

学位論文の要旨

課程博士	医学博士	氏 名	石関 哉生
学位論文の題目 High Glucose Increases the Expression of Neurokinin1 Receptors in Cultured Neonatal Rat Spinal Neurons (培養ラット脊髄神経細胞における高濃度ブドウ糖による ニューロキニン 1 受容体の発現亢進) 共 著 者 名 安孫子 亜津子、伊藤 博史、平野 史倫、滝山 由美、羽田 勝計 未 公 表 研 究 目 的 糖尿病の合併症である末梢神経障害の症状に知覚過敏状態がある。近年、知覚過敏の発症機序の一つとして脊髄神経細胞におけるニューロキニン 1(NK1)受容体の発現亢進が関与していると言われている。NK1 受容体は脊髄後角の神経細胞に存在し、ニューロペプチドであるサブスタンス P をリガンドとする受容体で、痛覚伝導に重要であると言われている。これまで NK1 受容体の発現をコントロールするものとして、サイクリック AMP(cAMP)、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)、CGRP 受容体、細胞内 Ca²⁺、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA) 受容体、Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼなどが挙げられている。糖尿病モデルラットに NK1 受容体のアンタゴニストを投与すると、高血糖から引き起こされた知覚過敏状態が改善したとの報告があり、NK1 受容体は糖尿病神経障害における知覚過敏の発症に関与している可能性が考えられている。また高血糖状態では細胞内で様々な代謝異常が引き起こされており、おもな既知の代謝異常として、酸化ストレスの発生、プロテインキナーゼ C の活性化、ポリオール経路の活性化、糖化最終産物の産生などが糖尿病性合併症の発症に関連していると言われている。さらに酸化ストレスの発生機序にはグルコースの自動酸化、グルタチオンサ			

イクルの障害、ヘキソサミン経路亢進、NAD(P)H オキシダーゼの活性化、ミトコンドリア由来活性酸素産生などがある。

今回我々はブドウ糖が脊髄神経細胞において NK1 受容体の発現調節に関与しているという仮説を立て、培養神経細胞を用いて、培養液中の糖濃度と NK1 受容体の発現の関連を検討し、さらにその機序についても検討した。

材 料 ・ 方 法

生後 1 日齢の新生 Wister ラットから脊髄を摘出し、トリプシン消化で細胞を分離した。非コートディッシュにて DMEM+20%FBS で 3 時間培養することで非神経細胞を接地させた後、浮遊細胞を回収し、ポリ-L-リジンコートディッシュで 2 時間培養した。その後培地を非血清 DMEM に切り替えて培養した細胞を実験に用いた。培養細胞は PGP9.5 による免疫染色で神経細胞の同定を行った。培地を D グルコースの濃度で低糖濃度(5.6mmol/l)と高糖濃度(25mmol/l)として、8 日間の培養後、RT-PCR 法および Western Blot 法で NK1 受容体の発現を検討した。CGRP の発現は RT-PCR 法で検討した。高糖濃度から引き起こされる細胞内代謝異常の影響を明らかにするために、同細胞を 7 日間培養後、プロテインキナーゼ A 阻害薬(PKAI)、プロテインキナーゼ C 阻害薬(PKCI)、抗酸化剤である α リポ酸(α LA)、アルドース還元酵素阻害薬(ARI)を 24 時間添加した後、同様に NK1 受容体の発現を検討した。細胞内 cAMP 濃度は ELISA 法で測定した。細胞内の酸化ストレス状態はジヒドロエチジウムで活性酸素を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

成 績

新生ラット脊髄から単離した培養細胞を PGP9.5 で免疫染色した結果、約 85%の細胞が染色陽性であり、脊髄神経細胞として実験に用いた。神経細胞を 8 日間培養し NK1 受容体の発現を検討したところ、低糖濃度培地で培養した細胞に比較して高糖濃度培地で培養した細胞で NK1 受容体の mRNA 発現亢進および蛋白量の増加が認められた。この mRNA 発現亢進は L グルコースを加えた高浸透圧下の培養では認められなかった。神経細胞に dibutyryl-cAMP を添加したところ、濃度依存性に NK1 受容体 mRNA 発現亢進を認め、その発現は高糖濃度培養で有意に増加していた。高糖濃度培養した神経細胞では CGRP の mRNA 発現も増加していたが、細胞内の cAMP 濃度は低糖濃度培養と高糖濃度培養で差はなかった。CGRP のアンタゴニスト添加によって、糖濃度による NK1 受容体 mRNA 発現には影響を与えなかった。各種阻害薬を添加した結果、PKAI、PKCI、ARI では高糖濃度培養による NK1 受容体発現亢進に影響なかったが、 α LA の添加で NK1 受容体の発現亢進が抑制され、その効果は α LA 濃

度に依存していた。他の抗酸化剤を添加した結果、ミトコンドリア由来活性酸素の阻害薬添加で α LAと同等の抑制効果が見られた。ジヒドロエチジウム染色の結果、培養細胞内の酸化ストレスは高糖濃度培養にて増加しており、 α LA添加濃度に依存して酸化ストレスの程度は抑制されていることが確認された。

考 案

培養脊髄神経細胞では高糖濃度培養でNK1受容体の発現が亢進しており、その発現亢進に高糖濃度培養で引き起こされた細胞内の酸化ストレスが関与している可能性が考えられ、特にミトコンドリア由来の酸化ストレスが影響していることが示唆された。これまで報告されていたNK1受容体発現をコントロールする因子の一つであるCGRPについては、今回の細胞で、高糖濃度培養で発現亢進が認められたが、細胞内cAMP濃度上昇がないことと、PKAIでNK1受容体発現抑制がなかったことからその関与は否定的と考えた。NMDA受容体や細胞内 Ca^{2+} との関連は検討していず、関与を否定することはできなかった。酸化ストレスによるNK1受容体の発現亢進についての機序についても更なる検討が必要である。これまで糖尿病神経障害に対する α リポ酸の効果が糖尿病モデル動物による実験や臨床試験から報告されている。今回の我々の結果から、糖尿病神経障害における知覚過敏の発症機序解明と、今後の糖尿病神経障害治療薬の開発にNK1受容体の一つのターゲットとなりうる可能性が示唆される。

結 論

培養神経細胞において、NK1受容体は高糖濃度培養にて発現亢進していた。その発現亢進は抗酸化剤で抑制され、酸化ストレスがNK1受容体の発現に関与している可能性が考えられた。

引 用 文 献

Abrahams, L.G., et al., *Cyclic AMP regulates the expression of neurokinin1 receptors by neonatal rat spinal neurons in culture*. J Neurochem, 1999. 73(1): p. 50-8.

Seybold, V.S., et al. *Calcitonin gene-related peptide regulates expression of neurokinin1 receptors by rat spinal neurons*. J Neurosci, 2003. 23(5): p. 1816-24.

Deloulme, J.C., J. Baudier, and M. Sensenbrenner, *Establishment of pure neuronal cultures from fetal rat spinal cord and proliferation of the neuronal precursor cells in the presence of fibroblast growth factor*. J Neurosci Res, 1991. **29**(4): p. 499-509.

学位論文の審査結果の要旨

報 告 番 号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	石 関 哉 生
<u>審査委員長 田 中 達 也 ㊞</u> <u>審査委員 吉 田 成 孝 ㊞</u> <u>審査委員 羽 田 勝 計 ㊞</u>			
学 位 論 文 題 目			
High Glucose Increases the Expression of Neurokinin1 Receptors in Cultured Neonatal Rat Spinal Neurons （培養ラット脊髄神経細胞における高濃度ブドウ糖によるニューロキニン1受容体の発現亢進）			
本論文は糖尿病患者に認められる知覚過敏の一つの要因として、脊髄神経細胞における痛覚モジュレーターである Substance P 受容体のニューロキニン1（NK1）受容体の増加を、培養脊髄神経細胞を用いて説明しようと試みた研究である。 生後1日齢の Wistar ラットより取り出した脊髄から、神経細胞を分離し実験に用いた。培養に用いる培地の糖濃度を高糖濃度（450mg/dl）および通常糖濃度（100mg/dl）とし培養を行った。高糖濃度で培養された細胞での NK1 受容体の発現亢進を認め、またその亢進は高糖濃度による高浸透圧の影響ではないことも示された。			

次に、強力な抗酸化作用をもつ α リボ酸を培地に添加したところ α リボ酸濃度依存性に高糖濃度による NK1 受容体の発現亢進が抑制され、高糖濃度による NK1 受容体の発現亢進に細胞における酸化ストレス亢進が関与している可能性を示した。培養細胞内の酸化ストレスの程度をジヒドロエチジウム染色で検討したところ、酸化ストレスは高糖濃度培養にて増加しており、 α リボ酸添加濃度に依存して酸化ストレスは抑制されることが確認された。また、酸化ストレスの発生源を検討したところ、ミトコンドリア由来活性酸素の阻害薬添加で α リボ酸と同等の抑制効果を得られた。

以上の結果から脊髄神経細胞における NK1 受容体は高糖濃度で発現亢進することが示され、高糖濃度により誘発された細胞内の酸化ストレスの亢進が関与していることが示された。

本論文は糖尿病神経障害における知覚過敏状態を脊髄神経細胞での受容体発現亢進にその原因があることをはじめて示したもので、今後糖尿病神経障害の病態解明に大きく貢献することが期待できる。なお、論文提出者に対し各審査委員より、本論文とその関連領域に関して試問が行われ、適切な回答が得られた。以上より本論文は博士の学位論文として適切であると判定した。