

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16247

研究課題名(和文) 糖尿病性多発神経障害における insulin-Notch 連関を介した再生機構の意義

研究課題名(英文) The neuroregenerative crosstalk of Insulin-Notch signaling in diabetic polyneuropathy

研究代表者

姫野 龍仁 (Himeno, Tatsuhito)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：60753762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性多発神経障害(DPN)の機序は十分に解明されていない。本研究では、糖尿病におけるインスリンシグナル異常と神経幹細胞/前駆細胞(NSC/NPC)の維持経路であるNotchシグナルの相互作用に注目して、再生・恒常性維持機構がDPNの病態形成に関与するかを検証した。

その結果、糖尿病マウスの末梢神経系でインスリンシグナル亢進及びNotchシグナル抑制を確認し、さらにNSC/NPCが早期に減少することを確認した。末梢神経系特異的 insulin-Notchシグナル欠損マウスにおいて末梢神経の軸索変性を確認した。

これらの結果より、DPNにNSC/NPCの量的変化が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性多発神経障害は高頻度な糖尿病性合併症である。本研究では糖尿病性多発神経障害の病態の一部を解明した。

糖尿病性多発神経障害は病態の解明が不十分であるため、治療法の開発も停滞している状況である。このような状況において、本研究の成果を応用することで、今後、この疾患に対する治療法の開発が進むことが期待できる。

研究成果の概要(英文)： The mechanisms of diabetic polyneuropathy (DPN) are not fully understood. In this study, to examine whether regenerative and homeostatic mechanisms are involved in the pathogenesis of DPN, we focused on the interaction between abnormal insulin signaling and Notch signaling, which is an important pathway to keep static phase of neural stem cells/progenitor cells (NSC/NPC).

As a result, we confirmed that insulin signaling is enhanced and Notch signaling is suppressed in the peripheral nervous system of diabetic mice. Furthermore, NSC/NPC is reduced at the early stage of the life in these mice. We confirmed axonal degeneration of peripheral nerves in mice lacking peripheral nervous system-specific insulin-Notch signaling. These results suggest that quantitative changes in NSC/NPC are involved in DPN.

研究分野：糖尿病学

キーワード：糖尿病性神経障害

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性多発神経障害(DPN)は、糖尿病患者の約半数に認められ(Dyck PJ, Neurology, 1993)、自発痛・しびれ感・知覚低下などの感覚障害に加え、一部の患者には足壊疽・切断といった生命予後悪化をもたらす病態を招く。DPNの発症・進展機序としては、高血糖に伴う代謝障害(ポリオール代謝亢進、PKC活性の変化、AGE蓄積、酸化ストレス亢進など)と血流障害が重要であると考えられている。代謝障害に対する治療として、 α リポ酸およびアルドース還元酵素阻害薬が一部の国で使用されているが有効性は十分でなく、DPNの改善を目的とした治療法は確立されておらず、有効な治療法の確立のためには、発症機序のさらなる解明が必要な段階である。

これまでに私共のチームは主にDPNの再生療法に注目し、動物実験において各種幹細胞/前駆細胞の細胞移植療法などを試みてきた。線維芽細胞成長因子-2の局所投与がDPNに有益であることを示したことを契機に(Nakae, Diabetes, 2006)、各種細胞成長/保護因子を産生する組織幹/前駆細胞を用いた細胞移植療法を検証してきた。その結果、これまでに、間葉系幹細胞(Himeno T, Biomed Res Int, 2013)、血管内皮前駆細胞(Himeno T, J Diabetes Res, 2015)、神経堤幹細胞(Okawa T, Cell Transplant, 2013)、骨髄単核球(Naruse K, Plos One, 2011)のDPNにおける有益性を報告した。しかしながら、これら再生療法の“治療法の開発”において、根拠となる先立つべき“DPNの病態の解明”が欠如していることが国内外の研究者から指摘されてきた。そこで私は、末梢神経系での再生・恒常性維持機構を解明し、さらにその仕組みがDPNの発症に関わることを検証する必要性を認識し、本研究の着想に至った。これらの経験よりヒントを得て、今回、末梢神経系の再生・維持機構を解明し、DPNにおける新規機序としての、その可能性を検討することとした。

中枢神経系においては、成体におけるニューロン新生が証明されているが、末梢神経系では、ニューロンの一部である軸索再生を対象とする研究が大半を占め、ニューロンそのものの再生・新生は明らかではない。しかし近年、一次感覚ニューロン再生が報告され(Ghallaher ZR, Front Neurosci, 2011)、さらにこれを裏付けるように、一次感覚ニューロン細胞体の存在する後根神経節(DRG)での神経幹細胞/前駆細胞(NSC/NPC)の存在が、*ex vivo*の実験系で証明されている(Nagoshi N, Cell Stem Cell, 2008)。しかし、それらの細胞の*in vivo*での分布・生理的機能および疾患応答性については検討されていない。そこで今回、DRGのNSC/NPCに注目して末梢神経系のニューロン再生機構を同定し、その機構の生理的役割を解明し、さらに、その糖尿病における変化を検証した。

今回、私が注目したのは、insulin signalingの主要下流因子FoxO1が核内Notch活性化複合体を構成するという報告である(Kitamura T, J Clin Invest, 2007)。Notch signaling不活性化マウスの中枢神経系では、NSCが自己複製できずに早期に増殖→分化→枯渇し、脳機能低下を生じることが示されている(Ehm O, J Neurosci, 2010)。Insulin signalingがFoxO1をリン酸化しFoxO1の核外移行を促進する事実を考慮すると、insulin signaling活性化が核内Notch活性化複合体形成不全およびNotch signaling不活性化をもたらす可能性が推察される。そこで、私は、糖尿病状態下のinsulin signaling亢進によりNotch signalingが不活性化され、NSC/NPCの早期分化・枯渇を促進しDPNを発症・進展させると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、上述した仮説を検証し、DPN の新たな機序として insulin-Notch 連関を介した再生・恒常性維持機構の関与を証明することを目的とした。

3. 研究の方法

DRG における NSC/NPC の性質解明

NSC/NPC マーカー陽性細胞を、フローサイトメトリー(FACS)により分離し、NSC/NPC の特徴・能力を有するかを評価した。用いたマーカーは SOX2 とし、SOX2-EGFP マウスの DRG を酵素処理後、FACS を行った。SOX2 発現細胞に GFP を発現する SOX2-GFP マウスの DRG より、FACS で SOX2⁺細胞を採取し、球状集塊 neurosphere の形成能を評価した。更にこの neurosphere を分散後、再度、neurosphere の形成、すなわち、二次 neurosphere の形成能を評価した。ニューロン・グリアへの分化能、自己複製能も評価した。

DRG における NSC/NPC の分布

中枢神経系 NSC/NPC マーカー SOX2、Musashi1 を標的とした免疫染色法により野生型マウスの DRG における NSC/NPC の組織内分布を評価した。

糖尿病マウスにおける Notch signaling と insulin signaling の経時的変化

高脂肪食肥満(DIO)マウスおよび 2 型糖尿病 db/db マウスにおいて、DRG の NSC/NPC における FoxO1 の細胞内局在を免疫組織学的染色法により評価した。また、24 週齢以降の db/db マウスの DRG における、NSC/NPC (SOX2⁺および Musashi1⁺細胞) の量的変化を解析した。組織学的検討に加え、Notch signaling 下流の Hes/Hey family (Hes1, Hes5, Hey1, Hey2, HeyL) の発現を real-time RT-PCR により評価した。

末梢神経系における Notch signaling の役割の解明

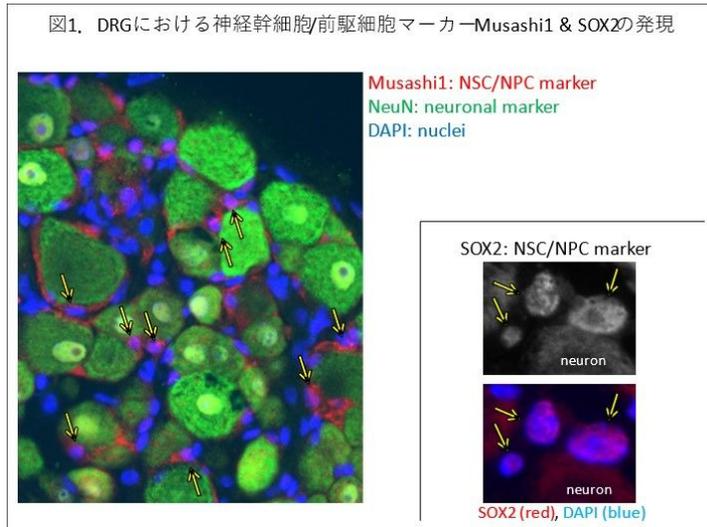
感覚神経系特異的 Cre-recombinase 発現マウス“Advillin-Cre マウス”と DN-MAML1-GFP^{fl/+}マウスを交配し感覚神経系特異的な Notch signaling 抑制マウスを作成した。floxed マウスは Notch の活性化補助因子 MAML1 に対する dominant negative 効果を有する MAML1-GFP 融合タンパクの上流に、loxP を持つ repressor を設計しており、Notch 活性化を抑制できる。

本マウスにおいて、NSC/NPC の変化、末梢神経機能変化、末梢神経病理学的変化を評価した。

4. 研究成果

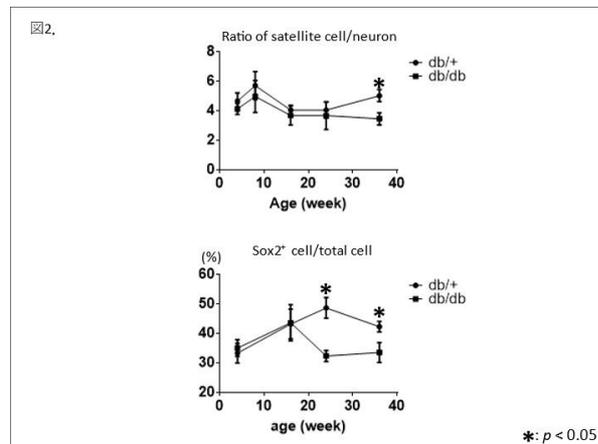
DRG における神経幹細胞/前駆細胞マーカー Musashi1 および SOX2 の発現

一次感覚ニューロンの細胞体から形成される DRG において神経幹細胞あるいは前駆細胞のマーカーによる免疫組織学的染色法の結果、ニューロンの周囲の従来サテライト細胞と一括して呼ばれていた細胞の一部が、Musashi1 および SOX2 といった NSC/NPC マーカー陽性の細胞であることが確認できた(図1.黄色矢印)。SOX2-EGFP マウスの DRG における FACS では、SOX2⁺細胞により neurosphere 形成が示された。一方で、SOX2⁻細胞では neurosphere は形成されなかった(data not shown)。



DRG における NSC/NPC マーカー陽性細胞の経時的変化

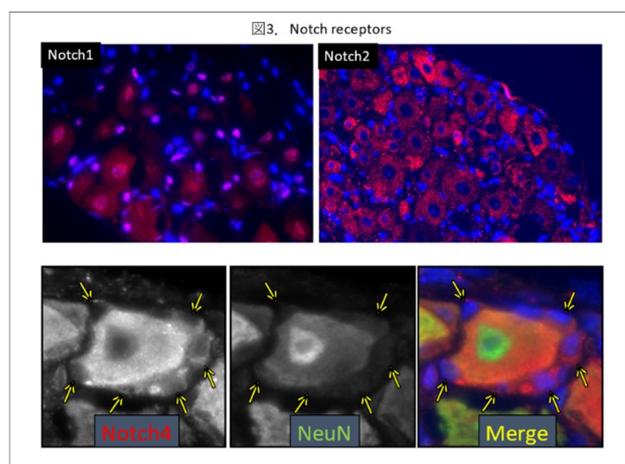
これらの NSC/NPC マーカー陽性の細胞が加齢とともにどのように変化するかを肥満2型糖尿病マウス db/db マウスと正常対照群の db/+ マウスとで比較した。ニューロン以外のサテライト細胞数については、36週齢時点で db/db マウスにおいて減少した。SOX2 陽性細胞は24週齢以降、db/db マウスで減少していた(図2)。



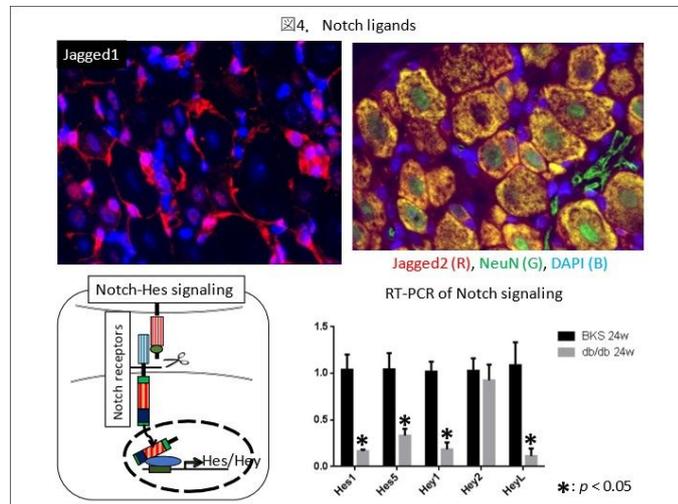
DRG の NSC/NPC 陽性細胞における Notch signaling 構成分子の発現

DRG に Notch 受容体が存在することが確認できた。主要な Notch 受容体である Notch1,2,4 のいずれもがニューロンとサテライト細胞の一部に発現していることが確認できた(図3)。

Notch リガンドについても評価したところ、リガンドの一つ Jagged1 がおもにサテライト細胞に発現し、別のリガンドである Jagged2 はニューロンと一部のサテライト細胞に発現していることが確認できた(図4上段)。

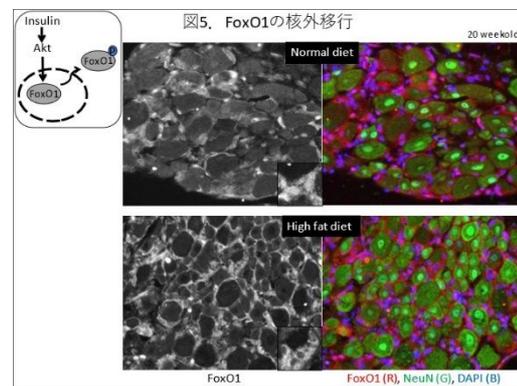


これらの免疫染色の結果より、Notch シグナルが DRG においても存在していることが示唆されたことより、Notch の代表的な下流のシグナルである Hes と Hey の発現を real time RT-PCR により評価したところ、24 週齢の 2 型糖尿病 db/db マウスにおいて、Hey2 以外のこれらの分子の発現が低下していることが確認できた(図 4 下段)。



DRG における FoxO1 の細胞内分布

Notch シグナルの低下とインスリンシグナルの関係を確認するために、DRG における FoxO1 の分布を評価したところ、20 週齢の通常食マウスでは FoxO1 は核内に局在し、高脂肪食マウスでは核外へ移行していることが確認できた(図 5)。



末梢神経系特異的 DNMA1L1 マウスの表現型

末梢神経系特異的 DNMA1L1 マウスにおいて、24 週時点での腓腹神経の電子顕微鏡観察では、ほとんどの無髄神経が消失し、正常対照群と比べ有髄神経の数も減少していた(data not shown)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakai-Shimoda Hiromi, Himeno Tatsuhito, Okawa Tetsuji, Miura-Yura Emiri, Sasajima Sachiko, Kato Makoto, Yamada Yuichiro, Morishita Yoshiaki, Tsunekawa Shin, Kato Yoshiro, Seino Yusuke, Inoue Rieko, Kondo Masaki, Seino Susumu, Naruse Keiko, Kato Koichi, Mizukami Hiroki, Nakamura Jiro, Kamiya Hideki	4. 巻 25
2. 論文標題 Kir6.2-deficient mice develop somatosensory dysfunction and axonal loss in the peripheral nerves	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103609 ~ 103609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103609	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Himeno Tatsuhito, Kamiya Hideki, Nakamura Jiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Not out of the woods yet: "Diabetic neuropathy" or "neuropathy associated with diabetes"?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 753 ~ 755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13780	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Himeno Tatsuhito, Kamiya Hideki, Nakamura Jiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Diabetic polyneuropathy: Progress in diagnostic strategy and novel target discovery, but stagnation in drug development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 25 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Himeno Tatsuhito, Kamiya Hideki, Nakamura Jiro	4. 巻 11
2. 論文標題 <i>Lumos</i> for the long trail: Strategies for clinical diagnosis and severity staging for diabetic polyneuropathy and future directions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 5 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------