

糖尿病性末梢神経障害の培養モデルの確立と治療薬開発への応用

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第五部
荒木 敏之

1. はじめに

糖尿病性末梢神経障害は糖尿病患者の日常生活動作能力にも重要な影響を及ぼすが、血糖コントロール以外に有効な治療法は存在しない。ヒトで見られる糖尿病性末梢神経障害はマウスなど実験小動物の糖尿病モデルでは再現困難であり、その研究自体が簡単ではない。我々は最近、DRG(後根神経節)神経細胞とSchwann細胞の共培養による末梢神経髄鞘化の培養モデル(*in vitro* myelination)において、培養液中のビタミンB6の有無により髄鞘形成の起こり方が大きく変化すること、この際、通常の培養条件に比べて髄鞘形成が著明に低下している条件下でのみ、共培養におけるAdvanced glycation endproduct(AGE)の産生亢進を認めることを明らかにした(図1)。本研究では、*in vitro* myelination実験において髄鞘形成が抑制された状態のSchwann細胞に過剰発現しているAGE陽性蛋白をまず同定し、その蛋白の髄鞘形成過程における機能を明らかにし、糖尿病性末梢神経障害における寄与を明らかにすることで、糖尿病性末梢神経障害の発症機序の理解と治療法開発に資することを目的とした。

2. 方法

1) *in vitro* myelinationにおけるビタミンB6の関与する反応過程の検索:、*in vitro* myelination実験においてどの時期にビタミンB6が存在することが必要であるのかを、ビタミンB6含有培地の使用時期を共培養開始前、共培養開始後髄鞘化誘導前、髄鞘化誘導後1週目、髄鞘化誘導後2週目、のように限定することによって、どの時期のビタミンB6投与が髄鞘化最も影響を与えるのかを検討した。

2) 髄鞘化が抑制された培養条件下に出現するAGE陽性蛋白の同定:我々は既にImmunoblot法において髄鞘化が抑制された培養条件特異的にAGE陽性となる蛋白が発現していることを確認している。これらの蛋白を分離し、同定を行った。

3. 結果

1) *in vitro* myelination実験におけるビタミンB6投与時期を模式図(図2)のように変えて髄鞘形成に対する影

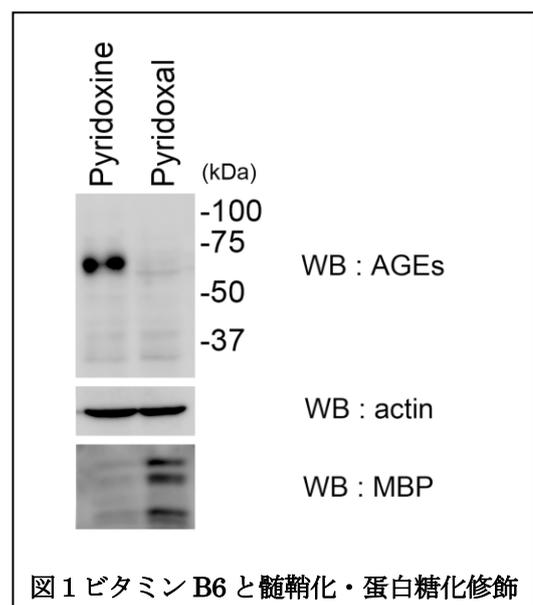
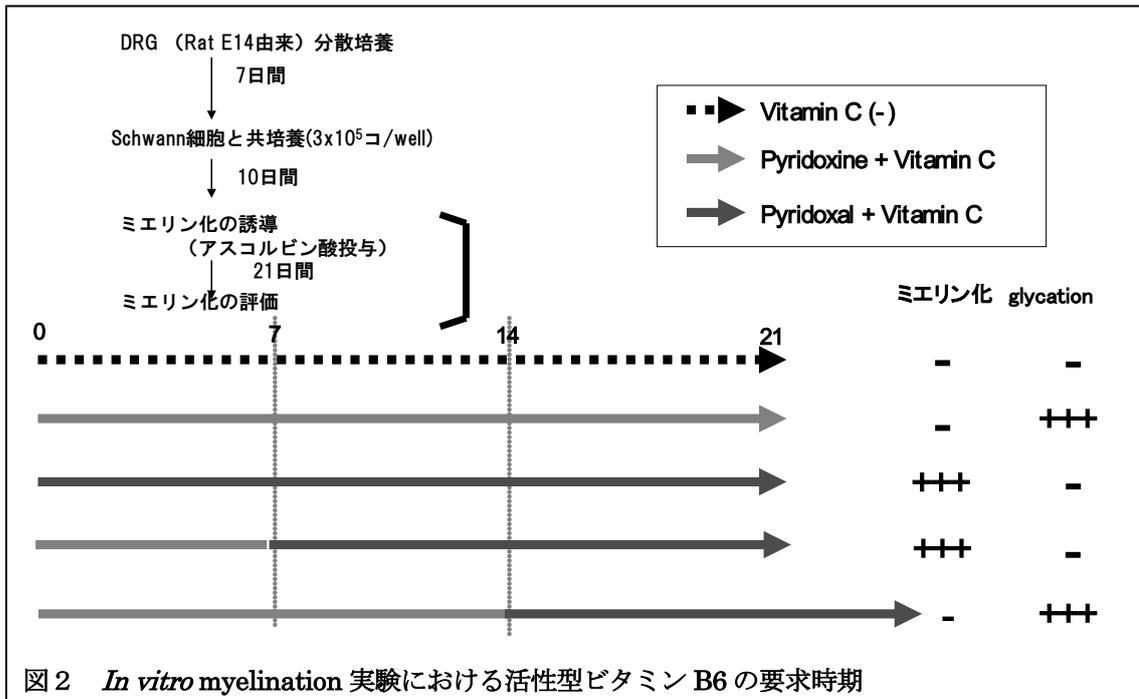


図1 ビタミン B6 と髄鞘化・蛋白糖化修飾



響を検討したところ、アスコルビン酸による髄鞘化誘導開始後2週間を超える期間、培養をピリドキシン (ビタミンB6前駆体) 入りの培地で維持した場合には、それ以降にピリドキサル (活性型ビタミンB6) 入り培地に変更した場合でも髄鞘形成は認められず、Schwann細胞は徐々に細胞死に至った。ピリドキシン入り培地での維持期間が1週間の場合には、その後培養液にピリドキサルを加えることによる、最初からピリドキサル入り培地を使っていた場合と同様の髄鞘形成が観察された。

2) AGE陽性蛋白を、電気泳動ゲルから抽出し、PMF解析によって分子量から蛋白の同定をおこなったところ、糖化修飾を受けている蛋白はCRMP2 (Collapsin response mediator protein-2) であることが判明した。確認のため、髄鞘化抑制条件下のSchwann細胞とDRG神経細胞の共培養のLysateから抗CRMP2抗体で免疫沈降するCRMP2蛋白は糖化修飾をうけていることを示した。

CRMP2は、微小管関連蛋白として殆ど全ての細胞種に発現しているものと考えられる。過去の報告では神経細胞における機能に関する論文が多く、Schwann細胞におけるCRMP2に関する報告は殆ど見られないが、今回の検討においてSchwann細胞におけるCRMP2の発現を確認したところ、神経細胞における発現レベルより相当程度少ないものの、Schwann細胞におけるCRMP2発現も認められた。また、DRG神経細胞、Schwann細胞をそれぞれ個別に培養し、共培養における糖化修飾亢進が認められるのと同じ培養条件で維持したところ、CRMP2蛋白の糖化は、神経細胞、Schwann細胞共に検出することができた。これらのことから、現時点では、神経細胞におけるCRMP2とSchwann細胞におけるCRMP2のどちらの糖化修飾が髄鞘化との関連において重要なのかは現時点では確定的でない。

4. 考察

CRMP2は、神経細胞においては、軸索に存在する微小管を構成する主要な蛋白であるTubulinの順行性軸索輸送に関連するアダプター蛋白としての機能があり、GSK3などの酵素が媒介するリン酸化の

有無による機能調節を受けることで、軸索の伸展を調節しているものと考えられている。一方、Schwann細胞におけるCRMP2の機能に関しては、殆ど論文報告は見られない。上述のように蛋白量あたりのCRMP2の発現は、Schwann細胞と比較して神経細胞で非常に多いことから、神経細胞におけるCRMP2の糖化修飾による機能変化が髄鞘化の効率に関与していることになる。今回我々がモデルとして用いた *in vitro* myelinationシステムにおいて髄鞘化を促進するアスコルビン酸、ピリドキサールはいずれも髄鞘化に影響を与える化合物として知られているが、そのメカニズムはこれまでのところ明らかではない。今回の我々の結果は、これらの化合物が末梢神経髄鞘化に影響を与えるメカニズムとして、神経細胞・神経突起側の変化を介した反応を有する可能性を示唆するものであると考えられる。今後、さらにこのメカニズムの詳細に関する検討を行っていく予定である。

5. 発表論文

Saitoh F, Araki T, Proteasomal degradation of glutamine synthetase regulates Schwann cell differentiation. *J. Neurosci.*, 30:1204-1212, 2010