

—総説—

糖尿病性神経障害における シュワン細胞機能異常に関する研究

鈴木猛志

要約：糖尿病性神経障害の発症進展機序解明の一端として、末梢神経機能維持に重要な役割を果たすシュワン細胞に着目し、ポリオール代謝経路亢進および終末糖化産物（AGEs）の細胞機能に対する影響を検討した。ラット末梢神経から単離培養したシュワン細胞において高濃度グルコース下でのポリオール代謝経路の亢進が確認され、その亢進に伴い、ニューロトロフィン-3（NT-3）誘導性の神経成長因子（NGF）産生能が低下することが明らかになった。また、その低下にはポリオール代謝経路亢進に依存した酸化ストレスの増大の関与が示唆された。つぎに、グリセルアルデヒドおよびグリコールアルデヒド AGEs がアポトーシスおよび炎症性サイトカイン産生を誘導することを明らかにした。さらに、不死化マウスシュワン細胞 IMS32 を用い、高濃度グルコース下で網羅的遺伝子発現変化について検討した結果、ポリオール代謝経路亢進依存的に、毒性アルデヒドの解毒に関わるアルデヒド還元酵素遺伝子の発現が低下するものと考えられる。以上の成績から、糖尿病下の末梢神経では高血糖に起因したポリオール代謝経路の亢進と AGEs によるシュワン細胞障害が誘発され、糖尿病性神経障害が発症進展することが示唆された。

索引用語：糖尿病性神経障害、シュワン細胞、ポリオール代謝経路、アルドース還元酵素、終末糖化産物、酸化ストレス、神経成長因子、アルデヒド還元酵素

Impaired Function of Schwann Cells in Diabetic Neuropathy

Takeshi SUZUKI

Abstract: To elucidate the mechanisms of the development of diabetic neuropathy, we investigated the involvement of increased polyol pathway flux and advanced glycation end-products (AGEs) on the dysfunction in Schwann cells which play an important role in the peripheral nervous systems. In the cultured Schwann cells isolated from rat sciatic nerves, neurotrophin-3 (NT-3)-induced nerve growth factor (NGF) production was suppressed under high glucose conditions due to enhanced oxidative stress linked to the acceleration of the polyol pathway. Glyceraldehyde- and glycolaldehyde- derived AGEs induced apoptosis and production of inflammatory cytokines. Moreover with DNA microarray and northern blot analysis in the immortalized mouse Schwann cell line IMS32, the reduction in mRNA expression of aldehyde reductase related to detoxification of toxic aldehydes was observed through the increase in the polyol pathway flux. Taken together, Schwann cell injury caused by polyol pathway flux acceleration and directive affect of AGEs seems to play a key role in the impairment of nerve function in the peripheral nerve of diabetic patients.

Keyphrases: diabetic neuropathy, Schwann cells, polyol pathway, aldose reductase, advanced glycation end-products, oxidative stress, nerve growth factor, aldehyde reductase

1. 緒言

糖尿病性神経障害は、多くの疫学的調査の結果からいわ

ゆる糖尿病合併症の中で最も高頻度に認められることが明らかになっているが、自覚症状に乏しく、その臨床的意義も軽視されやすい。糖尿病性神経障害で問題となる多発

性神経障害の臨床的症候は多様であり、四肢末端の痺れ感、自発痛や異常感覚、感覚低下や鈍麻などが挙げられ、これらはしばしば睡眠障害、食欲不振などを引き起こし、致命的な症候を来すことがある。特に感覚鈍麻、知覚異常の強い患者では靴擦れや火傷が引き金となり、感染、虚血性血管障害が加わって足趾の潰瘍、壊疽、切断に至るとされている。したがって、糖尿病性神経障害は患者の Quality of Life (QOL) や生命維持に直結する重大な合併症であり、発症早期からの進展阻止は大きな課題である。

糖尿病性神経障害発症の成因として長期にわたる高血糖の持続が重要であると考えられる。しかし、高血糖が如何に末梢神経組織を傷害するかについては、完全には解明されていない。近年の研究結果から、高血糖を基盤としたポリオール代謝経路亢進、グリケーション（非酵素的糖化反応）、酸化ストレス、サイトカイン産生などが主な発症機序として挙げられ、これらの因子が複合的に関与していると推察される^{1,2)}。すなわち、これら多様な機構が末梢神経組織自体および神経内血管に作用して細胞傷害を誘発し、末梢神経での末端性軸索変性、神経線維脱落をもたらすものと考えられる。したがって、これらの要因を排除する薬物の開発が望まれ、国内で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 (aldose reductase, AR, EC1.1.1.21) に対する阻害薬の1剤が1990年代前半に上市されている。しかし、それ以降、上市薬剤は無く、臨床試験の方法および効果判定に関する考え方が国内外で一定していないこともあり、いまだ多くの臨床試験が継続中である。また、前述のように病態発症、進展の機序が複雑であることから、新規な機序を持つ薬剤の開発も進んでいない。したがって、短期間の治験プロトコルで承認された1作用機序の1薬剤だけが市場にある状況では、十分に医療現場のニーズに応え得るものではないと考えられる。

合併症成因に基づいた薬物開発の遂行には糖尿病性神経障害発症、進展の機序をより明確にすることが重要であり、培養細胞を用いた検討が有用である。糖尿病患者の病理学的特徴は、神経線維の広範な脱落、残存神経の軸索変性および脱髄所見であり、同時に神経内栄養血管の細小血管変化も認められる³⁾。血管組織における合併症発症機序解明研究は血管構成細胞である血管内皮細胞、血管平滑筋細胞もしくは周皮細胞を用い、多くの施設で進められている⁴⁻⁶⁾。一方、神経系細胞を用いた合併症発症機序研究の報告は少なく、特に神経軸索を取り巻き、神経電位の跳躍伝導に必須なシュワン細胞に関する基礎研究はほとんど実施されていない。シュワン細胞は神経組織構成細胞として重要であるとともに、末梢神経の特徴である神経損傷時の再生に重要な役割を果たす^{7,8)}。また、前述のARが多く分布する細胞であり⁹⁾、糖尿病時の高血糖によるポリオール代謝経路亢進が容易に生じることが推察される。しかし、その単離培養の困難性から糖尿病分野での基礎研究は

進んでいない。

本総説では、糖尿病性神経障害の発症、進展機序の一端を解明することを目的として実施した、高血糖に起因する末梢神経シュワン細胞障害に関する基礎検討成績について述べる。

2. ラット坐骨神経から単離したシュワン細胞におけるポリオール代謝経路の特徴

糖尿病性神経障害発症要因として、解糖系の側副路であるポリオール経路の亢進がインスリン非依存性にグルコースを取り込む組織の初期障害に関与することが示唆されている^{10,11)}。ポリオール経路は二つの酵素反応、すなわち還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) を補酵素としてグルコースをソルビトールに変換するARによる反応と酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) を補酵素としてソルビトールをフルクトースに変換するソルビトール脱水素酵素 (sorbitol dehydrogenase, SDH, EC 1.1.1.14) による反応によって構成される。当初は組織細胞内のソルビトール蓄積による細胞内浸透圧異常が合併症を誘発すると考えられたが^{10,12)}、近年、ポリオール経路の亢進による二次的な細胞内代謝バランスの異常、すなわち、血管内皮の一酸化窒素 (NO) 合成酵素活性の低下やプロテインキナーゼC (PKC) 活性の亢進をもたらすジアシルグリセロール合成の増大に関与する補酵素バランスの異常が合併症の要因として注目されている^{13,14)}。

そこで、末梢神経において神経機能維持に重要な役割を果たしているとともにARが局在するシュワン細胞の末梢神経からの単離培養法を確立し、シュワン細胞におけるポリオール経路活性に関する基礎検討を試みた。

シュワン細胞の単離培養：シュワン細胞は成年雄性ラットの坐骨神経から単離した。まず、結合組織などを除去した後、神経束を数mmに断片化した。神経断片を6穴培養プレートに入れ、抗生物質（ペニシリン 100U/mL、ストレプトマイシン 100 μ g/mL）および10%牛胎児血清 (FBS) を含有するダルベッコ変法培地 (DMEM-FBS) 中で培養した。2週間に2回以上神経断片を新しいプレートに移し、2~3日ごとに培地を交換した。その後、神経断片を集め、ディスパーゼ (1.25 U/mL) およびコラゲナーゼ (0.05%) を含有するDMEM-FBSで一昼夜酵素消化処理した。翌日、19ゲージの注射針を通して細分化し、DMEM-FBSで2回洗浄後、6穴プレートに神経断片懸濁液を播種した。1時間後に非接着細胞を回収し、新しいプレートに移した。この操作を2回以上繰り返し、最終的に回収した非接着細胞を丁寧にほぐし、ポリリジンでコート

した培養プレートに播種した。翌日から2日間、10 μ mol/LのDNA合成阻害剤シトシンアラビノシドを含有するDMEM-FBSにて培養後、培地をDMEM-FBSに交換した。この操作を2~3回行った。その後、生存細胞を2 μ mol/Lフォルスコリンおよび10 μ g/mL牛下垂体抽出液を含むDMEM-FBS(SC培地)で培養した。細胞がコンフルエントになった後、Ca²⁺およびMg²⁺を含まないリン酸緩衝生理食塩水(PBS-)を用いてピペティングし、回収した後、再度、SC培地中、ポリリジンでコートした培養プレートを用いて使用時まで培養した。

単離シュワン細胞の純度は、マーカー分子であるS-100タンパクとp75低親和性NGF受容体に対する免疫染色の結果、99%以上であった。また、後根神経節細胞との共培養でミエリン鞘形成能を保持していることを確認した(成績不掲載)。

ポリオール経路の評価:シュワン細胞をグルコース終濃度5.6mmol/Lと30mmol/L(高濃度グルコース)のSC培地で3日間培養した。また、AR阻害剤SNK-860(フィダレスタット)、もしくはSDH阻害剤SDI-158を添加し、ソルビトール量に対する影響を検討した。その結果、細胞内ソルビトール蓄積は認められず、AR活性(成績不掲載)も変動しなかった。また、SNK-860の1 μ mol/Lの添加で細胞内ソルビトール量は有意に減少した。一方、SDH阻害剤SDI-158は影響を及ぼさなかった(Fig.1)。

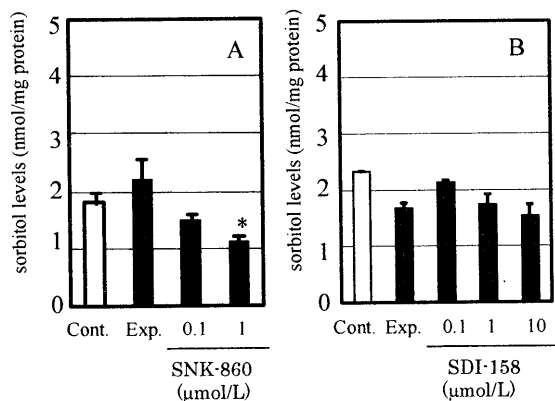


Fig. 1 Effects of the AR inhibitor SNK-860 (A) or SDH inhibitor SDI-158 (B) on sorbitol levels in Schwann cells. Cells were cultured with 30mmol/L glucose for three days. □: Control (5.6mmol/L glucose), ■: Experimental (30mmol/L glucose). SNK-860 (0.1, 1 μ mol/L) or SDI-158 (0.1, 1, 10 μ mol/L) was added to the medium containing 30mmol/L glucose. Data are expressed as mean \pm SEM of 3 experiments. * P<0.05, compared with Experimental.

つぎに、ソルビトールの流出を評価するために、培養上清と細胞を回収し、それぞれ細胞外ソルビトール量および細胞内ソルビトール量として評価した。その結果、高濃度グルコース存在下で細胞内ソルビトール量は変動しないものの、細胞外培地中ソルビトール濃度は有意に上昇した(Table 1)。

Table 1 Intracellular and extracellular sorbitol levels in Schwann cell cultures

| | Sorbitol levels | |
|--------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | Intracellular (nmol/mg protein) | Extracellular (nmol/mL medium) |
| Control | 1.85 \pm 0.23 | 0.47 \pm 0.05 |
| Experimental | 2.24 \pm 0.31 | 2.67 \pm 0.13 *** |

Schwann cells were cultured in DMEM without FBS for 3 hours. Extracellular levels of sorbitol were determined as levels in the medium. Glucose levels of Control and Experimental were 5.6mmol/L and 30mmol/L, respectively. Data are expressed as mean \pm SEM of 3 experiments. *** P<0.001, compared with Control.

つぎに高濃度グルコース条件下、NaClもしくはラフィノース添加の細胞内ソルビトール量およびAR活性に及ぼす影響を検討した。AR活性は培地の浸透圧増加に伴って増大した(Fig.2)。また、細胞内ソルビトール量とAR活性との間には正の相関関係が認められた(相関係数: 0.998)(成績不掲載)。

さらに、高浸透圧条件下での細胞内ソルビトール量の増大は、AR阻害剤SNK-860添加によって正常グルコース条件下の数値まで抑制された。一方、SDH阻害剤SDI-158は濃度依存的に細胞内ソルビトール量を増大させた(Fig.3)。

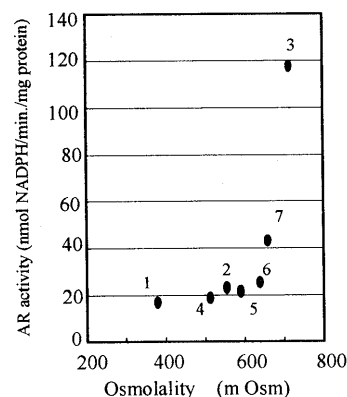


Fig. 2 Relationship between osmolality in the medium and AR activity in Schwann cells

Cells were cultured under various hyperosmotic conditions for 5 days. 1: Experimental (30mmol/L glucose), 2: +100mmol/L NaCl, 3: +200mmol/L NaCl, 4: +100mmol/L raffinose, 5: +150mmol/L raffinose, 6: +175mmol/L raffinose, 7: +200mmol/L raffinose.

成年ラット坐骨神経から単離培養したシュワン細胞では、高濃度グルコース存在下で培養しても細胞内ソルビトール量の増大は認められなかった。しかし、AR阻害剤処理によって細胞内ソルビトール量は低下し、細胞外培地中ソルビトール濃度の上昇が認められたことから、本細胞でのポリオール経路の亢進が確認された。一方、SDH阻害剤処理は細胞内ソルビトール量に影響を及ぼさなかった。

したがって、本条件下ではARによってソルビトールは産生されるが、SDHによってフルクトースへは変換されず、直ちに細胞外に放出される可能性が示唆された。関連

して、脳グリア細胞でソルビトールトランスポーターの存在を示唆する報告もある¹⁵⁾。

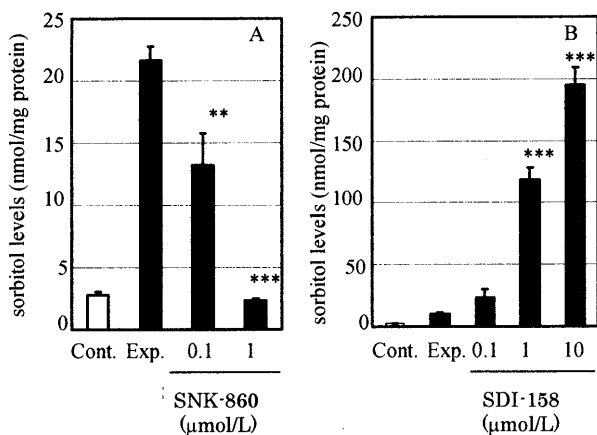


Fig. 3 Effects of the AR inhibitor SNK-860 (A) or SDH inhibitor SDI-158 (B) on sorbitol levels in Schwann cells
Cells were cultured in the medium containing 30mmol/L glucose and 200mmol/L raffinose for 3 days. □: Control (5.6mmol/L glucose), ■: Experimental (30mmol/L glucose+200mmol/L raffinose). Data are expressed as mean ± SEM of 3 experiments. **P<0.01, ***P<0.001, compared with Experimental.

糖尿病患者および糖尿病モデル動物の末梢神経では、ソルビトール量の増大が認められている¹⁶⁾。しかし、ARが局在するシュワン細胞で産生されたソルビトールがシュワン細胞内に蓄積するのか、シュワン細胞外に流出するのかは明らかではない。SDHは神経軸索に多く存在するため、シュワン細胞内でグルコースから産生されたソルビトールは細胞外に輸送後、神経軸索においてフルクトースに変換される可能性がある。また、本実験成績から、AR活性が増大して細胞内ソルビトール蓄積が認められるような条件下では、SDH阻害剤処理で細胞内ソルビトール量がより増大することから、過剰なソルビトール産生反応が生じた場合にはシュワン細胞内でもSDHが機能することが示唆された。

3. 高濃度グルコース負荷シュワン細胞におけるNT-3誘発NGF産生の低下：ポリオール経路との関連性

臨床試験において、AR阻害剤SNK-860（フィダレスタット）が神経伝導速度を改善し、感覚鈍麻などの自覚症状をも改善することが示された¹⁷⁾。感覚鈍麻は知覚神経の感受性が低下したもので、機能神経束数の減少や神経再生能の低下がその病態を進展させる。シュワン細胞は神経軸索との発生学的、生化学的、形態学的な相互作用を介して神経再生に重要な役割を担っている。その役割の一つとして神経成長因子（nerve growth factor、NGF）の分泌があげられる^{18,19)}。

NGFの活性異常が臨床試験および実験的糖尿病モデル

における神経再生低下に関与することが示されている²⁰⁻²⁴⁾。しかし、損傷神経におけるNGF産生を誘発する生体分子は明確になっていない。培養神経組織および単離線維芽細胞では、マクロファージ由来のインターロイキン（IL）-1がNGF産生を調節することが示唆されているが²⁵⁻²⁸⁾、シュワン細胞のNGF産生を誘発しないという報告もある²⁷⁾。

前述のラット単離培養シュワン細胞を用い、NGF産生を誘発する生体因子の探索と、高濃度グルコース下でのNGF産生に対するポリオール代謝経路の影響を検討した。

NGF産生因子の探索：シュワン細胞に対して、神経損傷部位で発現することが知られている様々な因子、シュワン細胞の増殖および生存に関与する因子で刺激し、培養上清中、NGF量をenzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法にて定量した。検討した因子は、塩基性線維芽細胞成長因子（b-FGF）²⁹⁾、神経毛様体成長因子（CNTF）^{30,31)}、肝細胞成長因子（HGF）³²⁾、インスリン様成長因子I（IGF-1）³³⁾、IL-1β^{25,34)}、IL-6³⁵⁾、leukemia inhibitory factor（LIF）³⁶⁾、ニューロトロフィン-3（NT-3）^{38,39)}、血小板由来成長因子（PDGF）³⁷⁻³⁹⁾、腫瘍壊死因子α（TNF-α）⁴⁰⁾および血管内皮細胞成長因子（VEGF）⁴¹⁾である。

その結果、上記検討因子の中で、NT-3にのみNGF産生作用が認められた（成績不掲載）。

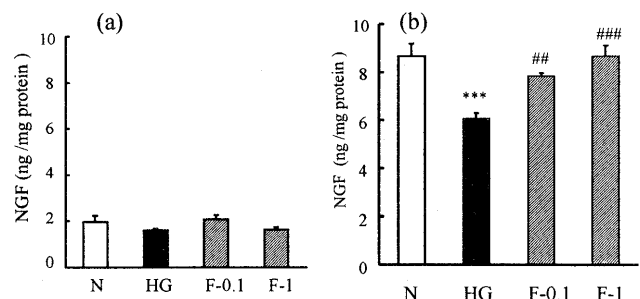


Fig. 4 NGF production in Schwann cells cultured under high-glucose condition in the presence or absence of an AR inhibitor

Cells were cultured in the medium containing 5.6 mmol/L (N) or 30 mmol/L (HG) glucose in the presence or absence of 0.1 and 1 μmol/L fidarestat (F-0.1 and F-1, respectively) for 5 weeks before treatment with NT-3 (50 ng/mL) for 24 h. (a) Basal levels of NGF in the medium containing non-treated cells. (b) NGF levels in the medium containing the cells treated with NT-3. Both results of (a) and (b) were obtained from 5 separate experiments and expressed as mean ± SEM. ***P<0.001, compared with N. ## P<0.01, ### P<0.001, compared with HG.

高濃度グルコースおよびAR阻害剤の影響：Fig.4に示すように、正常グルコース（5.6 mmol/L）下（N）およびAR阻害剤フィダレスタットを含む高濃度グルコース（30 mmol/L）下（HG）で5週間培養した結果、NGF産生量は各群で差が認められなかった。しかしながら、NT-3誘導NGF産生は高濃度グルコース下で有意に低下し、その低

下は AR 阻害剤によって用量依存的に正常レベルに是正された。

ポリオール代謝経路の亢進は細胞内酸化ストレス増大を誘引することが示唆されているので、細胞中還元型グルタチオン (GSH) 量を評価した。Fig.5 に示すように高濃度グルコース下では GSH 量は有意に減少し、その減少は 1 μ mol/L のフィダレスタット添加により是正された。また、酸化ストレス状態で活性化される p65 nuclear factor (NF)- κ B 量は増大し、この変化も 1 μ mol/L のフィダレスタット添加により是正された。

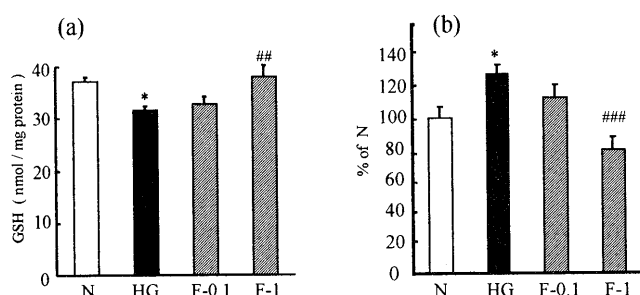


Fig. 5 Effects of high glucose and an AR inhibitor on the levels of GSH (a) and activated NF- κ B (b)

Schwann cells were cultured for 5 weeks in the medium containing 5.6 mmol/L (N) or 30 mmol/L (HG) glucose in the presence or absence of 0.1 and 1 μ mol/L fidarestat (F-0.1 and F-1, respectively). Results were obtained from 5 to 8 separate experiments, and expressed as mean \pm SEM. *P<0.05, compared with N. ##P<0.01, ###P<0.001, compared with HG.

近年、NF- κ B と cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-response element binding protein (CREB) のコアクティベーターである CREB 結合タンパクへの競合作用が、これら転写因子の転写活性を調節することが報告された⁴²⁾。また、アデニレートシクラーゼ活性化剤フォルスコリンがシュワン細胞で NGF 産生を促進し、CREB が cAMP 依存性プロテインキナーゼによってリン酸化を受けることが知られている。そこで、CREB 量に対する高濃度グルコースの影響を検討した。高濃度グルコースによって CREB 量は有意に減少し、その減少はフィダレスタット添加によって是正された。この是正効果は GSH 量に対する効果に近似していた。一方、CREB のリン酸化程度は NT-3 存在下および非存在下でも高濃度グルコースの影響を受けなかった(Fig.6)。

グルタチオン合成阻害剤の影響：細胞内グルタチオン量の NGF 産生に対する影響を評価するために、グルタチオン合成阻害剤である L-buthionine-S,R-sulfoximine (BSO) の影響を検討した。BSO 前処理により、細胞内 GSH 量は用量依存的に有意に低下した。そして、5 μ mol/L の BSO 前処理した細胞では NT-3 誘導 NGF 産生の低下、活性型 NF- κ B 量の増大および CREB 量の低下が認められた(Fig.7)。

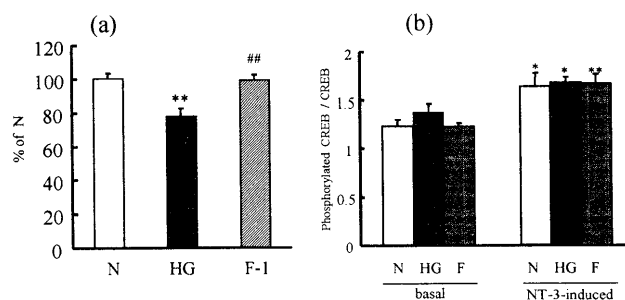


Fig. 6 Effects of high glucose and an AR inhibitor on the level of nuclear CREB

Schwann cells were cultured for 5 weeks in the medium containing 5.6 mmol/L (N) or 30 mmol/L (HG) glucose in the presence or absence of 1 μ mol/L fidarestat (F-1). (a) The levels of CREB in the nuclear extracts. Results (% of control: N) are expressed as mean \pm SEM obtained from 7 separate experiments. **P<0.01, compared with N. ##P<0.01, compared with HG. (b) The phosphorylated CREB/CREB ratio in the nuclear extracts of the cells treated or untreated with 50 ng/mL NT-3 for 24 h. Results are expressed as mean \pm SEM obtained from 6 separate experiments. *P<0.05, **P<0.01, compared with basal control.

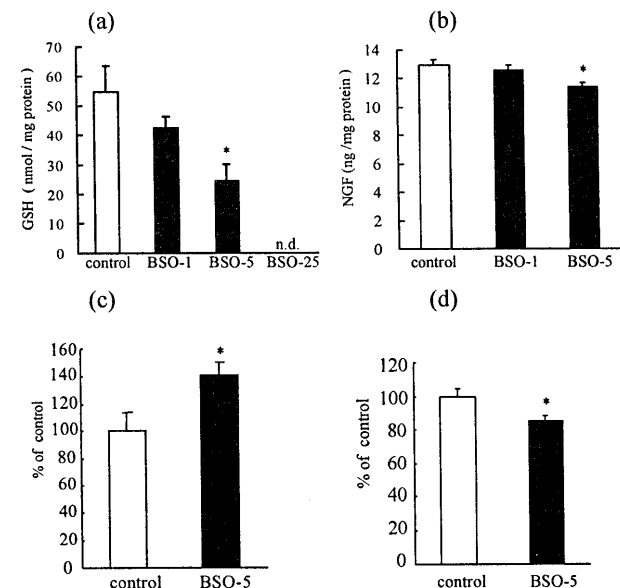


Fig. 7 Effects of an inhibitor of GSH synthesis on cellular GSH levels (a), NT-3-induced NGF production (b), activated NF- κ B levels (c) and CREB levels (d)

Schwann cells were cultured in the medium containing 1, 5 or 25 μ mol/L L-buthionine-S, R-sulfoximine (BSO) for 6 days before treatment with 50 ng/mL NT-3 for 24 h. Results are expressed as mean \pm SEM obtained from 4 to 9 separate experiments. *P<0.05, compared with the control, n.d., not detected.

糖尿病状態では末梢神経線維再生の異常および神経栄養因子欠乏が起こっており、臨床および基礎における糖尿病モデル試験の成績から、NGF の作用低下が糖尿病下での神経再生障害に重要な役割を担っていることが示唆されている²⁰⁻²⁴⁾。本試験成績より、高血糖状態はシュワン細胞の通常の NGF 産生には影響を及ぼさないが、NT-3 によって誘導される NGF 産生を、ポリオール代謝経路亢進作用により、低下させることが明らかとなった。

正常末梢神経において、NT-3 はシュワン細胞に発現し、神経損傷初期すなわちシュワン細胞が神経軸索から脱離した時には、その mRNA は低下し、数週間後に正常レベルに戻る^{43,44}。したがって、正常時には NT-3 はシュワン細胞内に蓄えられ、神経損傷初期に何らかの役割を果たすことが推察される。本試験成績と NT-3 がシュワン細胞の生存性を高める因子でもあることから、NT-3 は神経損傷直後にシュワン細胞から分泌され、オートクリン作用によってそのシュワン細胞の生存を維持するとともに、損傷直後の神経再生に向けたシュワン細胞からの NGF 産生を誘引する可能性が考えられる。実際、NT-3 の外的投与によって神経損傷後の神経再生が促進されることが報告されている^{45,46}。また、NGF には神経自体に対する作用だけでなく、単球およびマクロファージに対する作用があり、糖尿病マウスの神経損傷部位へのマクロファージ集積の異常、すなわち、再生に向けた損傷神経の除去機能の異常も報告されている⁴⁷⁻⁴⁹。したがって、神経損傷後の再生反応初期に想定される高血糖下でのシュワン細胞における NT-3 誘導 NGF 産生低下が、糖尿病下の神経再生低下に関与することが推察される。

また、高血糖状態はシュワン細胞の細胞内 GSH 量の低下および活性化 NF- κ B 量の増大を引き起こした。この変化は、NT-3 誘導 NGF 産生低下同様に AR 阻害剤で是正された。一方、GSH 生合成阻害剤は活性化 NF- κ B 量の増大とともに NT-3 誘導 NGF 産生を低下させることが明らかとなった。NF- κ B は酸化ストレスによって活性化されること⁵⁰、GSH は細胞内の主要抗酸化因子であることから、ポリオール代謝経路亢進依存的酸化ストレス増大が NT-3 誘導 NGF 産生を低下させることが示唆された。さらに、転写因子 CREB 量の低下も高血糖下での NT-3 誘導 NGF 産生低下に関与することが推察された。なお、高血糖下での酸化ストレス増大による CREB 欠乏に関する知見は血管平滑筋細胞でも報告されている⁵¹。

4. 終末糖化産物によるアポトーシスの誘導と炎症性サイトカイン産生

糖尿病患者末梢神経では advanced glycation end-products (AGEs) の蓄積が認められ⁵²、抗グリケーション剤によって AGEs 生成を阻害した実験的糖尿病ラットでは神経障害が改善されている⁵²⁻⁵⁵。また、血管壁では AGEs が細胞内シグナル伝達を活性化し、サイトカインなどの発現上昇や細胞死を誘発することも報告されている⁵⁶⁻⁶⁰。

AGEs はグルコースだけではなく、様々な短鎖糖から生成する。糖尿病患者血清中では、グルコース、グリセルアルデヒドおよびグリコールアルデヒド由来の AGEs (AGE-1、2 および 3) 量が増大することが報告されてい

る⁶¹。さらに、これら生体中の AGEs が中枢神経細胞、血管細胞および腎細胞に様々な作用を引き起こすことも確認されている^{59,60,62,63}。しかしながら、糖尿病性神経障害における AGEs の役割は明確ではない。そこでシュワン細胞への AGEs の影響について検討した。

AGEs の調製：AGEs は竹内らの方法⁶²に従い、タンパクとして牛血清アルブミン (BSA) を用いて下記 AGEs を調製した。

AGE-1：グルコース由来 AGEs

AGE-2：グリセルアルデヒド由来 AGEs

AGE-3：グリコールアルデヒド由来 AGEs

コントロール BSA：糖類非添加 BSA

AGEs の細胞生存性への影響：シュワン細胞に 500 μ g/mL の AGE-1、2、3 およびコントロール BSA を添加した。24 時間後に細胞を回収し、固定後、ヘキスト 33342 で細胞核を染色した。Fig.8 に示すように、AGE-2 および 3 刺激により、核が凝縮断片化したアポトーシス細胞が検出され、アポトーシス細胞数はコントロール BSA 刺激群と比較して有意に増大した。一方、AGE-1 刺激ではアポトーシスの誘導は認められなかった。また、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) アッセイを用いて細胞生存に対する影響を検討した結果、AGE-2 および 3 は用量依存的に細胞生存率を低下させ、10 μ g/mL でも低下が認められた(成績不掲載)。

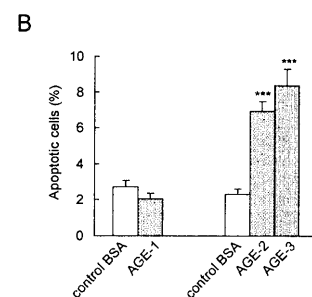
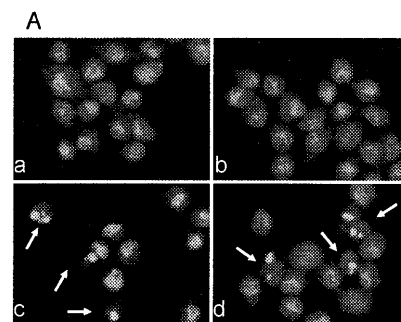


Fig. 8 Induction of apoptosis in cultured Schwann cells after exposure to AGEs

(A) Exposure to 500 μ g/mL of AGE-2 (c) or AGE-3 (d) induced apoptotic nuclear alterations of Schwann cells (arrows), while there was no apoptosis when the cells were exposed to AGE-1 (b) or control BSA (a). (B) The percentage of apoptotic Schwann cells exposed to AGEs. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 3). ***P < 0.001, compared with control BSA.

また、アポトーシスカスケードにおいて重要な役割を果たすミトコンドリア膜機能の低下が AGE-2 および 3 刺激によって生じた (成績不掲載)。

つぎに、AGEs 誘発細胞死に対する酸化ストレス、mitogen-activated protein (MAP) キナーゼおよびミトコンドリア膜機能変化の関与について検討を加えた。Fig.9 に示すように、抗酸化剤 α -リポ酸処理により、AGE-3 誘発細胞死は完全に抑制された。一方、p38MAP キナーゼ阻害剤は部分的ながら有意に細胞死を抑制した。

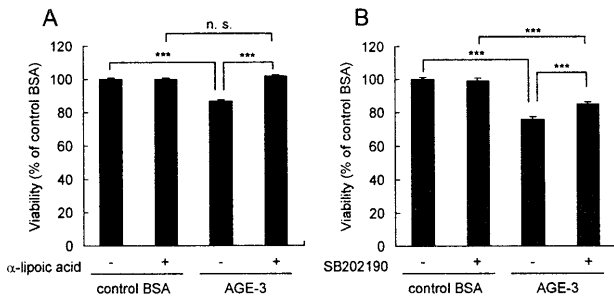


Fig. 9 Effects of the antioxidant α -lipoic acid and the p38 MAP kinase inhibitor SB202190 on AGE-3-induced decrease in cell viability

(A) Schwann cells grown to confluence were incubated with AGE-3 or control BSA (500 μ g/mL) with or without α -lipoic acid (1 mmol/L). After incubation for 24 h, viable cells were quantified by MTT assay. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 4). ***P < 0.001. n.s., not significant. (B) Schwann cells pretreated with 10 μ mol/L SB202190 for 1 h were incubated with AGE-3 or control BSA (500 μ g/mL). After incubation for 24 h, viable cells were quantified by MTT assay. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 6). ***P < 0.001.

8-ヒドロキシデオキシグアノシンの検出 : AGEs による酸化ストレスを観察するため、免疫染色によって 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) を検出した。Fig.10 に示すように AGE-2 および 3 刺激により、核中 8-OHdG 免疫染色強度の増大が認められた。

サイトカイン産生および NF- κ B 活性化の評価 : Fig.11 および 12 に示すように酸化ストレスによって誘導される細胞傷害の主要因子であり、炎症性メディエーター分子の遺伝子発現に参与する NF- κ B の活性化と炎症性サイトカイン TNF- α および IL-1 β の産生増大も認められた。

以上より、AGEs がシュワン細胞に対して直接生物学的作用を及ぼすことが明らかとなった。グリセルアルデヒド由来 AGE (AGE-2) およびグリコールアルデヒド由来 AGE (AGE-3) は、細胞生存を低下させ、アポトーシスを誘発した。一方、グルコース由来 AGE (AGE-1) は影響を及ぼさなかった。さらに、AGE-2 および 3 は細胞増殖を阻害し、炎症性サイトカインの産生を引き起こした。したがって、長期糖尿病患者で増大する AGEs、特に AGE-2 および 3 が末梢神経機能および構造異常に関与することが示唆された。

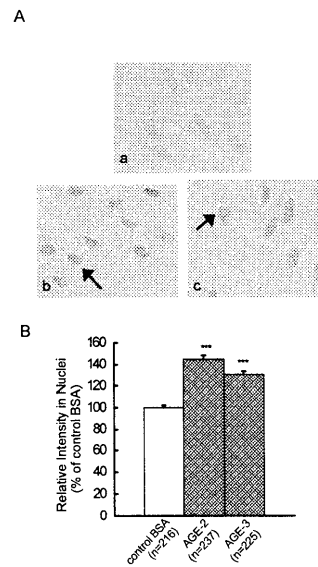


Fig. 10 Increase in 8-OHdG levels in cultured Schwann cells after exposure to AGEs

(A) Exposure to 500 μ g/mL of AGE-2 (b) and 3 (c) induced the increase in the immunostaining intensity against 8-OHdG in nucleus (arrows). (B) The relative staining intensity in nucleus was expressed as the percentage of the control BSA-treated cells. Data are expressed as mean \pm SEM. ***P < 0.001, compared with control BSA.

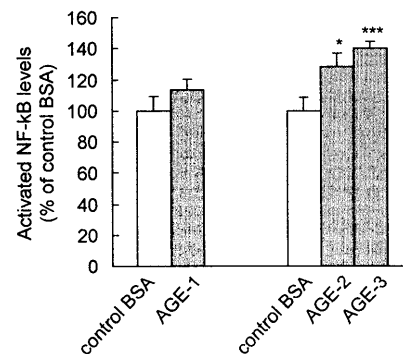


Fig. 11 Effects of AGEs on the activation of NF- κ B

Schwann cells grown to confluence were incubated with AGEs or control BSA at 100 μ g/mL. After incubation for 24 h, activated p65 NF- κ B levels in the nuclear extracts were measured. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 4). *P < 0.05, ***P < 0.001, compared with control BSA.

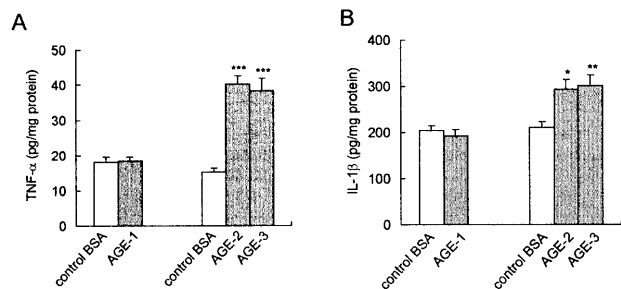


Fig. 12 Effects of AGEs on production of proinflammatory cytokines in Schwann cells

Schwann cells grown to confluence were incubated with AGEs or control BSA at 100 μ g/mL. After incubation for 4 days, concentrations of TNF- α (A) and IL-1 β (B) in the medium were determined with ELISA. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 4). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, compared with control BSA.

AGEs によるシュワン細胞生存率低下が抗酸化剤で抑制され、AGEs 刺激で細胞内酸化ストレスマーカーである核 8-OHdG の増加を生じることから、AGEs による細胞毒性の発現には酸化ストレスが関与することが示唆された。また、酸化ストレスとの関連性が示唆されている炎症性メディエーター分子の遺伝子発現に関与する NF- κ B の活性化と炎症性サイトカイン TNF- α および IL-1 β の産生増大も認められた。

AGEs によるシュワン細胞の死はミエリン鞘傷害や再生神経の構造異常をもたらすことが推察される。さらに、サイトカイン産生増大はサイトカイン自体による神経障害を誘発する可能性もある。

5. 不死化マウスシュワン細胞 IMS32 における高濃度グルコース下の遺伝子発現プロファイルの変化

つぎに不死化シュワン細胞株 IMS32 細胞を用い、高血糖が及ぼす遺伝子発現変化を検討した。IMS32 細胞は成年マウス脊髄後根神経節および末梢神経の長期培養から株化された細胞であり、通常のシュワン細胞機能を有し、かつ、高い増殖活性を示すことが知られている^{64,65}。しかし、ポリオール代謝経路についての検討はなされていない。

IMS32 細胞遺伝子発現プロファイル：IMS32 細胞をグルコース終濃度 5.6mmol/L (Glc-5.6) と 30mmol/L (高濃度グルコース、Glc-30) 条件下で 14 日間培養後、総 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ分析に供した。遺伝子発現量は Glc-5.6 群に対する相対値として示した。

Table2 に示すように、20,000 個ほどのマウス遺伝子について分析した結果、高濃度グルコース (Glc-30) 条件下で変動する 29 個の遺伝子を同定した。このうち、10 個の遺伝子が 2 倍以上発現増大するもので、19 個の遺伝子が 1/2 以下に発現低下するものであった。

つぎにマイクロアレイの結果を検証するために、これら 29 個の遺伝子について、RT-PCR あるいはノザンプロット分析を実施した。Fig.13 に示すように、RT-PCR によって Glc-30 条件下で発現増大する 3 個の遺伝子、serum amyloid A3 (SAA3)、angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) および ecotropic viral integration site 3 (Evi3) を同定した。また、Fig.14 に示すように、ノザンプロットによって、発現低下する aldo-keto reductase 1A4 (AKR1A4、アルデヒドリダクターゼ遺伝子) を同定した。そして、AR 阻害剤 (SNK-860) は、SAA3、ANGPTL4 および Evi3 の発現増大には影響を及ぼさなかったが、AKR1A4 の発現低下を是正した。

AKR1A4 はアルドース還元酵素 (AR) とともにアルドケト還元酵素ファミリーの一員であるアルデヒド還元酵素 (AHR) の遺伝子である^{66,67}。AR と AHR との間には

Table 2 Altered gene expression in IMS32 under the high glucose ([Glc-30]) versus normal glucose ([Glc-5.6]) condition

| GenBank Accession No. | Gene | Ratio ([Glc-30]/[Glc-5.6]) |
|-------------------------|---|----------------------------|
| [Up-regulated] | | |
| AK033182 | Myosin light chain, alkali, fast skel. | 2.04 |
| NM_008182 | Glutathione S-transferase alpha 2 | 2.46 |
| NM_009426 | Thyrotropin-releasing hormone (TRH) | 2.04 |
| NM_011315 | Serum amyloid A3 (SAA3) | 2.61 |
| NM_020581 | Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) | 2.3 |
| NM_023557 | RIKEN cDNA 2210409D01 | 3.35 |
| NM_144731 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine polypeptide N-acetyl-galactosaminyl transferase (GALNT7) | 2.43 |
| NM_144876 | RIKEN cDNA D930050H05 | 3.21 |
| NM_145492 | Ecotropic viral integration site3 (Evi-3) | 3.13 |
| NM_146720 | Olfactory receptor 421 (Olfir421) | 2.05 |
| [Down-regulated] | | |
| AK019078 | Adult male tongue cDNA (RAP1 GTPase activating protein 1H) | 0.37 |
| NM_008474 | Type II 65kd keratin (KRT-2-16) | 0.44 |
| NM_007392 | Alpha 2 actin | 0.49 |
| NM_007810 | Cytochrome P450, 19, aromatase (Cyp19) | 0.45 |
| NM_008522 | Lactotransferrin | 0.43 |
| NM_008826 | Phosphofructokinase | 0.49 |
| NM_009075 | Ribose 5-phosphatase isomerase | 0.44 |
| NM_010266 | Guanine deaminase | 0.43 |
| NM_011144 | Peroxisome proliferation activated receptor alpha (PPARalpha) | 0.45 |
| NM_013549 | Histone2, H2AA1 | 0.34 |
| NM_013713 | Keratin associated protein 15 | 0.29 |
| NM_018973 | P140 protein | 0.42 |
| NM_019467 | Allograft inflammation factor 1 (AIF1) | 0.43 |
| NM_019752 | Serine protease (Prss25) | 0.37 |
| NM_020009 | FK506 binding protein associated protein 1 (FRAP1) | 0.27 |
| NM_021473 | Aldo-keto reductase (AKR1A4) | 0.39 |
| NM_023115 | Protocadherin 15 (PCDH15) | 0.19 |
| NM_024464 | RIKEN cDNA 2010319C14 | 0.24 |
| NM_025892 | RIKEN cDNA 3730525G14 | 0.28 |

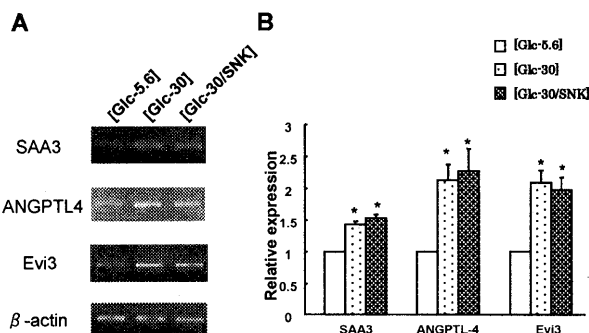


Fig. 13 Relative mRNA expressions of serum amyloid A3 (SAA3), angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) and ecotropic viral integration site 3 (Evi3) in IMS32 determined by semi-quantitative RT-PCR

(A) The pictures of gel electrophoresis. (B) The mRNA expressions of SAA3, ANGPTL4 and Evi3 in Glc-30 and Glc-30/SNK (AR inhibitor) relative to those in Glc-5.6. Values represent the mean \pm SEM of 4 experiments. *P<0.05, compared with Glc-5.6.

約 50%のアミノ酸配列相同性があり⁶⁸、両酵素ともグリセルアルデヒド、メチルグリオキザール、ヒドロキシノネナルなどの活性型アルデヒドを還元分解する^{66,67}。しかし、AHR は AR とは異なり、グルコースなどの還元糖との反応性は弱い^{71,72}。今回の試験においては、高濃度グルコース培養下で AHR 遺伝子が発現低下し、その低下が AR 阻害剤によって是正された。高濃度グルコース培養下では AR の発現上昇が起こるため、その AR によってアルデヒド化合物の還元作用が十分となった結果、AHR の発現が低下したものと推察される。一方、AR 阻害剤によって AR が阻害されると、グルコースをソルビトールへと還元するポリオール代謝経路亢進が阻害されるとともに、生体防御に必要な活性アルデヒドの還元、すなわち解毒作用も低減するため、代償として AHR の発現が元に戻ると考えられる。このことは、AR 阻害剤によって AR が阻害

されても、活性アルデヒドの解毒作用については AHR が十分な役割を果たすことを意味するものであり、AR 阻害剤の副作用が生じにくいことが推察される。

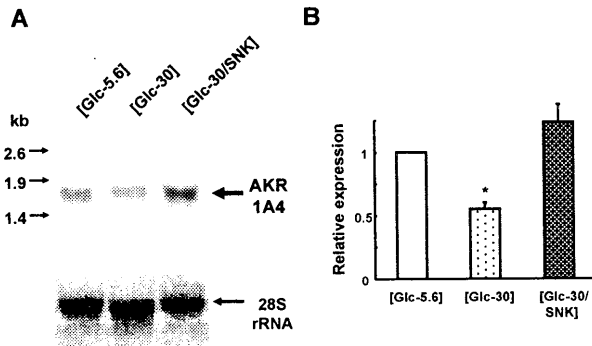


Fig. 14 Relative mRNA expression of aldehyde reductase (AKR1A4) in IMS32 determined by Northern blot analysis
 (A) The picture of the blot hybridized with an alkaline-phosphatase-labeled cDNA probe (top). A methylene blue (MB)-stained image (28S ribosomal RNA) of the duplicate membrane (bottom) showed that a relatively equal amount of RNA was loaded.
 (B) The mRNA expression of AKR1A4 in Glc-30 and Glc-30/SNK (AR inhibitor) relative to that in Glc-5.6. Values represent the mean \pm SEM of 4 experiments. * $P < 0.05$, compared with Glc-5.6 or Glc-30/SNK.

6. 総括

末梢神経シュワン細胞における、高血糖に起因した細胞内ポリオール代謝経路の亢進、細胞外からの終末糖化産物 (AGEs) 刺激、および酸化ストレス増大による複合的な機能障害および細胞傷害が、糖尿病性神経障害発症進展に関与することが明らかとなった。

今後、より強力な AR 阻害、AGEs 生成阻害あるいは分解促進、酸化ストレス是正などの作用機序を持つ薬剤の早期開発が望まれる。

7. 謝辞

本総説を終えるに際し、終始御指導ならびに御鞭撻を賜り、本総説提出の機会を与えて下さり、さらに有益なる御助言を頂きました 岐阜薬科大学薬理学講座 稲垣直樹教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行に際し、終始御指導と御鞭撻を賜りました京都府立医科大学大学院分子薬理学教室 矢部千尋教授、弘前大学医学部病理学講座 八木橋操六教授、北陸大学薬学部病態生化学講座 竹内正義教授ならびに東京都神経科学総合研究所 三五一憲博士に深甚なる謝意を表します。そして、本研究に対して深い御理解と多大の御支援を頂きました株式会社三和化学研究所、寺尾敏常務、鈴木常正取締役、熊谷良洋取締役、松本幸治所長、加藤憲明グループ長に深謝申し上げます。

す。

さらに長年、本研究に協力頂いた株式会社 三和化学研究所研究員各位に感謝致します。

8. 参考文献

- 1) Obrosova, I.G., *Curr. Diab. Rep.*, **2003**, 3, 439.
- 2) Pop-Busui, R., Sima, A., Stevens, M., *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **2006**, 22, 257.
- 3) Yagihashi, S., *Diabetes Metab. Rev.*, **1995**, 11, 193.
- 4) Cai, J., Boulton, M., *Eye*, **2002**, 16, 242.
- 5) Santilli, F., Cipollone, F., Mezzetti, A., Chiarelli, F., *Horm. Metab. Res.*, **2004**, 36, 319.
- 6) Rask-Madson, C., King, G.L., *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.*, **2007**, 3, 46.
- 7) Ide, S., *Neurosci. Res.*, **1996**, 25, 101.
- 8) Frostick, S.P., Yin, Q., Kemp, G.J., *Microsurgery*, **1998**, 18, 397.
- 9) Kern, T.S., Engerman, R.L., *Histochem. J.*, **1982**, 14, 507.
- 10) Kinoshita, J.H., *Proctor Lecture. Invest. Ophthalmol.*, **1974**, 13, 713.
- 11) Greene, D.A., Lattimer, S., Ulbrecht, J., Carroll, P., *Diabetes Care.*, **1985**, 8, 290.
- 12) Nishimura, C., Lou, M.F., Kinoshita, J.H., *J. Neurochem.*, **1987**, 49, 290.
- 13) Williamson, J.R., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K.S., Ido, Y., Kawamura T., Nyengaard, J.R., Enden M.V.D., Kilo, C., Tilton, R.G., *Diabetes*, **1993**, 42, 801.
- 14) Cameron, N.E., Cotter, M.A., *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **1999**, 45, 137.
- 15) Stahl, B., Wiesinger, H., Hamprecht, B., *J. Neurochem.*, **1989**, 53, 665.
- 16) Gabbay, K.H., Merola, L.O., Field, R.A., *Science*, **1966**, 151, 209.
- 17) Hotta, N., Sakamoto, N., Shigeta, Y., Kikkawa, R., Goto Y., *J. Diabetes Complications*, **1996**, 10, 168.
- 18) Bunge, R.P., *Curr. Opin. Neurobiol.*, **1993**, 3, 805.
- 19) Fu, S.Y., Gordon, T., *Mol. Neurobiol.*, **1997**, 14, 67.
- 20) Hellweg, R., Hartung, H.-D., *J. Neurosci. Res.*, **1990**, 26, 258.
- 21) Unger, J.W., Klitzsch, T., Pera, S.; Reiter, R., *Exp. Neurol.*, **1998**, 153, 23.
- 22) Vo, P.A., Tomlinson, D.R., *Exp. Neurol.*, **1999**, 157, 127.
- 23) McArthur, J.C., Yiannoutsos, C., Simpson, D.M., Adornato, B.T., Singer, E.J., Hollander, H., Marra, C., Rubin, M., Cohen, B.A., Tucker, T., Navia, B.A., Schifitto, G., Katzenstein, D., Rask, C., Zaborski, L., Smith, M.E., Shriver, S., Millar, L., Clifford, D.B., the AIDS Clinical Trials Team, *Neurology*, **2000**, 54, 1080.
- 24) Goss, J.R., Goins, W.F., Lacomis, D., Mata, M., Glorioso, J.C., Fink, D.J., *Diabetes*, **2002**, 51, 2227.
- 25) Lindholm, D., Heumann, R., Meyer, M., Thoenen, H.,

- Nature*, **1987**, *330*, 658.
- 26) Lindholm, D., Heumann, R., Hengerer, B., Thoenen, H., *J. Biol. Chem.*, **1988**, *263*, 16348.
 - 27) Matsuoka, I., Meyer, M., Thoenen, H., *J. Neurosci.*, **1991**, *11*, 3165.
 - 28) Horie, H., Sakai, I., Akahori, Y., Kadoya, T., *Neuroreport*, **1997**, *8*, 1955.
 - 29) Chen, J.K., Yao, L.L., Jenq, C.B., *J. Neurosci. Res.*, **1991**, *30*, 321.
 - 30) Smith, G.M., Rabinovsky, E.D., McManaman, J.L., Shine, H.D., *Exp. Neurol.*, **1993**, *121*, 239.
 - 31) Shuto, T., Horie, H., Hikawa, N., Sango, K., Tokashiki, A., Murata, H., Yamamoto, I., Ishikawa, Y., *Neuroreport*, **2001**, *12*, 1081.
 - 32) Krasnoselsky, A., Massay, M.J., DeFrances, M.C., Michalopoulos, G., Zarnegar, R., Ratner, N., *J. Neurosci.*, **1994**, *14*, 7284.
 - 33) Syroid, D.E., Zorick, T.S., Arbet-Engels, C., Kilpatrick, T.J., Eckhart, W., Lemke, G., *J. Neurosci.*, **1999**, *19*, 2059.
 - 34) Korompilias, A.V., Chen, L.E., Seaber, A.V., Urbaniak, J.R., *J. Orthop. Res.*, **1999**, *17*, 714.
 - 35) Haggiag, S., Chebath, J., Revel, M., *FEBS Lett.*, **1999**, *457*, 200.
 - 36) Dowsing, B.J., Morrison, W.A., Nicola, N.A., Starkey, G.P., Bucci, T., Kilpatrick, T.J., *J. Neurochem.*, **1999**, *73*, 96.
 - 37) Meier, C., Parmantier, E., Brennan, A., Mirsky, R., Jessen, K.R., *J. Neurosci.*, **1999**, *19*, 3847.
 - 38) Lobsiger, C.S., Schweitzer, B., Taylor, V., Suter, U., *Glia*, **2000**, *30*, 290.
 - 39) Peulve, P., Laquerriere, A., Paresy, M., Hemet, J., Tadie, M., *Exp. Cell Res.*, **1994**, *214*, 543.
 - 40) Scarpini, E., Conti, G.C., Bussini, S., Clerici, R., Siglienti, I., Piccio, L., De, Pol, A., Baron, P.L., Scarlato, G., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1999**, *883*, 520.
 - 41) Sondell, M., Lundborg, G., Kanje, M., *J. Neurosci.*, **1999**, *19*, 5731.
 - 42) Zhong, H., Vol, I.R.E., Ghosh, S., *Mol. Cell*, **1998**, *1*, 661.
 - 43) Funakoshi, H., Frisén, J., Barbany, G., Timmusk, T., Zachrisson, O., Verge, V.M.K., Persson, H., *J. Cell Biol.*, **1993**, *123*, 455.
 - 44) Cai, F., Tomlinson, D.R., Fernyhough, P., *Neurosci. Lett.*, **1998**, *252*, 45.
 - 45) Sterne, G.D., Brown, R.A., Green, C.J., Terenghi, G., *Eur. J. Neurosci.*, **1997**, *9*, 1388.
 - 46) Ljungberg, C., Novikov, L., Kellerth, J.-O., Ebendal, T., Wiberg, M., *Neurosci. Lett.*, **1999**, *262*, 29.
 - 47) Kennedy, J.M., Zochodne, D.W., *Brain*, **2000**, *123*, 2118.
 - 48) Ehrhard, P.B., Ganter, U., Bauer, J., Otten, U., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 5423.
 - 49) Susaki, Y., Shimizu, S., Katakura, K., Watanabe, N., Kawamoto, K., Matsumoto, M., Tsudzuki, M., Furusaka, T., Kitamura, Y., Matsuda, H., *Blood*, **1996**, *88*, 4630.
 - 50) Schreck, R., Rieber, P., Baeuerle, P.A., *EMBO J.*, **1991**, *10*, 2247.
 - 51) Watson, P.A., Nesterova, A., Burant, C.F., Klemm, D.J., Reusch, J.E.-B., *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 46142.
 - 52) Sugimoto, K., Nishizawa, Y., Horiuchi, S., Yagihashi, S., *Diabetologia*, **1997**, *40*, 1380.
 - 53) Cameron, N.E., Cotter, M.A., Dines, K., Love, A., *Diabetologia*, **1992**, *35*, 946.
 - 54) Yagihashi, S., Kamijo, M., Baba, M., Yagihashi, N., Nagai, K., *Diabetes*, **1992**, *41*, 47.
 - 55) Wada, R., Nishizawa, Y., Yagihashi, N., Takeuchi, M., Ishikawa, Y., Yasumura, K., Nakano, M., Yagihashi, S., *Eur. J. Clin. Invest.*, **2001**, *31*, 513.
 - 56) Chibber, R., Molinatti, P.A., Rosatto, N., Lambourne, B., Kohner, E.M., *Diabetologia*, **1997**, *40*, 156.
 - 57) Hirata, C., Nakano, K., Nakamura, N., Kitagawa, Y., Shigeta, H., Hasegawa, G., Ogata, M., Ikeda, T., Sawa, H., Nakamura, K., Ienaga, K., Obayashi, H., Kondo, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, *236*, 712.
 - 58) Min, C., Kang, E., Yu, S.H., Shinn, S.H., Kim, Y.S., *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **1999**, *46*, 197.
 - 59) Yamagishi, S., Amano, S., Inagaki, Y., Okamoto, T., Koga, K., Sasaki, N., Yamamoto, H., Takeuchi, M., Makita, Z., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2002**, *290*, 973.
 - 60) Yamagishi, S., Inagaki, Y., Okamoto, T., Amano, S., Koga, K., Takeuchi, M., Makita, Z., *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 20309.
 - 61) Takeuchi, M., Makita, Z., Bucala, R., Suzuki, T., Koike, T., Kameda, Y., *Mol. Med.*, **2000**, *6*, 114.
 - 62) Takeuchi, M., Bucala, R., Suzuki, T., Ohkubo, T., Yamazaki, M., Koike, T., Kameda, Y., Makita, Z., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **2000**, *59*, 1094.
 - 63) Yamagishi, S., Inagaki, Y., Okamoto, T., Amano, S., Koga, K., Takeuchi, M., *Kidney Int.*, **2003**, *63*, 464.
 - 64) Watabe, K., Fukuda, T., Tanaka, J., Honda, H., Toyohara, K., and Sakai, O., *J. Neurosci. Res.*, **1995**, *41*, 279.
 - 65) Sango, K., Tokashiki, A., Ajiki, K., Horie, M., Kawano, H., Watabe, K., Horie, H., Kadoya, T., *Eur. J. Neurosci.*, **2004**, *19*, 55.
 - 66) Allan, D., Lohnes, D., *Mech. Dev.*, **2000**, *94*, 271.
 - 67) Hyndman, D., Bauman, D.R., Heredia, V.V., Penning, T.M., *Chem. Biol. Interact.*, **2003**, *143-144*, 621.
 - 68) Bohren, K.M., Bullock, B., Wermuth, B., Gabbay, K.H., *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 9547.
 - 69) Flynn, T.G., *Metabolism*, **1986**, *35* (4 Suppl.1), 105.
 - 70) Vander Jagt, D.L., Robinson, B., Taylor, K.K., Hunsaker, L.A., *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 4364.
 - 71) Takahashi, M., Lu, Y.B., Myint, T., Fujii, J., Wada, Y., Taniguchi, N., *Biochemistry*, **1995**, *34*, 1433.
 - 72) Danesh, F.R., Wada, J., Wallner, E.I., Sahai, A., Srivastava, S.K., Kanwar, Y.S., *Curr. Med. Chem.*, **2003**, *10*, 1399.