



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	乙第1920号
学位記番号	論第1676号
氏名	大蔵 篤彦
授与年月日	令和4年9月26日
学位論文の題名	SGK1 in Schwann cells is a potential molecular switch involved in axonal and glial regeneration during peripheral nerve injury (末梢神経損傷時のシュワン細胞におけるリン酸化酵素 SGK1 の役割) Biochemical and Biophysical Research Communications 2022; 607: 158-165
論文審査担当者	主査： 松川 則之 副査： 澤本 和延, 飛田 秀樹

論文内容の要旨

.....

[Introduction] 外傷性末梢神経損傷は、交通事故、スポーツ、労働災害などにより生じる。中枢神経損傷に比べ末梢神経損傷後の回復は良好であるとされるが、いまだ十分な回復がなされているとはいいがたい。実際には、発症初期には外科的あるいは内科的薬物療法が選択されるが、治療期間の長期化に伴い、機能回復を促すために長期の理学療法や運動療法へ移行することも多い。このようなことから、より早く確実な回復のために、神経回復過程の分子メカニズムに基づいた新規治療法の開発やリハビリテーション法の向上が期待されている。末梢神経束は神経軸索が束ねられ構成されており、それらの軸索をシュワン細胞が髄鞘を形成し、鞘状に取り囲む構造をしている。シュワン細胞は、末梢神経損傷に伴い変性し失われるが、その際、損傷部位周囲の未熟なシュワン細胞は、回復期に増殖・分化し、軸索の再生・伸長を支援する。このように、シュワン細胞は末梢神経の髄鞘形成に重要な役割を果たしており、この細胞を軸とした末梢神経損傷の病態生理の解明は軸索の機能回復の促進につながる可能性がある。Heller ら(J. Cell Biol, 2014) はシュワン細胞に存在する serum- and glucocorticoid- inducible kinase 1 (SGK1)が発生・発達期の末梢神経の髄鞘形成に関与していることを報告したが、末梢神経損傷や末梢神経修復における SGK1 の意義はいまだ解明されていない。本研究では、末梢神経修復時の SGK1 に着目し、その過程における SGK1 の役割について検討した。

[Materials and methods] (1)C57BL6 マウスの坐骨神経をピンセットで挫滅損傷を生じさせた。損傷 1 日目と 5 日目の後肢の趾間の幅で坐骨神経損傷とその後の回復を評価した。損傷後 5 日目にマウス坐骨神経組織を採取し、電子顕微鏡で損傷神経の形態学的変化を観察した。同様に、損傷部位末梢側で免疫組織学的染色法によりシュワン細胞および SGK1 の存在を調べた。(2)シュワン細胞株である S16 細胞を用い、SGK1 の発現、SGK 阻害剤の効果（細胞数と細胞質の面積、細胞傷害性、分化及び神経修復に関与する遺伝子発現）を検討した。

[Results] 生体マウスを用いて末梢神経損傷モデルの作製をところ、障害肢の麻痺が認められたことから、モデルにおける坐骨神経の損傷を確認した。挫滅 5 日目で有意な機能回復を認め、健常側との差が焼失したが、電子顕微鏡による観察では、障害側で神経線維の密度が低下しており、また障害された有髄神経で観察される二重輪が認められ、回復途上であることが示唆された。これらの試料に対し免疫組織化学的手法を用いたところ、損傷した神経の周囲に GFAP 陽性の未熟なシュワン細胞が出現し、これらの細胞には SGK1 が存在することが確認された。次に、シュワン細胞株である S16 細胞を用いて、SGK1 のシュワン細胞における役割を検討した。S16 細胞には SGK の中でも特に SGK1 が発現していた。SGK 阻害剤 gsk650394 を投与すると、MTT 活性と細胞増数が減少し、細胞体のサイズは増大した。SGK 阻害は有意な LDH release 活性や PI 染色数増加を示さず細胞傷害を起こさないことから、細胞死を起こさずにシュワン細胞の細胞増殖を抑制し、細胞サイズを増大させることが示唆された。さらに、定量的 PCR 法とウェスタンブロット法を用いた実験で、SGK 阻害により髄鞘形成と神経再生の促進因子である BDNF、MBP、Krox20 の遺伝子発現は増加し、未成熟なシュワン細胞で発現する Sox10 の発現が低下することを見出した。

[Conclusions] 本研究では、末梢神経損傷時におけるシュワン細胞の SGK1 の役割に着目した。上記の結果から、SGK1 の活性は未成熟なシュワン細胞の増殖に関与し、SGK1 の活性抑制によりシュワン細胞は増殖から分化へと転換することが示唆された。末梢神経損傷後 SGK1 の活性化および SGK 阻害を適切なタイミングで行うことにより、その回復を促進できる可能性があると考えた。

論文審査の結果の要旨

【背景・目的】 外傷性末梢神経損傷は中枢神経損傷に比べ回復は良好であるとされるが、必ずしも十分な回復が得られるとは限らない。末梢神経ではシュワン細胞が髓鞘を形成し、神経軸索を鞘状に取り囲んでいる。シュワン細胞は末梢神経損傷に伴い変性し失われるが、損傷部位周囲の未熟なシュワン細胞が回復期に増殖・分化し、軸索の再生・伸長を支援する。シュワン細胞に存在する serum- and glucocorticoid- inducible kinase 1 (SGK1)は、発生・発達期の末梢神経の髓鞘形成に関与すると報告されているが、末梢神経損傷や末梢神経修復における SGK1 の意義はいまだ解明されていない。本研究では、末梢神経修復時およびその過程における SGK1 の役割について検討した。

【方法】 (1) C57BL6 マウスの坐骨神経をピンセットで挫滅損傷を生じさせた。損傷 1 日目と 5 日目の後肢の趾間の幅で坐骨神経損傷とその後の回復を評価した。損傷後 5 日目にマウス坐骨神経組織を採取し、電子顕微鏡で損傷神経の形態学的変化を観察した。同様に、損傷部位末梢側で免疫組織学的染色法によりシュワン細胞および SGK1 の存在を調べた。(2) シュワン細胞株である S16 細胞を用い、SGK1 の発現、SGK 阻害剤の効果（細胞数と細胞質の面積、細胞傷害性、分化及び神経修復に関与する遺伝子発現）を検討した。

【結果】 (1) 坐骨神経の挫滅損傷後、障害側の麻痺が出現したが、挫滅 5 日目で有意な機能回復を認め、健常側との差は消失した。電子顕微鏡による観察では、障害側で神経線維の密度が低下と二重輪が認められた。免疫組織化学的検討では、損傷神経周囲に GFAP 陽性の未熟なシュワン細胞が出現し、同細胞には SGK1 が発現していた。(2) S16 細胞には SGK1 が発現していた。SGK 阻害剤 gsk650394 を投与すると、MTT 活性と細胞増数が減少し、細胞体のサイズは増大した。SGK 阻害は有意な LDH release 活性や PI 染色数増加を示さず細胞傷害を起さなかった。さらに定量的 PCR 法とウェスタンブロット法による検討で、SGK 阻害により髓鞘形成と神経再生の促進因子である BDNF、MBP、Krox20 の遺伝子発現は増加し、未成熟なシュワン細胞で発現する Sox10 の発現が低下した。

【考察】 本研究では、末梢神経損傷時において SGK1 の活性が未成熟なシュワン細胞の増殖に関与し、SGK1 の活性抑制によりシュワン細胞は増殖から分化へと転換することを示した。このことは SGK1 活性化および阻害のタイミングを適切にコントロールすることによって、神経機能回復を変化させる（たとえば促進）可能性があることを示した点で意義がある。末梢神経損傷後の神経機能回復における SGK1 の役割解明にはさらなる検討が必要である。

【審査の結果】

申請者の 20 分間のプレゼンテーションの後に、主査松川から末梢神経障害の臨床的病態分類、臨床症候の特徴や使用した S16 細胞の特徴など 8 項目、第一副査の澤本教授から SGK1, N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1) の生物学的機能、NDRG1 異常に伴う Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病の臨床的特徴と病態生理、免疫染色結果の解釈など 7 項目、第二副査の飛田教授から透過型電顕の特性と資料作成法、細胞培養法や用いられた各種生存細胞・死細胞評価法の具体的な反応系や結果評価など 7 項目の質問がなされた。申請者は、多くの質問に対して回答に窮する場面が見受けられたが、最終的には概ね申請論文内容を理解していると審査委員会は判断した。本論文では、圧迫性末梢神経障害の回復過程に SGK1-NDRG1 シグナルが関与している可能性が示唆された。今後、動物モデルを用いた詳細なメカニズム解明と介入研究の基盤研究として意義ある研究である。以上をもって本論文の著者には、博士（医学）の称号を与えるに相応しいと委員会は判断した。

論文審査担当者 主査 松川 則之 副査 澤本 和延 飛田 秀樹