

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	上堀 勢位嗣
学位論文題目			
Effects of a novel compound MCC257 for diabetic peripheral neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats.			
(Streptozotocin 誘発糖尿病ラットにおける糖尿病性末梢神経障害に対する MCC257 の効果に関する研究)			
共著者名		伊藤 博史、宮内 和誠、石関 哉生、 浅井 真人、柏谷 朋、網頭 慶太、 牧野 勲	
未発表			
<b>研究目的</b>			
<p>糖尿病合併症の一つである糖尿病性末梢神経障害の成因には細小血管障害、polyol 代謝異常、神経細胞のアポトーシス、神経栄養因子の障害などの種々の仮説が存在するが、現在のところその発症機構は未だ不明である。</p> <p>神経栄養因子ファミリーの内の一つ Nerve growth factor (NGF) は、感覚神経および交感神経の標的となる末梢組織で産生され、軸策末端の NGF receptor に結合し、逆行性軸策輸送により、Dorsal root ganglia (DRG) または、交感神経節へ運ばれ、主に神経細胞の成長、機能維持、再生に働いている。糖尿病では NGF の末梢組織における産生低下、逆行性軸策輸送の低下<sup>1)</sup>が報告されており、これらによる NGF 生理作用の低下が神経機能異常、形態異常を来すことが示唆されている。また NGF は痛覚伝達物質である、substance P (SP) の産生を調節している因子であることが報告されている。SP は末梢神経において C-fiber に限局し、温痛覚の維持、末梢組織の微小循環を調節する因子としても報告されている。</p> <p>NGF の作用は sphingolipid の一つである、ganglioside GM1 により促進されることが報告され、その作用発現機序として NGF の high affinity receptor である TrkA の tyrosine phosphorylation と dimerization を惹起することが報告されている<sup>2)3)</sup>。MCC257 は三菱ウェルファーマ社により新たに開発された 経口投与可能な GM1 mimic であり、その薬理効果、糖尿病性末梢神経障害の成因における NGF 作用の重要性を明らかにするため以下の検討を行った。</p>			

## 材料・方法

生後7週の雄性 Crj-Wistar ラットに Streptozosine (STZ)を静脈注射 (50mg/BWkg)し、STZ 誘発糖尿病ラットを作成。STZ 投与し、1週後に随時血糖 400mg/dl 以上をもって糖尿病の発症とした。生後8週より MCC257 をそれぞれ 0.3mg/BWkg、1.0mg/BWkg、3.0mg/BWkg にて4週間毎日経口投与を行った。非糖尿病コントロール群として、それぞれ週数を合致させたラットを用いた。

MCC257 を4週間経口投与後、radiant heat による弱い熱刺激 (0.9 °C/sec) をラットの tail に与えることにより、ラットの無髄神経線維である C-fiber を特異的に刺激し、ラットが退避行動を示すまでの潜時を計測する taik flick test (TFT) を施行。TFT 後、ラットの体重、血糖、HbA1c を測定した。

MCC257 投与後、各群における L4~L6 level の DRG、soleus muscle を採取し、それぞれの検体の SP 濃度と NGF 濃度を ELISA 法にて測定した。

## 成績

### ① ラットの体重、血糖、HbA1c

糖尿病群と MCC257 経口投与群ではコントロール群と比較し体重は有意な減少を認めた ( $p<0.001$ )。糖尿病群と MCC257 経口投与群は、血糖値、HbA1c においてコントロール群と比較し有意な上昇を認めた ( $p<0.001$ )。糖尿病群と MCC257 経口投与群の間には体重、血糖、HbA1c において有意差は認められなかった。

### ② TFT

コントロール群の潜時は  $12.3 \pm 0.9$  sec、糖尿病群における潜時は  $19.4 \pm 0.8$  sec、MCC257 経口投与した各群ではそれぞれ  $14.2 \pm 0.7$  sec (0.3 mg/BWkg),  $13.7 \pm 0.4$  sec (1.0 mg/BWkg),  $13.6 \pm 0.5$  sec (3.0 mg/BWkg)であった。糖尿病群は、コントロール群と比較して有意な潜時の延長を認めた ( $p<0.001$ )。MCC257 経口投与群はいずれの用量群も、コントロール群との間に有意差を認めず、また糖尿病群との比較では有意に潜時の低下を認めた ( $p<0.001$ )。

### ③ NGF contents in DRG

コントロール群では  $12.7 \pm 1.1$  ng/g wet tissue、糖尿病群では  $7.7 \pm 0.3$  ng/g wet tissue、MCC257 経口投与した各群ではそれぞれ  $10.4 \pm 1.7$  ng/g wet tissue (0.3 mg/Bw

kg),  $11.4 \pm 1.3$  ng/g wet tissue (1.0 mg/Bw kg),  $13.8 \pm 1.3$  ng/g wet tissue (3.0 mg/Bw kg) であった。糖尿病群では DRG において、コントロール群に比較し有意な NGF の減少を認めた ( $p < 0.001$ )。MCC257 経口投与群では DRG において、糖尿病群に比較し有意な NGF の増加を認めた。 ( $p < 0.05$  0.3 and 1.0mg/BWkg vs DM ;  $p < 0.001$  3.0mg/BWkg vs DM) また、コントロール群とは有意な差を認めなかった。MCC257 投与群間では、有意差は認めなかったが、用量依存性に増加する傾向を示した。

#### ④ NGF contents in soleus muscle

コントロール群では  $206 \pm 12$  pg/g wet tissue、糖尿病群では  $101 \pm 7$  pg/g wet tissue、MCC257 経口投与した各群ではそれぞれ  $184 \pm 34$  pg/g wet tissue (0.3 mg/BWkg),  $216 \pm 14$  pg/g wet tissue (1.0 mg/BWkg),  $245 \pm 44$  pg/g wet tissue (3.0 mg/BWkg) であった。糖尿病群では、soleus muscle、において、コントロール群に比較し有意な NGF の減少を認めた ( $p < 0.001$ )。MCC257 経口投与群では soleus muscle において、糖尿病群に比較し有意な NGF の増加を認めた。 ( $p < 0.05$  0.3 and 1.0mg/BWkg vs DM ;  $p < 0.001$  3.0mg/BWkg vs DM) また、コントロール群とは有意な差を認めなかった。MCC257 投与群間では、有意差は認めなかったが、用量依存性に増加する傾向を示した。

#### ⑤ substance P contents in DRG

コントロール群では  $17.5 \pm 0.9$  ng/g wet tissue、糖尿病群では  $7.7 \pm 0.6$  ng/g wet tissue、MCC257 経口投与した各群ではそれぞれ  $16.8 \pm 1.4$  ng/g wet tissue (0.3 mg/BWkg),  $18.3 \pm 1.7$  ng/g wet tissue (1.0 mg/BWkg),  $18.7 \pm 1.0$  ng/g wet tissue (3.0 mg/BWkg) であった。糖尿病群では DRG において、コントロール群に比較し有意な SP の減少を認めた ( $p < 0.001$ )。MCC257 経口投与群では DRG において、糖尿病群に比較し有意な SP の増加を認めた ( $p < 0.001$ )。また、コントロール群とは有意な差を認めなかった。MCC257 投与群間では、有意差は認めなかったが、用量依存性に増加する傾向を示した。

#### ⑥ substance P contents in soleus muscle

コントロール群では  $118 \pm 7$  ng/g wet tissue、糖尿病群では  $80 \pm 6.3$  ng/g wet tissue、MCC257 経口投与した各群ではそれぞれ  $125 \pm 7.2$  ng/g wet tissue (0.3 mg/BWkg),  $131 \pm 8.9$  ng/g wet tissue (1.0 mg/BWkg),  $136 \pm 3.3$  ng/g wet tissue (3.0 mg/BWkg) であった。糖尿病群では DRG において、コントロール群に比較し有意な SP の減少を認めた ( $p < 0.001$ )。MCC257 経口投与群では DRG において、糖尿病群に比較し有意な SP の増加を認めた ( $p < 0.001$ )。また、コントロール群とは有意な差を認めなかった。MCC257 投与群間では、

有意差は認めなかったが、用量依存性に増加する傾向を示した。

### 考案

今回の実験において、新たに開発された ganglioside GM1 mimic である MCC257 は糖尿病ラットの体重、血糖状態に影響を与えず、特に副作用も認めなかった。MCC257 を経口投与することにより、各組織における NGF 含有量低下は抑制され、これに伴い痛覚伝達物質である SP の含有量低下も抑制されたものと考えられた。TFT にて潜時の延長が抑制されていたが、MCC257 は NGF を介して SP を増加させること、TrkA receptor を enhance させることにより糖尿病性末梢神経障害に認められる small fiber neuropathy の発症を抑制したと考えられた。MCC257 の用量依存性については経口投与群間には明らかな有意差は認めなかったが、用量依存性に増加する傾向を示した。これらの結果は MCC257 が低用量においても十分に効果を有することが示唆された。

### 結論

新たに開発された GM1 mimic である MCC257 は糖尿病状態において低下した NGF 作用を回復させることにより、末梢神経機能を改善することが示唆された。




### 引用文献

- 1) Tomlinson DR, Fernyhough P, Diemel LT : Role of neurotrophins in Diabetic neuropathy and treatment with nerve growth factors.  
Diabetes 1997 Sep;46 Suppl 2:S43-9
- 2) Rabin SJ, Mocchetti I : GM1 ganglioside activates the high-affinity nerve growth factor receptor trkA.  
J Neurochem 1995 Jul;65(1):347-54
- 3) Farooqui T, Franklin T, Pearl DK, Yates AJ : Ganglioside GM1 enhances induction by nerve growth factor of a putative dimer of TrkA.  
J Neurochem 1997 Jun;68(6):2348-55

### 参考文献

- 1) 上堀勢位嗣, 伊藤博史, 宮内和誠, 石関哉生, 浅井真人, 柏谷 朋, 牧野 勲 : 頻回の嘔吐を伴う糖尿病胃不全麻痺にドンペリドン坐剤が著効した1例.  
糖尿病 2002 45巻 8号: 605-611

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	上 堀 勢位嗣
<p>審査委員長 坂 本 尚 志 </p> <p>審査委員 牧 野 勲 </p> <p>審査委員 菊 池 健次郎 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Effects fo a novel compound MCC257 for diabetic peripheral neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats.            (Streptozotocin 誘発糖尿病ラットにおける糖尿病性末梢神経障害に対する MCC257 の効果に関する研究)</p>			
<p>本論文は糖尿病性末梢神経障害に対する ganglioside GM1 様作用を持つ MCC257 の効果を明らかにしようと試みた論文である。</p> <p>これまで糖尿病性においては末梢組織における Nerve growth factor (NGF) の産生低下、およびそれによる痛覚伝達物質である SubstanceP の脊髄後根神経節における産生低下により末梢神経障害の病態が左右されることが示されている。そこで本論文は、NGF の作用効果を促進する sphingolipid の一つである GM1 様作用を持つ新たに開発された MCC257 が糖尿病性末梢神経障害に対しどのような効果を示すか、動物モデルを用いて明らかにしようと試みた論文である。</p>			

実験には、Streptozotocin 誘発ラットを用い、痛覚閾値を指標として、末梢神経障害に対する効果を解析している。また、MCC257 が NGF 産生およびそれによる SubstanceP の産生を介しているかを明らかにするために、末梢組織および脊髄後根神経節の NGF および SubstanceP の量を測定している。

得られた結果は明らかで、MCC257 投与により、糖尿病ラットの痛覚閾値上昇は改善した。また、MCC257 投与により、糖尿病ラットで低下していた NGF および SubstanceP の量は回復した。

このことは、MCC257 は痛覚を伝達する small fiber における neuropathy の改善に有効であることを示している。また論文提出者らが推測している MCC257 の作用機序が NGF 産生を介している可能性を示している。MCC257 は経口投与可能であり、今後経口糖尿病性末梢神経障害治療薬として活用できることが考えられ、この領域の進歩に資するところが大きいと思われる。

なお、論文提出者に対する本論文の内容、関連領域に関する試問に対し、適切な回答が得られ、学力も十分と考えられた。以上より、本論文は博士の学位論文に値すると判定された。