



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	乙第1924号
学位記番号	論第1680号
氏名	志田 恭子
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	Peripheral neuropathy in the pre-diabetic state of the type 2 diabetes mouse model (TSOD mice) involves TRPV1 expression in dorsal root ganglions (2型糖尿病モデルマウス(TSODマウス)の前糖尿病状態における末梢神経障害の脊髄後根神経節のTRPV1発現の関与) IBRO Neurosci Rep 2022;12:163-169.
論文審査担当者	主査： 松川 則之 副査： 片岡 洋望, 飛田 秀樹

論文内容の要旨

糖尿病 (DM) の合併症である末梢神経障害は、DM となる前段階 (前 DM 状態) から既に発症していると考えられており、IGT (impaired glucose tolerance) ニューロパチーと呼ばれる。DM の末梢神経障害は不可逆的だが、IGT ニューロパチーは可逆的なため、前 DM 状態の段階で治療すれば、患者の生活の質の向上や医療費の削減につながる。

TSOD (Tsumura Suzuki Obese Diabetes) マウスは、ddY 系マウス由来の多遺伝子性の 2 型糖尿病モデルマウスであり、アジア系人種の肥満に似た内臓脂肪型肥満を示し、高血糖、高インスリン血症、IGT、尿糖陽性を呈する。ヒトの DM 合併症 (腎障害、脂肪肝、末梢神経障害) に似た症状を示すことから、2 型 DM モデルとして用いられている。そこで、TSOD マウスを用い、前 DM 状態における IGT ニューロパチーの発症機序を検討した。

16 週齢における平均体重は TSOD マウスが 57.1 ± 1.1 g、正常血糖対照群である TSNO (Tsumura Suzuki Non-Obese) マウスが 33.8 ± 0.7 g であり、TSOD マウスにおいて有意に重かった ($P < 0.01$)。TSOD マウスの平均随時血糖値は、12 週齢 (162 ± 13 mg/dL) と比べ 13 週齢 (302 ± 43 mg/dL) で有意に上昇した ($P < 0.05$)。また、13 週齢の TSOD マウスの随時血糖値は 302 ± 43 mg/dL であり、TSNO マウスでは 130 ± 7 mg/dL で、有意に高かった ($P < 0.05$)。尿糖の陽性率は 12 週齢の TSOD マウスでは 14.3% だったが、13~16 週齢では 42.9%~71.4% に上昇した。耐糖能をインスリン負荷試験で評価したところ、TSNO マウスの血糖値は、インスリンにより投与後 15 分から 90 分まで低下した。TSOD マウスではインスリンによる血糖値への影響は見られず、インスリン抵抗性を確認した。

以上の結果より、TSOD マウスの随時血糖値の平均値が 250 mg/dL 以下、尿糖陽性率が 40% 以下である 5~12 週齢を前 DM 状態と定義し、以下の実験を行った。

痛覚閾値の測定のため von Frey 試験により評価したところ、TSOD マウスの 50% 機械的閾値は 0.6g 前後であったが、TSNO マウスでは 0.2g 前後であり、機械痛覚閾値が有意に低下していた ($p < 0.01$)。熱刺激に対する痛覚閾値を測定するため、 51°C のホットプレート装置を用いて評価した。6 週齢の TSOD マウスにおける反応潜時は 11.6 ± 0.9 秒で、TSNO マウス (14.6 ± 0.7 秒) よりも有意に短縮していた ($p < 0.05$)。12 週齢では、TSOD マウスにおいて 7.2 ± 0.6 秒、TSNO マウスで 15.2 ± 0.8 秒であり、熱痛覚閾値の低下が認められた ($p < 0.01$)。

次に、痛みの情報を伝える感覚神経の細胞体が存在する後根神経節 (DRG) の TRPV1 陽性細胞の直径を評価した。DRG の細胞体は、大きいもの (直径 $35 \mu\text{m}$ 以上) が有髄神経である A β 線維、小さいもの (直径 $25 \mu\text{m}$ 以下) が有髄の A δ 線維と無髄の C 線維である。

12 週齢の TSNO および TSOD マウスから L4、L5、および L6 の DRG を摘出し、抗 TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) 抗体を用いて免疫組織化学的に評価した。TSOD マウスの TRPV1 陽性細胞は、TSNO マウスと比較し、直径 $11 \sim 13 \mu\text{m}$ では有意に少なく ($P < 0.05$)、直径 $19 \sim 21 \mu\text{m}$ では有意に多かった ($P < 0.05$)。つまり、TSOD マウスにおける TRPV1 陽性細胞の分布は、小径細胞から大径細胞へと変化していた。さらに、有髄神経のマーカーである neurofilament heavy (NF-H) と TRPV1 の抗体を用いた二重蛍光標識を行い、12 週齢の TSOD マウスの DRG における有髄神経細胞の TRPV1 発現を確認したところ、TSNO マウスよりも有意に増加していた ($P < 0.05$)。

以上から、有髄神経における TRPV1 の発現増加が、TSOD マウスの機械・熱痛覚閾値低下の原因であることが示唆された。先行研究から、A β 線維に TRPV1 が発現すると、触覚が侵害感覚に伝達されることが示唆されているため、本研究で認められた TSOD マウスの DRG における変

化が機械・熱痛覚閾値低下の原因であると考えられた。

本研究から、5～12 週齢の前 DM 状態の TSOD マウスは IGT ニューロパチーのモデルとして有用であり、DRG の無髄小径神経細胞から有髄大径神経細胞への TRPV1 発現の変化が、IGT ニューロパチーの病態に関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

前糖尿病 (DM) 状態で起こる神経障害を、IGT (impaired glucose tolerance) ニューロパチーと呼ぶ。DM の末梢神経障害は不可逆的だが、IGT ニューロパチーは可逆的なため、前 DM 状態で治療すれば、患者の生活の質の向上や医療費の削減につながる。TSOD (Tsumura Suzuki Obese Diabetes) マウスは、ddY 系マウス由来の多遺伝子性の 2 型 DM モデルマウスであり、アジア系人種の肥満に似た内臓脂肪型肥満を示す。TSOD マウスを用いて、前 DM 状態における IGT ニューロパチーの発症機序を検討した。対照群には TSNO (Tsumura Suzuki Non-Obese) マウスを用いた。

まず、6~16 週齢における体重、随時血糖値、尿糖を測定した (尿糖は 9 週齢以降の TSOD マウスのみ)。その結果、12 週齢までの TSOD マウスでは、随時血糖値は高値にならず、尿糖は陰性が多いと判明した。また、インスリン負荷試験で、TSOD マウスのインスリン抵抗性を確認した。

以上の結果より、TSOD マウスの随時血糖値の平均値が 250mg/dL 以下、尿糖陽性率が 40% 以下である 5~12 週齢を前 DM 状態と定義し、以下の実験を行った。

機械的刺激による痛覚閾値の測定のために von Frey 試験、熱刺激による痛覚閾値の評価のためにホットプレート試験を実施したところ、TSOD マウスで機械・熱痛覚閾値の有意な低下を認め、IGT ニューロパチーの症状が確認できた。次に、痛みに関連の深い後根神経節 (DRG) の TRPV1 陽性細胞の直径を、TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) 抗体で免疫組織化学的に評価した。TSOD マウスの TRPV1 陽性細胞は直径 11~13 μ m では有意に減り、直径 19~21 μ m では有意に増加した。つまり、TSOD マウスの TRPV1 陽性細胞の分布は、小径細胞から大径細胞へと変化した。さらに、有髄神経マーカーの neurofilament heavy (NF-H) と TRPV1 の抗体で二重蛍光標識を行い、12 週齢の TSOD マウスの DRG における有髄神経細胞の TRPV1 発現を確認したところ有意に増加していた。以上から、有髄神経における TRPV1 の発現増加が、TSOD マウスの機械・熱痛覚閾値低下の原因であることが示唆された。

本研究から、TSOD マウスは IGT ニューロパチーのモデルとして有用であり、DRG の TRPV1 発現の変化が、IGT ニューロパチーの病態に関与していることが示唆された。

【審査の内容】

約 20 分間のプレゼンテーションの後に、主査の松川教授より、IGT ニューロパチーの臨床診断の方法、TSOD マウスの採用理由、13 週齢で急激な血糖変動がある理由、13 週齢以降の症状の変化、発症機序の検討に DRG のみの観察でよいかなどに関して、合計 11 項目の質問があった。次に副査の片岡教授より、TSOD マウスと他の DM モデルの相違点、3-4 週齢での神経障害の可能性、治療介入による神経障害の改善の確認の必要性などに関して、合計 5 項目の質問および提案があった。最後に副査の飛田教授より、二重染色法の説明、TSOD マウスの分子レベルの DM 発症機序、von Frey 試験で刺激される TRP の種類、IGF-1 が髄鞘化に関与する可能性などに関して、合計 8 項目の質問があった。

いずれの質問と提案に対しても申請者からは概ね満足のいく回答が得られ、学位論文の内容を十分に把握していると判断した。本研究は、前 DM 状態のマウスで IGT ニューロパチーの症状を確認し、発症機序の一つとして TRPV1 発現の変化を提案する重要な研究であり、評価される。

以上を持って、申請者には博士 (医学) の学位を授与するに値すると判断した。

論文審査担当者 主査 松川 則之

副査 片岡 洋望、飛田 秀樹