

愛橘学術賞 受賞論文発表

愛知医科大学

内科学講座 糖尿病内科

浅野 紗恵子

Ranirestat Improved Nerve Conduction Velocities, Sensory Perception, and Intraepidermal Nerve Density in Rats with Overt Diabetic Polyneuropathy.

ラニレスタットはラットの確立した糖尿病性多発神経障害における神経伝導速度、温覚閾値および表皮内神経密度を改善する

背景

- 糖尿病性多発神経障害(DPN)は早期より発症し、頻度の高い糖尿病性合併症である。
- 感覚障害や下肢切断によるQOL低下を招くほか、心血管イベントのリスク因子であることが示されている。
- しかしながら、DPNの発症機序にアプローチする治療法は確立されていない。

背景

- DPNの成因は以下のように大別される。

血液・血管性因子

神経栄養因子

代謝性因子

① ポリオール代謝活性の亢進

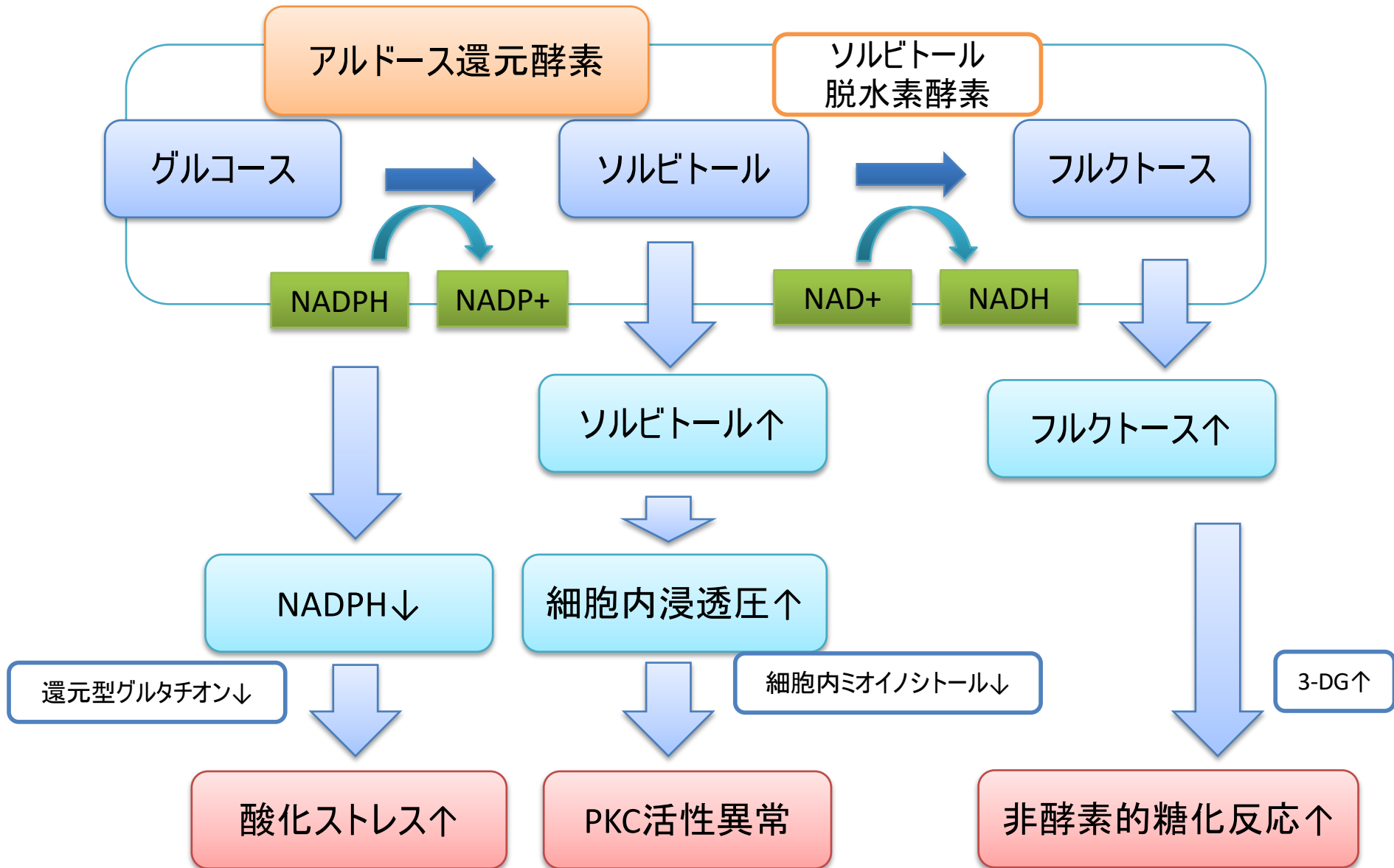
② ヘキサミン経路

③ PKC活性異常

④ 非酵素的糖化反応の亢進

⑤ 酸化ストレスの亢進

背景：DPNとポリオール代謝経路



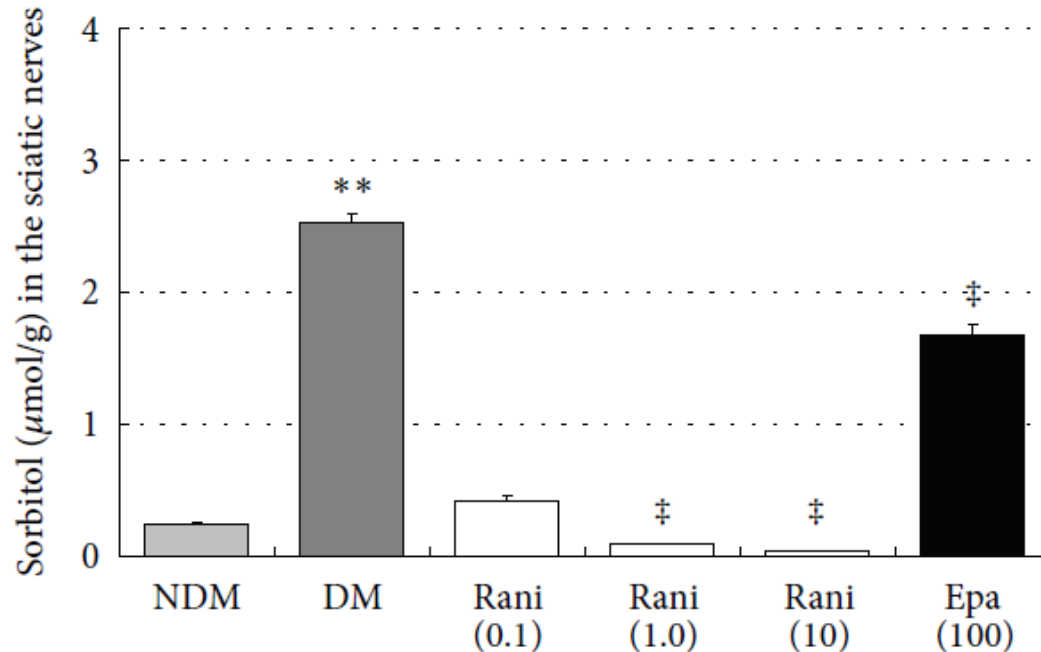
背景

- アルドース還元酵素阻害薬 (ARI) は、ポリオール代謝経路の律速酵素であるアルドース還元酵素 (AR) を標的とした糖尿病合併症治療薬である。
- ARIによるDPNの進展抑制効果¹⁾が報告されており、現在epalrestatのみが臨床応用されている。
- しかし、epalrestatは進展したDPNに対しては十分な効果が認められていない。

1) Hotta.N. Diabetes Care. 2006 Jul;29(7):1538-44.

背景

- 新規のARIであるranirestatはより強力にARを阻害し、DPNモデル動物において坐骨神経内のソルビトール値を有意に低下させることが報告されている²⁾。



背景

- ranirestatは糖尿病患者への経口投与で運動神経の神経伝導速度と振幅の改善を認めた報告^{3,4)}がされている。
- 国内第3相試験でも神経伝導速度を改善したが、症状の有意な改善は認められなかった⁵⁾。

3) Bril V. Diabetes Care. 2004 Oct;27(10):2369-75. 4) Satoh JJ Diabetes Res. 2016;2016:5383797

5) Sekiguchi K. J Diabetes investig. 2019; 10:466-474

背景

- ラットにおいては、ranirestatのDPNの発症予防効果の報告^{6,7)}されている。しかし、動物実験では糖尿病発症初期からranirestatが投与されており、DPN発症後の治療効果は検討されていない。
- ranirestatのDPNにおける治療効果の病理的な検討については、詳細な報告はされていない。

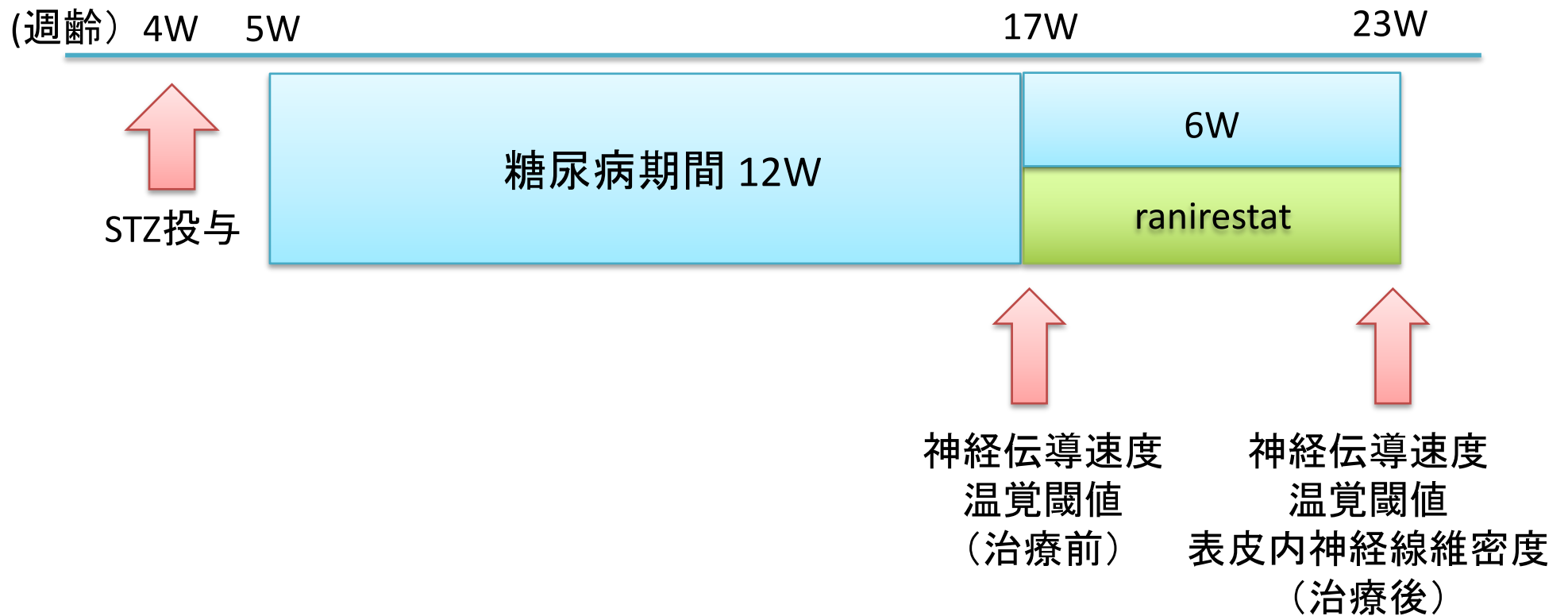
目的

- ①STZ誘発糖尿病モデルラットにおける確立したDPNに対するranirestatの改善効果を検討する。
- ②マウス後根神経節(DRG)に存在するニューロンの初代培養を用いて、ranirestatの末梢神経系に対する直接効果を検討する。

実験1: 方法

- 4週齢雄性SD rat (Non-DM: 治療群 n=10, プラセボ群 n=10; DM: 治療群 n=9, プラセボ群 n=8) に対しストレプトゾトシンを腹腔内投与し、1週間後に随時血糖値300mg/dL(16.7mM)以上で糖尿病と診断。
- 糖尿病発症12週後より、ranirestat 1mg/kgを6週間経口投与する。
- DPNは、神経伝導速度、足底の温覚閾値(プランターテスト)、表皮内神経線維密度を用いて評価を行った。

実験1: 方法



実験1：結果（体重・血糖）

血糖および体重に優位な差は認めなかった。

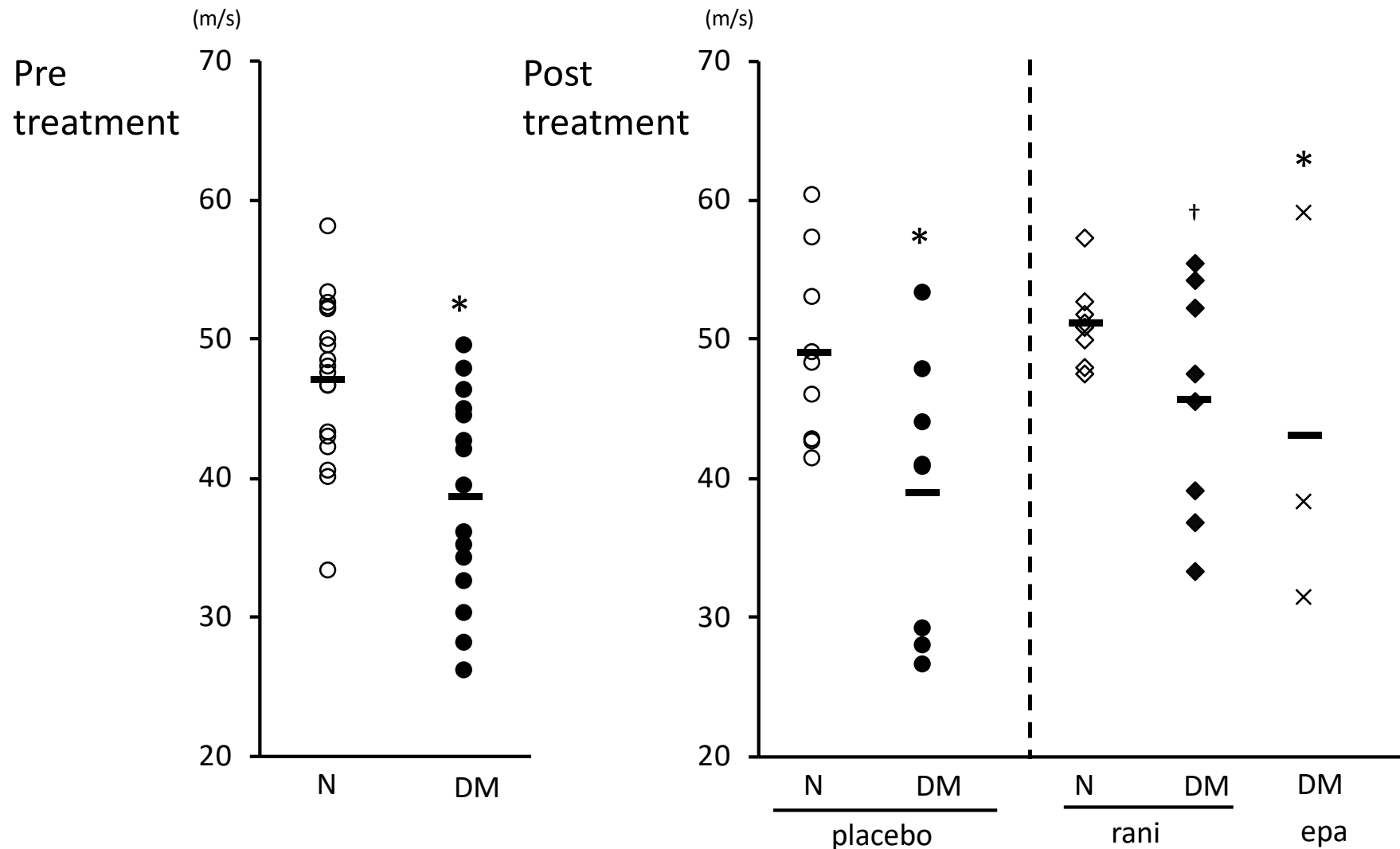
	Nondiabetic rats			Diabetic rats		
	Pre Treatment	Post Treatment		Pre Treatment	Post Treatment	
		Placebo	Rani		Placebo	Rani
Number	19-20	4-6	8	16	5	7
随時血糖 (mM)	6.7 ± 1.3	16.8 ± 4.6 [†]	13.2 ± 2.9 [†]	28.3 ± 3.9*	29.6 ± 4.9*	30.5 ± 4.1*
体重(g)	518 ± 32	566 ± 35	485 ± 96	254 ± 54*	241 ± 34*	253 ± 67*

Result are means ±SD.

*: p < 0.05 versus pre-treatment nondiabetic rats and †: p < 0.05 versus pre-treatment nondiabetic rats.

実験1: 結果 (運動神経伝導速度)

Ranirestat投与群では運動神経伝導速度の有意な改善を認めた。



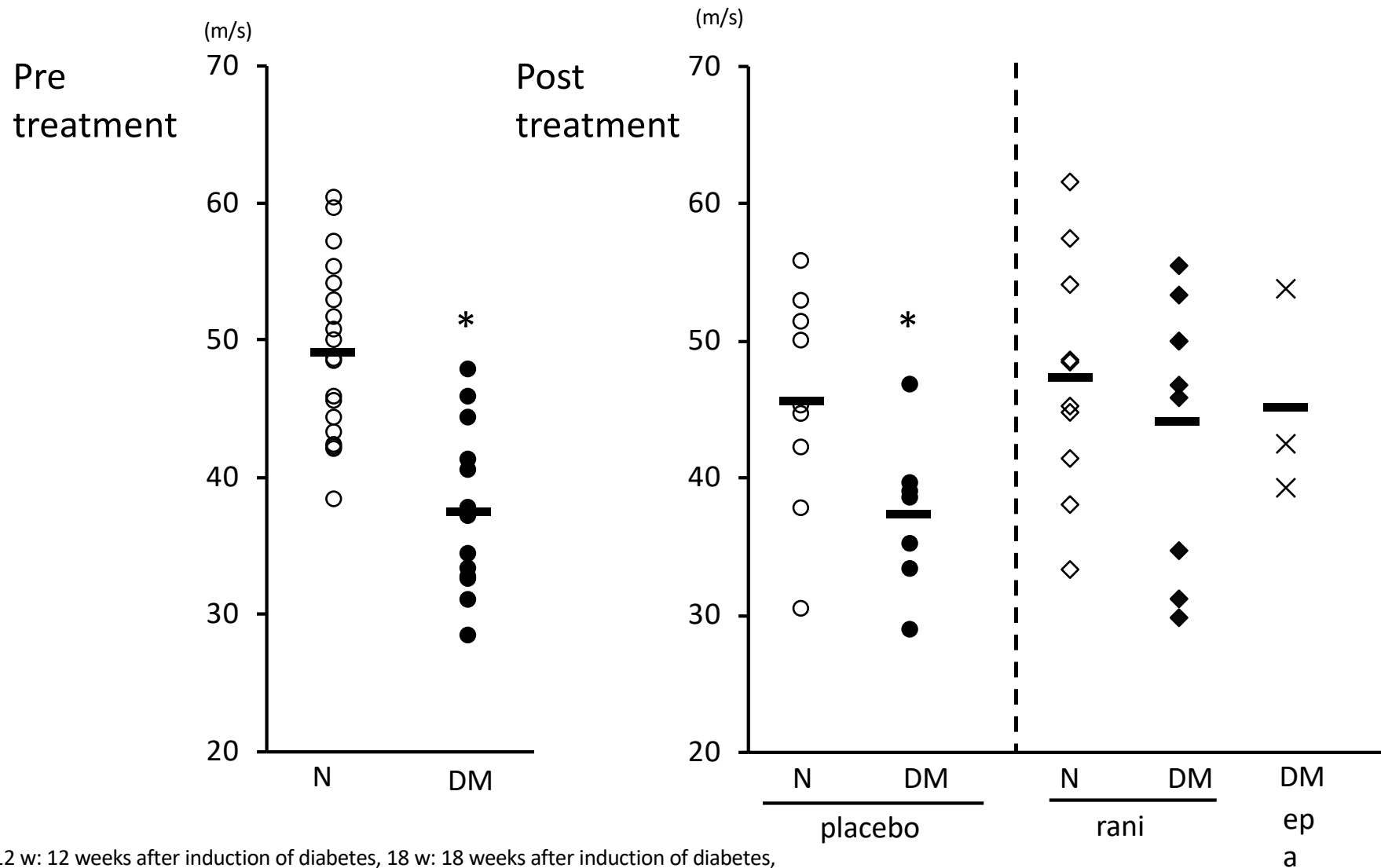
12 w: 12 weeks after induction of diabetes, 18 w: 18 weeks after induction of diabetes,

N: non-diabetic rats, DM: diabetic rats * : $p < 0.05$ compared with N or N-placebo, † : $p < 0.05$ compared with D-placebo.

n = 15 ~ 18 at 12 w, n = 8 ~ 10 in groups treated with placebo or ranirestat, n = 3 in D-epa. Bold horizontal line in each group demonstrates an average value.

実験1: 結果 (感覚神経伝導速度)

Ranirestat投与群では感覚神経伝導速度の有意な改善を認めた。



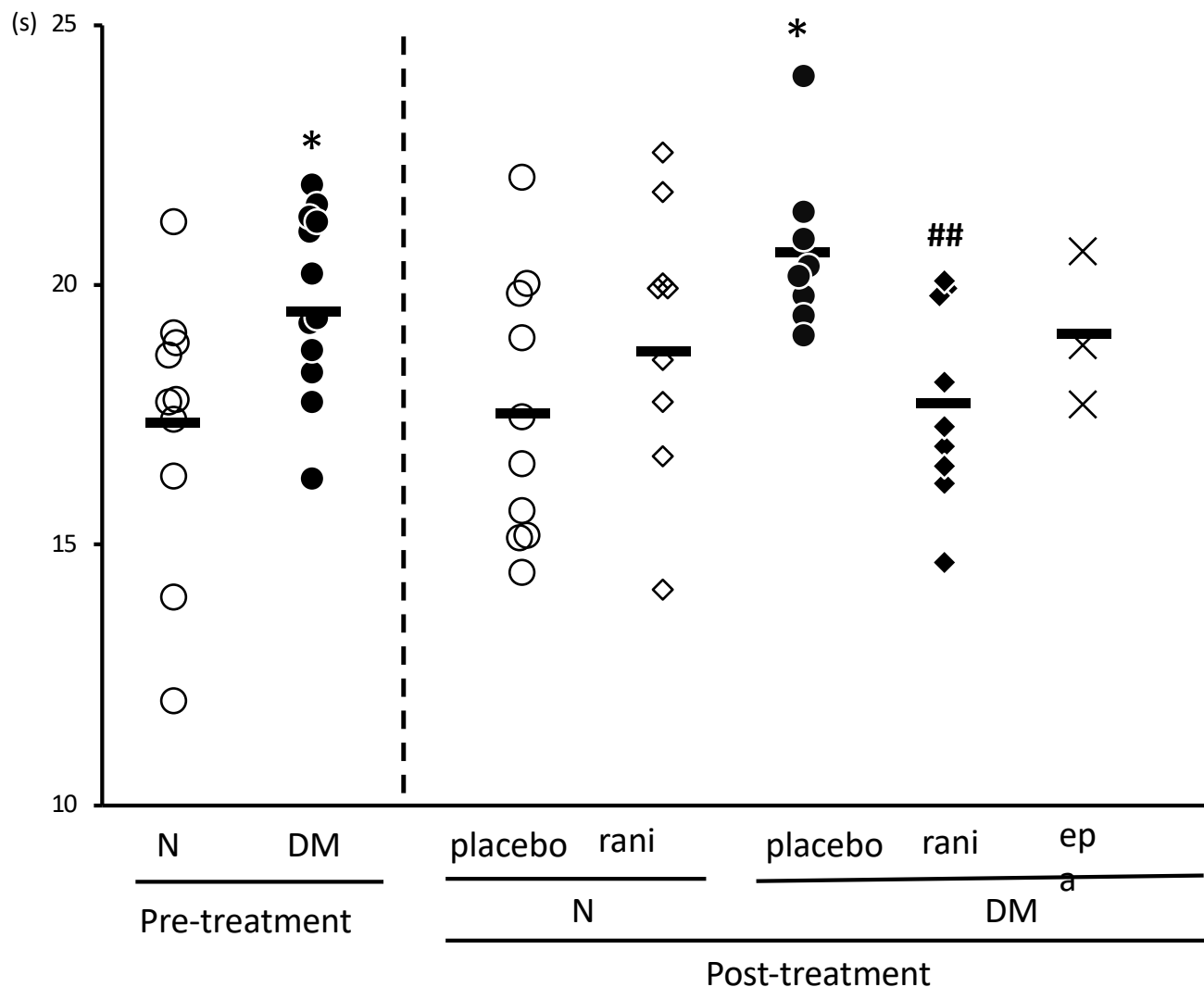
12 w: 12 weeks after induction of diabetes, 18 w: 18 weeks after induction of diabetes,

N: non-diabetic rats, DM: diabetic rats * : p < 0.05 compared with N or N-placebo, † : p < 0.05 compared with DM-placebo.

n = 15 ~ 18 at 12 w, n = 8 ~ 10 in groups treated with placebo or ranirestat, n = 3 in D-epa. Bold horizontal line in each group demonstrates an average value.

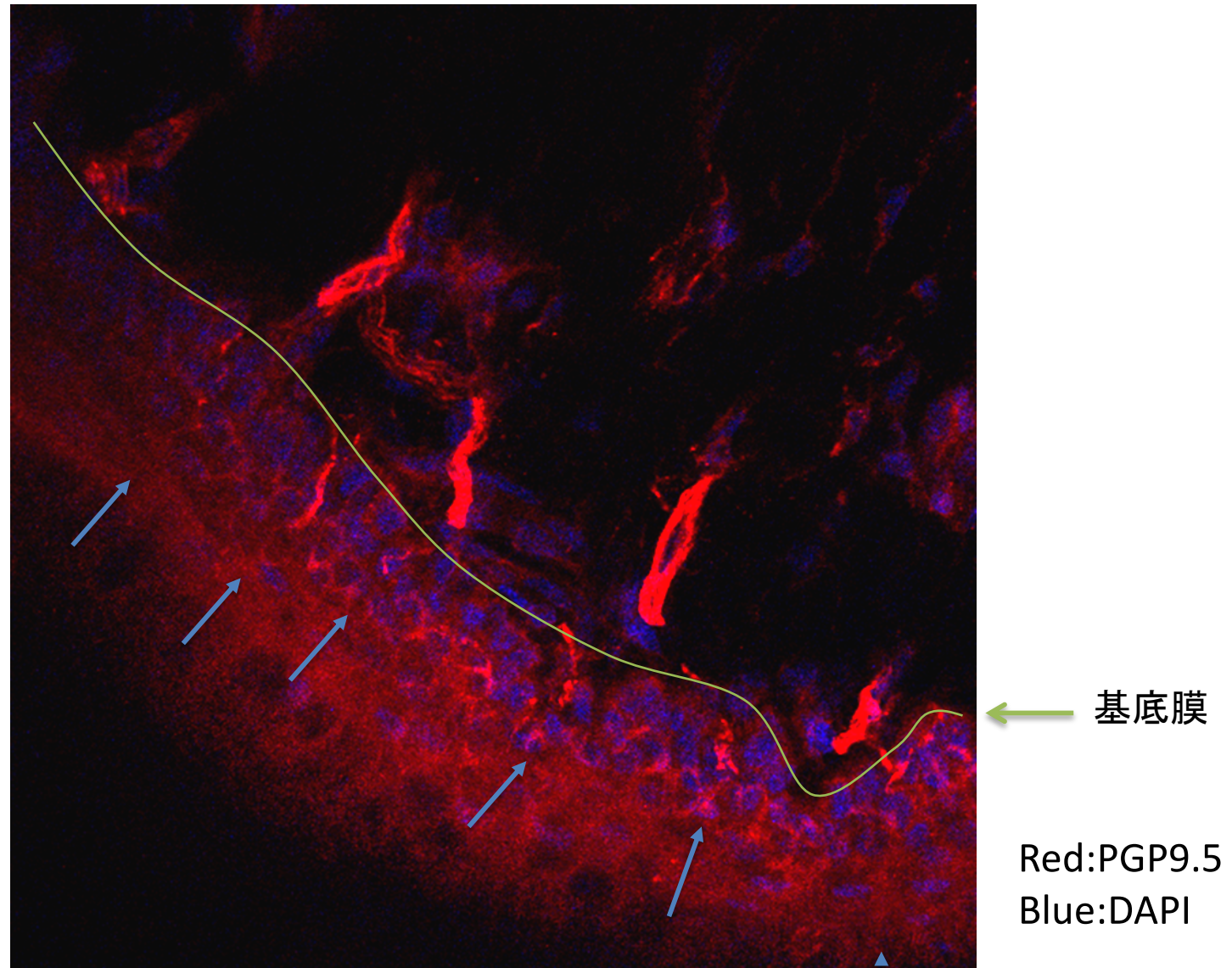
実験1: 結果 (温覚閾値)

Ranirestat投与群は温感閾値異常(逃避反応の遅延)の有意な改善を認めた。



N: non-diabetic rats, DMdiabetic rats, rani: rats treated with ranirestat, epa: rats treated with epalrestat. *: $p < 0.05$ compared with N or non-diabetic placebo, ##: $p < 0.005$ compared with diabetic placebo. $n = 15 \sim 18$ at 12 w, $n = 8 \sim 10$ in groups treated with placebo or ranirestat, $n = 3$ in rats treated with epalrestat. Bold horizontal line in each group demonstrates an average value.

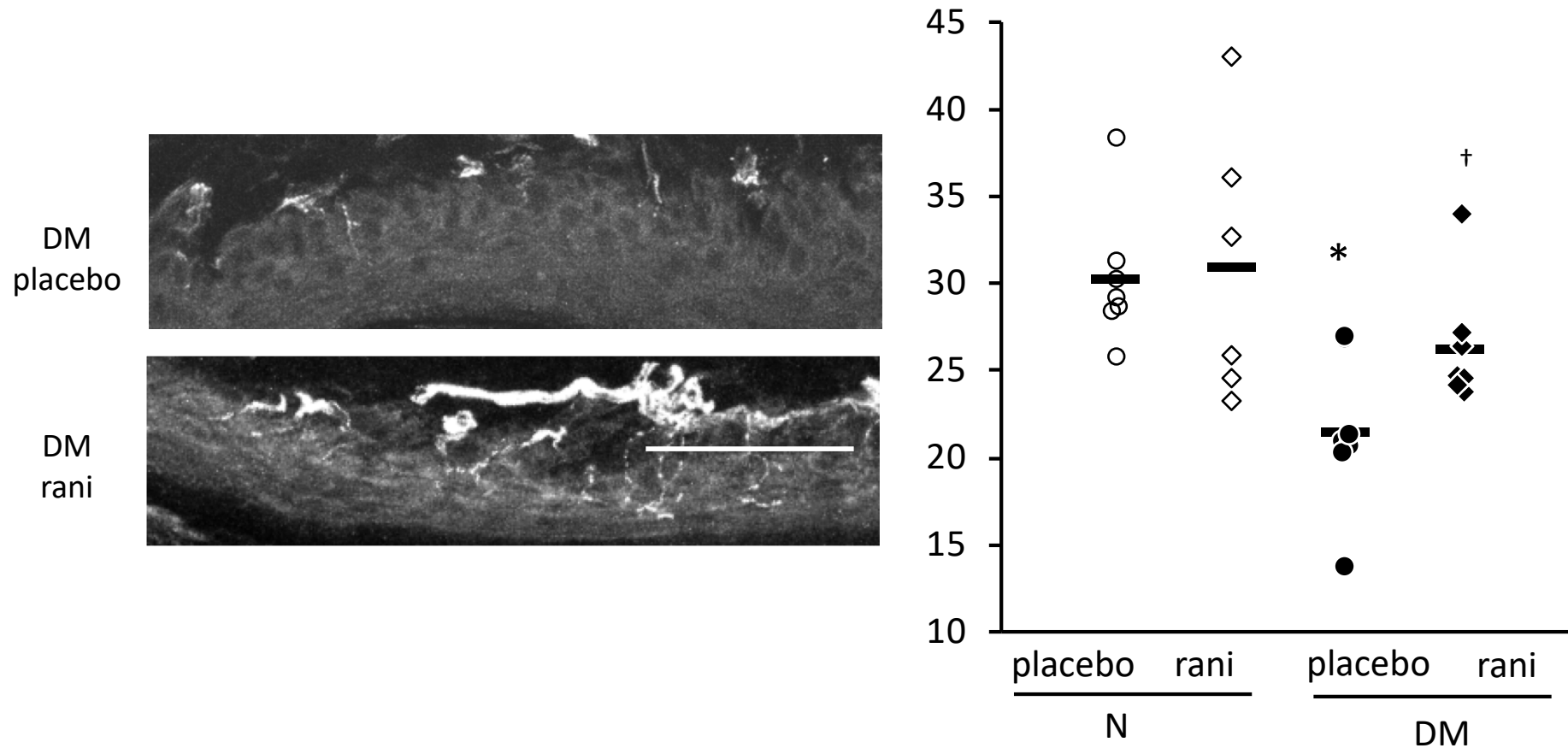
表皮内神経線維密度(正常血糖群)



ラットの足底皮膚を採取し、神経線維をPGP9.5で染色し、15 μ 厚の切片を共焦点顕微鏡を用いて観察し、基底膜(黄線)を通過する神経線維(青矢印)の本数を計測する。

実験1: 結果 (表皮内神経線維密度)

Ranirestat投与群では表皮内神経繊維密度の有意な改善を認めた。



N: non-diabetic rats, DM: diabetic rats, placebo: rats treated with placebo, rani: rats treated with ranirestat.

*: $p < 0.05$ versus N treated with placebo, †: $p < 0.05$ versus D treated with ranirestat, $n = 6-8$ in each group. Scale bar: 50 μm .

実験2: 方法

ranirestatの末梢神経に及ぼす直接効果を検討するため、脊髄根神経節(DRG)ニューロンの初代培養を行った。

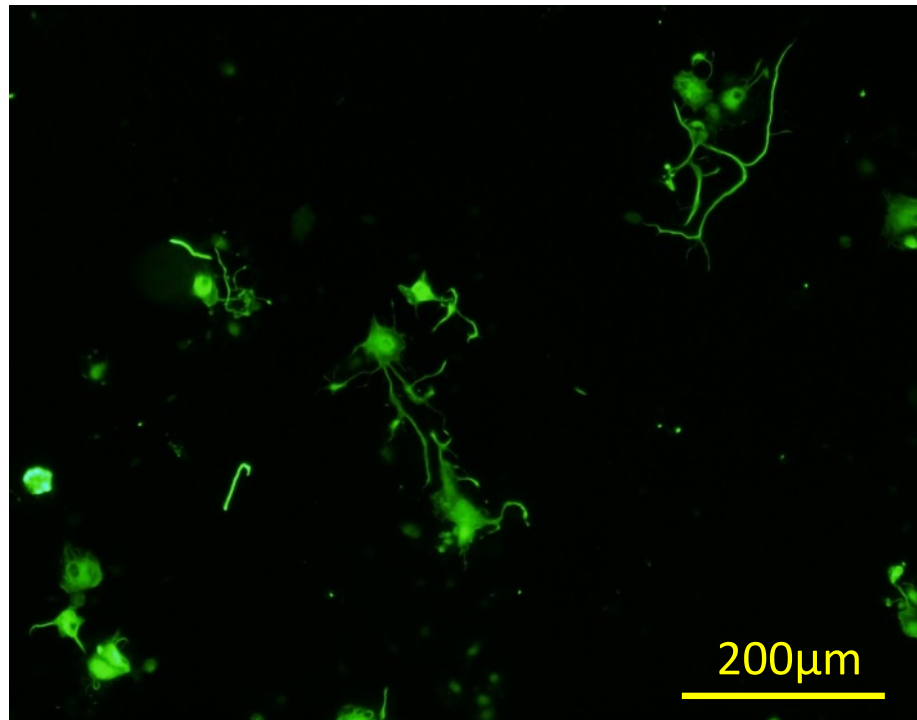
C57BL/6雄性マウス(4週齢)及びSDラット(3週齢)よりDRGを採取し、ranirestat 1 μ Mを投与して48時間の培養後、神経突起の伸長を定量化した。

神経突起は抗neurofilament-L抗体による免疫染色で可視化した。

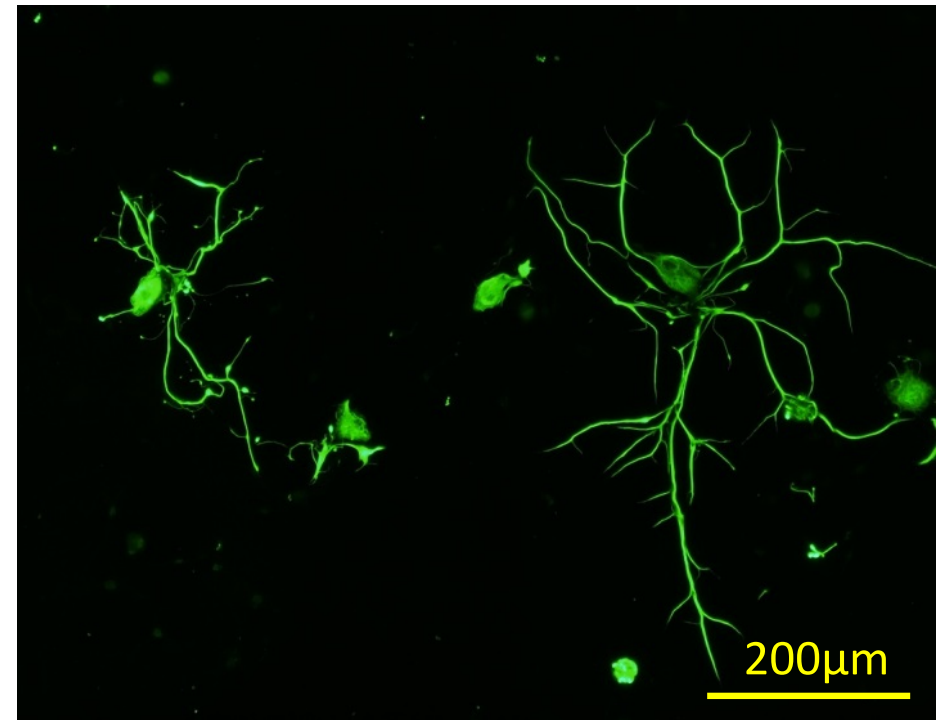
実験2：結果（神経突起伸長）

Ranirestat投与群では有意な神経突起の伸長を認めた。

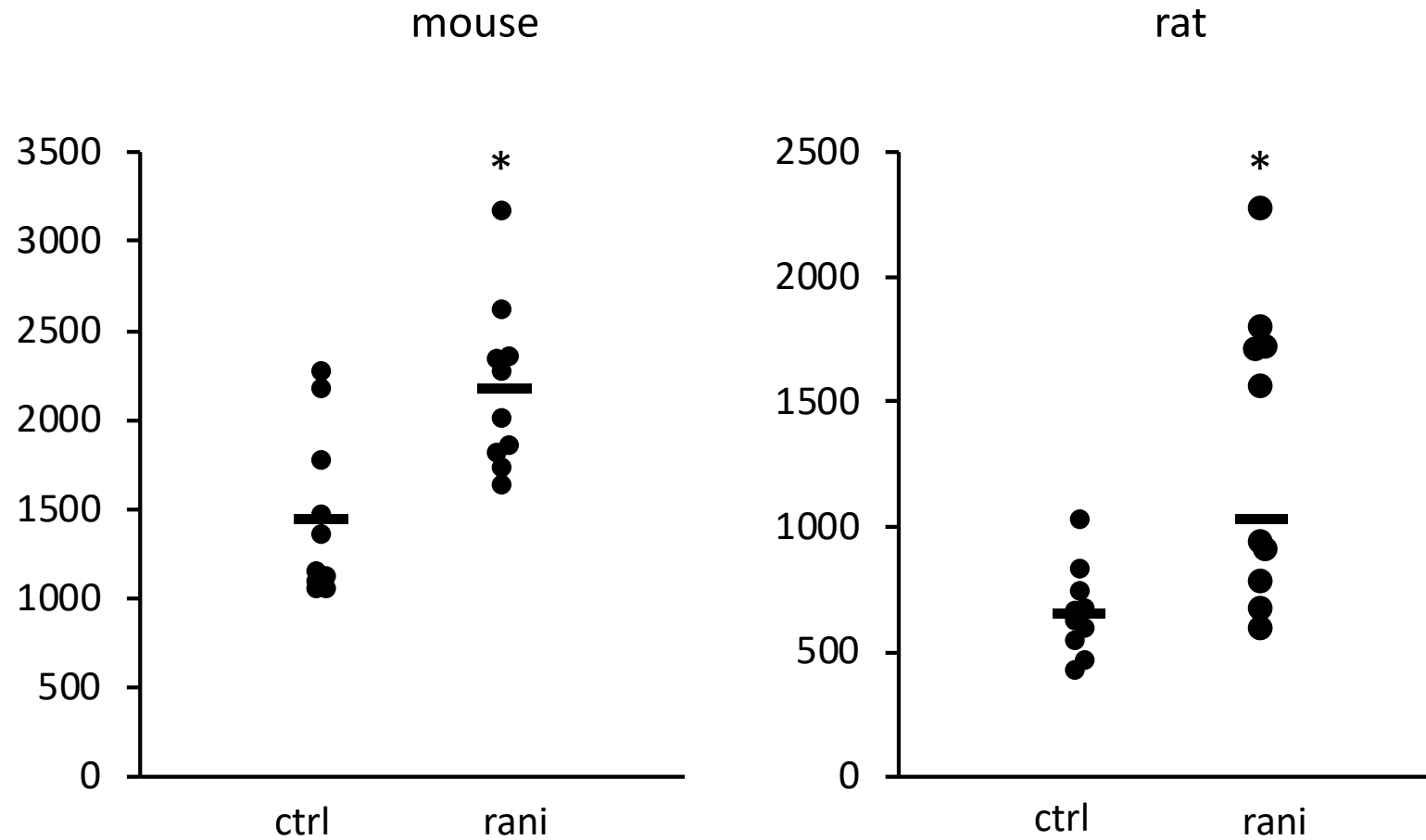
Control



Ranirestat 1 μM



実験2: 結果 (神経突起伸長)



ctrl: control medium, rani: medium supplemented with 1 $\mu\text{mol/l}$ ranirestat. * $p < 0.05$ versus ctrl. $n = 10$ in each group.

考察

- 既報では糖尿病発症早期よりranirestatを投与しており、予防効果が証明されている。
- 本研究は糖尿病誘発をした12週間後にDPNが確立したことを確認してからranirestatの投与を行い、DPNに対してranirestatが改善効果を有することを確認した。
⇒より診療の実際に即した介入効果を確認した。

考察

- 表皮内神経線維密度は小径線維障害の病理学的な評価方法であり、本研究ではranirestatがDPNに対して病理学的にも有効であることを示した。

考察

- DRGの初代培養における突起伸長は神経再生を模するex vivoの実験であり、ranirestatが末梢神経系の再生にも有効であることが示唆された。
- ARIであるsorbiniilの投与により、SIRT2の活性化を通じてDRGの神経突起伸長を認めた報告がなされている⁸⁾。
本研究のranirestatによる神経突起伸長効果はSIRT2経路が関与していると考えられた。

結語

- ranirestatは発症したDPNに対しても治療効果を有することが示唆された。

謝辞

このような名誉ある賞にご選定いただき誠に光栄に存じます。論文の作成にあたり。ご指導をいただいた中村二郎教授、神谷英紀先生、姫野龍仁先生をはじめとする指導教官の先生方、また実験にご協力をいただいた大学院生の皆様に感謝を申し上げます。