

Title	Methylcobalamin promotes the differentiation of Schwann cells and remyelination in lysophosphatidylcholine-induced demyelination of the rat sciatic nerve
Author(s)	西本, 俊介
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55791
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏名 Name	西本 俊介
論文題名 Title	<p>Methylcobalamin promotes the differentiation of Schwann cells and remyelination in lysophosphatidylcholine-induced demyelination of the rat sciatic nerve (メチルコバラミンはシュワン細胞の分化を促進し、ラット坐骨神経脱髄モデルの再髄鞘化を促進する)</p>
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕 ビタミンB12の一つであるメチルコバラミン (MeCbl) はメチオニン合成酵素の補酵素として働き、末梢神経障害に対する治療薬として広く臨床応用されている。末梢神経損傷後の再生過程における髄鞘形成に関して、1980年代にMeCblがレシチンの合成を促進し、末梢神経損傷後の髄鞘形成を促進するという報告があるが、その詳細は現在までほとんどわかっておらず、髄鞘形成に重要なシュワン細胞に対する効果もわかっていない。本研究では末梢神経損傷後の回復過程において重要な役割を果たすシュワン細胞に対して、MeCblが与える影響について検討した。</p>	
<p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 生後1~3日齢のラット坐骨神経からSCsを単離培養した。増殖培地にMeCblを添加し、増殖曲線を用いて細胞増殖に対する検討を行った。次にウェスタンブロッティングを用いてシュワン細胞の増殖分化に関わるErk、Aktシグナルの変化について検討し、またcleaved caspase-3、cleaved caspase-9抗体を用いて、アポトーシスに対する効果を検討した。シュワン細胞の分化に対する効果を調べるために、ウェスタンブロッティングにて髄鞘を形成する主要なタンパクであるMyelin Protein zero (P0)、Myelin associated glycoprotein (MAG)、Myelin basic protein (MBP) と、髄鞘の主要構成成分である脂質の合成を評価するためにATP citrate lyase (Acly) の発現を測定した。また後根神経節細胞とシュワン細胞を共培養しSCs分化に対する影響を検討した。次に坐骨神経にlysophosphatidylcholine (LPC) を局所注射することで脱髄モデルを作成し、MeCbl投与における再髄鞘化に対する効果を蛍光免疫染色による組織学的評価と、Sciatic functional index (SFI)、電気生理検査、知覚検査にて評価した。</p> <p>増殖曲線による評価では、コントロール群とMeCbl投与群の間に有意差はなかった。Erk活性の検討で、シュワン細胞の増殖培地にMeCblを投与すると、濃度依存的にErk活性の低下を認め、投与後30分と1時間でErkのリン酸化の低下を有意差をもって認めた。Akt活性には影響を与えなかった。アポトーシスの評価では、MeCblを加えて投与してもアポトーシスへの影響は見られなかった。シュワン細胞の分化・髄鞘化を検討するために、シュワン細胞にcAMP投与して分化誘導し、P0、MAG、MBPとAclyの発現量の変化を評価した。P0、MAGの発現量においては有意な変化は見られなかった。MBPの発現量は、MeCbl単独投与では、MBPの発現の有意な上昇は認めなかったが、cAMPを加えた分化メディウムにMeCblを加えることで、MBPの発現が有意に上昇した。Aclyについても分化メディウムにMeCblを加えることで、Aclyの発現が有意に上昇した。後根神経節とシュワン細胞を共培養し、MeCblの髄鞘化に対する効果を検討した。共培養1週間後アスコルビン酸で分化誘導し、MeCbl投与を開始しMBP陽性軸索数を測定し再髄鞘化を評価した。分化誘導7日目では有意差はなかったが、分化誘導14、21日目、コントロール群と比較して、MeCbl投与群で、MBP陽性軸索数が優位に多かった。In vivo脱髄モデルにおいて、坐骨神経に生食を局所投与する非脱髄群とLPCを局所投与する脱髄群に分け、生食もしくはMeCblを全身投与し、投与後7日目で坐骨神経を採取し評価した。全軸索数のうちのMBP陽性の軸索数を測定し、脱髄群において生食投与よりMeCbl投与群の方が有意に改善した。坐骨神経機能を評価するSFIは脱髄群において生食投与よりMeCbl投与群の方が有意に改善した。電気生理検査でCompound muscle action potentialは各群に有意差はなかったが、Nerve conduction velocityは有意に脱髄群において生食投与よりMeCbl投与の方が改善した。知覚検査でも同様に脱髄群において生食投与よりMeCbl投与群の方が有意に改善した。</p>	
<p>〔総括(Conclusion)〕 過去の報告より、Erkを活性化させることでシュワン細胞は脱分化され増殖の方向へ向き、Erkの活性を阻害するとシュワン細胞が分化し髄鞘化の方向へ向くと考えられているが、in vitroの結果から、MeCblがシュワン細胞のErkの活性を阻害することがわかった。そしてMeCbl投与により髄鞘蛋白であるMBPや、脂質合成を示すAclyの発現量とともに有意に増加し、また共培養においてもMeCbl投与の方が有意にMBP発現量が多い結果となり、MeCblがErkの活性を阻害することで、シュワン細胞の分化、髄鞘化を促進することが示唆された。In vivoの結果でも同様に、MeCblを投与することで、脱髄した末梢神経の再髄鞘化を促進することが示唆された。以上より、MeCblはシュワン細胞の増殖段階後の分化過程を促進させることで、末梢神経再生促進に寄与していることが示唆された。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 西本 俊介	
論文審査担当者	(職) 氏 名 主 査 大阪大学教授 吉川 秀樹
	副 査 大阪大学教授 望月 秀樹
	副 査 大阪大学教授 山下 俊英

論文審査の結果の要旨

ビタミンB12の一つであるメチルコバラミン (MeCbl) はメチオニン合成酵素の補酵素として働き、末梢神経障害に対する治療薬として広く臨床応用されている。末梢神経損傷後の再生過程における髄鞘形成に関して、1980年代にMeCblが末梢神経損傷後の髄鞘形成を促進するという報告があるが、その詳細は現在までほとんどわかっていない。本研究では末梢神経損傷後の回復過程において重要な役割を果たすシュワン細胞に対して、MeCblが与える影響について検討した。これまでにErkの活性を阻害するとシュワン細胞が分化し髄鞘化の方向へ向くと考えられているが、*in vitro*の結果から、MeCblがシュワン細胞のErkの活性を阻害することがわかった。そしてMeCbl投与により髄鞘蛋白であるMBPや、脂質合成を示すAclyの発現量がともに有意に増加し、また共培養においてもMeCbl投与にて有意にMBP発現量が多く、MeCblがErkの活性を阻害し、シュワン細胞の分化、髄鞘化を促進することが示唆された。*In vivo*の結果でも同様に、脱髄した末梢神経の再髄鞘化を促進することが示唆された。以上より、MeCblはシュワン細胞の増殖段階後の分化過程を促進させることで、末梢神経再生促進に寄与していることが示唆された。

以上学位に値するものと認める。