

学位授与番号：甲 963 号

氏 名：金澤 康

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 26 年 3 月 12 日

学位論文名：

Rho-kinase 阻害薬ファスジルは、シュワン細胞のミエリン形成において適切な接着関連因子の分布を促し、糖尿病ラットにおける運動神経伝導速度を正常化する

主論文名：

The Rho-kinase inhibitor fasudil restores normal motor nerve conduction velocity in diabetic rats by assuring the proper localization of adhesion-related molecules in myelinating Schwann cells.

(Rho-kinase 阻害薬ファスジルは、シュワン細胞のミエリン形成において適切な接着関連因子の分布を促し、糖尿病ラットにおける運動神経伝導速度を正常化する)

学位審査委員長：教授 靱山俊彦

学位審査委員：教授 加藤総夫 教授 井口保之

学 位 論 文 要 旨

論文提出者名

金澤 康

指導教授名 宇都宮 一典

主論文：

The Rho-kinase inhibitor fasudil restores normal motor nerve conduction velocity in diabetic rats by assuring the proper localization of adhesion-related molecules in myelinating Schwann cells.

(Rho-kinase 阻害薬ファスジルは、シュワン細胞のミエリン形成において適切な接着関連因子の分布を促し、糖尿病ラットにおける運動神経伝導速度を正常化する。)

Experimental Neurology. 2013 September; 247:438-46

Rho-kinase は、低分子量 G 蛋白 Rho の標的蛋白質として同定されたセリン-スレオニンリン酸化酵素で、細胞骨格構築、細胞の運動、接着制御などに関与する。糖尿病性神経障害と Rho/Rho-kinase シグナルの連関について検討した。また糖尿病による神経障害発症機転として、有髄神経におけるシュワン細胞の軸索へのカドヘリン依存的な接着結合に注目し、E-cadherin(E-cad)、またその接着の安定性を司る p120-catenin(p120 ctn)、 β -catenin(β)の坐骨神経における発現、分布の変化について検討した。

1 型糖尿病モデルラットを作製。糖尿病無治療群(無治療群)とし、対照群および連日 Rho-kinase 阻害薬である Fasudil 投与を行う糖尿病 Fasudil 治療群(糖尿病治療群)、対照 Fasudil 治療群(対照治療群)とともに、4 週間飼育を行った。4 週間後に、各群の坐骨神経における運動神経伝導速度(MNCV)を測定。また飼育開始時より 1 週間毎に、熱刺激に対し逃避反応を示すまでの潜時を測定し、各々運動神経障害、感覚神経障害の評価を行った。

また坐骨神経から採取した蛋白上精を使用し、RhoA 活性、Rho-kinase 活性の各群間の変化について評価検討を行った。

組織学的評価として、Schmidt-Lanterman 切痕(S-L)における E-cad、 β 、p120 ctn の染色性、分布の変化を評価、検討を行った。免疫染色標本から、S-L における染色性により 4 段階に点数化し、各群で集計、評価した。また E-cad、p120 ctn、 β の坐骨神経における蛋白発現の変化を、免疫ブロット法を用いて評価検討を行った。

4 週間後、MNCV は無治療群で対照群と比較し約 30%遅延し、糖尿病治療群では遅延を認めず。また熱刺激に対する反応潜時は無治療群で有意に短縮し過敏状態を示したが、糖尿病治療群ではその変化を認めなかった。

RhoA および Rho-kinase 活性は、無治療群で対照群と比較し有意に亢進し、Rho-kinase 活性は糖尿病治療群で抑制された。対照治療群で対照群と比較し Rho-kinase 活性が有意に抑制され、RhoA 活性は有意に亢進を認めた。

S-L の染色性は、E-cad、p120 ctn で対照群に比し不明瞭となり、糖尿病治療群でその傾向が改善したが、 β は 3 群間で分布の変化は認められなかった。

また坐骨神経において E-cad の蛋白発現は無治療群で低下する傾向にあり、p120 ctn は無治療群で有意に低下、糖尿病治療群でそれが抑制された。対照治療群では E-cad、p120 ctn の蛋白発現は有意に亢進したが、 β の発現は 4 群間で有意な変化を認めなかった。

糖尿病性神経障害の成立機転に Rho/Rho-kinase 活性亢進の関与が考えられた。高血糖下での Rho/Rho-kinase 系の亢進が p120 ctn の発現を変化させ、細胞膜での E-cad の安定性を低下させることが考えられる。シュワン細胞と軸索との接着性を脆弱化が、糖尿病性神経障害発症・進展の一因となる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

金澤康氏の学位申請論文は主論文 1 編からなり、タイトルは、

“The Rho-kinase inhibitor fasudil restores normal motor nerve conduction velocity in diabetic rats by assuring the proper localization of adhesion-related molecules in myelinating Schwann cells. ”、日本語では「Rho-kinase 阻害薬ファスジルは、シュワン細胞のミエリン形成において適切な接着関連因子の分布を促し、糖尿病ラットにおける運動神経伝導速度を正常化する。」であり、2013 年 9 月に、*Experimental Neurology* 誌の 247 巻 438-46 ページに公表された。その要旨は以下の通りである。

Rho-kinase は、低分子量 G 蛋白 Rho の標的蛋白質として同定されたセリン-スレオニンリン酸化酵素で、細胞骨格構築、細胞の運動、接着制御などに関与する。本研究では、糖尿病性神経障害と Rho/Rho-kinase シグナルの連関、また糖尿病による神経障害発症機転として、有髄神経におけるシュワン細胞の軸索へのカドヘリン依存的な接着結合に注目し、E-cadherin (E-cad)、またその接着の安定性を司る p120-catenin (p120 ctn)、 β -catenin (β)の坐骨神経における発現、分布の変化について検討した。

1 型糖尿病モデルラットを作製して糖尿病無治療群(無治療群)とし、対照群および連日 Rho-kinase 阻害薬である Fasudil 投与を行う糖尿病 Fasudil 治療群(糖尿病治療群)、対照 Fasudil 治療群(対照治療群)とともに、4 週間飼育を行った。4 週間後に、各群の坐骨神経における運動神経伝導速度 (MNCV)を測定。また飼育開始時より 1 週間毎に、熱刺激に対し逃避反応を示すまでの潜時を測定し、各々運動神経障害、感覚神経障害の評価を行った。

また坐骨神経から採取した蛋白上精を使用し、RhoA、Rho-kinase 活性の各群間の変化について評価、検討した。

組織学的評価として、Schmidt-Lanterman 切痕(S-L)における E-cad、 β 、p120 ctn の染色性、分布の変化を評価、検討した。免疫染色標本から、S-L における染色性により 4 段階に点数化し、各群で集計、評価した。また E-cad、p120 ctn、 β の坐骨神経における蛋白発現の変化を、免疫ブロット法を用いて検討した。

4 週間後、MNCV は無治療群で対照群と比較し約 30%遅延し、糖尿病治療群では遅延を認めず、また熱刺激に対する反応潜時は無治療群で有意に短縮し過敏状態を示したが、糖尿病治療群ではその変化を認めなかった。

RhoA および Rho-kinase 活性は、無治療群で対照群と比較し有意に亢進し、Rho-kinase 活性は糖尿病治療群で抑制された。対照治療群で対照群と比較し Rho-kinase 活性が有意に抑制され、RhoA 活性は有意に亢進を認めた。

S-L の染色性は、E-cad、p120 ctn で対照群に比し不明瞭となり、糖尿病治療群でその傾向が改善したが、 β は 3 群間で分布の変化は認められなかった。

また坐骨神経において E-cad の蛋白発現は無治療群で低下する傾向にあり、p120 ctn は無治療群で有意に低下、糖尿病治療群でそれが抑制された。対照治療群では E-cad、p120 ctn の蛋白発現は有意に亢進したが、 β の発現は 4 群間で有意な変化を認めなかった。

以上の結果から、糖尿病性神経障害の成立機転に Rho/Rho-kinase 活性亢進の関与が考えられた。高血糖下での Rho/Rho-kinase 系の亢進が p120ctn の発現を変化させ、細胞膜での E-cad の安定性を低下させるこ

とが考えられる。シュワン細胞と軸索との接着性を脆弱化が、糖尿病性神経障害発症・進展の一因となる可能性がある。

公開学位審査会は平成 26 年 2 月 19 日、審査委員長 靱山俊彦教授、審査委員加藤総夫教授、井口保之教授出席のもとに行われ、金澤氏の研究内容発表に続いて質疑応答が行われ、以下の質問があった。

- 1) 本研究における新しい発見は何なのか
- 2) rho/rho-kinase の機能はどの細胞で検討していることになるのか
- 3) 温度過敏に対する効果はどのように説明できるか
- 4) rho/rho-kinase の上流にあるものは何か
- 5) 統計解析方法について、non-parametric な検定が必要ではないか
- 6) myelin に欠陥が出やすい系を選んだとすればそれは本研究の限界ではないか
- 7) この動物モデルは I 型糖尿病に近いと考えられるのに対し、実際の臨床では II 型が極めて多いが、その点をどのように考えるか
- 8) 無髄神経の障害についてはどうか
- 9) 中枢における効果はどうか
- 10) 温度管理は適切であったか
- 11) シナプスを介する場合はどうか
- 12) Schwann 細胞以外の関与はどうか

金澤氏はこれらの質問に対し、現状における限界に言及しつつ適切に解答し、活発な議論が行われた。その後加藤教授、井口教授と慎重に審議した結果、本研究は糖尿病における末梢神経障害の診断、治療に対して一つの切り口を示す基礎研究であり、学位論文として価値を有すると判断した。