

氏 名（本 籍）	堀 貴 光	（岐阜県）
学 位 の 種 類	博 士（医学）	
学 位 授 与 番 号	甲第 1222 号	
学 位 授 与 日 付	令和 5 年 3 月 25 日	
学 位 授 与 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
学 位 論 文 題 目	Relationship between the Responsiveness of Amyloid $\beta$ Protein to Platelet Activation by TRAP Stimulation and Brain Atrophy in Patients with Diabetes Mellitus	
審 査 委 員	（主査）教授	山口 瞬
	（副査）教授	中川 敏幸          教授 下畑 享良

## 論 文 内 容 の 要 旨

2 型糖尿病（diabetes mellitus : DM）はアルツハイマー病（Alzheimer' s disease : AD）を含む認知症の重要な危険因子である。2 型 DM と AD の臨床的特徴は認知障害，大小血管病変，脳萎縮，代謝能低下等において類似していることが明らかにされている。しかし，DM から認知症に至る分子機序の詳細は未だ解明されていない。

脳実質におけるアミロイド  $\beta$  蛋白質（Amyloid  $\beta$  protein : A $\beta$ ）の沈着は，AD で起こる神経変性に関与していると考えられている。一方，A $\beta$  はヒトの血中に存在していることが知られている。A $\beta$  は Amyloid precursor protein（APP）の断片であり，APP は血小板に豊富に含まれている。血小板の  $\alpha$  顆粒に貯蔵されている APP fragments と A $\beta$  は血小板の活性化に伴って放出され，血中の A $\beta$  は主として血小板由来であると考えられている。しかし，血中の A $\beta$  の生理的意義は明らかにされていない。近年，A $\beta$  が直接ヒト血小板を活性化することが報告された。一方で，私が所属する研究室では先行研究にて，健常人の血小板において A $\beta$  がトロンビン受容体活性化ペプチド（thrombin receptor-activating peptide : TRAP）刺激によって惹起されるその活性化を抑制することを明らかにしている。また，DM 患者の血小板において，TRAP 刺激は Akt を活性化し，リン酸化された heat shock protein 27（HSP27）の遊離を促進することを明らかにしている。

MRI は認知症に伴う脳のダメージを評価するための有用なツールとして広く受け入れられている。脳白質病変（white matter hyperintensity : WMH）の出現は，高齢者の認知障害を含む老年症候群に関与していると考えられている。DM 患者では非 DM 患者に比べて WMH の体積が増加することが報告されている。また，AD や DM 患者では脳萎縮の進展が認められ，最近，食後高血糖が 2 型 DM 高齢者の脳萎縮や WMH と関連していると報告された。本研究では，DM 患者を対象に，TRAP 刺激による血小板活性化に対する A $\beta$  の影響，およびその反応性と MRI 所見との関連について解析を行った。

### 【対象と方法】

実験は 2 型 DM 患者 96 例を対象とした。静脈血を採取し，遠心分離法により多血小板血漿（platelet rich plasma : PRP）を調整した。PRP を A $\beta$  で前処置したのちに TRAP で刺激し，光透過法およびレーザー光散乱システムを用いて血小板凝集能を測定した。細胞内の Akt および HSP27 のリン酸化は Western blot 法によって分析した。血小板から分泌される platelet derived growth factor AB（PDGF-AB）および遊離されるリン酸化 HSP27 は ELISA 法によって測定した。頭部 MRI を撮像し，自動セグメンテーションアプリを用いて WMH，脳実質容積（parenchymal volume : PAR）および頭蓋内容積（intracranial volume : IC）を計測し，脳白質病変出現率（WMH/IC），脳萎縮率（PAR/IC）を解析し，血小板の反応性との関連を検討した。

### 【結果】

- 1) DM 患者群の一部では、健常者群と同様に、TRAP 刺激による血小板凝集に対して A $\beta$  が抑制効果を示した。その一方で、DM 患者群の中には、TRAP 刺激による血小板凝集が A $\beta$  によって変化しない症例および亢進する症例が認められた。
- 2) TRAP 刺激により惹起される Akt および HSP27 のリン酸化は、A $\beta$  の血小板凝集能に対する作用と連動していた。すなわち、TRAP 刺激による血小板凝集が A $\beta$  によって抑制される症例では Akt および HSP27 のリン酸化が A $\beta$  によって抑制され、TRAP 刺激による血小板凝集が A $\beta$  によって変化しない症例では Akt および HSP27 のリン酸化が A $\beta$  によって変化しなかった。
- 3) TRAP 刺激による血小板凝集および PDGF-AB 分泌、リン酸化 HSP27 遊離について、症例ごとに P/N(A $\beta$ -positive/A $\beta$ -negative) の値を求め、相関関係を調べた。PDGF-AB の分泌およびリン酸化 HSP27 の遊離においても、血小板凝集能に対する作用と相関することが認められた ( $R^2 = 0.278$ ,  $p = 0.000$ ;  $R^2 = 0.058$ ,  $p = 0.018$ )。
- 4) DM 患者における脳白質病変出現率と血小板凝集能、PDGF-AB 分泌およびリン酸化 HSP27 遊離の間に相関は認められなかった。
- 5) DM 患者における脳萎縮率と PDGF-AB 分泌に関しては有意な相関が認められた ( $R^2 = 0.052$ ,  $p = 0.026$ )。

### 【考察】

健常人では A $\beta$  が TRAP 刺激によって惹起される血小板活性化を抑制する。DM 患者では健常人と同様に抑制する症例も認められたが、その一方で、影響しない症例および亢進する症例も認められた。DM 患者では健常人と異なり A $\beta$  に対する血小板の反応性が個々に変化しており、DM 患者では反応が均一ではないことが示唆された。脳萎縮率と PDGF-AB 分泌との間に有意な相関が認められ、A $\beta$  によって PDGF-AB 分泌が亢進する症例では脳萎縮の程度が少なかった。PDGF-AB は活性化血小板から分泌されていることを考慮すると、トロンビン受容体の活性化に伴い、血小板から何らかの脳萎縮に対する「anti-atrophic factor」が放出されている可能性が考えられた。

### 【結論】

TRAP 刺激による血小板活性化の A $\beta$  に対する反応性は、DM 患者では健常人と異なり多様であることが示唆された。加えて、A $\beta$  による血小板活性化の抑制作用が認められない患者において、脳萎縮の程度が減少することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 堀 貴光は、2 型糖尿病患者の中に、トロンビン受容体活性化ペプチド刺激による血小板活性化に対して A $\beta$  が抑制効果を示す健常者と異なり、A $\beta$  が無効の症例や増強効果を示す症例が存在することを明らかにした。さらに、活性化血小板からの PDGF-AB 分泌が A $\beta$  によって亢進する症例では、脳萎縮の程度が少ないことを示した。本研究の成果は、血小板や糖尿病、認知症の研究、および脳神経科学の発展に少なからず寄与するものと認める。

---

### [主論文公表誌]

Takamitsu Hori, Daisuke Mizutani, Takashi Onuma, Yu Okada, Kumi Kojima, Tomoaki Doi, Yukiko Enomoto, Hiroki Iida, Shinji Ogura, Takashi Sakurai, Toru Iwama, Osamu Kozawa and Haruhiko Tokuda: Relationship between the Responsiveness of Amyloid  $\beta$  Protein to Platelet Activation by TRAP Stimulation and Brain Atrophy in Patients with Diabetes Mellitus  
Int. J. Mol. Sci. 23, 14100 (2022) . doi: 10.3390/ijms232214100.