

氏名(本籍)	阪上 芳 男 (大阪府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第436号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成15年3月27日
学位論文題目	<b>Amelioration of retarded neurite outgrowth of dorsal root ganglion neurons by overexpression of PKC <math>\delta</math> in diabetic rats</b> (PKC $\delta$ の強発現による糖尿病ラット後根神経節神経細胞の神経突起伸張遅延の改善)

審査委員	主査 教授	新 井 良 八
	副査 教授	工 藤 基
	副査 教授	可 児 一 孝

## 論文内容要旨

### 【目的】

糖尿病性神経障害の成因仮説の1つに末梢神経再生障害がある。一方、神経再生にはProtein kinase C (PKC) の活性が密接に関与することが報告されている。現在、PKCには11種のサブタイプが報告されており、構造上、classical PKC ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )、novel PKC ( $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\eta$ 、 $\theta$ 、 $\mu$ ) atypical PKC ( $\zeta$ 、 $\iota$ 、 $\lambda$ ) の3群に分けられている。その中でもPKC  $\beta$  の活性亢進が糖尿病合併症の伸展に重要な役割を果たしていることが示唆されている。他方、novel PKCの1つであるPKC  $\delta$  は神経細胞の神経突起伸展に重要な役割を果たすことが報告されているが、糖尿病状態における神経細胞のPKC  $\delta$  活性については明らかではない。そこで、糖尿病における末梢神経再生障害にPKC活性が密接に関与しているという可能性を検証するため、後根神経節 (DRG) 神経細胞を用いて糖尿病状態における軸索再生とPKC、特にPKC  $\delta$  の関係について検討した。

### 【方法】

1) 6週齢Sprague-Dawleyラットにstreptozocinを投与して糖尿病ラットを作成した。12-16週間飼育後L4-L5レベルのDRGニューロンを単離培養し、72時間後、神経突起を有する神経細胞の比率(%neurons with neurites (%NN))を同週齢の対照ラットと比較した。2) 対照ラットのDRGニューロンにclassical PKC阻害薬Gö6979及びPKC  $\delta$  特異的阻害薬であるRottlerinを加え%NNの変化を比較した。3) PKC  $\delta$  活性をphosph-PKC  $\delta$  (pPKC  $\delta$ ) の割合にて比較検討した。即ち、L4-L5レベルのDRGを可溶化した後、抗PKC  $\delta$  抗体にて免疫沈降を行い、抗pPKC抗体にてimmunoblottingを行った。さらに抗PKC  $\delta$  抗体にてre-blottingを行い、pPKC  $\delta$  とPKC  $\delta$  の発現比をNIH imageを用いて解析した。4) 糖尿病ラット由来のDRGニューロンにadenovirus vectorを用いてPKC  $\delta$  を強発現させ、%NNの変化を検討した。

### 【結果】

1) 単離72時間後の細胞体の形態は対照群、糖尿病群間で有意な変化を認めなかった。しかし、%NNは糖尿病群で有意に低下しており(対照群;  $62.7 \pm 3.0\%$ 、糖尿病群;  $40.8 \pm 2.9\%$ )、神経突起の長さも糖尿病群で短かった。2) Gö6979 (8nM) は対照群DRGニューロンの%NNに影響を与えなかったが、Rottlerin (5  $\mu$ M) は%NNを有意に低下させた(対照群;  $59.9 \pm 6.8\%$ 、Gö6979;  $53.6 \pm 8.7\%$ 、Rottlerin;  $37.0 \pm 5.2\%$ )。3) PKC  $\delta$  の発現は対照群・糖尿病群間で差を認めなかったが、そのリン酸化は糖尿病群で有意に低下していた。4) human wild-type PKC  $\delta$  を組み込ん

だadenovirusを糖尿病ラット由来のDRGニューロンに感染させたところ、神経突起の伸展は有意に改善し、%NNが非感染群に比して有意に上昇した。この改善はPKC $\delta$ が入っていないadenovirusを感染させた場合見られなかった。PKC $\delta$ が強発現されていることは免疫細胞染色及びimmunoblottingにて確認され、またpPKC $\delta$ が増加していることもimmunoblottingで確認された。

#### 【考 察】

糖尿病における末梢神経再生障害についてはin vivo系での報告が多い。一方、糖尿病の神経細胞の軸索伸展をin vitroで観察した成績では、我々の成績とは反対に神経突起再生の亢進を認めた報告もある。この所見の乖離については、実験に用いた動物種、糖尿病罹病期間、培養方法の違いなどが関与していると思われる。また、糖尿病合併症の発症機序としてPKCの活性亢進が報告されているが、神経障害に関しては活性低下が病態に関与しているとの報告もあり、PKCサブタイプにより活性が異なることが起因していると思われる。PKCサブタイプの活性が糖尿病性神経障害でどのように変化しているかは坐骨神経（軸索及びシュワン細胞）では報告間で結果が異なり、DRG（神経細胞体）ではほとんど報告がない。特にDRGにおいてはPKC $\delta$ も含めnovel PKCの活性に関する報告は皆無である。今回我々が得た知見は糖尿病での神経細胞体におけるnovel PKC活性とその意義を検討した最初の報告であり、糖尿病性神経障害の成因の究明と治療の開発に新しい局面を呈するものと考えられる。

#### 【結 論】

糖尿病における末梢神経再生障害をin vitroの系で確認した。糖尿病状態の神経細胞ではPKC $\delta$ のリン酸化が低下しており、またphospho-PKC $\delta$ の強発現にて再生障害が改善したことにより発症機序にPKC $\delta$ の活性低下が関与している可能性が示唆された。

## 学 位 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は糖尿病ラットにおいて、神経突起伸長とprotein kinase C $\delta$ 活性の関係を検討した。糖尿病ラットおよび正常ラットの後根神経節の単離培養神経細胞において、光学顕微鏡観察法と免疫ブロッティング法を用いて、次の3点を明らかにした。①糖尿病ラットでは正常ラットに比べて、神経突起の伸長が抑制され、リン酸化protein kinase C $\delta$ 蛋白量が減少していた。②正常ラットにおいて、protein kinase C $\delta$ 活性の阻害薬は神経突起の伸長を抑制した。③糖尿病ラットにおいて、adenovirus vectorによるprotein kinase C $\delta$ の強発現は、神経突起の伸長を改善した。以上の結果は、糖尿病ラットにおいて見られた神経突起伸長能の低下に、protein kinase C $\delta$ 活性の低下が関与することを示唆した。

本研究は糖尿病性神経障害の発症機構に、protein kinase C $\delta$ 活性の低下が関与することを支持する初めての報告である。従って、博士（医学）の授与に値するものと判定した。