

論文要旨

Serum VEGF increases in diabetic polyneuropathy,
particularly in the neurologically active symptomatic stage
(血清 VEGF は、糖尿病性多発神経障害の自覚的神経症
状が顕性化する病期において増加する)

出口尚寿

【序論および目的】血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) は強力な血管新生作用、血管透過性亢進作用を有し、高血糖や低酸素によってその産生が刺激されるため、糖尿病細小血管合併症の発現に関わる重要なサイトカインと考えられている。特に糖尿病性網膜症における増殖性変化への関与は広く知られるところであるが、糖尿病性多発神経障害 (diabetic polyneuropathy: DPN) への関与や、DPN の臨床病期との関連についての報告はほとんどない。そこで今回我々は、血清 VEGF の DPN への関与、および血清 VEGF と DPN の臨床病期との関連について検討した。

【材料および方法】当科、および当科関連病院定期通院中の糖尿病連続症例 220 人 (男性 105 人、女性 115 人、平均年齢 63.5 ± 12.6 歳、1 型糖尿病 11 人、2 型糖尿病 209 人、糖尿病罹病期間 10.4 ± 9.2 年、 HbA_{1c} 8.0 ± 2.1 %) を対象とした。DPN の病期分類 (Dyck PJ ら、1988) を基に、日本で提唱された DPN の「簡易診断基準と病期分類」を用いて、自覚的神経症状、アキレス腱反射、振動覚、感覚障害、自律神経障害、運動障害、QOL 障害をもとに Stage 0 (神経障害なし)、Stage 1 (無症候期)、Stage 2 (症候期)、stage 3 (廃疾期) の 4 病期に分類した。患者の血清 VEGF 濃度を ELISA 法にて測定し、DPN 合併の有無別、DPN の病期別に比較検討した。

【結果】糖尿病患者の血清 VEGF 濃度は 264.6 ± 219.3 pg/ml であり、過去に我々が報告した正常患者対象 (214.9 ± 139.3 pg/ml) と比し有意に高値であった ($p=0.0004$)。糖尿病患者において血清 VEGF 濃度は、DPN 群 (310.1 ± 224.3 pg/ml)、DPN なし群 (216.5 ± 204.0 pg/ml) と、DPN 群において有意に高値であった ($p<0.0014$)。対照的に、糖尿病性網膜症あり群 (261.1 ± 210.6 pg/ml)、なし群 (268.1 ± 237.3 pg/ml)、および糖尿病性腎症 (顕性蛋白尿) あり群 (241.5 ± 185.7 pg/ml)、なし群 (284.1 ± 248.8 pg/ml) での検討では、血清 VEGF 濃度に有意差は認めなかった。

DPN 病期別の血清 VEGF 濃度は、Stage 0 ($n=107$, 61.5 ± 13.6 歳、糖尿病罹病期間 9.1 ± 10.4 年、 HbA_{1c} 7.7 ± 2.2 %) ; 216.5 ± 204.0 pg/ml、Stage 1 ($n=35$, 66.4 ± 12.1

歳、糖尿病罹病期間 8.4 ± 5.2 年、 HbA_{1C} 7.8 ± 2.1 %) ; 256.7 ± 224.4 pg/ml、Stage 2 (n=65、 65.5 ± 11.3 歳、糖尿病罹病期間 11.9 ± 7.8 年、 HbA_{1C} 8.3 ± 2.0 %) ; 364.8 ± 225.9 pg/ml、Stage 3 (n=13、 62.3 ± 8.2 歳、糖尿病罹病期間 14.9 ± 12.9 年、 HbA_{1C} 8.5 ± 1.5 %) ; 180.3 ± 109.4 pg/ml であった。Stage 2 (症候期) では、Stage 0 (神経障害なし)、Stage 3 (廃疾期) に比し血清 VEGF は有意に高値であった ($p=0.0002$ 、 $p=0.04$)。

【結論及び考察】血清 VEGF は、DPN を合併している糖尿病患者において合併していない患者よりも有意に高値であった。さらに、痛み、しびれなどの自覚的神経症状や自律神経障害主に小径有髄神経、無髄神経障害) が前景に立って出現してくる Stage 2 において、感覚鈍麻や運動障害など、神経線維脱落の進行や大径有髄神経障害による症状がオーバーラップしてくる Stage 3 よりも有意に上昇していた。VEGF は高血糖や低酸素により産生が亢進し、糖尿病細小血管合併症の発現に関連するが、今回の我々の検討では、血清 VEGF は血糖コントロール状態よりもむしろ DPN の臨床病期や重症度による差が存在することが明らかとなった。

異常感覚や疼痛、しびれなどの陽性神経症状は Stage 2 でしばしば見られ、感覚鈍麻や消失などの陰性神経症状は Stage 3、すなわち DPN の後期~末期に特徴的である。DPN における陽性神経症状は、高血糖による変性神経線維と未熟な再生神経線維の異常発火、異常伝導に起因し、陰性神経症状は、神経変性・脱落による神経線維数の減少を反映していると考えられている。VEGF が Stage 1 よりも Stage 2 において上昇し、Stage 3 において最も低値であったということは、VEGF 産生が神経線維の変性よりもむしろ再生に関与し、病期の進行に伴う神経線維脱落に伴い、その産生が低下している可能性が示唆される。

naked-VEGF の局所注射により神経血流量と神経機能が著しく改善したという報告や、後根神経節への VEGF 遺伝子導入により DPN の進行を阻止できたとする報告がある。また、運動ニューロン病や脳血管疾患等では、VEGF が種々の神経保護効果 (神経軸索伸長、増殖、脈管形成) を果たすことが示され、VEGF が神経構成細胞のプロテクターとして作用すると考えられている。DPN においても、VEGF は神経変性・再生が活発に行われている病期においては傷害神経に対して保護的に作用している可能性が高い。

VEGF は糖尿病性網膜症患者の硝子体や前房水中で増加し、増殖病変の悪化に関与しているが、網膜症患者血清では VEGF は増加しないと報告されている。本研究においても血清 VEGF は糖尿病性網膜症患者と糖尿病性腎症患者では上昇していなかった。このように、VEGF が糖尿病性細小血管合併症においては善悪二面性を持つことは明らかである。VEGF は脈管形成・増殖を加速するが、この血管新生作用が、血管透過性亢進と合わせて網膜・腎糸球体、神経 (栄養血管) 局所において各々好ましい結果をもたらすか否かによる違いであろうと我々は考えている。

論文審査の要旨

報告番号	医論第 1466 号	氏名	出口 尚寿
審査委員	主査	丸山 征郎	
	副査	出雲 周二	坂本 泰二

Serum VEGF increases in diabetic polyneuropathy, particularly in the neurologically active symptomatic stage

(血清 VEGF は糖尿病性多発神経障害の
神経症候が顕性化する病期において増加する)

血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)は、強力な血管新生作用、血管透過性亢進作用を有し、高血糖や低酸素によってその産生が刺激されるため、糖尿病性網膜症や糖尿病性腎症などの糖尿病細小血管合併症の発症、進展に関わる重要なサイトカインと考えられているが、糖尿病性多発神経障害(diabetic polyneuropathy: DPN)への関与や、DPNの臨床病期との関連についての報告はない。今回の研究は、血清 VEGF の DPN への関与、および血清 VEGF と DPN の臨床病期との関連を明らかにすることを目的としている。

本研究では、鹿児島大学旧第三内科および関連病院定期通院中の糖尿病患者連続 220 症例を対象としている。DPN の臨床病期分類(Dyck PJら、1988)を基準とし、日本で提唱された DPN の「簡易診断基準と病期分類」を用いて改変し、自覚的神経症状、アキレス腱反射、振動覚、感覚障害、自律神経障害、運動障害、QOL 障害をもとに Stage 0(神経障害なし)、Stage 1(無症候期)、Stage 2(症候期)、stage 3(廃疾期)の 4 病期に分類し、患者の血清 VEGF 濃度を ELISA 法にて測定し、DPN 合併の有無別、DPN の病期別に比較検討している。

本研究で得られた新しい知見は次の 3 点である。

1. 糖尿病患者の血清 VEGF 濃度は正常対象と比し有意に高値であった。
2. 糖尿病患者において血清 VEGF 濃度は、DPN 群において DPN なし群よりも有意に高値であったが、糖尿病性網膜症の有無、糖尿病性腎症の有無別では、血清 VEGF 濃度に有意差は認めなかった。
3. DPN 病期別の血清 VEGF 濃度は、Stage 2 において Stage 0、Stage 3 に比し有意に高値であった。

本研究は、血清 VEGF が DPN を合併している糖尿病患者において有意に高値であり、その病態に関与していることを明らかにした。さらに、痛み、しびれや自律神経障害などの神経症候が前景に立って出現する病期において上昇し、神経機能が廃失する病期において最も低下していることを明らかにした。VEGF の産生が神経線維の変性よりもむしろ再生に関与し、傷害神経に対して保護的に作用し、高度な神経線維の脱落に伴って低下している可能性が想定される。血清 VEGF 濃度には血糖コントロール状態や他の合併症の存在よりも、むしろ DPN の臨床病期や重症度そのものによる差が存在することがはじめて明らかにされ、糖尿病細小血管合併症の病態・治療に関する新しい視点を与えた。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1466 号	氏名	出口 尚寿
審査委員	主査	丸山 征郎	
	副査	出雲 周二	坂本 泰二

主査および副査の3名は、平成21年12月10日、学位請求者 出口尚寿 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 血小板由来の成長因子である VEGF と PDGF とを分けて測定していないが、基本的に違うものと考えてよいのか。

(回答) VEGF、PDGF いずれも主に巨核球により産生されるが、本研究で用いた ELISA 系は VEGF165、121 に対するモノクローナル抗体を用いており PDGF とは反応しない。

質問2) 引用文献には血漿 VEGF を測っているものもあるが、血清 VEGF との違いはどうか。

(回答) 循環血中の VEGF はその多くが血小板由来であることより、血漿 VEGF 濃度は血小板からリークした VEGF を測定している可能性を否定できない。なお、この事実を踏まえて血漿 VEGF が測定されている論文は極めて少ない。

質問3) 一般的な糖尿病領域の臨床研究で 220 という数は大規模と言えるか。除外基準で最終的に絞られた数が 220 名とすると、実際は何名くらいが対象だったのか。

(回答) 糖尿病関連の臨床研究として大規模とは言えないが、実際の糖尿病外来で患者の神経所見をとるのは時間を要するため、糖尿病性神経障害に関する我が国の臨床研究の中では対象症例は多いほうである。2施設で連続約 300 症例が対象で、既往症、各種検査結果等で 80 例ほどが除外された。

質問4) 神経障害の自覚症状をもつ 17%の症例を Stage0 に分類して良いのか。

(回答) 簡易診断基準を基本としており、自覚症状がないにも関わらずアキレス腱反射の減弱や振動覚の低下などの神経所見の異常を伴う subclinical な症例が Stage1 であり、自覚症状の有無にかかわらず客観的な神経所見に異常を認めないものは Stage0 として良いと考える。

質問5) 同一個体をサンプリングする場合、手技的な差や再現性はどうか。

(回答) 我々は今回の研究を含め 600 を超える検体で ELISA 法により血清 VEGF 測定を 1 サンプルにつき 2 回測定しており、測定間誤差は 10%以内であった。

質問6) 神経線維の脱落により VEGF が低下するということだが、測定した VEGF は神経由来なのか。

(回答) 今回測定した血清 VEGF は血小板由来であり、巨核球で産生される。血清 VEGF 濃度の低下は神経組織修復と骨髄応答の結果であり、神経障害の病期の進行にともなう神経線維数の減少を反映すると考える。

質問7) 眼科領域では VEGF と炎症性サイトカインの関連が報告されているが、神経障害における炎症やサイトカインとの関連はどうか。

(回答) 高血糖によりグリケーション、酸化ストレス亢進を介して VEGF が誘導されると、マクロファージからの炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-1 β) 産生増加が惹起され、糖尿病性神経障害の発症、進展に関与している。

質問8) Stage2 から Stage3 になると VEGF が著明に低下するが、臨床的にこの Stage2 と 3 には明らかな区別をつけることができるのか。

(回答) Stage2 と Stage3 の区別は、運動神経障害の有無、自律神経障害の程度、QOL 障害によるので患者の主観、診断医の主観が介在するため議論となるところであるが、運動神経障害としての筋力低下・筋萎縮の有無が両病期の区別において重要なポイントとなる。

質問9) 網膜症や腎症など他の合併症での解析で年齢による有意差が出ているが、多変量で解析しても VEGF は増えるのか。

(回答) 今回の研究において多変量解析での検討は行っていないが、共同研究者の健常人を対象とした研究において血清 VEGF と年齢との相関は認めなかった。

質問10) 糖尿病性神経障害に対する VEGF の功罪についてさらなる検討を行うというが、具体的にはどのような検討を考えているのか。

(回答) 神経保護という点から糖尿病性神経障害における傷害神経の VEGF 受容体の発現について、糖尿病モデル動物を用いた検討を考えている。一方、治療後痛性神経障害でみられる神経表面の新生血管は盗血現象を引き起こし、末梢の虚血に関与していることがわかっており、過剰なインスリン投与や急激な血糖下降と VEGF の関連についても検討課題としている。

質問11) 糖尿病患者が癌を合併すると VEGF が上昇すると思われるが、神経所見に変化が生じるのか。

(回答) 癌の合併により糖尿病性神経障害が悪化するとして報告はないが、傍腫瘍症候群における末梢神経障害との関連が示唆され、神経所見が変化する可能性がある。

質問12) 神経細胞は VEGF165 を作るのか。

(回答) VEGF はすべての上皮・間葉系細胞に発現しており、神経細胞においても VEGF165 を産生しているが、今回測定した血清 VEGF は血小板由来の VEGF であり、神経細胞由来の VEGF との関連は明らかではない。

質問13) 同じ細小血管合併症である腎症や網膜症で血清 VEGF が上がらないのはなぜか。

(回答) 血清 VEGF 濃度は骨髄への組織修復シグナルに依存すると考えており、臓器としての体内での分布差、すなわち網膜・腎局所での反応と、全身に分布する神経での反応との差ではないかと考えている。

質問14) 組織学的に典型的な糖尿病性ニューロパチーの症例は Stage3 にあたると考えて良いのか。

(回答) 組織学的に小径有髄線維優位の神経線維の脱落を伴うという点で、臨床的には Stage2~3 に相当すると考える。

質問15) 組織学的に sprouting などの神経再生所見が stage2 でみられるのか。

(回答) 現実的に糖尿病性神経障害の病期分類のために神経生検の適応はないため、stage2 患者の神経鞘内神経再生は確認されていない。皮膚生検による表皮内神経の検討でも sprouting に関する詳細な検討は行われていないが、治療後痛性神経障害患者において再生神経の sprouting が示されている。

質問16) 今回の研究対象をコホートとして別の臨床研究にも発展させてほしいがその予定があるか。

(回答) 糖尿病性神経障害の研究班において、この臨床病期分類を検証するために多施設共同でプロスペクティブスタディを進行中であり、我々も今回の研究対象を含む 50 症例を登録している。神経学的所見、電気生理学的所見、皮膚生検による表皮内神経密度の検討結果を集積し、現在 2 年目のデータのまとめを完了している。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。