

氏 名 (本 籍)	田 原 将 行 (兵庫県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 3 2 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 8 年 9 月 1 3 日
学 位 論 文 題 目	Effect of protein kinase Cbeta inhibitor on Ca ²⁺ homeostasis in diabetic sensory neurons (糖尿病性神経障害の一次感覚ニューロンでのカルシウム恒常性に対する PKC β 阻害剤の効果)
審 査 委 員	主 査 教 授 木 村 宏 副 査 教 授 堀 池 喜 八 郎 副 査 教 授 岡 村 富 夫

論文内容要旨

※整理番号	537	(ふりがな) 氏名	たはら 田原 まさゆき 将行
学位論文題目	Effect of protein kinase C beta inhibitor on Ca ²⁺ homeostasis in diabetic sensory neurons (糖尿病性神経障害の一次感覚ニューロンでのカルシウム恒常性に対する PKC β 阻害剤の効果)		
<p>目的：糖尿病性神経障害の成因としてポリオール代謝異常、酸化ストレス、血管障害等と共にプロテインキナーゼ C (以下 PKC) 活性異常の重要性が指摘されている。現在、PKC 活性化仮説に基づきその阻害薬 LY333531 (以下 LY) は、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症と並び、糖尿病性神経障害に対しての臨床治験が進行中である。これまでの糖尿病モデル動物を用いた報告では、同薬の作用点として血流改善効果を介した神経機能改善が報告されている。我々は PKC β が感覚神経の一次ニューロンである後根神経節 (以下 DRG) ニューロン、特に小径ニューロンに局在し、かつ、その活性が亢進していることを報告しており、血流改善を介した作用以外に DRG ニューロンへの直接作用を介した痛覚過敏改善効果を報告している。そこで、PKC β の糖尿病性神経障害の病態における役割と LY の効果を、特に感覚ニューロンへの直接作用を検討する目的で後根神経節 (以下 DRG) ニューロンの初代培養系を用いて検討した。この際、特に疼痛も含めたニューロンの機能発現に密接に関与する Ca 恒常性の観点から検討した。</p> <p>方法：8週令雄性 SD ラットの尾静脈にストレプトゾトシン (50mg/kg) 注射し、一週間後に血糖 20mm 以上のものを糖尿病モデルとした。6～8週後に両側 L4、L5 の DRG を採取し、翌日使用した。細胞内 Ca 測定は、蛍光色素 fura-2/AM (5 μM、30分間)、ミトコンドリアの膜電位測定は、Rhodamine 123 (5 μM、30分間) を DRG ニューロンに取り込ませた。Poly-L-lysine でコートした径 1.8mm のカバーガラス上に接着させた DRG ニューロンを約 4 ml/min、37°C の保った Tyrode solution で持続灌流している蛍光顕微鏡上 (IX70) で 5 秒ごとに観察した。励起光は LAMDA DG-4 を使用し、冷却 CCD カメラ Cool SNAP HQ で観察を行った。脱分極刺激としては 50mMKCl を使用し、細胞内 Ca 濃度は、Grynkiewicz の式より計算した。ミトコンドリアの膜電位は、膜電位を消失させる CCCP を用いた方法により半定量的に評価した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

結果：1. 糖尿病モデルラットの DRG ニューロンにおいては、正常 DRG ニューロンと比較し、安静時 Ca 濃度、及び 50mMKCl 脱分極刺激による細胞内 Ca 流入（ピーク Ca 濃度－安静時 Ca 濃度）には差が見られなかったが、その回復過程は遅延していた。結果 2. LY は濃度依存性に、その遅延した Ca 回復時間を改善した。また、その作用は急性（1～3分）かつ可逆性であり濃度依存性を示したが、安静時には細胞外からの Ca 流入に影響を与えることはなかった。結果 3. その作用はミトコンドリアカルシウムユニポーター阻害剤 Ruthenium 360 で抑制され、LY はミトコンドリアに作用して効果を示すと考えられた。また、糖尿病 DRG ニューロンにおいては、同阻害剤への反応性は低く、Ca 回復時間の延長がほとんど見られなかった。このことより、カルシウム緩衝能に関して糖尿病 DRG ニューロンにおけるミトコンドリア機能異常が示唆された。結果 4. ミトコンドリア膜電位は、糖尿病 DRG ニューロンで低下していたが、LY は有意な変化を与えなかった。

考察：これらのことは、糖尿病性神経障害モデル動物において神経機能改善効果を示す LY が、一部には、感覚神経自体に直接作用してその効果を発揮している可能性を示唆している。また、糖尿病ラット DRG ニューロンでは Ca 恒常性異常があり、その一部は、ミトコンドリア機能異常に伴うものであると考えられた。LY の改善効果の作用機序はミトコンドリア膜電位を介することなく、ミトコンドリアの Ca 緩衝能を改善している可能性が示唆された。

結論：糖尿病性神経障害に対する PKC β 阻害剤は、感覚神経への直接作用を持っており、その作用機序として、ミトコンドリアを介して異常なカルシウム恒常性を改善させる可能性がある。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	537	氏名	田原 将行
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>糖尿病モデルラットの感覚ニューロンに対するプロテインキナーゼ Cβ (PKCβ) 阻害剤 LY333531(LY) の直接効果を評価するため、後根神経節の初代培養ニューロンにおける細胞内カルシウム (Ca) 濃度を蛍光 Ca²⁺指示薬 fura-2 を用いて検討した。その結果、1) 対照ラットに比べ糖尿病モデルでは、高 K⁺脱分極刺激による小型ニューロン細胞内 Ca 濃度上昇からの回復時間が遅延すること、2) LY はこの遅延現象を濃度依存性に急速かつ可逆的に正常化すること、3) この LY による効果はミトコンドリア Ca ユニポーター阻害剤ルテニウム 360 の前処理によって完全に拮抗されること、等が判明した。</p> <p>以上の結果から、PKCβ 阻害剤は糖尿病性神経障害における感覚神経のミトコンドリア Ca 緩衝能の改善を介し、病的 Ca 恒常性を正常化するものと示唆された。</p> <p>本研究は、糖尿病性神経障害の新しい治療法の開拓に大きく寄与するものであり、博士 (医学) の授与に値すると判定された。</p> <p style="text-align: right;">(平成18年 8月30日)</p>			