The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Methylcobalamin increases Erk1/2 and Akt activities through the methylation cycle and promotes nerve regeneration in a rat sciatic nerve injury model
Author(s)	岡田, 潔
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54163
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【105】

氏　　名	岡　田　　潔（おか だ きよし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２３６７４　号
学位授与年月日	平成22年３月23日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学　位　論　文　名	Methylcobalamin increases Erk1/2 and Akt activities through the methylation cycle and promotes nerve regeneration in a rat sciatic nerve injury model （メチルコバラミンはメチレーションサイクルを介してErk1/2、Aktを活性化し、坐骨神経損傷ラットにおいて神経再生を促進する）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　吉川　秀樹 （副査） 教　授　遠山　正彌　　教　授　山下　俊英

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

ビタミンB12は、神経系の維持に必須の物質であり、その欠乏は亜急性連合性脊髄変性症などの疾患の原因となることが知られている。また、ビタミンB12が神経疾患や障害に対して治療効果を持つことを報告した文献も散見されるが、その効果や機序は未だ明らかとなっていない部分が多い。今回我々は、ビタミンB12にいくつかの類縁体が存在し、それぞれが異なった代謝経路に関与している点に着目し、どの類縁体がもっとも神経細胞に影響を及ぼすかを検討し、その代謝経路や下流のシグナル伝達を調査することで、ビタミンB12の神経系への効果機序を明らかにすることを目的とした。また同時にビタミンB12投与が神経損傷に対して実際どのような影響を与えるかをラットの坐骨神経損傷モデルを用いることで検討した。

〔　方法ならびに成績　〕

【in vitro】

生後９日齢のラットから小脳顆粒細胞及び後根神経節細胞を採取、培養し、ビタミンB12の４種類の類縁体（シアノコバラミン、メチルコバラミン、ヒドロキソコバラミン、アデノシルコバラミン）投与下での神経軸索突起伸展、細胞生存への影響を、免疫染色法を用いて測定した。この実験の結果から、100ｎＭ以上の濃度のメチルコバラミン投与時に小脳顆粒細胞、後根神経節細胞いずれにおいても軸索伸展と細胞生存が促進されることが判明した。次に、メチルコバラミンが哺乳類の生体内で関わる代謝経路であるメチレーションサイクルが上記の効果に関与しているかを調査するため、サイクル内の下流の代謝産物（S-アデノシルメチオニン）と、メチルコバラミン代謝の阻害剤（ニトロベンゾチアジアゾール）をそれぞれ投与する実験系を作成した。この実験結果では、S-アデノシルメチオニン投与がメチルコバラミン投与と同様の効果を来たすことが明らかとなり、また、ニトロベンゾチアジアゾール投与によってメチルコバラミン投与の効果が抑制されたことから、メチルコバラミンの神経細

胞への影響はメチレーションサイクルが関与している可能性が示唆された。同様の実験系において、神経細胞の軸索伸展や細胞生存に関わるシグナルとして知られるErk1/2とAktの活性をWestern blotting法を用いて検出したところ、メチルコバラミン投与によってErk1/2とAktの活性が上昇すること、またこの効果もメチレーションサイクルを介していることが判明した。Erk1/2とAktのそれぞれの阻害剤であるU0126とLY294002を投与する実験によって、メチルコバラミンの軸索伸展、細胞生存促進効果がU0126とLY294002によって抑制されたことから、メチルコバラミンの効果がErk1/2、Aktのシグナルを介していることが考えられた。

【in vivo】

８週齢のラットの片側の坐骨神経を大腿中央部で切断後に再縫合することで坐骨神経損傷モデルを作成した。浸透圧ポンプを用いて持続的にPBSと、メチルコバラミン１mg/kg/dayを投与する群を作成し、１２週間にわたって下肢機能の回復を評価し、１２週経過時点での末梢神経潜時の差を比較した。また、６週と１２週経過時点の坐骨神経組織の回復をトルイジンブルー染色と免疫組織学的染色によって評価した。結果として、患側下肢機能はメチルコバラミン投与群において、知覚運動機能及び末梢神経潜時いずれにおいても有意に改善が認められた。また組織学的にも再生軸索や髄鞘の形成をメチルコバラミン投与群において有意に認め、neurofilament、myelin basic proteinの蛋白発現量も上昇していた。

〔　総　　括　〕

本研究において我々はメチルコバラミンが100ｎM以上の濃度で神経細胞の軸索突起進展と細胞生存を促進すること、またその効果が様々なメチレーション反応に関与するメチレーションサイクルを介していることを示した。また、メチルコバラミンがメチレーションサイクルを通して、Erk1/2、Aktを活性化していることが明らかになった。ラットの坐骨神経損傷モデルにおいては、メチルコバラミンの大量持続投与が、神経軸索の再生と機能の改善を促進することがわかった。100ｎMは、ビタミンB12の正常血中濃度の約１５０倍に相当する濃度であり、以上の結果を考慮すると、メチルコバラミンは大量持続投与や局所投与など、標的とする組織、細胞へ効率的に高濃度の投与を行うことにより、神経損傷に対するより効果的な治療薬となりうる可能性があることも考えられた。

論文審査の結果の要旨

メチルコバラミンはビタミンB12の類縁体のひとつであり、神経系の維持に必須の物質である。過去にメチルコバラミンの神経系への影響について述べた研究は散見されるが、その詳細な作用メカニズムは未だ明らかにはなっていない。本研究において我々はメチルコバラミンが100ｎM以上の濃度で中枢神経細胞である小脳顆粒細胞、および末梢神経細胞である後根神経節細胞の軸索突起進展と細胞生存を促進することを明らかとした。また、その効果が様々なメチレーション反応に関与するメチレーションサイクルと呼ばれる代謝経路を介していることを示した。この細胞内シグナルの下流を調査する実験において、メチルコバラミンがメチレーションサイクルを通して、Erk1/2、Aktを活性化していること、またErk1/2とAktの活性化が軸索伸展と細胞生存の促進に関与していることが明らかになった。また、ラットの坐骨神経損傷モデルにおいては、メチルコバラミンの大量持続投与が、神経軸索の再生と機能の改善を促進することがわかった。以上の結果を考慮すると、メチルコバラミンは大量持続投与や局所投与など、標的とする組織、細胞へ効率的に高濃度の投与を行うことにより、神経損傷に対するより効果的な治療薬となりうる可能性があることも考えられ、臨床応用へつながる研究として、本研究は学位論文に値すると考える。