



The double-edged effect of insulin on the neuronal cell death associated with hypoglycemia on the hippocampal slice culture

Tanaka, Yoichiro

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-03-25

(Date of Publication)

2012-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4312

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004312>

※ 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。



氏 名 田中 陽一郎
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博い第 1912 号
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の日付 平成 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

The double-edged effect of insulin on the neuronal cell death associated with hypoglycemia on the hippocampal slice culture (低血糖下海馬培養切片における神経細胞死に対するインスリン作用の二面性)

審 査 委 員

主 査 教 授 前田 潔
教 授 寺島 俊雄
教 授 甲村 英二

背景と研究目的

低血糖や高血糖によって中枢神経系は障害され易く、インスリンが血中グルコース濃度の調節を司っている。

しかし、インスリンの中枢神経への作用は未だよく分かっていない。

近年、認知機能障害と2型糖尿病の疫学的関連が示唆され、インスリンシグナルの伝達障害が中枢神経の生存に影響する事が分かってきた。

例えば、2型糖尿病では脳内のインスリンは不足し、グリコーゲン合成酵素キナーゼ(GSK3)が活性化され、神経細胞死が誘発される。

また、虚血後にインスリンを使用すると脳傷害が軽減するが、これはインスリンに神経保護作用がある事を示唆している。インスリンは神経細胞の生存に不可欠である。

一方で、低血糖は中枢神経細胞にとって非常に悪影響を及ぼし、特に高齢者においては、夜間低血糖を起こさない程度の血糖コントロールが至適とされている。

1型糖尿病においては、過度のインスリン投与によって2~4%の患者が死亡している。

即ちインスリンは、中枢神経系において神経生存に必須であると共に、低血糖時には致死的な作用も有している。

今回我々は、特に低血糖時の、神経細胞の生存に関するインスリンの役割をより明らかにするため、培養海馬切片を用いて実験した。

方法と結果

生後9-11日のラットの海馬切片を37℃・5%CO₂のインキュベーターで14日間培養し、メディアムを各条件のものに交換した後、0時間、24時間、48時間、72時間におけるCA1及びDGの神経細胞死率を測定した。

CA1における神経細胞死に及ぼす血清の作用

培地に血清を入れた場合と入れなかった場合の細胞死率の違いを測定した。Glucose濃度は30mMとした。結果はSerum有りの条件の方がSerumなしの条件に比べて72時間値で神経細胞の生存率が良好であった。(%neuronal cell death : Serum+: 22.7±6.3%,Serum-: 40.8±6.2%)

CA1における神経細胞死に及ぼす低グルコース濃度の影響

Serumが無い環境で、様々なグルコース濃度(0mM,1mM,3mM,5mM,30mM)での細胞死率の違いを調べた。Glucose 0mMとGlucose 1mMは顕著に細胞死率が高くなり、48時間値では0mMで57.0±6.5%、Glucose 1mMで53.7±7.4%だった。細胞死率はグルコースの濃度に対してU字カーブを描き、Glucose 5mMで神経細胞死が最も抑制されていた。

DGにおける神経細胞死に及ぼす低グルコース濃度の影響

Serumが無い環境下において、様々なグルコース濃度

(0mM,1mM,3mM,5mM,30mM)で細胞死率の違いを調べた。Glucose 0mMは48時間値で59.2±5.3%の細胞死率であり最も高かった。Glucose 1mMは48時間値では14.5±5.0%の細胞死率が観察された。グルコース濃度による細胞死率のU字カーブ変化は認めなかった。

CA1における神経細胞死に及ぼすインスリンの作用

Serumが無い環境下において、様々なグルコース濃度(0mM,3mM,30mM)にインスリン1nMを入れた場合と、入れなかった場合の細胞死率の違いを調べた。CA1において、Glucose 3mMの条件にインスリンを混入した場合としない場合では48時間値で10.3±1.2%と38.1±9.1%、72時間値では22.4±3.8%と54.5±8.2%の細胞死率であり、インスリンを混入した場合の方が神経細胞死率が低かった。しかし、Glucose 0mMの場合は48時間値で67.0±10.5%と37.3±8.9%の細胞死率であり、インスリンを混入した方が混入しなかった方より神経細胞死率が高かった。

Glucose 30mMの場合は有意差を認めなかった。

DGにおける神経細胞死に及ぼすインスリンの作用

DGにおいても1nMインスリンを入れた場合と入れなかった場合の細胞死率の違いを調べた。DGでGlucose 3mMの条件にインスリンを混入した場合としない場合では72時間値で31.8±4.2%と46.6±4.1%の細胞死率が観察され、インスリンを混入した場合の方が有意に細胞死率が低かった。しかしGlucose 0mMの場合はインスリンを混入した方が混入しなかった方より神経細胞死率が高く、48時間値で47.2±9.2%と23.9±3.7%の細胞死率が観察された。Glucose 30mMの場合は有意差を認めなかった。

考察

今回我々が行った実験において、低グルコースの条件ではインスリンは神経細胞保護作用を示すが、グルコースが欠乏している条件では逆にインスリンが神経細胞死を増加させる事が示された。

更に、DGは低グルコースに対してCA1より耐性があるが、インスリンの神経保護効果はDGよりCA1の方が顕著である事が判明した。

血清の神経細胞栄養効果

血清を加えたメディアムでは、インスリン1nMのみを加えた場合より神経細胞死率が低かった。これは、血清中にはインスリンに加えて様々な因子が含まれる為それらが神経細胞保護作用を示した事によると思われる。神経栄養因子にはNGFやBDNF、ビタミンB群などがあり、アポトーシスを抑制し神経細胞の生存促進に働いている。我々の結果はそれに符合するものである。

CA1の低血糖に対する脆弱性

海馬には選択的脆弱性があり、特にCA1はストレスに対して最も脆弱な部位である。その発現機序の全容は未だ明らかではない。

グルコース欠乏の状態では細胞外グルタミン酸濃度が上昇する事が知られており、虚血刺激を施したマウスの海馬におけるグルタミン酸濃度はCA1 > DGである。

これらの事から選択的脆弱性にはグルタミンレセプターが関与していると考えられ、グルタミン酸濃度の違いが今回の選択的脆弱性をもたらした可能性がある。

更に低血糖に対するシナプス活性の保持はphosphofructokinase(PFK)活性とよく相関し、DGはCA1よりPFK活性が高い事も明らかとなっている。

今回の実験で、DGはグルコース1mMという低血糖の条件に対しCA1より耐性が認められ、神経細胞生存に関するグルコース依存度が低い事が示された。既知の現象ではあるが、選択的脆弱性の機序について更なる解明が望まれる。

低血糖時におけるインスリンの神経保護作用

今回、インスリン濃度が1nMになるように培地を調整した。

この濃度は50Kgの人間で換算すると約27単位のインスリンを皮下注射した後の血中インスリン濃度に相当し、臨床で使用されるインスリン量に非常に近い。

過去にはインスリン4nMでアポトーシスが抑制されたとする報告がある。

我々の実験では更に低濃度のインスリンで神経細胞死を抑制し得た。

CA1において、グルコース3mMにインスリン1nMを加え、神経細胞死が抑制された。

ではグルコース濃度がどのレベルを下回るとインスリンは神経細胞にとって有害になるのか、という疑問が残る。我々はグルコース1.5mM、及び2mMの条件で同様にインスリンを負荷した実験を行ったが、いずれもインスリンは神経細胞の生存に有利に働いた。

一方、DGではインスリンによる神経細胞死抑制効果は認められなかった。

インスリンはGLUT4のtranslocationを介して積極的に細胞内にグルコースを取り込み約50%をエネルギーに転換する。またMAPキナーゼを活性化するなど細胞増殖因子としても働き、神経細胞の生存を援助している。

更に、インスリンはBDNFの発現を誘導する。これらの因子の連携は神経細胞の代謝調節において重要な役割を担っていると考えられ、神経細胞死の抑制に働くと思われる。CA1で神経細胞死が抑制されDGでは抑制されなかった理由は、CA1の方がDGよりインスリン感受性が高い為と考えられる。実際、CA1の方がDGよりGLUT4のmRNAが多く発現している。

また、脳内でのインスリンシグナルの低下はGSK3活性を増加させ、神経細

胞死を引き起こす事が分かっているが、GSK3は海馬では特に錐体細胞が豊富なCA1に多量に発現しているためインスリンシグナルの影響を受け易いと考えられる。

グルコース欠乏時におけるインスリンの細胞障害作用

グルコースが欠乏している条件では、意外にもインスリンが神経細胞死を増加させた。

これには以下のようなインスリンの機序が関与していると推測される。

インスリンの副次的な作用として、アミノ酸代謝や脂質代謝に影響し蛋白合成や脂質生成を促進する事で細胞のグルコース以外の基質利用を抑制するというものがある。

従って、十分なグルコースが存在しない環境下ではインスリンが細胞生存にネガティブに働く可能性がある。

また、AMPKは低酸素組織内のグルコース輸送の促進を行っているが、虚血心筋においてインスリンはAMPKの活性を減少させると報告されている。

同様の現象が神経細胞にも起こり、グルコース欠乏の状態ではインスリンが神経生存にネガティブに働いている可能性がある。

興味深い事に、in vivo の実験でもインスリンの神経保護効果はU字カーブを描き、グルコース濃度6-7mMで神経細胞死は最小限となるが、2-3mM以下では神経細胞死を促進させた、と報告されている。

結論

本実験により、中枢神経系においてインスリンが二面的な作用を持つ事が示唆された。

適切な濃度のグルコース存在下ではインスリンは神経細胞保護効果を示したが、低血糖時はインスリンの作用によって神経細胞死が促進された。

この機序を分子生物学的レベルで更に解明する事により、臨床現場において糖尿病治療での中枢神経合併症を防ぎ、より良い治療の提供につながる可能性がある。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|----------------------------------|---|-----|--------|
| 受付番号 | 甲 第 1913 号 | 氏 名 | 田中 陽一郎 |
| 論文題目 Title of Dissertation | <p>The double-edged effect of insulin on the neuronal cell death associated with hypoglycemia on the hippocampal slice culture</p> <p>低血糖下海馬培養切片における神経細胞死に対するインスリン作用の二面性</p> | | |
| 審査委員 Examiner | <p>主 査 本田 深</p> <p>Chief Examiner</p> <p>副 査 寺島 俊雄</p> <p>Vice-examiner</p> <p>副 査 甲村 英之</p> <p>Vice-examiner</p> | | |
| 審査終了日 | 平成 20 年 2 月 20 日 | | |

(要旨は1,000字～2,000字程度)

背景と研究目的

低血糖や高血糖によって中枢神経系は障害され易く、インスリンが血中グルコース濃度の調節を司っている。

しかし、インスリンの中枢神経への作用は未だよく分かっていない。

近年、認知機能障害と2型糖尿病の疫学的関連が示唆され、インスリンシグナルの伝達障害が中枢神経の生存に影響する事が分かってきた。

インスリンは神経細胞の生存に不可欠であるが、一方で低血糖は中枢神経細胞にとって非常に悪影響を及ぼし、時には致死的な作用も有している。

今回我々は、特に低血糖時の、神経細胞の生存に関するインスリンの役割をより明らかにする為実験を行った。

方法

生後9-11日のラットの海馬切片を37℃・5%CO₂のインキュベーターで14日間培養し、メディアウムを各条件のものに交換した後、0時間、24時間、48時間、72時間におけるCA1及びDGの神経細胞死率を測定した。

結果及び考察

血清の神経細胞栄養効果

血清を加えたメディアウムでは、インスリン1nMのみを加えた場合より神経細胞死率が低かった。血清中にはインスリンに加えて様々な神経栄養因子が含まれ、神経細胞の生存促進に働いている。我々の結果はそれに符合する。

CA1の低血糖に対する脆弱性

海馬の選択的脆弱性の詳細な発現機序は未だ明らかではない。

グルコース欠乏の状態では細胞外グルタミン酸濃度が上昇し、その濃度はCA1>DGである。よって選択的脆弱性にグルタミンレセプターが関与が示唆される。

更に低血糖に対するシナプス活性の保持はphosphofructokinase(PFK)活性とよく相関し、DGはCA1よりPFK活性が高い事も明らかとなっている。

今回の実験で、DGはグルコース1mMという低血糖の条件に対しCA1より耐性が認められ、神経細胞生存に関するグルコース依存度が低い事が示された。

低血糖時におけるインスリンの神経保護作用

培地のインスリン濃度は1nMで、50Kgの人間では約27単位のインスリンを皮下注射した後の血中インスリン濃度に相当する。臨床で使用されるインスリン量に非常に近い。

過去にはインスリン4nMでアポトーシスが抑制されたとする報告があるが、我々の実験では更に低濃度である。

CA1において、グルコース3mMにインスリン1nMを加え、神経細胞死が抑制

された。

グルコース濃度がどのレベルを下回るとインスリンは神経細胞にとって有害になるのか、という疑問に対しグルコース1.5mM、及び2mMの条件でインスリンを負荷したが、いずれも神経細胞の生存に有利に働いた。

一方、DGではインスリンによる神経細胞死抑制効果は認めなかった。

インスリンはGLUT4のtranslocationを発端にエネルギーを産生し、またMAPキナーゼを活性化するなど細胞増殖因子としても働く。

更に、インスリンはBDNFの発現を誘導する。これらの因子が持つ細胞の代謝調節機能により神経細胞死は抑制されると思われる。CA1でのみ神経細胞死が抑制された理由は、CA1の方がDGよりインスリン感受性が高い為と思われる。実際、CA1の方がGLUT4のmRNAが多く発現している。

また、脳内でのインスリンシグナルの低下はGSK3活性を増加させ神経細胞死を引き起こす。このGSK3は海馬では特に錐体細胞が豊富なCA1に多量に発現しているためインスリンシグナルの影響を受け易いと考えられる。

グルコース欠乏時におけるインスリンの細胞障害作用

グルコースが欠乏している条件では、意外にもインスリンが神経細胞死を増加させた。

インスリンの副次的な作用として、蛋白合成や脂質生成を促進する事でグルコース以外の基質利用を抑制する機序があり、十分なグルコースが存在しない環境下では細胞生存にネガティブに働く可能性がある。

また、AMPKは低酸素組織内のグルコース輸送の促進を行っているが、虚血心筋においてインスリンはAMPKの活性を減少させる。

同様の現象が神経細胞にも起こり、グルコース欠乏の状態ではインスリンが神経生存にネガティブに働いている可能性がある。

興味深い事に、in vivo の実験でもインスリンの神経保護効果はU字カーブを描き、グルコース濃度6-7mMで神経細胞死は最小限となるが、2-3mM以下では神経細胞死を促進させたと報告されている。

結論

本実験により、中枢神経系においてインスリンが二面的な作用を持つ事が示唆された。

適切な濃度のグルコース存在下ではインスリンは神経細胞保護効果を示したが、低血糖時はインスリンの作用によって神経細胞死が促進された。

また低血糖時の選択的脆弱性に対し、CA1でのみインスリンの保護効果が認められ、DGでは認められなかった。

この機序を分子生物学的レベルで更に解明する事により、臨床現場において糖尿病治療での中枢神経合併症を防ぎ、より良い治療の提供につながる可能

性がある。

本研究はラット海馬培養切片における神経細胞死について、その血糖地の影響を検討したものであるが、従来ほとんど行われなかったインスリン作用の二面性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。