

代謝性疾患における血小板機能等の病態・診断・治療に関する研究（22-4）

主任研究者 徳田 治彦 長寿医療研究センター 臨床検査部長

研究要旨

高齢者代謝性疾患における血小板凝集能亢進の機序について解析し、診断・治療への応用に資することをその目的とした。55歳以上の2型糖尿病患者、骨粗鬆症患者および脂質異常症患者より静脈血を採取し、多血小板血漿 (platelet-rich plasma: PRP) を調整、ADPにより惹起される血小板凝集を詳細に解析した。また細胞内情報伝達系についてはWestern blot法にて解析した。平成23年度においては糖尿病患者のべ47件、骨粗鬆症患者のべ14件について血小板凝集能の解析をADPのED50値を指標として実施し、糖尿病13例に亢進を認めた。なお抑制とされた12例のうち8例は抗血小板剤を投与中であった。これらのうち19例（糖尿病17例、骨粗鬆症2例）について細胞内情報伝達系の解析を行い、ADPによる血小板凝集促進効果においてそのED50値とHeat shock protein 27(HSP27)のリン酸化と負の相関を認めた。さらにHSP27のリン酸化部位の検討では、Ser78のリン酸化の程度が低用量ADPによる血小板凝集能促進作用と正の相関を認めた。以上より、ADPによるHSP27(Ser82)のリン酸化亢進が、代謝性疾患患者における血小板凝集能亢進状態のマーカーとなる可能性が強く示唆された。

主任研究者

徳田 治彦 国立長寿医療研究センター 臨床検査部長

分担研究者

酒井 義人 国立長寿医療研究センター 骨粗鬆症科（医長）

小澤 修 岐阜大学大学院医学系研究科 教授

研究協力者

榊原 孝夫 医療法人榊原 榊原整形外科 理事長

A. 研究目的

血小板は生理的な止血の制御に中心的な役割を果たしていることは周知のことである。一方、高齢者では血小板機能が亢進し、血栓形成が循環不全を起こし多様な疾患（脳梗塞、狭心症、悪性腫瘍等）の発症に関与していると考えられている。加齢とともに糖尿病の有

病率は増加し、70歳以上では3人に一人が糖尿病に罹患していると推計されている。高齢者の糖尿病では微小血管障害による三大合併症とともに脳梗塞・心筋梗塞等の大血管障害も多く発症し、これらはいずれも重大な後遺障害を招くことから、有効な予防対策は高齢化の著しい我が国において喫緊の課題である。私共はこれまでに、国立療養所中部病院および国立長寿医療センターで治療中の2型糖尿病患者における血小板凝集能の解析を行い、①大部分の糖尿病患者でシェアーストレス（ずり応力）により血小板微小凝集塊形成が惹起され、糖尿病患者における血糖コントロールの指標であるHbA1c値との有意な相関を示すこと、②ADP刺激による血小板凝集反応において、血糖値正常群ではADP受容体のうちP2Y1受容体が主として関与するが、一方糖尿病患者における血小板凝集能の亢進状態ではP2Y12受容体が関与すること、③糖尿病患者におけるコラーゲン刺激による凝集亢進にはp44/p42MAPKおよびp38MAPKの活性化が関与すること、④血小板におけるp38MAPK活性の定量が臨床指標となることを報告した（*J.Clin.Endocrinol.Metab.*2005;90:920-927, *Life Sci.*2009;85:386-394）。抗血小板剤であるアスピリンは、糖尿病患者において血栓性疾患の主要な二次予防薬であるが、その効果は限定的でアスピリン抵抗性の存在が示唆されている。従って、糖尿病患者の血小板凝集亢進に関する細胞内情報伝達機構を解析し、異常の早期発見・制御が可能となれば健康寿命の延伸に資するところ大と考えられる。

一方、骨粗鬆症性骨折は寝たきり状態の主因であり、骨粗鬆症の効果的かつ安全な予防・治療法の確立が求められる。本症に対する薬物療法として、塩酸ラロキシフェンが広く使用されているが、本剤により深部静脈血栓症、肺塞栓症、網膜血栓症等の静脈血栓塞栓症（vein thromboembolism: VTE）の発生リスク増加が知られている。私共は、閉経後骨粗鬆症患者における血小板凝集能を塩酸ラロキシフェン投与との関連において検討し、7例中2例に血小板凝集能の亢進を認め、それぞれ異なる機序(p44/p42 MAPK あるいは Akt の活性化亢進)が関与することを報告した（*Intern.Med.*2008;47:1523-1528, *Osteoporosis Int.*2010; 21:189-193）。

本研究の目的は、糖尿病や骨粗鬆症をはじめとする高齢者の代謝性疾患における血小板凝集能亢進の機序についての解析から、その診断・治療への応用に資することである。代謝性疾患の患者における血小板機能につき治療経過との関連において詳細に解析し、簡便な臨床指標を提示する。成果として、代謝性疾患を有する高齢者の生命・社会的予後を規定する大血管障害を含む主要な合併症に対する有効な予防・治療体制の確立が期待できる。

## B. 研究方法

55歳以上の2型糖尿病患者、骨粗鬆症患者および脂質異常症患者を対象とした。被験者の肘静脈等より静脈血約10 mLをクエン酸加条件に採取し、多血小板血漿（platelet-rich plasma: PRP）および一般血漿（platelet-poor plasma: PPP）を分離調整したのち、ずり応力（シェアーストレス）あるいはADP等で刺激し、レーザー粒子径測定法に基づく測定装

置 (PA-200:興和) を用いて血小板凝集能の変化を解析した。刺激前後の PRP は分取し、血小板からの生理的活性化物質 (platelet-derived growth factor, および CD40 ligand) を ELISA 法にて測定し、これらの遊離に関する解析に供するとともに、血小板細胞質画分を調整し、ADP により刺激され活性化される細胞内情報伝達系 [アデニル酸シクラーゼ /cAMP、プロテインキナーゼ A、プロテインキナーゼ C、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-キナーゼ)、Akt/protein kinase B、MAP キナーゼスーパーファミリー (p44/p42 MAP キナーゼ、p38 MAP キナーゼ、SAPK/JNK)、Ca<sup>++</sup>動員等]、HSP27 を Western blot 法で検討した。

患者情報については全疾患共通項目として身長、体重、血圧、服用中の薬剤名、白血球数、赤血球数、血色素値、血小板数、総蛋白、アルブミン、AST、ALT、ALP、g-GTP、総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪、尿素窒素、クレアチニン、血糖、HbA1c、2型糖尿病患者項目として糖尿病罹病期間・治療期間、網膜症の有無・病期、尿中アルブミン値、骨粗鬆症患者項目として腰椎・大腿骨骨密度 (YAM%・T-score)、骨代謝マーカー (骨型 ALP、血清 NTx など) を収集することとした。

さらに追跡調査を計画した。即ち2型糖尿病あるいは脂質異常症でCT等により脳梗塞(無症候性を含む)と診断された患者のうち、二次予防治療としての抗血小板療法が新規に開始された場合は、開始後1ヵ月後(4週)、3ヵ月後(12週)、6ヵ月後(24週)に追跡調査を実施することとした。それ以外については6ヵ月後(12週)に調査することとした。骨粗鬆症患者については、治療開始後1ヶ月後(4週)、3ヵ月後(12週)に追跡調査を実施することとした。

#### (倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、最新の臨床研究に関する倫理指針を遵守している。研究への参加は患者の自由な意思によるものであるとともに、患者のプライバシーには十分配慮し、結果の解析にあたっては連結可能匿名化とすることとした。研究計画は国立長寿医療研究センター倫理審査委員会および岐阜大学医学系研究科医学研究等倫理審査委員会において承認を得た。

## C. 研究結果

### I. 糖尿病患者における血小板機能解析結果

平成22年8月31より平成23年3月31までにのべ47件の解析を行った。初回解析時のプロフィールを表1に示す。使用していた糖尿病治療薬の内訳は、スルフォニルウレア剤20例、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤3例、チアゾリン誘導体2例、DPP-4阻害剤11例、インスリン5例であった。また、脂質異常症治療剤であるスタチン製剤は9例に、高血圧治療薬のうちARBまたはACE阻害剤は13例に投与されていた。

これまでの解析により、健常人におけるADP刺激時の血小板凝集についてED50値は1.778 ± 0.122 μMと推算している。これをもとにこれまで解析を行ったケースを、初回分析結果により血小板凝集能正常群、亢進群、抑制群の3群に分類したところ、それぞれ13例、13例、12例であった。抑制群に分類されたものの内8例は抗血小板剤が既に投与されていた。一方、正常群では抗血小板剤の投与例は1例のみ、亢進群では0例であった。亢進群でCTあるいはMRI所見（無症候性脳梗塞）が見られた9例とも抗血小板剤の投与を希望した。追跡結果ではアスピリンまたはクロピドグレルの投与を行った全例で血小板凝集能の亢進が解除されていたが、シロスタゾールを投与した1例では無効であった。

表1. 糖尿病患者プロフィール

症例	age	sex	FPG (mg/d)	HbA1c(%)	sBP (mmHg)	dBP (mmHg)	Pit	ADP ED50	抗血小板剤	糖尿病薬					スタチン	ARB or ACE I
										SU	αGI	TZD	DPP- I	Ins		
1	63	F	110	6.7	116	69	26.8	2.181	-	-	○	-	-	○	-	
2	67	F	141	6.8	118	70	16.5	2.625	Ci	○	○	-	-	-	-	
3	63	F	120	6.5	137	67	23.2	0.939	-	-	-	-	-	-	-	
4	71	M	149	8.1	141	92	22.5	2.565	-	-	-	○	-	-	-	
5	74	M	125	6.1	149	88	11.5	2.609	S	○	-	-	○	-	○	
6	84	M	125	8.6	132	60	26.4	1.894	A	○	-	-	-	-	○	
7	69	F	127	7.1	130	80	17.3	0.762	-	-	-	○	-	-	○	
8	67	F	201	12.9	135	84	34.3	0.711	-	○	-	-	-	-	-	
9	73	M	121	6.6	93	56	15.5	0.791	-	○	-	-	-	-	○	
10	61	M	244	12.3	130	74	27.2	6.529	T	-	-	-	-	○	○	
11	60	M	193	9.4	110	76	20	0.79	-	○	-	-	-	-	-	
12	76	M	87	7.2	106	56	18.8	0.745	-	-	-	-	-	○	-	
13	61	M	239	12.6	94	64	16.7	1.571	-	-	-	-	-	○	○	
14	63	F	132	7.7	128	80	32.6	1.844	-	○	-	-	-	-	-	
15	72	M	88	8.1	137	73	33.7	0.208	-	○	-	-	○	-	-	
16	72	F	246	10.3	123	67	24.3	0.676	-	○	-	-	○	-	-	
17	62	M	113	6.2	94	65	17.4	2.063	-	-	-	-	-	-	-	
18	68	F	88	6.3	136	90	22.7	1.857	-	-	-	-	-	-	-	
19	73	M	138	7.7	134	71	11.9	1.827	-	-	-	-	-	○	-	
20	81	F	190	10.3	125	63	25.4	1.583	-	○	-	-	-	-	○	
21	63	M	143	9.9	124	64	18.2	2.562	A	-	-	-	○	-	○	
22	78	F	75	7.2	146	77	23.3	1.826	-	○	○	-	-	-	○	
23	61	M	183	12.3	115	72	16.8	2.076	A, Ci	-	-	-	-	-	○	
24	63	F	174	7.6	116	70	16.4	1.862	-	-	-	-	○	-	-	
25	73	F	126	7.9	109	72	26.8	2.548	A	○	-	-	○	-	○	
26	56	F	116	7.5	113	67	19.3	0.73	-	○	○	-	-	-	-	
27	68	M	101	6	128	82	20.3	1.983	-	-	-	-	○	-	-	
28	62	M	137	8.2	132	64	27	1.836	-	○	-	-	-	-	-	
29	70	F	231	10.3	136	60	34.4	2.214	A	-	-	-	-	○	-	
30	65	M	241	10.2	150	64	19.1	0.673	-	○	-	-	-	○	○	
31	68	M	126	6.4	137	88	17.8	1.888	-	-	-	-	-	-	-	
32	80	F	91	8.2	134	68	19.5	1.896	-	○	-	-	-	-	○	
33	56	M	297	12.1	99	63	26.7	0.658	-	○	-	-	-	-	-	
34	56	F	242	12.5	140	78	23.1	2.333	-	○	-	-	○	-	○	
35	84	M	183	11	154	69	19.8	2.333	A	○	-	-	○	-	○	
36	79	F	159	8.9	119	73	21.8	0.672	-	-	-	-	-	○	-	
37	60	F	134	7.8	98	74	13.8	1.434	-	-	-	-	-	-	○	
38	77	M	254	10.7	132	73	16.2	0.819	-	○	-	-	○	-	-	

※抗血小板剤；A：aspirin，S：Sarpogrelate，T：Ticlopidine，Ci：Cilostazol

## II. 骨粗鬆症患者における血小板機能解析結果

平成 22 年 8 月 31 より平成 23 年 3 月 31 までのべ 14 件の解析を行った。初回解析時のプロフィールを表 2 に示す。初回分析結果を糖尿病患者と同様、血小板凝集能正常群、亢進群、抑制群の 3 群に分けたところ、それぞれ 1 例、4 例、3 例であった。うち 2 例が骨粗鬆症治療を希望せず、ラロキシフェンが 4 例に、テリパラチドが 2 例に投与された。引き続き経過観察を予定している。

ラロキシフェンを投与した 1 例において、ED50 値の変化が確認された。また、テリパラチドを投与した 2 例では、いずれも投与 6 時間後の再検で ED50 値の低下が見られた。

表 2. 骨粗鬆症患者プロフィール

症例	age	sex	ALP (IU/L)	骨ALP	sNTx	BMD L2-L4 YAM(%)	Plt.	ADP ED50	抗血小板剤	スタチン	ARB or ACE I
1	76	F	192	15.2	14.4	57	19.3	2.333	-	-	-
2	75	F	388	22.1	13	65	23.9	2	A	-	-
3	74	F	287	17.8	15.7	62	30.6	2.739	-	-	-
4	80	F	287	16.1	14.6	70	22.5	2.142	-	-	○
5	69	F	282	27.8	35.2	66	22.1	0.939	-	○	-
6	64	F	395	36.2		66	18.7	0.712	-	-	-
7	66	F	232	14.1	17	67		0.759	-	-	-
8	58	F	305	24	27.4	79	22.3	0.696	-	-	-

## III. 血小板内情報伝達機構の解析

代謝性疾患 19 例 (Diabetes Mellitus 17 例、Osteoporosis 2 例) において解析し、血小板活性化物質である ADP による血小板凝集促進効果においてその ED50 値と Heat shock protein 27 (HSP27) のリン酸化と負の相関があった。HSP27 は Ser15、Ser78 および Ser85 の三か所のセリンがリン酸化されるが、その中で Ser15 および Ser85 ではなく、Ser78 のリン酸化の程度が低用量の ADP (1  $\mu$ M) による血小板凝集能促進作用と正の相関を認めた。なお、刺激血小板からの PDGF および sCD40L の遊離に相違は見られなかった。

## D. 考察と結論

多く糖尿病患者において血小板機能の亢進が見られることは既に報告しているが、その機序は未だ明らかでなく、その解明は糖尿病患者の生活予後の改善、早期診断法の確立、適切な治療体系の確立など、極めて有用性が高いと考えられる。これまでの検討により、ADP の血小板凝集促進作用における ED50 値が、客観的な血小板機能亢進の指標として有用であることが示唆された。ED50 値による病態分類において、抗血小板剤の投与例が全て抑制群となったことは、特異性が高いことを示唆すると考えられる。さらに症例を重ねて検討する予定である。ED50 値の検討には ADP に惹起される血小板凝集反応の用量依存性を検討することが必須である。正常範囲と考えられる ED50 値は  $1.778 \pm 0.122 \mu$ M と推

算されることから、0  $\mu$ M、0.3  $\mu$ M、1.0  $\mu$ M、3.0  $\mu$ M の4つの濃度を用いた検討が妥当であると考えられた、

これまでに骨粗鬆症患者の治療経過において、血小板凝集能の変化が見られることを報告してきた。今年度は十分な症例検討に至らず、さらに症例を重ねることが必要であるが、ラロキシフェンを投与した1例において、ED50値の変化が確認されたことから、糖尿病患者におけると同様、ADPによる血小板凝集反応のED50値を客観的指標とすることが可能かつ有用と考えられた。

ストレス蛋白質 (heat shock protein: HSP) は生体において生体防御という極めて重要な役割を担っていることは良く知られている。種々の外的環境の変化に対する生体反応をストレス応答と呼んでおり、環境の変化に対し生体は迅速に反応する。既に私共は血小板活性化において低分子量ストレス蛋白質のHSP27が重要な役割を果たしていることを報告している。また、HSP27はSer15、Ser78およびSer85の三か所のセリンがリン酸化されることが明らかとなっている。このリン酸化に伴い、HSP27の三次元構造が変化することにより、その機能が変化することが推測されているが、それぞれ三か所のリン酸化の意義の詳細は明らかとされていなかった。今回の解析から、HSP27の三か所のリン酸化部位のなかで、Ser15およびSer85ではなく、Ser78のリン酸化が低用量のADP (1  $\mu$ M) による血小板凝集能促進作用と正の相関を認めた。すなわち代謝性疾患における血小板凝集能亢進において、HSP27 (Ser78) のリン酸化が重要な役割を担っていることが示唆された。以上より、HSP27 (Ser78) のリン酸化亢進が代謝性疾患患者における血小板凝集能亢進状態のマーカールとなる可能性が強く、今後、簡便かつ新たな検査法の確立に資すると考えられた。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Enomoto Y, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Doi T, Niwa M, Akamatsu S, Tokuda H, Ogura S, Yoshimura S, Iwama T, Kozawa O. Thromboxane A2 promotes soluble CD40 ligand release from human platelets. *Atherosclerosis*. 209:415-421;2010
2. Kato H, Adachi S, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Akamatsu S, Enomoto Y, Tokuda H, Otsuka T, Iwama T, Kozawa O, Ogura S. Mechanism of collagen-induced release of 5-HT, PDGF-AB and sCD40L from human platelets: Role of HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAPK. *Thrombosis Res*.

126:39-43;2010

3. Doi T, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato H, Enomoto Y, Natsume H, Kato K, Mizutani J, Otsuka T, Tokuda H, Akamatsu S, Iwama T, Kozawa O, Ogura S. Antithrombin III reduces collagen-stimulated granule secretion of PDGF-AB and the release of soluble CD40 ligand from human platelets. Intern. J. Mol. Med. 26:387-392;2010
4. Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Hanai Y, Takai S, Harada A, Kozawa O. Inhibition by minodroate of basic fibroblast growth factor-stimulated vasucular endothelial growth factor synthesis in osteoblast-like cells. Mol. Med. Rep. 3:167-171;2010
5. Natsume H, Tokuda H, Adachi S, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Minamitani C, Niida S, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T. Rho-kinase limits FGF-2-stimulated VEGF release in osteoblasts. Bone. 46:1068-1074;2010
6. Minamitani C, Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Yamauchi J, Kato K, Natsume H, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T. p70 S6 kinase limits tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-6 synthesis in osteoblast-like cells. Mol. Cell. Endocrinol. 315:195-200,2010
7. Natsume H, Tokuda H, Mizutani J, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Kato K, Kozawa O, Otsuka T. Synergistic effect of vasoactive intestinal peptides on TNF- $\alpha$ -induced IL-6 synthesis in osteoblasts: amplification of p44/p42 MAP kinase activation. Intern. J. Mol. Med. 25:813-817;2010
8. Kato K, Tokuda H, Natsume H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T. Rho-kinase regulates prostaglandin D2-stimulated heat shock protein 27 induction in osteoblasts. Exp. Therapeut. Med. 1:579-583;2010
9. Kato K, Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Natsume H, Yamakawa K, Gu Y, Otsuka T, Kozawa O. AMP-activated protein kinase positively regulates FGF-2-stimulated VEGF synthesis in osteoblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 400:123-127;2010

## 2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし