



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。



【 143 】

氏 名・(本 籍) 福永 みちる (兵庫県)
博士の専攻分野の名称 博士(医学)
学 位 記 番 号 博い第1603号
学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当
学位授与の 日 付 平成16年3月31日

【 学位論文題目 】

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

審 査 委 員

主 査 教 授 千原 和夫
教 授 山村 博平
教 授 南 康博

【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、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-デオキシグルコソン(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、これらから形成する種々の AGEs 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、それ自身が細胞機能に影響を与える可能性が指摘されている。例えば、MG は、腎糸球体構成細胞であるメサンギウム細胞に対して、アポトーシスを誘導することが示され、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】Sprague-Dawley ラットの坐骨神経からシュワン細胞を初代培養し、1%FCS 含 DMEM 培養液で 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。(1)細胞生存率の評価：MTT assay の原理を利用して測定した。また、糖化反応阻害剤のアミノグアニジン(AG)の細胞生存率への影響を調べた。(2)アポトーシスの評価：TUNEL 法および電気泳動による DNA ラダー検出を行った。(3)阻害剤の効果：200 μ M の MG による刺激下で AG(100, 200 μ M)、抗酸化剤の N-acetyl-L-cysteine(NAC:0.2-20mM)および p38 MAPK 選択的阻害剤の

SB203580(0.1,1,10 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。(4)酸化ストレスの評価：糖尿病誘発 3 ヶ月後の STZ 糖尿病ラットと対照ラットの坐骨神経を用いて 8-OHdG に対する免疫染色を行った。

【結果】(1)培養シュワン細胞は MG によって濃度、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。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。(2)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。(3)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、MG200 μ M によるアポトーシスは AG、NAC、SB203580 の各種阻害剤によって抑制された。(4)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。

【考察】MG は、糖尿病状態で、種々の高血糖関連代謝経路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。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除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、以前に報告されたラットメサンギウム細胞の MG 刺激によるアポトーシス誘導の結果に類似しているため、糖尿病性細小血管症に共通した現象なのかもしれない。しかし、SC に対する濃度依存性の実験結果は、メサンギウム細胞の場合と比較して、より低い濃度の MG 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。

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も付加的にその抑制的効果に寄与

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。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。また、Tashiroらは、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。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1604号	氏名	福永みちる
論文題目	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		
審査委員	主査	千原和夫	
	副査	山本博平	
	副査	南康博	
審査終了日	平成16年3月17日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

糖尿病性神経障害の成因および発症機序についての詳細はまだ十分には明らかでない。糖尿病の合併症の進展に、高血糖による蛋白質の糖化反応（グリケーション）亢進が深く関与していることはほぼ間違いのない事実として受け入れられている。グリケーションは、グルコースなどの還元糖が生体内の様々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-デオキシシグルコソン（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）の形成に至る反応を指し、形成された種々の AGEs が糖尿病患者の組織中に蓄積していることが知られている。また、MG や 3-DG などのジカルボニル化合物が、AGEs の前駆体としてだけでなく、それ自身が細胞機能に影響を与える可能性が指摘されており、糖尿病の合併症進展に高反応性ジカルボニル化合物の意義が注目されている。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、そしてその機序に高反応性のジカルボニル化合物が関与する可能性が考えられている。そこで申請者は、高反応性ジカルボニル化合物の一つである 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。Sprague-Dawley ラットの坐骨神経から得たシュワン細胞を初代培養し、MG（0~400 μ M）で刺激したところ、培養シュワン細胞は MG によって濃度、時間依存性に細胞生存率が減少した。化学的に容易に MG をトラップすることが知られている AG を添加すると濃度依存性に生存率は回復した。100 μ M 以上の MG で刺激後 16 時間に、シュワン細胞縮小、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、24 時間後にはアポトーシスに特異的である DNA ラダーが検出された。MG によるアポトーシスは、抗酸化剤の N-acetyl-L-cysteine（NAC）によって抑制され、また 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ことより、MG のアポトーシス誘導作用には酸化ストレスの介在が示唆された。MG は細胞内の抗酸化ストレス酵素を修飾し活性を低下させ細胞内に生成した活性酸素を除去できなくなると考えられている。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注目されている p38MAPK の選択的阻害剤である SB203580 の添加により MG によるシュワン細胞のアポトーシスが抑制されたことよりこの経路の関与が推測される。

シュワン細胞のアポトーシスによる脱落から神経障害までの機序は想像の域を出ないが、おそらくシュワン細胞脱落の結果起こるミエリン鞘形成不全に起因す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、それらが相加的、相乗的に関与して糖尿病性神経障害をきたすと考えられる。

以上、本研究は、糖尿病性神経障害の成因について、グルコース由来ジカルボニル化合物の一つであるメチルグリオキサール（MG）のシュワン細胞に対する作用を研究したものであるが、従来知られていなかった MG がシュワン細胞のアポトーシスを促進することを初めて見出し、糖尿病性神経障害の機序の解明について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。