

学位論文題名

脳由来神経栄養因子(BDNF)の循環血液中における
存在様式の解明

学位論文内容の要旨

【要 旨】

【目的】

脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)は nerve growth factor (NGF) family に属する、28kDa, pI 10.3 のホモダイマーサイトカインである。これまでに BDNF の主要生理作用として神経可塑による中枢神経系の維持が注目され、多くの解析例が報告されてきた。一方で BDNF は末梢組織と循環血液中にも存在し、末梢組織における病態生理学的意義についての報告例は未だ少ないものの、これまでに血管内皮細胞の恒常性の維持や白血病の増悪への関与が報告されている。特に近年では血小板製剤輸血時における輸血アレルギー反応への BDNF の関与が立て続けに報告されるなど、末梢組織における BDNF の病態生理学的意義の解明は急務といえる。BDNF は循環血液中では大部分が血小板に貯蔵されていることが知られているが、血小板母細胞である巨核球での BDNF の産生は cell line を用いた in vitro の系では認められず、巨核球は BDNF 産生能力が欠如していると考えられてきた。現在のところ血小板内 BDNF の由来は同定されておらず、血小板・巨核球と BDNF の相互作用に対する知見の希薄さが末梢組織における BDNF の病態生理学的意義解明の大きな障壁になってきた。そこで本研究では血小板および巨核球に対する BDNF の病態生理学的作用の推定を研究目的と定め、(1) ヒト血小板内 BDNF の動態解析、(2) 幼若巨核球 in vitro モデルである MEG-01 に対する BDNF の生理作用解析、(3) MEG-01 における BDNF 産生調節機構の解析を実施した。

【方法】

本研究はヒト末梢血由来の血小板および幼若巨核球の in vitro モデルとして巨核球細胞株 MEG-01 を用いて実施した。血小板内 BDNF の動態解析は免疫電子顕微鏡 (immuno-electron microscopy, IEM) とシヨ糖密度勾配超遠心法による血小板細胞小器官分画によって実施した。シヨ糖密度勾配超遠心法による BDNF の貯蔵局在同定は western blotting (WB) を組み合わせて行った。MEG-01 に対する BDNF の生理作用解析は thrombopoietin (TPO) 添加・非添加条件下で MEG-01 を培養し、その時の BDNF の自己産生能を WB で検討した。続いて BDNF の巨核球に対する生理作用を推定するために、BDNF がもたらす MEG-01 の形態変化を細胞増殖と多核化の2点について検討した。BDNF の MEG-01 細胞増殖促進作用については TPO および BDNF

添加条件での細胞数の増減を計測することで評価し、MEG-01 の多核化に対する影響については細胞内 DNA を propidium iodide (PI) で染色後にフローサイトメトリーで測定して評価した。MEG-01 における BDNF 産生調節機構の解析は TPO 未刺激 MEG-01 を対象に、RT-PCR で BDNF transcripts (BDNF sense RNA と BDNF natural antisense transcript) の発現パターンを解析後、RNase A protection assay によって BDNF endogenous double strand RNA (dsRNA) の存在を検討した。その後、siRNA を用いて BDNF natural antisense transcript をノックダウンし、quantitative RT-PCR (qRT-PCR) と WB で MEG-01 における BDNF natural antisense transcript の BDNF 産生への影響を検討した。

【結果】

(1) ヒト血小板内 BDNF の動態解析

検討の結果、BDNF は α 顆粒と細胞質の2種類の局在に貯蔵されている事が明らかになり、さらにトロンビン刺激によって放出挙動を呈するものは α 顆粒内 BDNF である事が明らかになった。本検討により得られた細胞質内 BDNF の存在という知見は血小板母細胞である巨核球による BDNF の産生を示唆するものであり、これまですべて外因性であると考えられてきた血小板内 BDNF の由来について初めて巨核球由来の内因性 BDNF の可能性が提示された。

(2) 幼若巨核球 in vitro モデルである MEG-01 に対する BDNF の生理作用解析

巨核球における BDNF 産生の可能性が示唆された事から MEG-01 を用いた BDNF 産生能の解析を実施し、MEG-01 は TPO 存在下で BDNF を産生する事が明らかになった。また、産生された BDNF は autocrine 様式によって自己利用され、MEG-01 の細胞増殖を促進する事が明らかになった。一方、MEG-01 の多核化に対して BDNF は促進的作用を示さず、むしろ多核化抑制傾向が認められた。造血幹細胞から巨核球産生に至る分化成熟過程は megakaryopoiesis と呼ばれ、早期の自己増殖能に特徴づけられる分化過程と、それに続発する多核化・細胞質膨張が起こる成熟過程に分けられる。本検討により得られた知見から、BDNF は MEG-01 に対して自己細胞増殖を促進する megakaryocyte-colony stimulating factor (MEG-CSF) 様作用を呈する事が明らかになり、BDNF が megakaryopoiesis に関与する新しいサイトカインである可能性が示唆された。

(3) MEG-01 における BDNF 産生調節機構の解析

BDNF の MEG-CSF 様作用は MEG-01 の多核化に対して抑制性であり、これは BDNF が megakaryopoiesis の成熟過程においては逆に阻害因子である可能性を示していた。そこで著者は巨核球には BDNF の産生調節機構が存在すると仮定し、MEG-01 における BDNF 産生調節機構を検討した。検討の結果 MEG-01 は BDNF sense RNA (BDNF-S) とともに BDNF natural antisense transcript (BDNF-AS) を発現し、これら transcripts が内因的に dsRNA を形成している事が明らかになった。さらに siRNA による BDNF-AS ノックダウン実験の結果、BDNF の産生を BDNF-AS が抑制している事が明らかになった。この抑制機構についてはこれまでに得られた検討結果から内在性 RNA interference (RNAi) であると推察しているが、現時点ではまだ機構同定には至っていない。

【結論】

本研究によってヒト血小板内 BDNF の貯蔵局在は α 顆粒と細胞質である事が同定され、さらに in vitro モデルを用いた BDNF の巨核球に対する生理作用解析の結果、BDNF は巨核球によって産生・分泌される事、そして megakaryopoiesis に対して MEG-CSF 様作用を呈する新規関連因子である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 清 一
副 査 教 授 森 山 隆 則
副 査 教 授 千 葉 仁 志

学位論文題名

脳由来神経栄養因子(BDNF)の循環血液中における 存在様式の解明

脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)は nerve growth factor (NGF) family に属する 28kDa, pI 10.3 のホモダイマーサイトカインである。これまでに BDNF の主要生理作用として神経可塑による中枢神経系の維持が注目され、多くの解析例が報告されている。一方で BDNF は末梢組織と循環血液中にも存在し、末梢組織における病態生理学的意義についての報告例は未だ少ないものの、これまでに血管内皮細胞の恒常性の維持や白血病の増悪への関与が報告されている。特に近年では血小板製剤輸血時における輸血アレルギー反応への BDNF の関与が立て続けに報告されるなど、末梢組織における BDNF の病態生理学的意義の解明は急務といえる。BDNF は循環血液中では大部分が血小板に貯蔵されていることが知られているが、血小板母細胞である巨核球での BDNF の産生は cell line を用いた in vitro の系では認められず、巨核球は BDNF 産生能力が欠如していると考えられてきた。現在のところ血小板内 BDNF の由来は同定されておらず、血小板・巨核球と BDNF の相互作用に対する知見の希薄さが末梢組織における BDNF の病態生理学的意義解明の大きな障壁となっている。そこで本研究は、血小板および巨核球に対する BDNF の病態生理学的作用の解明を研究目的とし、(1) ヒト血小板内 BDNF の動態解析、(2) 幼若巨核球 in vitro モデルである MEG-01 に対する BDNF の生理作用解析、(3) MEG-01 における BDNF 産生調節機構の解析を実施したものである。

本研究はヒト末梢血由来の血小板と幼若巨核球の in vitro モデルとしての巨核球細胞株 MEG-01 を用いて実施している。血小板内 BDNF の動態解析には免疫電子顕微鏡とシヨ糖密度勾配超遠心法及び WB 法を利用し、MEG-01 に対する BDNF の生理作用解析には、TPO 添加・非添加時の BDNF 産生能を WB で検討している。BDNF がもたらす MEG-01 の形態変化は、細胞増殖と多核化の 2 点について検討し、BDNF の MEG-01 細胞増殖促進作用については TPO および BDNF 添加条件での細胞数計測にて評価し、MEG-01 の多核化に対する影響については細胞内 DNA を PI 染色後にフローサイトメトリーで測定している。MEG-01 における BDNF 産生調節機構の解析は TPO 未刺激 MEG-01 を対象に、RT-PCR で BDNF transcripts (BDNF sense RNA と BDNF natural antisense transcript : NAT) の発現パターンを解析後、RNase A protection assay によって BDNF endogenous dsRNA の存在を検討し、siRNA を用いて BDNF NAT をノックダウン後、quantitative RT-PCR と WB で MEG-01 における BDNF NAT の BDNF 産生への影響を検討している。

ヒト血小板内 BDNF の動態解析の検討の結果、BDNF は α 顆粒と細胞質の 2 種類の局在に貯蔵されていること、さらにトロンピン刺激によって放出挙動を呈するものは α 顆粒内 BDNF である事を明らかにした。本検討により得られた細胞質内 BDNF の存在という知見は血小板母細胞である巨核球による BDNF の産生を示唆することから、これまですべて外因性であると考えられてき

た血小板内 BDNF の由来について初めて巨核球由来の内因性 BDNF の可能性を提示した。未刺激 MEG-01 では既報のように蛋白レベルでの BDNF 産生は認められなかったが、TPO 刺激により MEG-01 が BDNF を産生し、産生された BDNF は autocrine 様式によって自己利用され、MEG-01 の細胞増殖を促進することを抗 BDNF 中和抗体添加実験より初めて明らかにした。一方、MEG-01 の多核化に対して BDNF は促進的作用を示さず、むしろ多核化抑制傾向が認められたことから、BDNF は MEG-01 の自己細胞増殖を促進する MEG-CSF 様作用を有するサイトカインとして megakaryopoiesis に関与するが、その後の成熟過程には関与しない可能性に言及している。そこで次に著者は、巨核球には BDNF 産生調節機構が存在すると想定し、MEG-01 における BDNF 遺伝子発現を検討した。その結果 MEG-01 は BDNF sense RNA (BDNF-S) とともに BDNF natural antisense transcript (BDNF-AS) を発現し、これら transcripts が内因的に dsRNA を形成していることを初めて明らかにした。さらに外来性 siRNA 導入による BDNF-AS ノックダウン実験の結果、BDNF-S 量の増加と BDNF 蛋白の産生が認められたことから、BDNF-AS が BDNF-S 発現を抑制することを確認した。これらの結果から、生理的な抑制機構は cis-NAT による内在性 RNAi であると推測できるが、現時点ではまだ機構の全容解明には至っていないという。

以上より、著者は血小板内 BDNF の貯蔵局在について初めて α 顆粒と細胞質である事を同定し、さらに in vitro モデルを用いた実験によって血小板内 BDNF の由来として巨核球による自己産生の新知見を得た。BDNF の巨核球への生理作用は MEG-CSF 様作用の可能性が示唆され、BDNF の megakaryopoiesis に対する新規関連因子である可能性を本論文により初めて提唱した。加えて本論文では巨核球による BDNF の内在的かつ能動的産生抑制機構の可能性についても検討されており、megakaryopoiesis の新たな分子機構の存在を示唆している。本論文は、巨核球の分化、増殖、血小板産生に至る一連の経路に BDNF という新たな調節因子の関与を示すものであり、未だ全貌が理解されていない megakaryopoiesis の解明に大きく貢献するものである。よって著者は、北海道大学博士（保健科学）の学位を授与される資格あるものと認める。