

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	古川 和郎
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第770号
学位授与の日付	平成29年9月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Advanced glycation end products induce brain-derived neurotrophic factor release from human platelets through the Src-family kinase activation. (最終糖化産物(AGEs)はヒト血小板において、Srcファミリーキナーゼの活性化を介して脳由来神経栄養因子(BDNF)の放出を促進させる)
論文審査委員	主査 教授 池内 健 副査 教授 那波 宏之 副査 教授 曾根 博仁

博士論文の要旨

【背景と目的】

脳由来神経栄養因子(BDNF; Brain-derived neurotrophic factor) はニューロトロフィンファミリーに属し、中枢神経や末梢神経の分化、生存に重要な役割をする。BDNFは脳の可塑性の制御にも関連し、うつ病のような精神疾患との関連も示唆されている。またBDNFは摂食制御やエネルギー代謝にも関連している。

糖尿病は、心血管疾患、脳梗塞、足切断などの大血管障害や網膜症、腎症や神経障害といった細小血管障害の合併症が問題となる慢性代謝疾患症候群である。これまでの研究からBDNFは、糖尿病の合併症である網膜症や神経障害などの細小血管障害や、また心筋梗塞などの大血管障害に対して保護的に機能することが基礎研究から示唆されている。

さらに、血中BDNFは狭心症や心不全などの心血管疾患と関連し、血清BDNFの低下は心血管疾患のリスクと関連することが報告されている。糖尿病患者における血中BDNFは、非糖尿病患者と比して増加している報告がある一方、減少しているとする報告もあり、この不一致は糖尿病の病態が、血中のBDNFに影響していることを示唆する。

ヒトにおける末梢血のBDNFの主要な供給源は血小板であることが分かっており、血清のBDNF濃度は血小板からの放出されたBDNFの量を反映しているかもしれない。しかし、糖尿病の病態における血小板からのBDNFの放出のメカニズムは明らかではない。

そこで、申請者らは糖尿病患者で増加し、糖尿病の細小血管障害や大血管障害の発症に寄与するとされる、最終糖化産物(AGEs; Advanced glycation end products)に注目し、ヒト血小板におけるBDNFの放出制御に関する最終糖化産物(AGE)の働きを調べることを本研究の目的として、研究を行った。

【方法】

文書による同意を頂いた糖尿病のない、健常人より静脈採血を行った。採血された静脈血は3.2%クエン酸ナトリウム入りの容器に移し、200×gで10分間遠心を行い、上清(多血小板血漿)を回収し、その後1μM

のプロスタグランジン E1 を含んだ 15%の ACD(Acid-citrate-dextrose) 溶液を加え、800×g で 10 分間遠心、洗浄を行った。その後、Tris/EDTA バッファーで遠心・洗浄を行った後に Ca イオンフリーのタイロードバッファーを加え、血小板数をカウントし、1 チューブあたり、 1×10^8 個となるように希釈を行った。

1×10^8 /tube の血小板に様々な濃度の AGE を投与し、37°C の恒温槽内で 5 分間、刺激を行った後、上清およびライセートを回収し、それぞれの BDNF を ELISA で測定し、血小板あたりの総 BDNF、放出された BDNF 量から BDNF の放出率を算出した。また、刺激した血小板についてウェスタンブロッティング、免疫沈降法を用いてタンパク解析を行った。

【結果】

コントロール、25mM グルコース、25mM マンニトール、100 μ g/ml AGE の比較では、AGE 投与によって有意に BDNF の放出率は増加し、また AGE による血小板からの BDNF の放出は濃度依存性であった。そこで、申請者らは BDNF の放出に関する細胞内 Ca イオンの動態について調べるために、細胞内 Ca イオンキレーターである、BAPTA-AM を AGE 投与 5 分前に投与し検討したところ、BAPTA-AM 10 μ M の投与により AGE による BDNF の放出は有意に抑制された。血小板には RAGE(Receptor for AGE)、CD36 や 5HT-2A/C などのいくつかの AGE の受容体が発現していることが知られている。特に CD36 は Src ファミリーキナーゼ(SFK; Src family kinase)を活性化させること、また SFK の活性化は、Syk タンパク、フォスホリパーゼ C γ (PLC γ ; phospholipase C γ) を介して、血小板内の Ca イオンの濃度上昇を起こすことが明らかとなっている。このことから、申請者らはこの SFK の阻害薬である PP2 を AGE 投与 5 分前に投与し、AGE による血小板からの BDNF の放出に与える影響について調べたところ、PP2 10 μ M の投与によって AGE による BDNF の放出は有意に抑制された。

そこで申請者らは詳細な血小板からの BDNF の放出メカニズムを調べるためタンパク解析を行った。ウェスタンブロッティングでの解析で、AGE は SFK である Src をリン酸化させ、またその反応は PP2 によって抑制された。また、免疫沈降法による解析では、AGE によって SFK の下流に存在する Syk タンパクはリン酸化され、またその反応は PP2 によって抑制された。

【考察】

これらの結果から、AGE はヒト血小板において Syk-Src (-PLC γ) 経路を介して、BDNF の放出を促進させることが分かった。AGE による細胞毒性や BDNF の保護的効果を考慮すると、糖尿病の早期段階において AGE によるヒト血小板からの BDNF の放出は、生物学的な防御機構として機能している可能性がある。また、糖尿病の病期が長くなり、血中 AGE の蓄積により、血小板内の BDNF の枯渇や制御不全が起こる可能性が考えられた。

審査結果の要旨

脳由来神経栄養因子(BDNF) は神経の分化、生存に重要な役割をするニューロトロフィンである。糖尿病は、心血管疾患、脳梗塞などの大血管障害や網膜症、腎症などの細小血管障害の合併症が問題となる慢性代謝疾患であり、糖尿病患者の血清 BDNF 濃度は健常人と比して低下している、あるいは上昇しているとする報告がある。末梢血 BDNF の主な供給源は血小板であることから、血清 BDNF 濃度は血小板から放出された BDNF を反映している可能性がある。

そこで、申請者らは糖尿病患者で増加するとされる、最終糖化産物(AGEs)に注目し、ヒト血小板における BDNF 放出と AGE の働きを調べた。

申請者は健常人から採血し、血小板を抽出し解析したところ、AGE 投与により血小板からの BDNF 放出が促進された。細胞内 Ca²⁺キレータである BAPTA-AM によって AGE による BDNF 放出反応は抑制され、また血小板に存在する Src ファミリーキナーゼ(SFK)を阻害する作用をもつ、PP2 によってもこの反応は抑制された。蛋白解析では AGE は SFK である Src をリン酸化させ、また SFK の下流に存在する Syk 蛋白もリン酸化させることが分かった。

以上より、AGE はヒト血小板において Src-Syk 経路を介して、BDNF 放出を促進させることが分かった。

本論文は、AGE がヒト血小板から BDNF の放出を促進させることを初めて示した論文である。ヒト血小板から AGE による BDNF の放出機構を明らかにした点に博士論文としての価値を認める。