

(見本) このForm (A3で1枚、2つ折)、ワープロで作製

(A3判)

論文内容の要旨

論文提出者氏名 山下 理比路

論文題目

Dysregulation of p53 and parkin induce mitochondrial dysfunction and leads to the diabetic neuropathic pain.

論文内容の要旨

【背景】糖尿病患者の約10-20%に発生する有病性糖尿病性神経障害(PDN)は、患者の生活の質を著しく悪化させるが、病態に関しては不明な点が多い。ミトコンドリア機能不全と活性酸素種(ROS)産生は糖尿病や神経変性疾患の病態に密接に関係しているとの指摘がある。ミトコンドリアの品質管理はダメージを受けたミトコンドリアを処理するオートファゴソーム機構であるマイトファジーによってなされ、マイトファジーは parkin と p53 によって維持される。parkin は膜電位の低下したミトコンドリアにユビキチンを付加することでマイトファジーに誘導し、p53 は parkin を制御して神経細胞死に重要な役割を果たすという報告がある。今回の研究の目的は、parkin と p53 によって制御されるミトコンドリア機能不全の糖尿病性神経障害への関与と、高血糖状態が誘導されることが知られるメチルグリオキサールの影響について明らかにすることである。

【方法】雄性 C57BL/6 マウスを用い、ストレプトゾトシン(STZ)を 100mg/kg 腹腔内投与して糖尿病性神経障害モデルマウスを作製した(STZ群)。対照群には生理食塩水を腹腔内投与した(生食群)。さらに、p53 の阻害薬である pifithrin- α (pft) 2mg/kg を3日毎に腹腔内投与する群を作成した(STZ+pft群)。3群に対し、von Frey による機械刺激と hot plate による熱刺激、足底へのアセトン塗布による冷刺激に対する逃避行動を観察し、痛覚閾値を決定した。実験開始日から21日後、深麻酔下に第4、5腰髄後根神経節(L4, 5 DRG)を採取し、parkin ならびに p53 発現量を quantitative polymerase chain reaction (qPCR)で定量した。ミトコンドリアの定量評価として、ミトコンドリア膜に特異的に発現する COX4 を免疫組織化学法で、ミトコンドリア DNA に含まれる CytOx2 を qPCR で定量した。過酸化脂質である 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)の発現量をウェスタンブロッティングで評価した。DRG における ROS 産生を評価するため、ROS を取り込んで発色する MitoSOX をマウスの髄腔内に注入して DRG 切片を作製し、蛍光顕微鏡で観察した。さらにメチルグリオキサール 5 μ g をマウスの尾静脈から投与した後、同様に投与 48 時間後まで痛覚閾値を評価し、L4, 5 DRG を採取して parkin と p53 発現量を qPCR で定量した。DRG 細胞を 1mM メチルグリオキサールを添加した培養液で培養し、parkin と p53 の発現量を qPCR で定量し、ミトコンドリアの膜電位を検出する JC-1 を用いて膜電位に与える影響を比較した。

【結果】STZ 群はモデル作成後3週間にわたり痛覚閾値は低下し、痛覚過敏が確認できた。DRG では parkin 発現は減少、p53 の発現は増加した。STZ+pft 群では痛覚閾値は低下せず、parkin の減少も認めなかった。ミトコンドリア DNA 量と COX4 発現量は生食群と比較して STZ 群で減少していたが、STZ+pft 群では減少を認めなかった。HNE 発現量と ROS 産生量は STZ 群で増加していたが、STZ+pft 群で増加を認めなかった。メチルグリオキサールを投与したマウスでは投与後 48 時間までの痛覚閾値低下と、parkin 発現の低下、p53 発現の増加を認めた。培養 DRG 細胞へのメチルグリオキサール投与後も同様に parkin 発現が低下、p53 発現が上昇しており、ミトコンドリア膜電位は低下していた。

【考察】一次知覚神経におけるミトコンドリア機能が疼痛の発生に関与しているとの指摘は以前からあるなかで、我々は今回 DRG 細胞におけるミトコンドリア量をミトコンドリア DNA と COX4 を用いることで測定し、STZ 投与後に減少していることが明らかになった。さらに、STZ 投与後には、DRG で HNE と ROS の産生が増加しており、ミトコンドリア機能不全による酸化ストレス増大が STZ 投与後の痛覚過敏に関係していると考えた。

p53 は損傷を受けた神経細胞で誘導され、parkin を制御することでマイトファジーの調節に関係している。STZ 群では p53 が増加しており、p53 阻害薬は parkin の減少を回避し、ミトコンドリア量の減少や ROS 産生を抑制した。同時に、p53 阻害薬は STZ による痛覚過敏を減弱させており、p53 阻害薬が parkin 発現低下を抑制し、ミトコンドリア機能を正常に保つことで痛覚過敏が抑制されたと考えられた。すなわち、DRG における p53 の発現が増加することにより生じる parkin によるミトコンドリア機能維持の破綻が有病性糖尿病性神経障害の分子メカニズムとして重要であると考えられた。

メチルグリオキサールは糖尿病患者の臓器合併症に関わるターゲット分子として注目されている。今回マウスにメチルグリオキサールを全身投与することにより、STZ 群と同様な痛覚過敏や p53/parkin の発現変化が観察された。培養 DRG 神経細胞にメチルグリオキサールを直接投与することで p53/parkin の発現は変化し、ミトコンドリア膜電位は低下した。このことから、糖尿病患者における血中メチルグリオキサール濃度の増加が DRG ニューロンに直接作用し、p53/parkin の発現を変化させることでミトコンドリア機能不全を引き起こす可能性が考えられた。

【結論】有病性糖尿病性神経障害において、DRG における p53 の活性化と parkin 発現の低下がミトコンドリア機能不全を引き起こし、ROS 産生を導くことで痛覚過敏に関与する。糖代謝異常により増加するメチルグリオキサールがこの病的変化の誘因となっている。parkin に関連したミトコンドリア機能をターゲットとした治療は、糖尿病性神経障害に対する新たなアプローチになる可能性がある。