

審査の結果の要旨

氏名 黒澤 美穂

本研究は糖尿病患者において血栓症が頻発する原因としてhistone感受性の亢進を想定し、histone感受性の亢進の原因として白血球接着因子Mac-1が好中球・血小板相互作用を介する血栓形成に重要であることを、histone誘発肺血栓および肺出血モデルマウスを用いた実験および好中球、多血小板含有血漿による試験管内の血栓形成を吸光度計を用いて定量化を行った実験により検証を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 本モデルにおいて抗Gr-1抗体により好中球を免疫学的に枯渇させたマウス、また、白血球上に発現するMac-1を欠損したマウスにおいて生存が改善したため、histoneによる血栓形成にはMac-1を介した血小板・好中球相互作用が重要であると考えられた。
2. C57BL/6jマウスに高脂肪食high fat diet (HFD)を投与し、2型糖尿病を自然発症させたDIO (diet induced obesity)マウスでは、通常飼料投与マウスと比べ、histone投与後、生存率の著明な低下を認めたため、これは糖尿病における易血栓性を示していることが示唆された。
3. HFD+histone 投与モデルは野生型マウスと比べ、Mac-1 KO マウスにおいて生存が改善した。これらの結果から、糖尿病患者では histone 感受性が亢進しており、そのメカニズムとして Mac-1 を介した血小板・好中球相互作用が考えられた。
4. ラクトフェリン Lactoferrin (Lf) はヒトの母乳や涙液、唾液などの外分泌液に含まれている物質であり、好中球の二次顆粒中にも含まれており、抗菌活性を始めとする多機能性蛋白として報告されている。我々の研究室は、最近の研究において血栓症と深く関わっている NETs が Lf の作用により顕著に制御されることを見出した (論文投稿中)。Lf は血小板機能・好中球機能を制御する物質として考えられ、histone 誘発血栓症モデルマウス、HFD 投与 histone 誘発血栓症モデルマウスに Lf を投与したところ、生存が著明に改善した。
5. 好中球・血小板相互作用による血栓形成への影響を定量化するためにCaCl₂を加えた多血小板含有血漿 (platelet-rich plasma : PRP) 、多形核好中球 (polymorphonuclear neutrophil : PMN) 、少量のthrombinを用いて96 well plate内で血漿クロットを作成し、その混濁度によりフィブリン血栓形成を定量化し、好中球・血小板相互作用による血栓形成を評価する実験系を新たに立てた。
6. 5の実験系を用い、histoneの存在下でPRP+PMN群の吸光度を比較したところ、histoneに

よる吸光度の増幅効果が見られ、histoneにより活性化した好中球・血小板による血栓形成の増強効果が確認された。Mac-1抗体、Lfはこの系において、histoneにより活性化した好中球・血小板による血栓形成による血栓形成を改善させた。

7. 糖尿病の病態は血液，細胞内において最終糖化産物 (advanced glycation end products : AGEs) の形成を促進する高血糖状態に特徴づけられる。In vitro において AGEs のモデル物質として使用されている AGE-BSA は PRP+PMN の血栓形成を増強した。また，AGEs の前駆体の一つである methylglyoxal (MG)は PRP+PMN+histone による血栓誘導を増強した。このことから、糖尿病において histone 感受性が亢進している要因として MG が関与していることが示唆された。

以上、本論文で、「糖尿病では血栓症の発症が助長される要因として、Mac-1 を介した血小板・好中球相互作用に代表される histone 感受性が亢進している」という新たなメカニズム解明の糸口を掴んだ。この histone 感受性を制御する新たな治療薬の候補として Lf の効果が期待され、Lf が糖尿病患者に対する安全な治療薬となる可能性を提示しており、学位の授与に値するものと考えられる。