

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350885

研究課題名(和文)骨格筋由来生理活性因子(マイオカイン)BDNFによる肥満・糖尿病の予防・治療

研究課題名(英文)The prevention and treatment of obesity and diabetes with BDNF, a myokine derived from skeletal muscle

研究代表者

羽入 修 (HANYU, Osamu)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：10452054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳由来神経栄養因子BDNFは食欲や血糖を抑制するため肥満や糖尿病の治療薬として期待されるが、骨格筋でも産生されマイオカインとしても注目される。我々はBDNFが膵グルカゴン分泌の抑制により血糖を低下させる可能性を示した。また最終糖化産物(AGE)がヒト血小板においてSrc family kinaseの活性を介してBDNFの放出を促進し、血小板内BDNFの枯渇をもたらしている可能性を示した(古川らCardiovasc Diabetol. 2017;16(1):20)。糖尿病ではAGEにより血小板内のBDNFが枯渇し、BDNFの血管保護効果の減弱により糖尿病血管合併症が促進される可能性が示唆された。

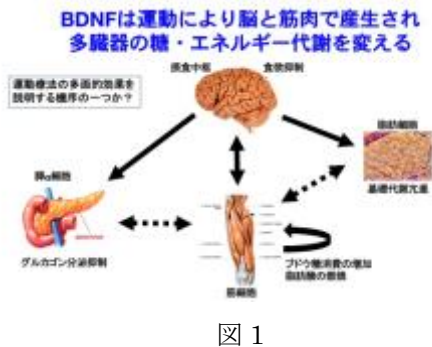
研究成果の概要(英文)：Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a possible anti-obesity and anti-diabetes agent with its anorectic and hypoglycemic effect. Recently BDNF is considered as one of myokines which is produced in skeletal muscle. We demonstrated that BDNF reduces blood glucose level via suppression of glucagon secretion from pancreas. In addition, advanced glycation end products (AGEs) induces BDNF release from human platelets through the activation of the Src family kinase pathway (Furukawa, K. et al. Cardiovasc Diabetol. 2017;16(1):20). Considering the toxic action of AGEs and the protective roles of BDNF, it can be hypothesized that AGE-induced BDNF release is a biological defense system in the early phase of diabetes. Chronic elevation of AGEs may induce depletion or downregulation of BDNF in platelets during the progression of diabetes mellitus.

研究分野：糖尿病内科 / 内分泌代謝内科 / 糖エネルギー代謝

キーワード：BDNF 糖尿病 肥満

1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病が増加し、網膜症や腎症、動脈硬化症などの糖尿病血管合併症が社会問題となっている。糖尿病の治療には食事療法、運動療法、薬物療法があるが、これら既存の治療では高血糖や合併症治療薬として効果不十分な症例も多く、新規の治療法が求められている。脳由来神経栄養因子 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)は血糖低下作用を有する事から新規糖尿病薬として期待されるが、糖エネルギー代謝への作用や糖尿病血管合併症への関与など不明な点が多い(図1)。



2. 研究の目的

BDNFは、血糖低下作用を有する事から新規糖尿病薬として期待がかかるが、近年、運動により筋組織でも産生されることが報告された。しかしその生理的役割は不明である。本研究では、BDNFの筋組織でのブドウ糖利用促進作用やインスリン感受性改善作用、肥満予防作用、グルカゴン分泌抑制作用など抗糖尿病効果の詳細な機序を解明すると共に、基礎的な臨床データを収集する。

また BDNF は血中ではそのほとんどが血小板のα顆粒内に存在し、心筋梗塞など血管障害では保護的に作用することが報告されている。今回は糖尿病など慢性的な高血糖状態における BDNF の動向や血管合併症への関与の可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

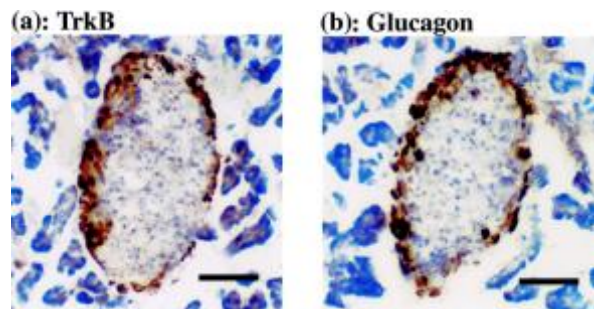
ホルマリン灌流固定を行なった正常 ddy マウス及び BDNF ノックアウトマウスの腭連続切片を用いて BDNF 受容体 (trkB) の免疫染色を行なった。BDNF ノックアウトマウスの遺伝子型は、尾の切片からゲノム遺伝子を抽出し、targeted allele 特異的 primer を用いた PCR 法で確認した。また正常 C57BL/6 マウスからコラゲナーゼ法で膵ランゲルハンス島を単離し、10ng/mL の BDNF を添加した培養液中で7日培養を行い、培養液中および膵ランゲルハンス島細胞内のグルカゴンとインスリンの含量を RIA 法で測定した。正常 C57BL/6 マウスに 10mg/kg の BDNF を連日皮下投与を行い、血中ブドウ糖濃度、血中グルカゴン濃度、餌の摂取量、および体重の変化を測定した。

一方、健常者の末梢血由来の血小板を、様々な濃度の AGE (glycated-BSA) と共に 37℃

で5分間インキュベートし、血小板内および血小板から放出された BDNF を ELISA 法で測定した。またこれらの反応系に Ca イオンのキレート剤である BAPTA-AM や、Src family kinases (SFKs) のインヒビターである PP2 を加えた場合も同様に検討した。Src や Syk (downstream kinase of SFKs) のリン酸化は Western blotting 法と免疫沈降法で評価した。

4. 研究成果

BDNF を7日間連日皮下投与した正常マウスでは、有意にえさの摂取量と空腹時血糖が低下した。また BDNF の受容体である trkB が膵α細胞に発現しており(図2)、BDNF 添加により単離ランゲルハンス島からのグルカゴン分泌が抑制された(図3)。



マウス膵ラ氏島α細胞における BDNF受容体(TrkB)の発現口

図2

BDNFによるグルカゴン分泌の抑制

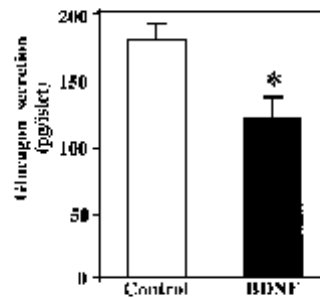


図3

また BDNF ノックアウトマウスでは血糖値が wildtype に比べ有意に高値だった。これらの結果より、BDNF は食欲抑制作用に加え、膵α細胞からのグルカゴン分泌を抑制することにより血糖を低下させる可能性が示された(羽入修ら, Diabetes Obes Metab 5(1): 27-37)。

またヒト血小板において、慢性的な高血糖状態で蓄積する最終糖化産物 (AGE) が容量依存性に BDNF の放出を促進した(図4、図5、古川和郎ら, Cardiovasc Diabetol. 16(1): 20. doi: 10.1186/s12933-017-0505-y)。

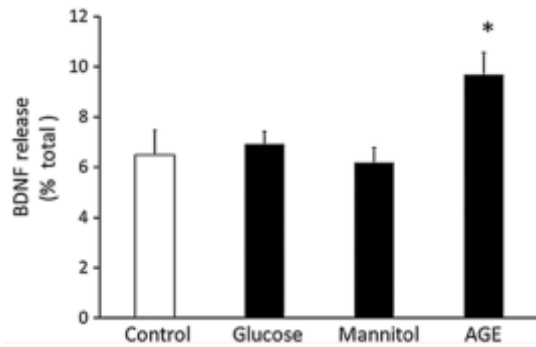


図 4

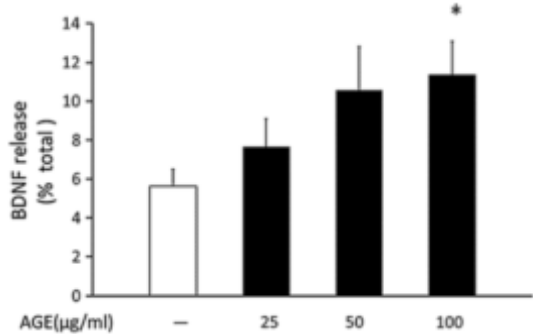


図 5

また膜透過性の Ca キレート剤である BAPTA-AM や Src family kinase(SFK)阻害剤である PP2 を添加すると AGE による BDNF 放出は抑制された (図 6、図 7)。

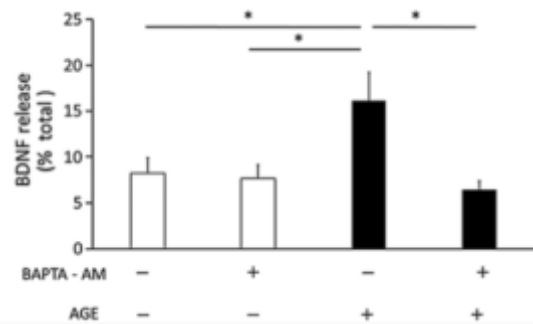


図 6

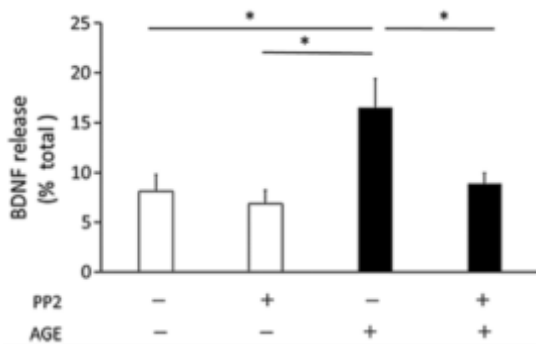


図 7

さらに Western blotting 法と免疫沈降法により、血小板内の SFK や Syk (downstream

kinase of SFKs) は、AGE 添加によりリン酸化されることが示された (図 8、図 9)。

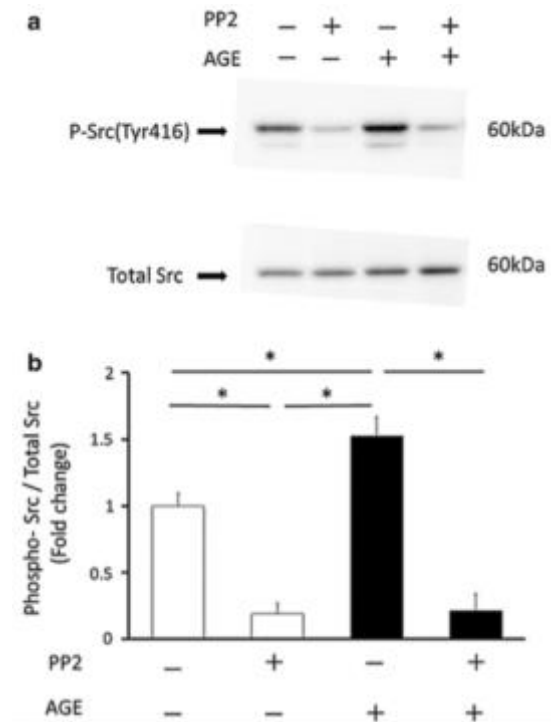


図 8

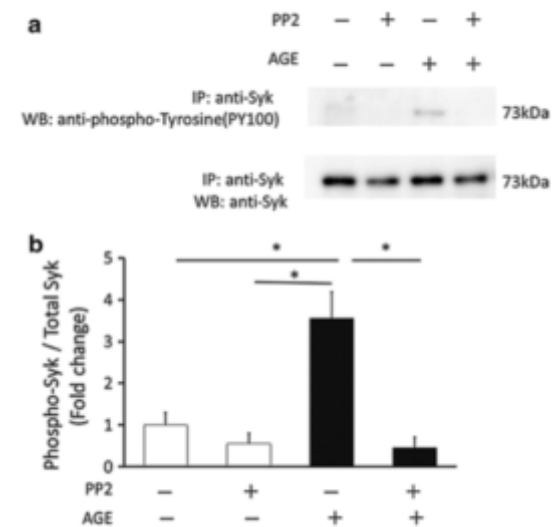


図 9

これらにより AGE は Ca 依存性に Src family kinase(SFK)の活性を介して、血小板内 BDNF の枯渇をもたらしている可能性が示された。糖尿病患者では慢性的な高血糖状態で蓄積する AGE により血小板内の BDNF が枯渇し、BDNF の血管保護効果の減弱により血管合併症が促進される可能性がある。

以上より、BDNF は糖代謝や肥満是正作用のみならず、糖尿病患者の血小板 BDNF 枯渇による血管障害の進行を抑止する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 28 件)

(1) Furukawa, K., I. Fuse, Y. Iwakura, H. Sotoyama, O. Hanyu, H. Nawa, H. Sone and N. Takei (2017). Advanced glycation end products induce brain-derived neurotrophic factor release from human platelets through the Src-family kinase activation. *Cardiovasc Diabetol* 16(1): 20 査読有.

(2) Kodama, S., K. Fujihara, H. Ishiguro, C. Horikawa, N. Ohara, Y. Yachi, S. Tanaka, H. Shimano, K. Kato, O. Hanyu and H. Sone (2017). Unstable bodyweight and incident type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *J Diabetes Investig* 13(10): 12623 査読有.

(3) Horikawa, C., Y. Yoshimura, C. Kamada, S. Tanaka, S. Tanaka, S. Matsunaga, O. Hanyu, A. Araki, H. Ito, A. Tanaka, Y. Ohashi, Y. Akanuma and H. Sone (2017). Is the Proportion of Carbohydrate Intake Associated with the Incidence of Diabetes Complications?—An Analysis of the Japan Diabetes Complications Study. *Nutrients* 9(2) 査読有.

(4) Yoshizawa, S., S. Kodama, K. Fujihara, H. Ishiguro, M. Ishizawa, Y. Matsubayashi, S. Matsunaga, T. Yamada, H. Shimano, K. Kato, O. Hanyu and H. Sone (2016). Utility of nonblood-based risk assessment for predicting type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *Prev Med* 91: 180-187 査読有.

(5) Kodama, S., K. Fujihara, H. Ishiguro, C. Horikawa, N. Ohara, Y. Yachi, S. Tanaka, H. Shimano, K. Kato, O. Hanyu and H. Sone (2016). Quantitative assessment of genetic testing for type 2 diabetes mellitus based on findings of genome-wide association studies. *Ann Epidemiol* 26(11): 816-818 e816 査読有.

(6) Kodama, S., K. Fujihara, H. Ishiguro, C. Horikawa, N. Ohara, Y. Yachi, S. Tanaka, H. Shimano, K. Kato, O. Hanyu and H. Sone (2016). Meta-analytic research on the relationship between cumulative risk alleles and risk of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 32(2): 178-186 査読有.

(7) Ishiguro, H., S. Kodama, C.

Horikawa, K. Fujihara, A. S. Hirose, R. Hirasawa, Y. Yachi, N. Ohara, H. Shimano, O. Hanyu and H. Sone (2016). In Search of the Ideal Resistance Training Program to Improve Glycemic Control and its Indication for Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med* 46(1): 67-77 査読有.

(8) Igarashi, R., K. Fujihara, Y. Heianza, M. Ishizawa, S. Kodama, K. Saito, S. Hara, O. Hanyu, R. Honda, H. Tsuji, Y. Arase and H. Sone (2016). Impact of individual components and their combinations within a family history of hypertension on the incidence of hypertension: Toranomon hospital health management center study 22. *Medicine (Baltimore)* 95(38): e4564 査読有.

(9) Fujihara, K., O. Hanyu, Y. Heianza, A. Suzuki, T. Yamada, H. Yokoyama, S. Tanaka, H. Yagyu, H. Shimano, A. Kashiwagi, K. Yamazaki, K. Kawai and H. Sone (2016). Comparison of clinical characteristics in patients with type 2 diabetes among whom different antihyperglycemic agents were prescribed as monotherapy or combination therapy by diabetes specialists. *J Diabetes Investig* 7(2): 260-269 査読有.

(10) Heianza, Y., K. Kato, S. Kodama, N. Ohara, A. Suzuki, S. Tanaka, O. Hanyu, K. Sato and H. Sone (2015). Risk of the development of Type 2 diabetes in relation to overall obesity, abdominal obesity and the clustering of metabolic abnormalities in Japanese individuals: does metabolically healthy overweight really exist? The Niigata Wellness Study. *Diabet Med* 32(5): 665-672 査読有.

(11) Yoshizawa, S., Y. Heianza, Y. Arase, K. Saito, S. D. Hsieh, H. Tsuji, O. Hanyu, A. Suzuki, S. Tanaka, S. Kodama, H. Shimano, S. Hara and H. Sone (2014). Comparison of different aspects of BMI history to identify undiagnosed diabetes in Japanese men and women: Toranomon Hospital Health Management Center Study 12 (TOPICS 12). *Diabet Med* 18(10): 12471 査読有.

(12) Yachi, Y., Y. Tanaka, I. Nishibata, S. Yoshizawa, K. Fujihara, S. Kodama, A. Suzuki, O. Hanyu and H. Sone (2014). Second trimester postload glucose

level as an important predictor of low birth weight infants: Tanaka Women's Clinic Study. *Diabetes Res Clin Pract* 13(14): 00069-00062 査読有.

(13) Takei, N., K. Furukawa, O. Hanyu, H. Sone and H. Nawa (2014). A possible link between BDNF and mTOR in control of food intake. *Front Psychol* 5(1093): 1093 査読有.

(14) Kodama, S., C. Horikawa, K. Fujihara, S. Yoshizawa, Y. Yachi, S. Tanaka, N. Ohara, S. Matsunaga, T. Yamada, O. Hanyu and H. Sone (2014). Meta-analysis of the quantitative relation between pulse pressure and mean arterial pressure and cardiovascular risk in patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 113(6): 1058-1065 査読有.

(15) Horikawa, C., Y. Yoshimura, C. Kamada, S. Tanaka, S. Tanaka, A. Takahashi, O. Hanyu, A. Araki, H. Ito, A. Tanaka, Y. Ohashi, Y. Akanuma, N. Yamada and H. Sone (2014). Dietary intake in Japanese patients with type 2 diabetes: Analysis from Japan Diabetes Complications Study. *J Diabetes Investig* 5(2): 176-187 査読有.

(16) Horiakwa, C., Y. Yoshimura, C. Kamada, S. Tanaka, S. Tanaka, O. Hanyu, A. Araki, H. Ito, A. Tanaka, Y. Ohashi, Y. Akanuma, N. Yamada and H. Sone (2014). Dietary Sodium Intake and Incidence of Diabetes Complications in Japanese Patients with Type 2 Diabetes - Analysis of the Japan Diabetes Complications Study (JDCS). *J Clin Endocrinol Metab* 22: jc20134315 査読有.

(17) Heianza, Y., A. Suzuki, K. Fujihara, S. Tanaka, S. Kodama, O. Hanyu and H. Sone (2014). Impact on short-term glycaemic control of initiating diabetes care versus leaving diabetes untreated among individuals with newly screening-detected diabetes in Japan. *J Epidemiol Community Health* 68(12): 1189-1195 査読有.

(18) Heianza, Y., K. Kato, S. Kodama, A. Suzuki, S. Tanaka, O. Hanyu, K. Sato and H. Sone (2014). Stability and changes in metabolically healthy overweight or obesity and risk of future diabetes: Niigata wellness study. *Obesity (Silver Spring)* 6(10): 20855 査読有.

(19) Heianza, Y., K. Kato, S. Kodama, N. Ohara, A. Suzuki, S. Tanaka, O. Hanyu, K. Sato and H. Sone (2014). Risk of the development of Type 2 diabetes in relation to overall obesity, abdominal obesity and the clustering of metabolic abnormalities in Japanese individuals: does metabolically healthy overweight really exist? The Niigata Wellness Study. *Diabet Med*: 12646 査読有.

(20) Heianza, Y., K. Kato, K. Fujihara, S. Tanaka, S. Kodama, O. Hanyu, K. Sato and H. Sone (2014). Role of sleep duration as a risk factor for Type 2 diabetes among adults of different ages in Japan: the Niigata Wellness Study. *Diabet Med* 30(10): 12555 査読有.

(21) Sone, H., S. Tanaka, S. Tanaka, S. Suzuki, H. Seino, O. Hanyu, A. Sato, T. Toyonaga, K. Okita, S. Ishibashi, S. Kodama, Y. Akanuma and N. Yamada (2013). Leisure-time physical activity is a significant predictor of stroke and total mortality in Japanese patients with type 2 diabetes: analysis from the Japan Diabetes Complications Study (JDCS). *Diabetologia* 56(5): 1021-1030 査読有.

(22) Kodama, S., C. Horikawa, S. Yoshizawa, K. Fujihara, Y. Yachi, S. Tanaka, A. Suzuki, O. Hanyu, H. Yagyu and H. Sone (2013). Body Weight Change and Type 2 Diabetes. *Epidemiology* 24(5): 778-779 査読有.

(23) Fujihara, K., S. Kodama, C. Horikawa, S. Yoshizawa, A. Sugawara, R. Hirasawa, H. Shimano, Y. Yachi, A. Suzuki, O. Hanyu and H. Sone (2013). The Relationship between Diabetic Neuropathy and Sleep Apnea Syndrome: A Meta-Analysis. *Sleep Disord* 2013(10): 150371 査読有.

(24) Hanyu, O., J. Yoshida, E. Abe, S. Hirayama, K. Miyake, Y. Aizawa and T. Miida (2009). High-sensitivity CRP reflects insulin resistance in smokers. *J Atheroscler Thromb* 16(5): 560-567 査読有.

(25) Hanyu, O., T. Miida, K. Kosuge, T. Ito, S. Soda, S. Hirayama, E. Wardaningsih, Y. Fueki, K. Obayashi and Y. Aizawa (2007). Preheparin lipoprotein lipase mass is a practical marker of

insulin resistance in ambulatory type 2 diabetic patients treated with oral hypoglycemic agents. Clin Chim Acta 384(1-2): 118-123 査読有.

(26) Ikarashi, T., O. Hanyu, S. Maruyama, S. Souda, C. Kobayashi, E. Abe, J. Ukisu, K. Naganuma, A. Suzuki, M. Toya, S. Kaneko, K. Suzuki, O. Nakagawa and Y. Aizawa (2004). Genotype Gly/Gly of the Arg16Gly polymorphism of the beta2-adrenergic receptor is associated with elevated fasting serum insulin concentrations, but not with acute insulin response to glucose, in type 2 diabetic patients. Diabetes Res Clin Pract 63(1): 11-18 査読有.

(27) Hanyu, O., T. Miida, K. Obayashi, T. Ikarashi, S. Soda, S. Kaneko, S. Hirayama, K. Suzuki, Y. Nakamura, K. Yamatani and Y. Aizawa (2004). Lipoprotein lipase (LPL) mass in preheparin serum reflects insulin sensitivity. Atherosclerosis 174(2): 385-390 査読有.

(28) Hanyu, O., K. Yamatani, T. Ikarashi, S. Soda, S. Maruyama, T. Kamimura, S. Kaneko, S. Hirayama, K. Suzuki, O. Nakagawa, H. Nawa and Y. Aizawa (2003). Brain-derived neurotrophic factor modulates glucagon secretion from pancreatic alpha cells: its contribution to glucose metabolism. Diabetes Obes Metab 5(1): 27-37 査読有.

[学会発表] (計 20 件)

(1) 古川和郎、武井延之、岩倉百合子、外山英和、羽入修、布施一郎、那波宏之、曾根博仁. 最終糖化産物 (AGE) はヒト血小板から Src family kinase の活性を介して BDNF の放出を促進させる: 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2016 年 5 月 19 日; 国立京都国際会議場 (京都府京都市)

(2) Yoshizawa S, Heianza Y, Tsuruta M, Kato K, Matsunaga S, Kodama S, Hanyu O, Kawai K, Kurihara K, Maekawa S, Sone H. Association of Physical Activity and Neighborhood Environment in Japanese Patients with Type 2 Diabetes: An Observational Study in Multiple Institutes across Japan (JDDM): 76th American Diabetes Association Scientific Sessions (ADA). 2016/06/10; New Orleans (USA)

(3) Igarashi R, Heianza Y, Ishizawa M,

Tsuruta M, Hatta M, Yoshizawa S, Horikawa C, Matsunaga S, Hanyu O, Kodama S, Sato K, Kato K, Sone H. Body Mass Index (BMI), Waist Circumference (WC) and Waist Height Ratio (WHtR) Cutoff Values, and the Impact of Their Combinations on Future Diabetes among Japanese Individuals. 76th American Diabetes Association Scientific Sessions (ADA); 2016/06/10; New Orleans (USA)

(4) Horikawa C, Kameda C, Tanaka S, Tanaka S, Hanyu O, Araki A, Ito, H, Tanaka A, Ohashi Y, Akanuma Y, Yamada N, Sone H. Is Carbohydrate Intake Associated with the Incidence of Diabetes Complications? Japan Diabetes Complication Study (JDCCS): 76th American Diabetes Association Scientific Sessions (ADA). 2016/06/10; New Orleans (USA)

(5) Horikawa C, Tsuruta M, Oshikane Y, Hirasawa R, Yachi Y, Fujihara K, Hanyu O, Sone H. Distance between dietary intake and self-rated dietary behavior in patients with diabetes: analysis from National Health and Nutrition survey in Japan: European Association for the Study of Diabetes (EASD). 2016/09/13; Munich (Germany)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽入 修 (HANYU, Osamu)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号: 10452054

(2) 研究分担者

曾根 博仁 (SONE, Hirohito)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 30312846

(3) 連携研究者

那波 宏之 (NAWA, Hiroyuki)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号: 50183083

(4) 研究協力者

古川 和郎 (FURUKAWA, Kazuo)