



グルコース由来メチルグリオキサールによるラット 坐骨神経由来シュワン細胞のアポトーシス

福永, みちる

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Date of Publication)

2013-04-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3045

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003045>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



グルコース由来メチルグリオキサールによる ラット坐骨神経由来シュワン細胞のアポトーシス

福 永 みちる

神戸大学大学院医学系研究科 応用分子医学講座
糖尿病代謝・消化器・腎臓内科学
(指導：春日雅人教授)

連絡先：福永 みちる

神戸大学大学院医学系研究科 応用分子医学講座
糖尿病代謝・消化器・腎臓内科学

Tel : (078)-382-5861 Fax : (078)-382-2080

(平成 16年 2月16日受付)

要 約

糖尿病状態では、グルコース由来高反応性のメチルグリオキサールの形成が亢進し、糖尿病合併症進展への関与が示唆されている。一方、糖尿病性末梢神経障害にアポトーシス細胞死が関与していることが示唆されており、今回、メチルグリオキサールがラット坐骨神経由来シュワン細胞に対してアポトーシス誘導作用を有しているか検討した。メチルグリオキサールは濃度および時間依存性にシュワン細胞の生存率を減少させ、アポトーシスに特徴的な変化を誘導した。また、このメチルグリオキサール誘導性アポトーシスは、糖化反応阻害剤アミノグアニジンや p38 MAPK 阻害剤 SB203580 によって抑制されるとともに、抗酸化剤の N-acetyl-L-cysteine でも抑制され、この現象に酸化ストレスの関与が示唆された。実際に、STZ 糖尿病ラットの坐骨神経で酸化ストレスマーカーの 8-OHdG の蓄積も確認された。これらの結果は、糖尿病状態下での酸化ストレスを介する末梢神経シュワン細胞傷害にメチルグリオキサールが関与している可能性を示唆しており、今後の糖尿病性神経障害治療のターゲットを考える上で興味深い知見と思われた。

緒 言

糖尿病性神経障害は糖尿病の三大合併症の中でも比較的早期から出現し、患者の quality of life を著しく損なうとともに生命予後にも影響を与えることがあ

る。従って、その成因を解明して、有効な治療法を確立することは重要な課題である。いくつかの大規模臨床研究によって、厳格な血糖コントロールが糖尿病性細小血管症の発症進展を阻止し得ることが示され^[1-3]、神経障害の成因に持続する高血糖が関与していることは示唆されるが、その詳細な機序には不明な点が多い。

糖尿病では、高血糖によって蛋白質の糖化反応（グリケーション）が亢進している。グリケーションは、グルコースなどの還元糖が生体内の蛋白質と非酵素的に反応しメチルグリオキサール (MG) や 3-デオキシグルコソソ (3-DG) のような高反応性のジカルボニル化合物の形成を経て、種々の糖化反応終末産物 (AGEs) の形成に至る反応の総称である。実際に、糖尿病患者において、血清中の MG や 3-DG の濃度が上昇していることや^[4, 5]、これらから形成する種々の AGEs^[6]が糖尿病患者の組織中に蓄積していることが証明されている。近年、MG や 3-DG のような反応性の高いジカルボニル化合物は、AGEs の前駆体としてだけでなく、それ自体が細胞機能に影響を与える可能性が指摘されている^[7, 8]。例えば、MG は、腎糸球体構成細胞であるメサングウム細胞に対して、アポトーシスを誘導することが示され^[9]、合併症進展に、MG のような高反応性のジカルボニル化合物が関与している可能性が示唆される。

一方、糖尿病性末梢神経障害にみられる代表的な病理学的所見の一つである節性脱髄の進展にシュワン細胞 (SC) のアポトーシスが関与している可能性が示唆されている。今回、糖尿病状態で形成亢進している高

キーワード：糖尿病性神経障害、グリケーション、メチルグリオキサール、アポトーシス、シュワン細胞、酸化ストレス

反応性ジカルボニル化合物の糖尿病性神経障害進展への関与を明らかにする目的で、MGの培養シュワン細胞に対するアポトーシス誘導作用について *in vitro* で検討した。また、アポトーシス関連の細胞内分子メカニズムを解明する目的でMAPKスーパーファミリーメンバーのp38MAPKの関与についても検討を加えた。

方 法

1. 使用細胞

ラット坐骨神経シュワン細胞の初代培養は10週齢のSprague-Dawley ラットの坐骨神経を摘出し、Morrissey らの方法^[10, 11]でシュワン細胞を単離し、3-7 継代目を実験に使用した。グルコース濃度 1 g/l の Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO BRL, Rockville, MD) に10% Fetal calf serum (FCS, JRH Biosciences CSL Company, Lenexa, KS), forskolin (2 μ mol/l) と牛下垂体抽出物 (10mg/l; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) を加えて継代し、すべての培養液にペントシリン (100u/ml) とストレプトマイシン (100 μ g/ml) を添加した。

2. ラットシュワン細胞培養条件

10cm 培養ディッシュでサブコンフルエントに達した培養シュワン細胞をDMEM 培養液 [1%FCS, 牛下垂体抽出物 (1mg/l) 含有] で24時間スタベーションした後、MG (0-400 μ M) とインキュベーションし、以下の項目を検討した。

3. 細胞生存率 (MTT assay)

24ウェルプレートで培養したシュワン細胞を0-200 μ MのMGとインキュベーションして8-48時間後の細胞生存率をMTT assayの原理を利用したCELL PROLIFERATION ASSAY KIT (CHEMICON International, Inc., Temecula, CA) を用いて測定した。また、200 μ MのMGに糖化反応阻害剤のアミノグアニジン (AG) を100あるいは200 μ M 加えた場合の細胞生存率についても同様に検討した。

4. DNA 断片化の検出

シュワン細胞を15cm培養ディッシュで培養しスタベーションした後、0-400 μ MのMGで24時間刺激した。ApopLadder EX™ kit (TaKaRa Biomedicals) を用いて、断片化DNAを抽出し、エチジウムブロマイド含2%アガロースゲルにて電気泳動を行った。

5. TUNEL 法

シュワン細胞を12ウェルプレートの poly-lysine-coated coverslip 上でサブコンフルエントに達するまで培養しスタベーションした後、MG200 μ Mと16時間インキュベーションし、アポトーシス陽性細胞を *in situ* Apoptosis Detection Kit (TaKaRa Biomedicals, Shiga, Japan) を用いてTUNEL法で検出した。また、200 μ MのMGにアミノグアニジン (AG:100, 200 μ M), 抗酸化剤の N-acetyl-L-cysteine(NAC:2mM) および p38 MAPK選択的阻害剤のSB203580 (1, 10 μ M) を添加しMG誘導性アポトーシスに対する阻害効果を調べた。それぞれ、無作為に5視野のTUNEL陽性細胞を数え、一元配置分散分析をした後、Dunnett 法で多重比較検定を行った。

6. 末梢神経組織の8-OHdG に対する免疫染色

8週齢のSprague-Dawley ラットにストレプトゾトシン (STZ, 65mg/ml) を静注して糖尿病を誘発して3ヶ月後の糖尿病ラットと対照ラットから坐骨神経を摘出して作製したパラフィン包埋切片に対してDAKO ENVISION™ System, Peroxidase (AEC) (DAKO CORPORATION, Carpinteria, CA) を用いて免疫染色を行くった。一次抗体として抗8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine モノクローナル抗体 (日本老化制御研究所, Shizuoka, Japan) を使用した。

結 果

1. 培養シュワン細胞生存率に及ぼすMGの影響

培養シュワン細胞はMGによって濃度依存性、時間依存性に細胞生存率が減少し、MG200 μ Mで48時間後には29%の生存率となった (Figure 1A)。AGを添加すると、100 μ Mで52%, 200 μ Mで56%と濃度依存性に生存率を回復させた (Figure 1B)。

2. DNA断片化の検出

培養ラットシュワン細胞を種々の濃度のMGと24時間インキュベーションした場合、100 μ M以上のMGで刺激された細胞においてアポトーシスに特異的であるDNAラダーが検出された (Figure 2)。

3. TUNEL法

培養シュワン細胞は100 μ M以上のMGで刺激後、16時間で、縮小、クロマチン凝縮、アポトーシス小体形成といったアポトーシスに特徴的な形態学的変化とともにTUNEL陽性所見を示した。MGの濃度依存性にTUNEL陽性細胞数が増加し、MG100 μ M以上で

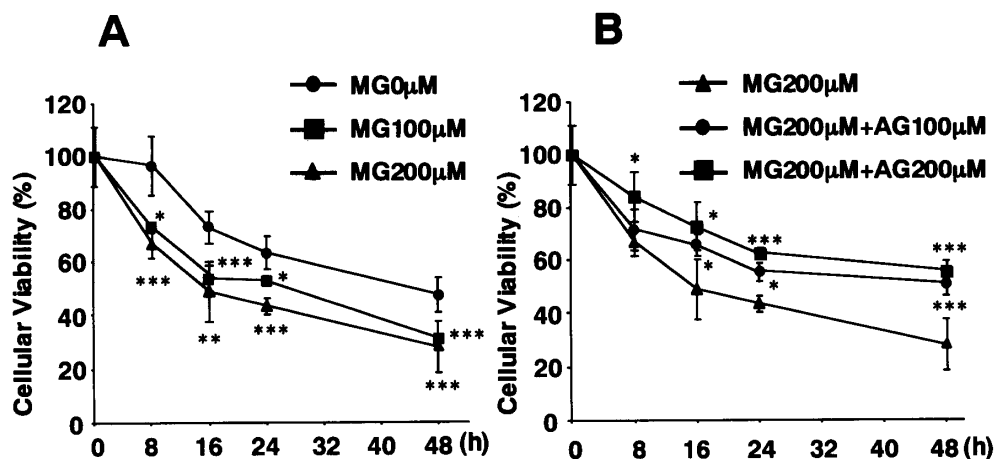


Fig.1. メチルグリオキサールによる培養ラットシュワン細胞の細胞生存率への影響

(A) 培養ラットシュワン細胞を0-200 μ MのMGと48時間後まで培養し、細胞生存率をMTT assayで測定した。濃度依存性、時間依存性に細胞生存率の減少が認められた。* $p < 0.05$ vs. medium alone, ** $p < 0.01$ vs. medium alone, *** $p < 0.005$ vs. medium alone (B) MG200 μ Mに糖化反応阻害剤アミノグアニジン 100, 200 μ Mを添加したところ、MGによる細胞生存率の減少を濃度依存性に回復させた。* $P < 0.05$ vs. MG200 μ M, ** $P < 0.005$ vs. MG200 μ M

MG 0 50 100 200 400 (μ M)

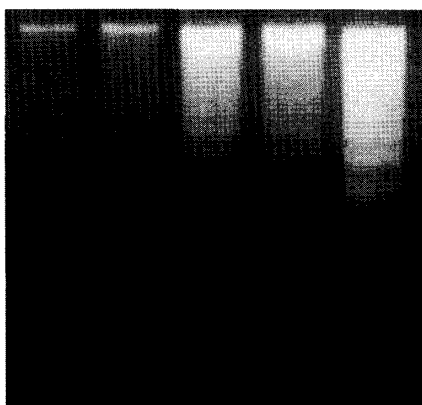


Fig.2. シュワン細胞のメチルグリオキサール誘導性DNA断片化

培養ラットシュワン細胞を100 μ M以上のMGで刺激後24時間で、アポトーシスに特異的であるDNAラダーが検出された。

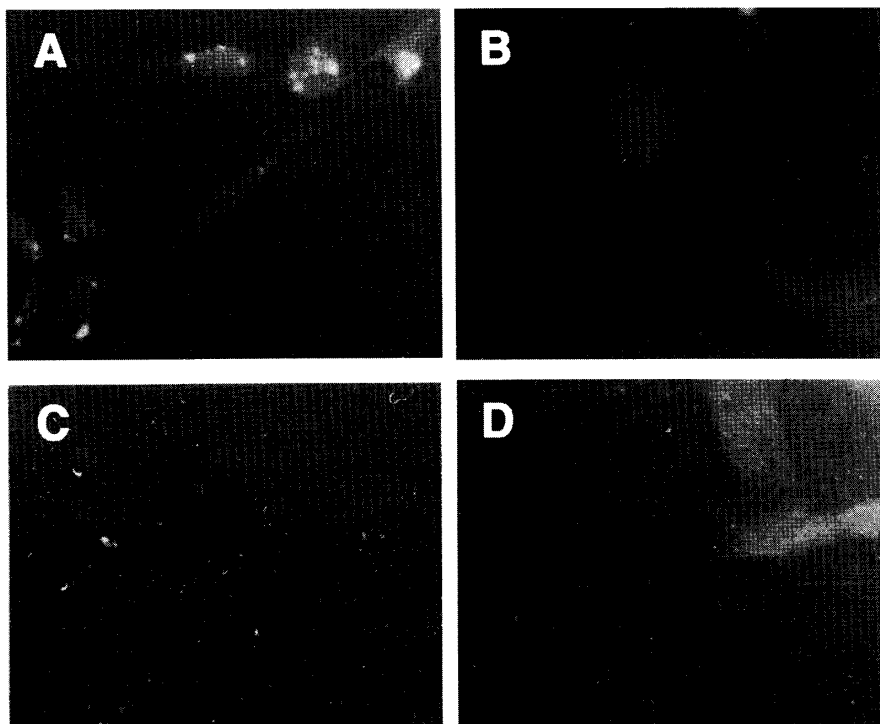


Fig.3. シュワン細胞のメチルグリオキサール誘導性アポトーシスへの各種阻害剤の効果 (TUNEL法)

培養ラットシュワン細胞は16時間メチルグリオキサール200 μ Mのみ (A) と、それに200 μ Mアミノグアニジン (B), 2mM N-acetyl-L-cysteine (C), 10 μ M SB203580 (D) を加えた条件下で培養し、アポトーシス陽性細胞をTUNEL法で検出した。

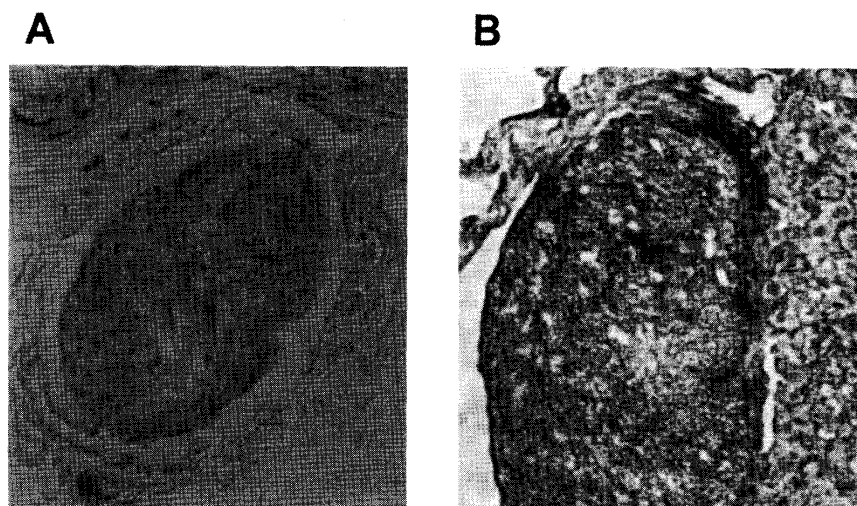


Fig.4. ラット坐骨神経における8-OHdGの局在

週齢を一致させた対照ラット (A) および STZ 注射後3ヶ月の糖尿病ラット (B) の坐骨神経において酸化ストレスマーカーの8-OHdGに対する免疫染色を行ったところ、STZ糖尿病ラットで8-OHdGの蓄積が認められた。

対照に比較して有意差が認められた。MG200 μ M によるアポトーシスはアミノグアニジン, NAC, SB203580の各種阻害剤によって抑制された (Figure 3)。

4. 末梢神経組織の8-OHdG形成

8-OHdGに対する免疫染色の結果、糖尿病誘発3ヶ月後のSTZ糖尿病ラットにおいて対照ラットに比較し、酸化ストレス亢進状態を示唆する8-OHdGの蓄積の増加が認められた (Figure 4)。

考 察

MGは、糖尿病状態で、種々の高血糖関連代謝経路^[12]を介して形成が亢進する高反応性ジカルボニル化合物である。今回、MGが、濃度依存性にSCにアポトーシスを引き起こすことが示された。この現象が抗酸化剤のNACによって阻害されたことから、MGのアポトーシス誘導作用には酸化ストレスが介在していることが示唆される。これに関連して、Cheら^[7]は、MGがラット大動脈平滑筋細胞に対して、細胞内活性酸素の生成亢進を介してHB-EGF分泌を刺激することを報告している。酸化ストレス惹起の機序としては、細胞内の抗酸化ストレス酵素がMGによって修飾されて活性が低下するために、細胞内に生成した活性酸素を消去できなくなることが考えられている。酸化ストレスと細胞のアポトーシス死を介在する細胞内情報伝達の一つとして、MAPKスーパーファミリーのメンバーであるp38 MAPKが着目されているが、今回のSCに対するMGのアポトーシス誘導作用もp38 MAPK阻害剤で抑制され、この経路の関与が示唆される。この現象は、以前に報告された^[9]ラットメサングウム細胞のMG刺激によるアポトーシス誘導の結果に類似しているので、糖尿病性細小血管症に共通した現象な

のかかもしれない。しかし、SCに対する濃度依存性の実験結果は、メサングウム細胞の場合と比較して、MGのより低い濃度でアポトーシスによるDNA断片化を引き起こすことを示しており、SCの方がMGに対する感受性が高いことが示唆される。このことは、糖尿病の自然経過において、一般的に神経障害が腎症より早期に現われるという事実を部分的に説明し得るかもしれない。

この糖尿病性神経障害の成因へのp38 MAPK活性化の関与は、ストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットにp38 MAPK阻害剤を与えると知覚神経伝導速度の遅延を防いだという報告^[13]からも支持される。一方、AGのMG誘導アポトーシスに対する抑制効果は、AGが化学的に容易にMGをトラップすることが知られている^[14]ので、この作用に起因すると思われるが、AGが有する抗酸化剤としての特性^[15]も付加的にその抑制的效果に寄与しているかもしれない。

糖尿病性神経障害の成因へのアポトーシス細胞死の関与を示す報告が集積してきている^[16-20]。神経細胞とシュワン細胞間の相互作用は末梢神経系が正常な機能を維持するために不可欠である。従って、シュワン細胞の機能障害は、ミエリン鞘形成不全による脱髄現象を誘導するだけでなく、シュワン細胞からの軸索への神経栄養因子の供給減少によって軸索の退化も促進し、神経障害の病理像を確立すると思われる^[21]。また、Tashiroら^[22, 23]は、MGが皮質および脊髄ニューロンに対して細胞内酸化ストレスの増加を伴ってアポトーシス死を誘導することを示しており、末梢神経においてもMGが直接、神経細胞を傷害する可能性も示唆される。このように、糖尿病状態で形成亢進するMGは、多様な機序で末梢神経障害の進展に寄与している可能性があり、今後の詳細な解明が期待される。

MGがシュワン細胞に対してアポトーシスを引き起

こすことを見出し、糖尿病性神経障害の進展におけるグルコース由来ジカルボニル化合物の潜在的な役割が示唆された。これらの結果は、今後の糖尿病性神経障害治療のターゲットを考える上で興味深い知見と思われた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御高閲を賜りました春日 雅人教授に深謝致します。また、この研究に際して御協力、御指導頂きました宮田 哲先生に謝意を表します。

文 献

1. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group.: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 329 : 977-986, 1993.
2. Ohkubo, Y., Kishikawa, H., Araki, E., Miyata, T., Isami, S., Motoyoshi, S., Kojima, Y., Furuyoshi, N., Shichiri, M.: Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus : a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 28 : 103-117, 1995.
3. Greene, D.A., Stevens, M.J., Feldman, E.L.: Glycemic control. In *Diabetic neuropathy*. Dyck, P.J., Thomas, P.K. ed. Second ed. WB Saunders Co., Philadelphia, p297, 1999.
4. Beisswenger, P.J., Howell, S.K., Touchette, A.D., Lal, S., Szwergold, B. S.: Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes*. 48 : 198-202, 1999.
5. Kusunoki, H., Miyata, S., Ohara, T., Liu, B. F., Uriuhara, A., Kojima, H., Suzuki, K., Miyazaki, H., Yamashita, Y., Inaba, K., Kasuga, M.: Relation between serum 3-deoxyglucosone and development of diabetic microangiopathy. *Diabetes Care*. 26 : 1889-1894, 2003.
6. Miyata, S., Monnier, V.: Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products in diabetic tissues using monoclonal antibody to pyrraline. *J. Clin. Invest.* 89 : 1102-1112, 1992.
7. Che, W., Asahi, M., Takahashi, M., Kaneto, H., Okado, A., Higashiyama, S., Taniguchi, N.: Selective induction of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor by methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 272 : 18453-18459, 1997.
8. Rosca, M.G., Monnier, V.M., Szweda, L.I., Weiss, M.F.: Alterations in renal mitochondrial respiration in response to the reactive oxoaldehyde methylglyoxal. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283 : F52-59, 2002.
9. Liu, B.F., Miyata, S., Hirota, Y., Higo, S., Miyazaki, H., Fukunaga, M., Hamada, Y., Ueyama, S., Muramoto, O., Uriuhara, A., Kasuga, M.: Methylglyoxal induces apoptosis through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in rat mesangial cells. *Kidney Int.* 63 : 947-957, 2003.
10. Morrissey, T.K., Kleitman, N., Bunge, R.P.: Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. *J. Neurosci.* 11 : 2433-2442, 1991.
11. Suzuki, T., Mizuno, K., Yashima, S., Watanabe, K., Taniko, K., Yabe-Nishimura, C.: Characterization of polyol pathway in Schwann cells isolated from adult rat sciatic nerves. *J. Neurosci. Res.* 57 : 495-503, 1999.
12. Thornalley, P.J.: Pharmacology of methylglyoxal : formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification - a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharmacol.* 27 : 565-573, 1996.
13. Agthong, S., Tomlinson, D.R.: Inhibition of p38 MAP kinase corrects biochemical and neurological deficits in experimental diabetic neuropathy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 973 : 359-362, 2002.
14. Thornalley, P.J., Yurek-George, A., Argirov, O.K.: Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the α -oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions. *Biochem. Pharmacol.* 60 : 55-65, 2000.

15. Giardino, I., Fard, A.K., Hatchell, D.L., Brownlee, M.: Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes*. 47 : 1114-1120, 1998.
16. Russell, J.W., Sullivan, K.A., Windebank, A.J., Herrmann, D.N., Feldman, E.L.: Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol. Dis.* 6 : 347-363, 1999.
17. Delaney, C.L., Russell, J.W., Cheng, H.L., Feldman, E.L.: Insulin-like growth factor- I and over-expression of Bcl-xL prevent glucose-mediated apoptosis in Schwann cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60 : 147-160, 2001.
18. Srinivasan, S., Stevens, M., Wiley, J.W.: Diabetic peripheral neuropathy : evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction. *Diabetes*. 49 : 1932-1938, 2000.
19. Schmeichel, A.M., Schmelzer, J.D., Low, P.A.: Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 52 : 165-171, 2003.
20. Vincent, A.M., Brownlee, M., Russell, J.W.: Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 959 : 368-383, 2002.
21. Eckersley, L.: Role of the Schwann cell in diabetic neuropathy. *Int. Rev. Neurobiol.* 50 : 293-321, 2002.
22. Kikuchi, S., Shinpo, K., Moriwaka, F., Makita, Z., Miyata, T., Tashiro, K.: Neurotoxicity of methylglyoxal and 3-deoxyglucosone on cultured cortical neurons : synergism between glycation and oxidative stress, possibly involved in neurodegenerative diseases. *J. Neurosci. Res.* 57 : 280-289, 1999.
23. Shinpo, K., Kikuchi, S., Sasaki, H., Ogata, A., Moriwaka, F., Tashiro, K.: Selective vulnerability of spinal motor neurons to reactive dicarbonyl compounds, intermediate products of glycation, in vitro : implication of inefficient glutathione system in spinal motor neurons. *Brain Res.* 861 : 151-159, 2000.

Apoptosis of Rat Schwann Cells of Sciatic Nerve induced by Glucose-derived Methylglyoxal

Michiru Fukunaga

Division of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Department of Clinical Molecular Medicine,
Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan

Abstract

The formation of glucose-derived methylglyoxal (MG) is accelerated under diabetic conditions. Since MG is highly reactive, it has been postulated that MG plays an important role in the development of diabetic complications. In the present study, MG decreased the cellular viability of sciatic nerve-derived Schwann cells (SCs) in a dose- and time- dependent manner. Further examinations showed that this reduction of SCs by MG was due to apoptotic cell death, probably via oxidative stress-related mechanisms. In fact, a marked accumulation of 8-OHdG, a marker of oxidative stress, was found in the sciatic nerve of streptozotocin-induced diabetic rats. These results suggested that oxidative stress is involved in the development of diabetic neuropathy and that MG may in part contribute to this oxidative stress-mediated injury of a cellular component in the peripheral nerve such as SCs under diabetic conditions.