

氏 名	檜 美和子
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第715号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成26年 9月10日
学位論文題目	Hyperglycemia induces abnormal gene expression in hematopoietic stem cells and their progeny in diabetic neuropathy (高血糖下に出現し糖尿病神経障害を誘導する異常な骨髄幹細胞)
審査委員	主査 教授 縣 保年 副査 教授 小笠原 一誠 副査 教授 遠山 育夫

論文内容要旨

*整理番号	721	氏名 (ふりがな)	かたぎ みわこ 檜 美和子
学位論文題目	Hyperglycemia induces abnormal gene expression in hematopoietic stem cells and their progeny in diabetic neuropathy (高血糖下に出現し糖尿病神経障害を誘導する異常な骨髄幹細胞)		
<p>【研究の目的】 糖尿病神経障害は糖尿病で生じる一般的な合併症の一つであり、その発症には多数の要因が関与する事が報告されている。しかし、その要因に対する治療を施しても完治することはない。これは糖尿病神経障害が既知の要因以外によって生じている可能性を示すものである。また、糖尿病では異常な骨髄由来細胞の存在が示されており、糖尿病神経障害の発症原因の一つとして骨髄由来細胞と正常な神経細胞との細胞融合が報告された。本研究では、糖尿病で生じる異常な骨髄細胞の由来を同定し、高血糖にさらされた骨髄細胞を正常動物に移植し、細胞融合が再現されるかどうかを検討した。</p> <p>【方法】 使用したマウスは、C57BL/6 (wild) マウス、GFP Tg (GFP) マウスである。</p> <p>①1 型及び 2 型糖尿病で神経障害が発症するかを検討するため、wild マウスに Streptozotocin (STZ:150mg/kg) を投与した群 (STZ-DM) と高脂肪食 (HFD) 負荷した群 (HFD-DM)、非処置群 (Ctrl) を作製し、それぞれの感覚神経伝達速度を測定した。また、各実験群の動物において、骨髄由来細胞と神経細胞との間で細胞融合が生じるかを、後根神経節 (DRG) を対象として検討した。②STZ-DM、HFD-DM それぞれの骨髄内に異常な細胞が存在するかを検討するため、Insulin と Tnf-alpha に対する骨髄の免疫染色を実施した。次に、糖尿病で生じる異常な骨髄由来細胞の起源を同定するため、各条件の動物から、全骨髄細胞、単核球、顆粒球、Lineage (-) 細胞、KSL 細胞の 5 分画を取り分け、Insulin 1 遺伝子発現をマーカーとして PCR 法を用いて遺伝子発現を比較し、この結果に基づいて Tnf-alpha 遺伝子発現を検討した。蛋白発現の比較は FACS 解析を用いて検討した。③糖尿病で生じた骨髄細胞の異常が個体を超えて伝達されるかを確認する為、STZ を用いて糖尿病を発症させた GFP-Tg マウス (STZ-GFP) と非糖尿病 GFP-Tg マウス (Ctrl-GFP) から骨髄細胞を分取し、正常 wild マウスに移植を行った。</p> <p>【結果】 感覚神経伝達速度は、Ctrl と比して STZ-DM では約 70%、HFD-DM では約 80%の遅延を認めた。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
 2. ※印の欄には記入しないこと。

(続 紙)

また、DRG の免疫染色では、いずれの糖尿病マウスでも Insulin と Tnf-alpha を発現する融合細胞が確認された。この結果を受け、骨髄で免疫染色を行った所、Insulin と Tnf-alpha 陽性細胞を認め、さらにこれらが共発現する細胞が存在していることが分かった。異常な骨髄由来細胞の起源を調べる為を実施した PCR では、骨髄幹細胞分画である KSL 細胞で Insulin1 遺伝子発現に違いを認め、KSL 細胞の Tnf-alpha 遺伝子発現を検討したところ、いずれの糖尿病モデルで有意に発現が増加していた。次に KSL 細胞内に存在する Insulin 及び Tnf-alpha 陽性細胞の割合を、FACS を用いて解析したところ、対照群では存在しなかったにもかかわらず、いずれの糖尿病群でも割合が有意に増加していた。

KSL-BMT 移植実験を実施した所、STZ-GFP から得た KSL を wild TBM と混ぜて移植した群で DRG neuron と細胞融合しており、この融合細胞は Insulin、Tnf-alpha を発現していた。

【考察】

本研究では、まず、これまでに報告されている 1 型糖尿病モデルとされる STZ 誘導型糖尿病マウスだけではなく、高脂肪食負荷による 2 型糖尿病モデルマウスにおいても神経障害が生じるか検討したところ、感覚神経伝達速度の遅延が認められ骨髄由来細胞と神経細胞との融合も確認できた。この結果を踏まえ、1 型、2 型糖尿病に共通する高血糖が骨髄細胞へ与える影響を検討した。骨髄には血球系に分化する造血幹細胞と骨や脂肪等に分化する間葉系幹細胞が存在し、またこれらの細胞の住处とされる骨髄ニッチという構造がある。糖尿病合併症発症に伴うこれらの細胞及びニッチの異常は多く報告されているが、骨髄内に存在するどの細胞集団に対して高血糖が影響を与えているのか報告が無く、本研究で初めてその細胞が骨髄幹細胞分画である KSL 細胞である事を示した。骨髄内に存在する KSL 細胞から分化した細胞が血流に乗り全身各臓器へくまなく送られることを考えると、高血糖にさらされ生じた異常な KSL 細胞が全身性に生じる糖尿病合併症の原因であることは想像に難くない。また、全身への影響のみならず、骨髄移植モデルによって個体を超えて異常な融合能が受け継がれたことから、高血糖が骨髄幹細胞に異常な性質を生じさせ、さらにこの異常な性質が幹細胞に刻み込まれた可能性が示された。

【結論】

糖尿病では骨髄幹細胞に異常が生じた結果、融合能を持つ異常な細胞が生じ、この細胞が神経細胞と融合し神経障害を発症する事を示した。また、この異常な骨髄幹細胞に細胞と融合するという異常な性質が記憶され、個体を超えてその性質が受け継がれる事が分かった。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	721	氏名	櫻 美和子
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>糖尿病神経障害の発症には多数の要因が関与する事が報告されているが、それらに対する治療を施しても完治することはなく、他の要因の存在が示唆されて来た。その一つとして異常な骨髄由来細胞と正常な神経細胞との細胞融合が報告された。本研究では、糖尿病で生じる異常な骨髄細胞の由来を同定し、同定した骨髄細胞分画を正常動物に移植し、神経細胞と細胞融合が誘導されるか検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <p>1) Streptozotosin(STZ)、高脂肪食(HFD)により糖尿病を惹起したマウス(STZ-DM、HFD-DM)において感覚神経伝達速度の遅延を認めた。また後根神経節(DRG)において骨髄細胞と神経細胞の融合が確認された。</p> <p>2) STZ-DM、HFD-DM マウスの骨髄細胞を様々な分画に分けて調べたところ、造血幹細胞分画であるKSL細胞でinsulinとTNFαが、STZとHFDによって特異的に発現誘導されることが認められた。</p> <p>3) STZ-DM マウスから骨髄KSL細胞を分取し、正常マウスに移植したところ、移植されたマウスのDRGにおいて骨髄KSL細胞と神経細胞の融合が認められた。</p> <p>本論文は、糖尿病で生じる異常な骨髄細胞の性状を明らかにし、その神経障害発症への関与について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 596字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 26年 9月 2日)</p>			