

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592659

研究課題名(和文)高ブドウ糖環境下に於ける神経細胞・表皮細胞・線維芽細胞の機能的・形態学的解析

研究課題名(英文)Analysis of nerve cells, keratinocytes and fibroblasts in a high glucose medium

研究代表者

松崎 恭一 (Matsuzaki, Kyoichi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20278013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：SortilinはproNGFと共にp75に結合すると、細胞死シグナルが細胞内へ伝達される。糖尿病の創傷治癒遷延に表皮細胞のsortilinが関与しているかを調べるため、培地中の糖濃度によって培養表皮細胞のsortilin遺伝子(SORT1)の発現量が変化するかを検討した。その結果、培養後24時間では、糖濃度の高低にかかわらずSORT1の遺伝子発現量は100mg/dLのSORT1の遺伝子発現量と有意差はなかった。培養後48、72時間では0mg/dLのSORT1の遺伝子発現量は100mg/dLのSORT1の遺伝子発現量に比べ有意に高かったが、他の濃度では有意差がなかった。

研究成果の概要(英文)：When proNGF binds to sortilin and p75, the cell death signal is transduced into the cell. We examined how sortilin gene expression changes in cultured human epidermal cells depending on the glucose concentration in the culture medium.

When the cells were grown in the new medium for 24 hours, the sortilin gene expression level at 100 mg/dL glucose did not differ significantly from the expression levels at other glucose concentrations. At 48 and 72 hours of culture, only the sortilin gene expression level at 0 mg/dL glucose was significantly higher than the expression level at 100 mg/dL glucose. The results suggest that the sortilin gene levels of epidermal cells are not clinically problematic at low glucose concentrations, just as at high glucose concentrations, provided the glucose levels are sufficient to maintain biological activities.

研究分野：形成外科

キーワード：高ブドウ糖 低ブドウ糖 表皮細胞 Sortilin-1 糖尿病性神経障害

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者の約 40%が糖尿病性神経障害を生じる。糖尿病性神経障害では全身の臓器を司る神経が障害されるが、皮膚で障害が生じると潰瘍、壊疽から時に敗血症に至ることさえある。また、慢性有痛性ニューロパチーによる強い疼痛が、日常生活や就労を困難にすることさえある。

高ブドウ糖環境下における表皮細胞の NGF 産生に及ぼす影響を検討した。その結果、通常の培地のブドウ糖濃度 100mg/dl に対し、200mg/dl の培地では表皮細胞のコロニー形成能に大きな変化はないが、培地中の NGF は有意に低下した(unpublished data)。この 200mg/dl の濃度では、細胞死を招く proNGF やソーチリンはどのように推移したかは興味深く、その解析によって、表皮細胞のターンオーバーが障害される以前に、神経障害の徴候がみられるかが明らかになると考えられた。

2. 研究の目的

Nerve growth factor (NGF)は糖尿病性末梢神経障害に伴う創傷治癒遅延に関与する。NGF はチロシンキナーゼ型受容体である TrkA を介して神経突起の伸長や分化を促進し、神経細胞が成熟した後も生存や機能維持にはたらく。さらに神経保護作用があるため、神経細胞死を抑制し神経損傷の修復に関与する[1-3]。一方、NGF の前駆体である proNGF は、腫瘍壊死因子受容体ファミリーの p75 に結合する。2001 年、proNGF が共受容体の sortilin と共に p75 に結合すると細胞死を招くことが報告された[4]。すなわち NGF と proNGF の作用は、ほぼ正反対であることが明らかになった。

Sortilin は 95 kDa glycoprotein で a member of the mammalian type-I transmembrane receptors containing a Vps10p domain である[5]。中枢神経系の細胞内膜系、とくに Golgi 体に多く存在し、細胞内分子輸送に関与する。Sortilin は細胞膜に存在する低親和性ニューロトロフィン受容体の p75 に proNGF と共に結合すると、細胞死シグナルが細胞内へ伝達される。脳卒中などで脳が損傷すると、損傷した細胞から放出されるタンパク質によって周辺の正常な細胞のアポトーシスが誘発され、発生から数分以内に神経細胞の細胞死が始まる。Sortilin はこのアポトーシス指令の重要な役割をはたすため、アルツハイマー病などの中枢神経疾患に続いて生じるアポトーシスに関与すると考えられている[6, 7]。2010 年、培養表皮細胞にも sortilin が存在し proNGF と共に p75 に結合することによって細胞死に至ることが明らかになった[7]。そこで今回、糖尿病の創傷治癒遅延に sortilin が関与しているかを調べるため、培養表皮細胞における sortilin 遺伝子(SORT1) の発現量が培地中の糖濃度によって変化するかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 表皮細胞の培養

本学生命倫理委員会の承認のもと、同意を得た患者より手術時に余剰となった正常皮膚から採取したヒト表皮細胞を用いた。表皮角化細胞増殖用培地 (EpiLife[®], Life technologies Corporation, CA, USA) に増殖添加剤 (EpiLife[®] Defined Growth Supplement, Life technologies Corporation, Carlsbad, USA)を加えた培地を用いて、37、5% CO₂条件下で培養した。この表皮細胞を 6 穴プレートに継代し 80%のコンフルエントにした後、無血清、無糖培地 (HuMedia-KG2, KURABO INDUSTRIES LTD, Tokyo, Japan)で 24 時間培養した。次いで、この培地を 0, 20, 40, 60, 100, 200, 400, 800 mg/dL の各種 glucose 濃度に調整し 24, 48, 72 時間培養した。

(2) SORT1 の発現

各条件で培養した表皮細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)を用いて Total RNA を抽出した。得られた Total RNA に対して SuperScript[®] VIL0™ cDNA Synthesis Kit (Life technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)を用いて逆転写反応を行い cDNA を得た。得られた cDNA より KAPA SYBR R FAST Universal qPCR Kit (KAPA BIOSYSTEMS, Boston, USA)を用いて real-time PCR を行なった。遺伝子発現の解析には Rotor Gene Q (Qiagen, Venlo, Netherlands)を使用し、下記プライマーを使用した。

(forward)

5' -TTATCCTGGCCATCGTGGGATTGA-3'

(reverse)

5' -ATTAGTGTGGGAGGCTGTGTCCAA-3'

GAPDH

(forward)

5' -CATGTTCGTCATGGGTGTGAACCA-3'

(reverse)

5' -AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT-3'

(3) 統計解析

各培養期間、糖濃度における reactive mRNA levels (SORT1/GAPDH)を、対応する培養期間の 100mg/dL の糖濃度の reactive mRNA levels (SORT1/GAPDH)と Dunnett の多重比較法を用いて 100mg/dL 群とその他の濃度群を比較した。統計解析ソフトは SAS Ver. 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を使用した。

4. 研究成果

(1) 結果

無血清、無糖培地での 24 時間の培養後、新たな培地での 24 時間の培養では、いずれの糖濃度の SORT1 の遺伝子発現量においても 100mg/dL の SORT1 の遺伝子発現量と有意差はなかった。新たな培地での培養後 48 時間では、0mg/dL の SORT1 の遺伝子発現量でのみ

100mg/dL の SORT1 の遺伝子発現量に比べ有意に高かった ($p=0.002$) (図 1)。

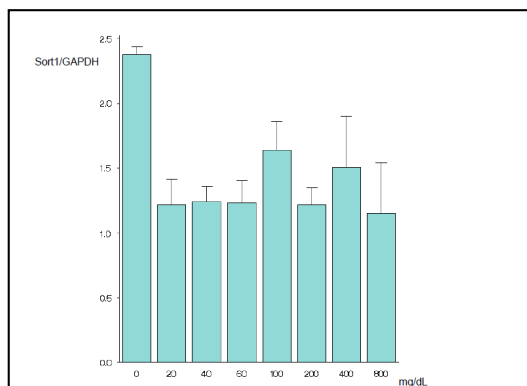


図 1 新たな培地で 48 時間培養後の SORT1 の遺伝子発現量

新たな培地での培養後 72 時間では、0mg/dL の SORT1 の遺伝子発現量でのみ 100mg/dL の SORT1 の遺伝子発現量に比べ高度に有意に高かった ($p<0.001$) (図 2)。

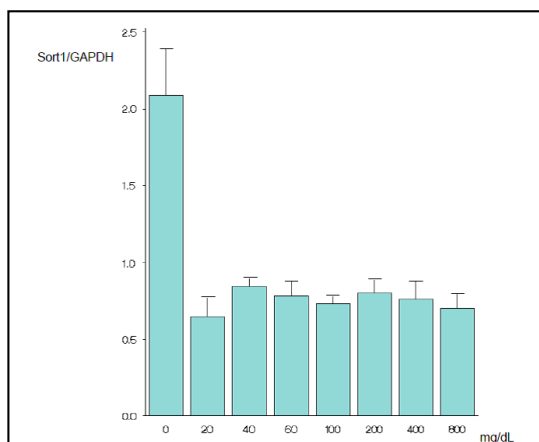


図 1 新たな培地で 48 時間培養後の SORT1 の遺伝子発現量

(2) 考察

創傷治癒過程において表皮細胞は NGF を産生し分泌する。分泌された NGF は nerve fiber を sprout して神経を再生するとともに、autocrine fashion によって、表皮細胞自身の増殖と遊走も促進する [2, 3, 8, 9]。そのため糖尿病性潰瘍の創傷治癒遅延に NGF が関与するかを調べた報告は多い [1-3, 10, 11]。一方、表皮細胞は proNGF も産生し、さらに p75 と sortilin も存在するので、autocrine に細胞死にいたる経路も存在する。表皮細胞を high glucose の培地で培養すると、細胞の増殖と分化、さらに cell mobility が抑性される [12-14]。そこでわれわれは、培地中の糖の濃度が高くなると、SORT1 の遺伝子発現量が増加するのではないかと考え、0, 100, 200, 400, 800 mg/dL の各種 glucose 濃度で

表皮細胞を培養して SORT1 の遺伝子発現量を調べた。結果は予想に反して、high glucose においても 100mg/dL の glucose の SORT1 の遺伝子発現量と比べて有意差はなかった。一方、今回の結果と同様に培養後 48 時間と 72 時間では、0mg/dL の糖濃度でだけ 100mg/dL の SORT1 の遺伝子発現量に比べて高値を示した (unpublished data)。そこで 0mg/dL と 100mg/dL の間ではどのように発現しているかを確認するため 20, 40, 60 mg/dL の糖濃度も追加して再検討した。その結果、SORT1 の遺伝子発現量は 0mg/dL と 100mg/dL の間で段階的に変化するのではなく、0mg/dL でのみ高いことが明らかになった。今回の研究に使用した培養表皮細胞は 80% のコンフルエントにした後、一旦、無血清、無糖培地で 24 時間培養したうえで 0, 20, 40, 60, 100, 200, 400, 800 mg/dL の各種 glucose 濃度に調整した培地で 24, 48, 72 時間培養したので、0mg/dL の glucose 濃度の培地で培養した細胞は、計 48 時間、72 時間、96 時間無糖状態で暴露されたことになる。

糖の濃度は細胞活性に大きな影響を与える。これまで行われてきた高血糖による創傷治癒遅延に関する研究の多くはサイトカインの視点で行われてきた。糖尿病では TGF- β 1 レベルの低下によって表皮細胞の遊走が障害される [15]。表皮細胞の EGF に対する反応の低下と、血小板で産生される EGF の減少も表皮細胞の増殖と遊走を障害する [16]。さらに表皮細胞における SDF-1 の産生も低下するため、血管内皮前駆細胞の創傷への誘導も障害されることなどが報告されてきた [17]。しかし sortilin の視点で、high glucose による創傷治癒遅延が研究された報告はない。糖尿病の病状が悪化すると、インスリンによる血糖値のコントロールが難しくなり、低血糖による昏睡を生じることがある。低血糖を含め低栄養は創傷治癒に悪影響を与える [18]。今回の研究では 20, 40, 60 mg/dL の low glucose においても SORT1 の遺伝子発現量は 100mg/dL の SORT1 と有意差がなかった。すなわち生命活動を維持できるレベルの糖濃度であれば high glucose と同様に low glucose においても表皮細胞の SORT1 の遺伝子発現量は臨床において問題はないことが示唆された。今後、タンパクとしての sortilin, proNGF, p75 の発現を表皮細胞で調べると共に、末梢神経細胞での発現が検討されれば、糖尿病性足潰瘍において sortilin, proNGF, p75 を介した表皮細胞の細胞死が関与しているか明らかになるかもしれない。

< 引用文献 >

1. Yiangou Y, Facer P, Sinicropi DV, Boucher TJ, Bennett DL, et al (2002) Molecular forms of NGF in human and rat neuropathic tissues: decreased NGF precursor-like immunoreactivity in human diabetic skin. J Peripher Nerv Syst 7:

190-197.
2. Barker AR, Rosson GD, Dellon AL (2006) Wound healing in denervated tissue. *Ann Plast Surg* 57: 339-342.
3. Radtke C, Rennekampff HO, Reimers K, Vogt PM, Kocsis JD (2013) Paracrine loop of keratinocyte proliferation and directed neuritic outgrowth in a neuroepithelial coculture. *Ann Plast Surg* 70: 162-167.
4. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294: 1945-1948.
5. Marcusson EG, Horazdovsky BF, Cereghino JL, Gharakhanian E, Emr SD (1994) The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* 77: 579-586.
6. Reitz C, Cheng R, Rogava E, Lee JH, Tokuhira S, et al (2011) Meta-analysis of the association between variants in SORL1 and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 68: 99-106.
7. Kiss M, Dallos A, Kormos B, Sántha P, Dobozy A, et al (2010) Sortilin is expressed in cultured human keratinocytes and is regulated by cutaneous neuropeptides. *J Invest Dermatol* 130: 2553-2560.
8. Di Marco E, Mathor M, Bondanza S, Cutuli N, Marchisio PC, et al (1993) Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop. *J Biol Chem* 268: 22838-22846.
9. Pincelli C, Marconi A (2010) Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 22: 71-79.
10. Bennett NT, Schultz GS (1993) Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg* 166: 74-81.
11. Ordoñez G, Fernandez A, Perez R, Sotelo J (1994) Low contents of nerve growth factor in serum and submaxillary gland of diabetic mice. A possible etiological element of diabetic neuropathy. *J Neurol Sci* 1994 Feb;121(2):163-6.
12. Spravchikov N, Sizyakov G, Gartsbein M, Accili D, Tennenbaum T, et al (2001) Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications. *Diabetes* 50: 1627-1635.
13. Terashi H, Izumi K, Devenci M, Rhodes LM, Marcelo CL (2005) High glucose inhibits human epidermal keratinocyte proliferation for cellular studies on

diabetes mellitus. *Int Wound J* 2: 298-304.
14. Lan CC, Wu CS, Kuo HY, Huang SM, Chen GS (2009) Hyperglycaemic conditions hamper keratinocyte locomotion via sequential inhibition of distinct pathways: new insights on poor wound closure in patients with diabetes. *Br J Dermatol* 160: 1206-1214.
15. Wang XJ, Han G, Owens P, Siddiqui Y, Li AG (2006) Role of TGF beta-mediated inflammation in cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc* 11:112-117.
16. Rafahi H, El-Osta A, Karagiannis TC (2011) Genetic and epigenetic events in diabetic wound healing. *Int Wound J* 8: 12-21.
17. Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, Chen H, Goldstein LJ, et al (2007) Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest* 117: 1249-1259.
18. Blondet JJ, Beilman GJ (2007) Glycemic control and prevention of perioperative infection. *Curr Opin Crit Care* 13:421-427.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Matsuzaki K, Tomioka M, Watabe Y : Expression of the sortilin gene in cultured human keratinocytes increases in a glucose-free medium. *Clinical Research on Foot & Ankle* doi: 10.4172/2329-910X.S3-004, 2014

〔学会発表〕(計 1件)

松崎恭一, 宮本明: 糖尿病性腎症により血液透析が導入された重症下肢虚血患者の足創傷をカテーテルと小切断で治療後2年の転帰. 第57回日本形成外科学会総会学術集会, 長崎新聞文化ホール、長崎市, 2014. 4.10

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 恭一 (Matsuzaki Kyoichi)
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20278013

(2) 研究分担者

井上 肇 (INOUE Hajime)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：60193603

(3) 研究分担者

富岡 みゆき (TOMIOKA Miyuki)
聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員
研究者番号：90398967