZ 55mg/kgを静脈内投与し糖尿病ラットを作製した。一部の糖尿病ラットには糖尿病作製後21日目より PGE1 製剤 (OP-1206) 10 $\mu$ g/kg/日を14日間毎日経口投与した。
2. 坐骨神経挫滅; 糖尿病作製後28日目に麻酔下で右坐骨神経を露出し鑷子にて挫滅を行い挫滅部位を9-0 ナイロン糸でマーキングした。
3. 知覚神経再生能評価; 挫滅後7日目に麻酔下で右坐骨神経を露出し35mm遠位より鑷子にて0.5mmずつ近位にずらしながらつまみ下肢近位筋の反射的収縮より軸索再生先端を同定し再生距離を求めた。
4. イムノプロット法; 坐骨神経挫滅前 (day0)、挫滅後1日 (day1)、7日 (day7)に各群ラット6匹ずつを断頭し、L4、L5DRGを採取し、これをRIPAバッファーにて可溶化した。それぞれの蛋白50 $\mu$ gをSDS-PAGEにて分離後PVDF膜に転写し、抗総JNK抗体、抗リン酸化JNK抗体、抗リン酸化c-jun抗体を用いてプロットした。
5. cAMP含量測定; 3.と同様に採取したL4、L5DRGを0.1M HCl内で破碎し、これを15分ボイルし1500rpmで20分遠心分離した上清を測定に用いた。cAMP含量測定はラジオイムノアッセイキットを用いて行った。
6. 免疫組織化学; day0、1、7に各群ラット3匹ずつを4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定しL5DRGを採取し凍結包埋後cryostatにて10 $\mu$ m厚の切片にし各抗体を用いて免疫染色を行った。DRG神経細胞のアポトーシスはTUNEL法を用いて検討した。

## 【結果】

1. 坐骨神経挫滅後7日間の知覚神経再生距離は対照ラットに比し糖尿病ラットで有意に短く、これはPGE1製剤投与により有意に改善した。
2. day0ではいずれの群のDRGにおいてもアポトーシスを認めなかった。day1では糖尿病ラットのDRGで38.1%の神経細胞にアポトーシスを認めたのに対して他のラットでは認めなかった。day7でも糖尿病ラットのDRGでは34.1%のアポトーシス細胞を認めたが他のラットでは認めなかった。
3. DRG cAMP含量は、day0では対照ラットに比し糖尿病ラットで有意に少なくこの減少はPGE1製剤の7日間治療により有意に改善した。day1では3群間に有意な差を認めず、いずれの群でもday0と比べて有意な変化を認めなかった。day7では対照ラットおよびPGE1ラットではday0に比し有意な増加を認めたのに対し糖尿病ラットでは有意な増加を認めなかった。
4. day1では全てのラットのDRGにおいてday0に比しJNK/c-junのリン酸化が有意に亢進していた。しかし、day7では、糖尿病ラットではday1と同様なリン酸化の亢進を認めたのに対し、他のラットではday0と同レベルまで回復していた。これらのリン酸化JNK/c-junは主に核内で確認された。

## 【考察】

糖尿病ラットでは坐骨神経挫滅後の軸索再生能が低下していた。また、坐骨神経挫滅により対照ラットではDRGのアポトーシスは認めなかったのに対し、糖尿病ラットでは挫滅1日後よりDRGの一部にアポトーシスが認められた。また、糖尿病ラットにおけるこのような知覚神経細胞の脆弱性はPGE1製剤治療により改善された。挫滅1日後では全てのラットのDRGにおいてJNK/c-junのリン酸化が亢進しておりアポトーシスは糖尿病ラットのみ認められたことからJNK/c-junリン酸化のみではアポトーシス誘導を説明するには不十分と考えられた。また、挫滅7日後では糖尿病ラットでのみJNK/c-junの遷延するリン酸化が認められたことよりむしろ軸索再生にJNK/c-junの脱リン酸化が重要であると考えられた。一方、DRG cAMP含量は挫滅1日後では3群間に有意な差はなく挫滅前と比較してもいずれの群でも有意な変化は認めなかったことから、これもDRG神経細胞のアポトーシス誘導との関連は否定的であった。挫滅7日後では対照ラットおよびPGE1ラットで挫滅前と比較して有意に増加しており糖尿病ラットでは増加していなかったことよりcAMP含量の増加は軸索再生に重要であることが示唆された。本実験では糖尿病ラットにおける坐骨神経挫滅後DRG神経細胞アポトーシス誘導の機序を明確にすることは出来なかったが、PGE1の血流増加作用を考慮すると、神経細胞への血流供給の低下がアポトーシスに何らかの影響を与えている可能性があると考えられる。

## 【結論】

糖尿病ラットの末梢知覚神経細胞は軸索障害によりアポトーシスに陥りやすく軸索再生能も低下していた。これらの異常はPGE1製剤により改善されることが判明した。

## 論文審査の結果の要旨

糖尿病性神経障害の病理所見として神経再生障害及び後根神経節(DRG)細胞脱落を認めるが、その機序は不明である。本論文は糖尿病ラットにおける坐骨神経挫滅後のDRG細胞のapoptosis及び軸索再生を検討し、これらに対するプロスタグランジンE1(PGE1)製剤の効果とcAMP及びJNK/c-junの関与を検討したものである。実験的に次の3点を確認している。

- 1) 糖尿病ラットでは坐骨神経挫滅後にDRG細胞apoptosis及び軸索再生能低下を認める。
- 2) PGE1製剤は糖尿病ラットのDRG細胞apoptosisを予防し軸索再生を促す。
- 3) cAMP、JNK/c-junは軸索再生に関与し、apoptosisには関与しない

以上の結果より、糖尿病ラットでは軸索傷害により神経細胞が脱落し、PGE1がそれを阻止する可能性が示唆される。

本論文は、糖尿病動物の知覚神経の脆弱性とPGE1製剤の効果を証明し、糖尿病性神経障害の発症機序の一端を明らかにしたことにより、博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。