

長寿医療研究開発費 平成27年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

高齢者の臓器保護に資する至適な血小板機能制御方法に関する研究（25-4）

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（部長）

研究要旨

3年間全体について

高齢者の臓器保護に資する至適な血小板機能制御法の策定を目指すことをその目的とし、55歳以上の糖尿病、骨粗鬆症、脳梗塞患者より静脈血を採取し、多血小板血漿(PRP)を調整し、ADP刺激、コラーゲン刺激、リストセチン刺激およびトロンビン刺激により惹起される血小板凝集を患者の臨床情報とともに詳細に解析した。細胞画分における機能性蛋白質の解析はウェスタンブロット法にて、血小板刺激時のplatelet-derived growth factor (PDGF)-AB濃度およびリン酸化 heat shock protein 27 (HSP27)濃度はELISAにて検討した。これまでの解析結果より1 μ M ADP刺激におけるTrans AUCとADP ED₅₀値、0.3 μ g/ml コラーゲン刺激におけるTrans AUC とコラーゲンED₅₀値との間に有意な回帰直線が得られた。2015年9月までに糖尿病患者117例、骨粗鬆症患者9例、脳梗塞患者79例につき解析を実施した。糖尿病患者における検討では、抗血小板薬はeGFRの低下にほとんど影響しないこと、糖尿病性腎症の進行事例は抗血小板薬投与例に少ないことが示された。最も汎用されたアスピリン投与例では全例に血小板機能の抑制が見られた。骨粗鬆症患者における解析では、selective estrogen receptor modulator (SERM)のうちバゼドキシフェンは血小板凝集能にほとんど影響しないことが示唆された。抗血小板薬投与中の脳梗塞患者の解析ではADP凝集の非抑制群で深部皮質下白質病変(DSWMH)の重症度が高い傾向が示されたが、脳室周囲病変(PVH)ではその傾向が見られなかった。また、脳微小出血と血小板機能抑制状況との関連は見られなかった。一方、糖尿病患者由来のPRPにおいて、コラーゲン刺激によりリン酸化されるHSP27がPDGF-AB分泌と共役して細胞外に遊離されること、微小凝集塊および大凝集塊の形成とそれぞれ負および正の相関を示すこと、Thrombin receptor-activating protein (TRAP)刺激によりAkt (PKB)およびp38 mitogen-activated protein (MAP) kinaseを介してリン酸化されたHSP27が、PDGF-AB分泌と共役して細胞外に遊離されることを明らかとした。さらに健常人由来のPRPにおいてコラーゲン刺激時の細胞内情報伝達機構についての検討により、インテグリン β 1の下流においてシグナルを伝達するRac 1 がp44/p42 MAP キナーゼの活性化およびHSP27のリン酸化を制御し、PDGF-ABの分泌およびsCD40ligandの遊離に関与すること、Rho/Rho kinase経路がトロンボキササンA2 (TXA2)によるsCD40 ligandの遊離およびPDGF-ABの分泌を介して血小板凝集を制御していること、TXA2刺激時にはRacはp38 MAP kinaseの上流で機能し、TXA2による血小板凝集に促進的役割をすること、PDGF-AB分泌およびsoluble CD40 (sCD40)

ligandの遊離を制御することを明らかとした。以上、高齢者の血小板機能を多角的に捉えるとともに実臨床における病態制御状況を詳細に分析した結果、血小板機能制御をADPあるいはコラーゲン刺激時のED50値を臨床指標として実施すれば、臓器保護に資する至適な血小板機能の制御が可能となることが示唆された。さらに、糖尿病患者由来の活性化血小板においてリン酸化されたHSP27の遊離がPDGF-AB分泌と共役することを、世界で初めて明らかとした。

平成27年度について

糖尿病患者 117 例、脳梗塞患者 107 例につき解析を実施した。糖尿病患者における検討では、抗血小板薬は eGFR の低下にほとんど影響しないこと、糖尿病性腎症の進行情報は抗血小板薬投与例に少ないことが示された。最も汎用されたアスピリン投与例では全例に血小板機能の抑制が見られた。脳梗塞患者の検討では、血小板凝集能と(PVH)の程度に相関が見られないこと、DSWMH は血小板凝集抑制が見られない群に強い傾向を示すこと、抗血小板薬の種類により血小板凝集抑制能に差があるが、脳微小出血発生について有意差が見られないことを明らかとした。糖尿病患者由来の血小板において、TRAP 刺激により Akt (PKB)および p38 MAP kinase を介してリン酸化された HSP27 が、PDGF-AB 分泌と共役して細胞外に遊離されることを明らかとした。さらに健常者由来の血小板において、TXA₂ 刺激時には Rac は p38 MAP kinase の上流で機能し、TXA₂ による血小板凝集に促進的役割をすること、PDGF-AB 分泌および sCD40ligand の遊離を制御することを明らかとした。

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 (部長)

分担研究者

酒井 義人 国立長寿医療研究センター 先端診療部 (医長)

新畑 豊 国立長寿医療研究センター 脳機能診療部 (部長)

小澤 修 岐阜大学大学院医学系研究科 (教授)

研究期間 平成25年4月1日～平成28年3月31日

A. 研究目的

アスピリン、チクロピジン、クロピドグレル等の抗血小板薬は、脳梗塞の再発予防あるいは糖尿病患者等のハイリスク群における血管障害の一次予防の目的で広く使用され、その有用性はよく知られている。しかしながら、これまでに行われた疾患別解析は高齢

者を対象としたものではなかった。また抗血小板薬の薬理作用自体の検討もまた十分ではなかった。脳梗塞はラクナ梗塞とアテローム性梗塞の2種類に大別され、穿通枝領域のラクナ梗塞と中・大血管が主体となるアテローム性梗塞では病態が異なることが知られている。高齢者では加齢に伴い血管は脆弱となるが、その傾向は細血管においてより顕著となる。細血管病変が主体のラクナ梗塞を発症した高齢者に対し、その再発予防に壮年者と同様に血小板機能を抑制すれば、出血性疾患を惹起する可能性が高まることも否定できない。一方、腎硬化症あるいは糖尿病性腎症有症者における抗血小板療法の評価は未だ十分とは言いがたい。このように高齢者に対する血小板機能制御については、客観的な安全性が確保された状態であるとは言いがたい。高齢者を対象として、薬剤選択あるいは用法・用量の妥当性を客観的指標に基づき詳細に解析する必要性は極めて高いと考えられる。本研究は、高齢者の臓器保護に資する至適な血小板機能制御法の策定を目指すことをその目的として、臨床的ならびに基礎的検討を行うものである。

B. 研究方法

3年間全体について

1)対象

55歳以上の糖尿病、骨粗鬆症、脳梗塞患者を疾患レベル解析の対象とした。また、岐阜大学における血小板機能制御機構の解析では、健常成人を被験者とした。

2)血小板血漿の調整

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。

3)血小板凝集能の解析

PRP を ADP、コラーゲン、リストセチンおよび TRAP にて刺激し、レーザー粒子径測定法(LS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。LS法では透過光遮蔽率(Trans %)の他に、血小板凝集塊の大きさにより、微小凝集塊(small, 25 μ m 未満 small)、中凝集塊(medium, 25-50 μ m)および大凝集塊(large, 50-75 μ m)が識別、表示できる。これらの刺激時 AUC を数量化し、解析に用いた。反応停止後の PRP を 20,000 $\times g$ にて 2 分間遠心分離し、沈査を細胞画分とし SDS にて可溶化するとともに、上清を-30度で保管し、細胞レベルでの解析に供した。

4)臨床情報の収集

共通項目として、年齢、性別、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、 γ -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、eGFR、シスタチン C、血糖、HbA1c、尿蛋白、頭部 MRI 所見を、2型糖尿病患者の追加項目として、糖尿病罹病

期間、治療期間、治療内容、網膜症の有無・病期、尿中アルブミン値を、骨粗鬆症患者の追加項目として治療期間・治療内容、腰椎・大腿骨骨密度(YAM%・T-score)、骨代謝マーカー(骨型 ALP、血清 NTx、等)を、脳梗塞患者追加項目として、治療期間・治療内容、有害イベントの発生状況を収集することとした。

5)血小板細胞レベルでの解析

可溶化した細胞画分中の機能性蛋白質のリン酸化をウェスタンブロット法にて解析した。リン酸化レベルは imageJ ver. 1.32 を用いて数値化し解析に使用した。上清中の PDGF-AB 濃度およびリン酸化 HSP27 濃度をそれぞれ対応する ELISA にて測定し、これらの血小板刺激時の分泌・遊離につき検討した。

6)統計学的解析

統計学的解析には SPSS ver. 19.0 (IBM SPSS Statistic Inc.)を使用した。

平成 27 年度について

本年度も上記の解析を継続して実施した。

(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

3 年間全体について

1) 糖尿病患者からの試料・情報収集

2 型糖尿病患者のうち、レーザー光スキャタリング法により検出される血小板凝集塊の形成における ADP 刺激に対する ED₅₀ 値を検討した事例を収集し、血小板機能亢進群(ADP ED₅₀<1.534 μM)、正常群(1.534 μM ≤ ADP ED₅₀ ≤ 2.022 μM)、抑制群(ADP ED₅₀ > 2.022 μM)の 3 群に分類した。これら 3 群において血中シスタチン C、尿中アルブミン排泄、eGFR 値等の経時的な解析を開始した。2013 年 12 月末までに収集した 63 例では、亢進群は 19 例、正常群は 24 例、抑制群は 20 例であった。抗血小板薬の投与状況について、亢進群でエイコサペンタイン酸投与例が、正常群でアスピリン投与例がそれぞれ 1 例見られたのみであったが、抑制群ではアスピリン投

与例が 8 例、サルボグレラート投与例、シロスタゾール投与例およびチクロピジン投与例が各 1 例と半数以上が抗血小板薬投与事例であった。亢進群において脳梗塞所見を認め、抗血小板薬が開始された 13 例を加え、抗血小板薬投与例 26 例と非投与例 37 例において、eGFR の変化率を検討した。平均観察期間は 43.1 ± 14.1 カ月であったが、投与前を 100%として投与例では $102.2 \pm 15.5\%$ 、非投与例では $97.8 \pm 21.2\%$ と有意な変化は見られなかった。

コラーゲン(Col.)凝集については、2015 年 9 月末までに 117 例の解析を行った。2013 年度には 54 例、初回検討事例 44 例の分析を行い、健常者の ED_{50} 範囲 ($0.460 \pm 0.082 \mu\text{g/ml}$) より $ED_{50} < 0.378 \mu\text{g/ml}$ を示す事例を亢進群としたところ、34 例が亢進を示した。また、抑制は 9 例で、5 例に抗血小板薬が投与されていた。MRI 所見の解析では ED_{50} 値の差は見られなかったが、男性において非刺激時の最大遮光率が脳室周囲白質病変(PVL)(+)群で高値を示した。

2014 年 3 月までに収集した ADP 刺激事例 90 例、コラーゲン刺激事例 106 例について、 $1 \mu\text{M}$ ADP 刺激時および $0.3 \mu\text{g/ml}$ コラーゲン刺激時の Area under curve(AUC)とそれぞれの ED_{50} 値との単回帰分析を実施した結果、以下の回帰式を得た。

$$ED_{50} \text{ of ADP} = -0.916 \times \text{Trans AUC}/1000 + 2.959 \mu\text{M} (R^2=0.613, p<0.001)$$

$$ED_{50} \text{ of Col.} = -0.845 \times \text{Trans AUC}/1000 + 1.833 \mu\text{g/ml} (R^2=0.586, p<0.001)$$

2014 年 4 月よりずり応力刺激のモデルとしてのリストセチンによる凝集と、トロンビン受容体を介する血小板凝集刺激として TRAP による凝集を ADP およびコラーゲン凝集との比較においての検討を開始した。2015 年 9 月末までに 63 例の解析を行ったが、ADP 刺激あるいはコラーゲン刺激とは事例により異なる傾向を認めた。

さらにこれまでに収集したコラーゲン凝集刺激分析事例について、腎機能への影響につき解析を行った。2015 年 9 月末までに観察期間が 6 ヶ月に達した事例は 101 例(男性 65 例/女性 36 例、年齢 71.2 ± 7.5 才)、12 ヶ月に達した事例は 82 例(男性 52 例/女性 30 例、年齢 71.7 ± 7.1 才)であった。観察開始時の HbA1c 値は $8.4 \pm 2.0\%$ 、6 ヶ月および 12 ヶ月時点での HbA1c 値はそれぞれ $7.4 \pm 1.3\%$ 、 $7.4 \pm 1.2\%$ であった。6 ヶ月までに eGFR が 10%以上低下した事例(6 か月低下群)は 31 例、低下が 10%未満にとどまった事例(6 ヶ月不変群)は 70 例、そのうち抗血小板薬の投与例は低下群 13 例(アスピリン 8 例、シロスタゾール 4 例、エイコサペンタイン酸(EPA)1 例*アスピリン併用、クロピドグレル 2 例*アスピリン併用)、不変群 31 例(アスピリン 17 例、シロスタゾール 8 例、EPA 3 例、クロピドグレル 4 例*アスピリン併用 2 例、サルボグレラート 1 例、ワーファリン 1 例*アスピリン併用)であった。12 ヶ月までに eGFR が 10%以上低下した事例(12 ヶ月低下群)は 25 例、低下が 10%未満にとどまった事例(12 ヶ月不変群)は 57 例、そのうち抗血小板薬の投与例は低下群 11 例(アスピリン 7 例、シロスタゾール 2 例、エイコサペンタイン酸(EPA)1 例*ア

スピリン併用、クロピドグレル 3 例*アスピリン併用)、不変群 25 例(アスピリン 15 例、シロスタゾール 6 例、EPA4 例、クロピドグレル 2 例*アスピリン併用 2 例、ワーファリン 1 例*アスピリン併用)であった。なおクロピドグレル投与事例で脳出血による死亡例が 1 例見られたが、投与下においても血小板凝集の抑制が明らかでない事例であった。次に 6 ヶ月まで経過観察し得た 108 例中抗血小板薬が未投与であった 63 例では、6 ヶ月低下群が 16 例、6 ヶ月不変群が 42 例であった。これらのコラーゲン(0.3 µg/ml)刺激時の AUC は、低下群が 1772.5 ± 675.0 、不変群が 1754.9 ± 597.1 と差がなかった。6 ヶ月以上尿中アルブミン排泄を追跡し得た事例のうち、追跡開始時に腎症 I 期(尿アルブミン排泄 < 30 mg/gCr)であった 40 例につき、腎症不変群(経過観察時も尿アルブミン排泄 < 30 mg/gCr)と腎症進行群(経過観察時に尿アルブミン排泄 > 30 mg/gCr)に分類したところ、腎症不変群は 29 例、腎症進行群は 11 例であった。抗血小板薬の投与事例は腎症不変群で 13 例、腎症進行群で 5 例と不変群(44.8%)、進行群(45.5%)ともほぼ同率であった。なお抗血小板薬の投与例で最も汎用されたアスピリン投与例は全例に血小板機能の抑制がみられた。以上より、抗血小板薬投与の腎症・腎硬化症への影響は概ね否定的であると考えられた。

2) 骨粗鬆症患者からの試料・情報収集

新規に骨粗鬆症と診断された患者より多血小板血漿を採取し、レーザー光スキャタリング法により検出される微小血小板凝集塊の形成における ADP 刺激に対する ED₅₀ 値を指標として、血小板機能亢進群、正常群、抑制群の 3 群に分類、これら 3 群において新しい SERM であるバゼドキシフェンを始めとする薬物治療の影響について、頭部 MRI 所見、血中シスタチン C、尿中アルブミン・蛋白質排泄、eGFR 値等を経時的に解析することとした。2015 年 9 月末までにバゼドキシフェン 3 例、ラロキシフェン 6 例の計 9 例につき検討し、投与開始時点では亢進群 6 例、抑制群 3 例で、正常群は見られなかった。6 か月の時点でも変化は見られなかった。一方、血小板機能解析と並行して行われたラロキシフェンの筋肉量への効果の検討では、ラロキシフェン投与が筋肉量の維持に寄与すること、特にサルコペニア患者で有用である可能性が示唆された。以上より SERM は安全性と有用性の高い薬剤であると考えられた。

3) 脳梗塞患者からの試料・情報収集

新たに脳梗塞を発症した患者あるいは脳梗塞の一次予防または二次予防として抗血小板療法を施行中の 107 名のうち抗血小板療法を施行していなかった 21 名と頭部 MRI 所見が確認できなかった 3 名を除外した 83 名について、ADP 凝集における ED₅₀ 値に基づき血小板凝集能抑制群(N=43)と非抑制群(N=40)に分類し、それぞれにおける白質病変の重症度を比較検討した。PVL と深部皮質下白質病変(DSWMH)では、非抑制群において DSWMH の重症度が高い傾向がみられた。また、アスピリン、シロスタゾール、クロピドグレルを単独で使用していた 78 名について ADP ED₅₀ 値を比較したところ、クロピドグレル群、アスピリン群、シロスタゾール群の順であり、いずれの群間でも有

意差を示した。このうち T2*強調画像が確認できた 74 例について脳微小出血の数を検討したが、使用薬剤間で有意差は見られなかった。なお、推算糸球体濾過率の検討では血小板凝集能抑制群と非抑制群の間に有意差は見られなかった。

4) 血小板機能の細胞レベルでの解析

糖尿病患者 36 例(男性 23 例/女性 13 例)についてコラーゲン刺激後の血小板内の HSP27 のリン酸化レベルをウェスタンブロット法により、刺激後の血漿中のリン酸化 HSP27 レベルおよび PDGF-AB レベルを ELISA にて解析した。リン酸化レベルは imageJ ver. 1.32 を用いて数値化した。コラーゲン(0.3 $\mu\text{g/ml}$)刺激時の血漿中の HSP27(serine 78)のリン酸化レベルは、細胞内の HSP27 レベルと負の相関を、血漿中のリン酸化 HSP27 レベルおよび PDGF-AB レベルと正の相関を認めた。さらに、刺激後の血漿中のリン酸化 HSP27 レベルは、血小板凝集のうち 50 μm ~75 μm を示す大凝集塊の形成と正の相関を、9 μm ~25 μm を示す微小凝集塊形成と負の相関を示した。一方、リン酸化 HSP27 の添加は血小板凝集および PDGF-AB 遊離に何ら影響しなかった。以上、コラーゲン刺激時には血小板内の HSP27 がリン酸化されることにより PDGF-AB 分泌と共役して血小板外に遊離されることが示唆された。さらに糖尿病患者 47 例 (男性 25 例/女性 22 例) について TRAP 刺激時の検討を行った。TRAP 刺激により HSP27 のリン酸化と同時に Akt (PKB)および p38 MAP kinase のリン酸化が促進されること、コラーゲン刺激時と同様、細胞外へのリン酸化 HSP27 の遊離が PDGF-AB 分泌と共役すること、血小板凝集との関連性が認められることを見出した。

また、ヒト血小板において、コラーゲンレセプターの一部であるインテグリン β 1 の下流においてシグナルを伝達する役割を果たしている低分子量 GTP 結合蛋白質である Rac1 がコラーゲン刺激で活性化され血小板凝集に関与すること、コラーゲン刺激により惹起される p44/p42 MAP kinase の活性化、HSP27 のリン酸化、PDGF-AB の分泌および sCD40 ligand の遊離が Rac1 の活性化に依存性であることを明らかにした。さらにリストセチンによりその産生が促進される TXA2 刺激による Rac の関与を検討し、Rac は p38 MAP kinase の上流で機能し、TXA2 による血小板凝集反応に促進的役割をすること、および TXA2 による PDGF-AB 分泌および sCD40 ligand の遊離を促進していることを明らかにした。一方、Rho kinase が p38 MAP kinase とは独立した経路として TXA2 による血小板凝集反応に促進的役割をすること、PDGF-AB 分泌および sCD40 ligand の遊離を制御することを明らかにした。

平成 27 年度について

1) 糖尿病患者からの試料・情報収集

これまでに収集したコラーゲン凝集刺激分析事例について、腎機能への影響につき解析を行った。2015年9月末までに観察期間が6ヶ月に達した事例は101例(男性65例/女性36例、年齢 71.2 ± 7.5 才)、12ヶ月に達した事例は82例(男性52例/女性30例、年齢 71.7 ± 7.1 才)であった。観察開始時のHbA1c値は $8.4 \pm 2.0\%$ 、6ヶ月および12ヶ月時点でのHbA1c値はそれぞれ $7.4 \pm 1.3\%$ 、 $7.4 \pm 1.2\%$ であった。6ヶ月までにeGFRが10%以上低下した事例(6か月低下群)は31例、低下が10%未満にとどまった事例(6ヶ月不変群)は70例、そのうち抗血小板薬の投与例は低下群13例(アスピリン8例、シロスタゾール4例、エイコサペンタイン酸(EPA)1例*アスピリン併用、クロピドグレル2例*アスピリン併用)、不変群31例(アスピリン17例、シロスタゾール8例、EPA3例、クロピドグレル4例*アスピリン併用2例、サルボグレラート1例、ワーファリン1例*アスピリン併用)であった。12ヶ月までにeGFRが10%以上低下した事例(12ヶ月低下群)は25例、低下が10%未満にとどまった事例(12ヶ月不変群)は57例、そのうち抗血小板薬の投与例は低下群11例(アスピリン7例、シロスタゾール2例、エイコサペンタイン酸(EPA)1例*アスピリン併用、クロピドグレル3例*アスピリン併用)、不変群25例(アスピリン15例、シロスタゾール6例、EPA4例、クロピドグレル2例*アスピリン併用2例、ワーファリン1例*アスピリン併用)であった。なおクロピドグレル投与事例で脳出血による死亡例が1例見られたが、投与下においても血小板凝集の抑制が明らかでない事例であった。次に6ヶ月まで経過観察し得た108例中抗血小板薬が未投与であった63例では、6ヶ月低下群が16例、6ヶ月不変群が42例であった。これらのコラーゲン($0.3 \mu\text{g/ml}$)刺激時のAUCは、低下群が 1772.5 ± 675.0 、不変群が 1754.9 ± 597.1 と差がなかった。6ヶ月以上尿中アルブミン排泄を追跡し得た事例のうち、追跡開始時に腎症I期(尿アルブミン排泄 $< 30 \text{ mg/gCr}$)であった40例につき、腎症不変群(経過観察時も尿アルブミン排泄 $< 30 \text{ mg/gCr}$)と腎症進行群(経過観察時に尿アルブミン排泄 $> 30 \text{ mg/gCr}$)に分類したところ、腎症不変群は29例、腎症進行群は11例であった。抗血小板薬の投与事例は腎症不変群で13例、腎症進行群で5例と不変群(44.8%)、進行群(45.5%)ともほぼ同率であった。なお抗血小板薬の投与例で最も汎用されたアスピリン投与例は全例に血小板機能の抑制がみられた。

2) 骨粗鬆症患者からの試料・情報収集

血小板機能解析と並行して行われたラロキシフェンの筋肉量への効果を解析した。255例(ラロキシフェン投与群48例、薬剤なし207例)において、補正四肢筋量を検討した結果、ラロキシフェン投与群では投与前 $5.817 \pm 0.086 \text{ kg/m}^2$ 、投与後 $5.814 \pm 0.102 \text{ kg/m}^2$ と有意差が見られなかったが、薬剤なし群では観察開始後1年で有意に減少していた(前 $5.986 \pm 0.067 \text{ kg/m}^2$ 、後 $5.826 \pm 0.068 \text{ kg/m}^2$ 、 $p < 0.05$)。後ラロキシフェン投与群ではラロキシフェン投与が筋肉量の維持に寄与すること、特にサ

ルコペニア患者で有用である可能性が示唆された。

3) 脳梗塞患者からの試料・情報収集

新たに脳梗塞を発症した患者あるいは脳梗塞の一次予防または二次予防として抗血小板療法を施行中の患者から抗血小板療法を施行していなかった事例と頭部MRI所見が確認できなかった事例を除外し、新たに10名を追加した全83名について、ADP凝集におけるED₅₀値に基づき血小板凝集能抑制群(N=43)と非抑制群(N=40)に分類し、それぞれにおける白質病変の重症度を比較検討した。PVLと深部皮質下白質病変(DSWMH)では、非抑制群においてDSWMHの重症度が高い傾向がみられた。また、アスピリン、シロスタゾール、クロピドグレルを単独で使用していた78名についてADP ED₅₀値を比較したところ、クロピドグレル群、アスピリン群、シロスタゾール群の順であり、いずれの群間でも有意差を示した。このうちT2*強調画像が確認できた74例について脳微小出血の数を検討したが、使用薬剤間で有意差は見られなかった。なお、eGFRの検討では血小板凝集能抑制群と非抑制群の間に有意差は見られなかった。

4) 血小板機能の細胞レベルでの解析

糖尿病患者47例(男性25例/女性22例)についてTRAP刺激時の検討を行った。TRAP刺激により血小板凝集と比例してHSP27のリン酸化が促進された。同時にAkt(PKB)およびp38 MAP kinaseのリン酸化が促進されたがp44/p42 MAP kinaseのリン酸化は促進されなかった。10 μM TRAP刺激時のHSP27リン酸化レベルとAkt(PKB)リン酸化レベル、p38 MAP kinaseリン酸化レベルおよびリン酸化HSP27遊離はそれぞれ有意な正の相関を示した(n=19, R²=0.383, p=0.005; n=19, R²=0.589, p<0.001; n=19, R²=0.399, p=0.004)。10 μM TRAP刺激時のリン酸化HSP27遊離とPDGF-AB分泌は正の相関を示した(n=47, R²=0.137, p=0.01)。10 μM TRAP刺激時のリン酸化HSP27遊離とレーザー光透過度、25 μm~50 μmを示す中凝集塊および50 μm~70 μmを示す大凝集塊の各area under curve(AUC)との間には有意な正の相関が見られた(n=47, R²=0.327, p<0.001; n=47, R²=0.129, p=0.013; n=47, R²=0.257, p<0.001)。さらに健常人由来の血小板において、Akt(PKB)阻害剤であるdeguelinは20 mM TRAP刺激時のHSP27リン酸化を抑制した。

ヒト血小板において、リストセチンによりその産生が促進されるTXA₂刺激によるRacの関与を検討し、Racはp38 MAP kinaseの上流で機能し、TXA₂による血小板凝集反応に促進的役割をすること、およびTXA₂によるPDGF-AB分泌およびsCD40 ligandの遊離を促進していることを明らかとした。

D. 考察と結論

本研究は高齢者の臓器機能に着目し、至適な血小板機能制御法を開発することを目的としている。糖尿病患者でADP刺激およびコラーゲン刺激による血小板凝集を解析し

た事例において、腎機能低下および糖尿病性腎症との関連につきデータを収集し解析を行ったが、結果として、抗血小板薬の投与は eGFR の低下にほとんど影響しない可能性が示された。一方、昨年までの解析においては糖尿病性腎症の進行事例の割合が抗血小板薬の投与例に少ない可能性が示されたが、事例を加えておこなった最終解析では差がみられなかった。観察中に、クロピドグレル投与例で脳血管障害による死亡例 1 例がみられたが、この事例は血小板機能制御が十分得られなかった可能性が示された。また、最も汎用されているアスピリン投与例においては全例コラーゲン凝集の抑制がみられていたことから、高齢者における血小板凝集能を指標とした抗血小板薬投与の有用性が示唆された。さらに、リストセチン刺激および TRAP 刺激による血小板凝集能の検討を行い、糖尿病患者における血小板機能の特性を明らかとしたいと考えている。

骨粗鬆症患者および脳梗塞患者の治療経過と血小板凝集についての解析からは、骨粗鬆症におけるバゼドキシフェンの投与は血小板凝集能に影響しないと考えられた。またラロキシフェンは筋肉量の維持に寄与すること、特にサルコペニア群において有用性が高い可能性が示唆された。従って、SERM は総じて安全性と有用性の高い薬剤と考えられた。脳梗塞患者においては、ADP 凝集の非抑制群において深部皮質下白質病変 (DSWMH) の重症度が高い傾向が示唆された。DSWMH は認知機能障害との関連が知られる病変であり、注目される。さらに、抗血小板薬を単独で投与されていた事例における検討にて、クロピドグレル、アスピリン、シロスタゾールの順に ADP ED₅₀ 値が低いことが明らかとなったが、脳微小出血数には差がなかった。併用薬剤の影響を完全に排除することは不可能であるが、抗血小板薬の種類により二次予防効果に差がある可能性が示唆された。なお、血小板凝集能抑制群と非抑制群で eGFR の差が見られなかったことは、抗血小板薬の腎機能への影響を否定する、即ち安全性を確認する結果と考えられた。

既に我々は血小板における HSP27 のリン酸化が、PDGF-AB や 5-HT の分泌に関与しており、糖尿病患者における血小板凝集能の亢進に重要な役割を果たしている可能性を報告している。本研究では、糖尿病患者において、コラーゲン刺激時あるいは TRAP 刺激時に HSP27 がリン酸化され、PDGF-AB の分泌と共役して細胞外に遊離すること、細胞外への HSP27 遊離は大凝集塊の形成と正の相関を示すこと、TRAP 刺激時には p38 MAP kinase と Akt (PKB) の活性化が HSP27 リン酸化に関与することが示された。既に我々はコラーゲン刺激時には p44/p42 MAP kinase と p38 MAP kinase が HSP27 リン酸化に関与することを報告しており、その機序はアゴニスト毎に異なることが明らかとなった。HSP27 の血小板からの遊離はこれまで知られておらず、画期的な新知見である。血小板の活性化は、血管内皮下のコラーゲンが露出している血管損傷部位への血小板の粘着 (tethering) により惹起される。さらに、トロンビンは血管損傷部位でプロトロンビンから形成される。今回の結果は、コラーゲンとトロンビンが協同して PDGF-AB 分泌と共役するリン酸化 HSP27 遊離を促進することを示唆するものであり、糖尿病患者にみられる動脈硬化性血管病変の進行をはじめとする病態における、HSP27 の臨床的重要

性を明らかとした画期的な新知見であると考え。一方、血小板における細胞内情報伝達機構に関して、インテグリン $\beta 1$ の下流においてシグナルを伝達する Rac 1 が p44/p42 MAP キナーゼの活性化および HSP27 のリン酸化を制御し、PDGF-AB の分泌および sCD40 ligand の遊離に関与すること、Rho/Rho kinase 経路が TXA₂による sCD40 ligand の遊離および PDGF-AB の分泌を介して血小板凝集を制御し、その経路は p38 MAP kinase とは独立した経路であること、TXA₂刺激時には Rac は p38 MAP kinase の上流で機能し、TXA₂による血小板凝集に促進的役割をすること、PDGF-AB 分泌および sCD40 ligand の遊離を制御することが示唆された。Rho kinase 阻害剤あるいは Rac 阻害剤の全身性炎症反応症候群(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)等の高齢者における重大な病態における有効性が示唆される結果である。さらに適切な血小板機能制御法の開発への応用が期待できると考えられる。

以上のように、高齢者の血小板機能を多角的に捉えるとともに実臨床における病態制御状況を詳細に分析し、臓器保護に資する至適な血小板機能の制御法を検討しうる体制を構築し、抗血小板薬の有効性・安全性が検証された。これらを踏まえて高齢者の病態に即した適切な血小板機能制御法を希求したいと考える。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

平成25年度

- 1) Kondo A, Tokuda H, Kato K, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T. Rho-kinase negatively regulates thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Biochimie* 2013;95:719-724.
- 2) Kondo A, Otsuka T, Matsushima-Nishiwaki-R, Kuroyanagi G, Mizutani J, Wada I, Kozawa O, Tokuda H. Inhibition of SAPK/JNK leads to enhanced IL-1-induced IL-6 synthesis in osteoblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 2013;535:227-233.
- 3) Kondo A, Otsuka T, Kato K, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Mizutani J, Tokuda H, Kozawa O. AMP-activated protein kinase regulates thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Int. J. Mol. Med.* 2013;31:1457-1462.

- 4) Cuong NT, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Kuroyanagi G, Kondo A, Mizutani J, Wada I, Otsuka T, Tokuda H, Kozawa O, Ogura S. Thrombopoietin amplifies ADP-induced HSP27 phosphorylation in human platelets: importance of pre-treatment. *Int. J. Mol. Med.* 2013;31:1291-1297.
- 5) Kondo A, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Kuroyanagi G, Mizutani J, Fukuoka M, Wada I, Kozawa O, Otsuka T. Unphosphorylated heat shock protein 27 suppresses fibroblast growth factor-2-stimulated vascular endothelial growth factor release in osteoblasts. *Mol. Med. Rep.* 2013;8:691-695.
- 6) Kuroyanagi G, Otsuka T, Kondo A, Matsushima-Nishiwaki R, Mizutani J, Kozawa O, Tokuda H. (-)-Epigallocatechin gallate amplifies interleukin-1-stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Biochimie* 2013;95:1933-1938.
- 7) Kageyama Y, Doi T, Akamatsu S, Kuroyanagi G, Kondo A, Mizutani J, Otsuka T, Tokuda H, Kozawa O, Ogura S. Rac regulates collagen-induced HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAP kinase in human platelets. *Int. J. Mol. Med.* 2013;32:813-818.
- 8) Kuroyanagi G, Yamada K, Imaizumi T, Mizutani J, Wada I, Kozawa O, Tokuda H, Otsuka T. Leg Iymphedema casued by iliopectineal bursitis associated with destruction of a rheumatoid hip joint. *Exp. Ther. Med.* 2013;6:887-890.
- 9) Kuroyanagi G, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Kondo A, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T. Resveratrol suppresses prostaglandin F_{2α}-induced osteoprotegerin synthesis in osteoblasts: inhibition of the MAP kinase signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* 2014;542:39-45.
- 10) Kondo A, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T. Rho-kinase limits BMP-4-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts: regulation of the p38 MAP kinase pathway. *Life Sci.* 2014;96:18-25.
- 11) Sakai Y, Imagama S, Ito Z, Wakao N, Matsuyama Y. Outcome of back exercise for flexion and extension-provoked low back pain. *Orthopedics and Muscular System.* 2013;1:119-124.
- 12) Ito Z, Imagama S, Kanemura T, Hachiya Y, Miura Y, Kamiya M, Yukawa Y, Sakai Y, Katayama Y, Wakao N, Matsuyama Y, Ishiguro N. Bone union rate with autologous iliac bone versus local bone graft in posterior lumbar interbody fusion (PLIF): a multicenter study. *Eur Spine J.* 2013;22:1158-1163.
- 13) Tauchi R, Imagama S, Sakai Y, Ito Z, Ando K, Muramoto A, Matsui H, Matsumoto T, Ishiguro N. The correlation between cervical range of motion and

misplacement of cervical pedicle screws during cervical posterior spinal fixation surgery using a Ct-based navigation system. *Eur Spine J.* 2013;22:1504-1508.

- 14) Imagama S, Ito Z, Wakao N, Seki T, Hirano K, Muramoto A, Sakai Y, Matsuyama Y, Hamajima N, Ishiguro N, Hasegawa Y. Influence of spinal sagittal alignment, body balance, muscle strength, and physical ability on falling of middle-aged and elderly males. *Eur Spine J.* 2013;22:1346-1353.
- 15) 酒井義人. 筋肉と脊柱管狭窄症—ロコモティブシンドロームの関連. *Bone Joint Nerve.* 2013;3:111-117.
- 16) 加藤隆司、新畑 豊、伊藤健吾. 【FDG-PETのがん診療以外への応用】 脳疾患への応用(認知症)映像情報 *Medical.* 2013;45:393-398.
- 17) Osawa Y, Suetsugu A, Matsushima-Nishiwaki R, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Seishima M, Kozawa O. Liver acid sphingomyelinase inhibits growth of metastatic colon cancer. *J. Clin. Invest.* 2013;123:834- 843.
- 18) Iida M, Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Iida H. Adenosine monophosphate-activated protein kinase regulates platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell migration. *Arch. Biochem. Biophys.* 2013;530:83-92.
- 19) Osawa Y, Hoshi M, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Kozawa O. Tumor necrosis factor- α promotes cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in hepatic stellate cells. *PLoS One.* 2013;8:e65251.
- 20) Matsushima-Nishiwaki R, Kumada T, Nagasawa T, Suzuki M, Yasuda E, Okuda S, Maeda A, Kaneoka Y, Toyoda H, Kozawa O. Direct association of heat shock protein 20 (HSPB6) with phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in human hepatocellular carcinoma: regulation of the PI3K activity. *PLoS One.* 2013;8:e78440.

平成26年度

- 1) Kondo A, Otsuka T, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Mizutani J, Kozawa O, Tokuda H. Resveratrol inhibits BMP-4-stimulated VEGF synthesis in osteoblasts: suppression of S6 kinase. *Int. J. Mol. Med.* 2014;33:1013-1018.
- 2) Sakurai T, Kawashima S, Satake S, Miura H, Tokuda H, Toba K. Differential subtypes of diabetic older adults diagnosed with Alzheimer's disease. *Geriatr. Gerontol. int.* 2014;14:62-70.
- 3) Kageyama Y, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Iida Y, Akamatsu S, Kondo A, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Mizutani J, Otsuka T, Tokuda H, Iida H, Kozawa O, Ogura S. Involvement of Rac in thromboxane A₂-induced human platelet activation:

- regulation of sCD40 ligand release and PDGF-AB secretion. *Mol. Med. Rep.* 2014;10:107-112.
- 4) Iida Y, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Tokuda H, Ogura S, Kozawa O, Iida H. (-)-Epigallocatechin gallate selectively inhibits adenosine diphosphate- stimulated human platelet activation: Suppression of heat shock protein 27 phosphorylation via p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Med. Rep.* 2014;10:1383-1388.
 - 5) Kuroyanagi G, Mizutani J, Kondo A, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Otsuka T, Kozawa O, Tokuda H. Suppression by resveratrol of prostaglandin D₂-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2014;91:73-80.
 - 6) Yamamoto N, Tokuda H, Kuroyanagi G, Mizutani J, Matsushima-Nishiwaki R, Kondo A, Kozawa O, Otsuka T. Regulation by resveratrol of prostaglandin E₂-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts. *Int. J. Mol. Med.* 2014;34:1439-1445.
 - 7) Kuroyanagi G, Otsuka T, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Nakakami A, Mizutani J, Kozawa O, Tokuda H. Downregulation by resveratrol of basic fibroblast growth factor-stimulated osteoprotegerin synthesis through suppression of Akt in osteoblasts. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15:17886-17900.
 - 8) Yamamoto N, Otsuka T, Kuroyanagi G, Kondo A, Kainuma S, Nakakami A, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Resveratrol reduces prostaglandin E₁-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts: suppression of stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2015;9;116-117:57-63.
 - 9) Iida Y, Doi T, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Tsujimoto M, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Enomoto Y, Tanabe K, Otsuka T, Iwama T, Ogura S, Kozawa O, Iida H. Rho-kinase regulates human platelet activation induced by thromboxane A₂ independently of p38 MAP kinase. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2015;94:73-81.
 - 10) Ito S, Harada A, Kasai T, Sakai Y, Takemura M, Matsui Y, Hida T, Ishiguro N. Use of alfacalcidol in osteoporotic patients with low muscle mass might increase muscle mass: An investigation using a patient database. *Geriatr Gerontol Int.* 2014;14 Suppl 1:122-128.
 - 11) Ando K, Imagama S, Iro Z, Hirano K, Tauchi R, Muramoto A, Matsui H, Matsumoto T, Sakai Y, Matsuyama Y, Ishiguro N. Differentiation of Spinal Schwannomas and Myxopapillary Ependymomas: MR Imaging and Pathologic Features. *J Spinal Disord Tech.* 2014;27:105-110.

- 12) Kanemura T, Matsumoto A, Ishikawa Y, Yamaguchi H, Satake K, Ito Z, Yoshida G, Sakai Y, Imagama S, Kawakami N. Radiographic changes in patients with pseudarthrosis after posterior lumbar interbody arthrodesis using carbon interbody cages. *J Bone J Surg Am.* 2014;e82:1-9.
- 13) Tauchi R, Imagama S, Inoh H, Yukawa Y, Kanemura T, Sato K, Sakai Y, Kamiya M, Yoshihara H, Ito Z, Ando K, Muramoto A, Matsui H, Matsumoto T, Ukai J, Kobayashi K, Shinjo R, Nakashima H, Morozumi M, Ishiguro N. Characteristics and surgical results of the distal type of cervical spondylotic amyotrophy. *J Neurosurg Spine.* 2014;21:411-416.
- 14) Ito T, Sakai Y, Kubo A, Yamazaki K, Ohno Y, Nakamura E, Sato N, Morita Y. The relationship between physical function and postural sway during local vibratory stimulation of middle-aged people in the standing position. *J Phys Thera Sci.* 2014; 26:1627-1630.
- 15) Nagasawa T, Matsushima-Nishiwaki R, Toyoda H, Matsuura J, Kumada T, Kozawa O. Heat shock protein 20 (HSPB6) regulates apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells: direct association with Bax. *Oncol Rep.* 2014;32:1291-1295.
- 16) Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Iida H. Dexmedetomidine suppresses interleukin-1 β -induced interleukin-6 synthesis in rat glial cells. *Int J Mol Med.* 2014;34:1032-1038.
- 17) Iida M, Tanabe K, Kozawa O, Iida H. Differential effects of intravenous anesthetics on PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell migration. *Cell Physiol Biochem.* 2014;33:1827-1837.
- 18) Nagasawa T, Matsushima-Nishiwaki R, Yasuda E, Matsuura J, Toyoda H, Kaneoka Y, Kumada T, Kozawa O. Heat shock protein 20 (HSPB6) regulates TNF- α -induced intracellular signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys.* 2015;565:1-8.
- 19) Suzuki M, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Suzuki N, Takamatsu R, Furui T, Yoshimi N, Kozawa O, Morishige K. Regulation by heat shock protein 22 (HSPB8) of transforming growth factor- α -induced ovary cancer cell migration. *Arch Biochem Biophys.* 2015;571:40-49.

平成 27 年度

- 1) Tsujimoto M, Doi T, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Iida Y, Enomoto Y, Iida H, Ogura S, Otsuka T, Tokuda H, Kozawa O, Iwama T. α B-crystallin reduces ristocetin-induced soluble CD40 ligand release in human platelets: suppression of thromboxane A₂ generation. *Mol. Med. Rep.*

2015;12:357-362.

- 2) Tokuda H, Kuroyanagi G, Tsujimoto M, Enomoto Y, Matsushima-Nishiwaki R, Onuma T, Kojima A, Doi T, Tanabe K, Akamatsu S, Iida H, Ogura S, Otsuka T, Iwama T, Tanikawa T, Ishikawa K, Kojima K, Kozawa O. Release of phosphorylated HSP27 (HSPB1) from platelets is accompanied with the acceleration of aggregation in diabetic patients. *PLoS One* 2015;10:e0128977.
- 3) Kuroyanagi G, Tokuda H, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T. Resveratrol amplifies BMP-4-stimulated osteoprotegerin synthesis via p38 MAP kinase in osteoblasts. *Mol. Med. Rep.* 2015;12:3849-3854.
- 4) Yamamoto N, Otsuka T, Kondo A, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Kozawa O, Tokuda H. Rac limits TGF- β -induced VEGF synthesis in osteoblasts. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2015;405:35-41.
- 5) Kuroyanagi G, Tokuda H, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T. Unphosphorylated HSP27 (HSPB1) regulates the translation initiation process via a direct association with eIF4E in osteoblasts. *Int. J. Mol. Med.* 2015;36:881-889.
- 6) Kuroyanagi G, Otsuka T, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Resveratrol suppresses TGF- β -induced VEGF synthesis in osteoblasts: inhibition of the p44/p42 MAP kinase and SAPK/JNK pathways. *Exp. Ther. Med.* 2015;9:2303-2310.
- 7) Kainuma S, Tokuda H, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Ohguchi R, Fujita K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T. PGD₂ stimulates osteoprotegerin synthesis via AMP-activated protein kinase in osteoblasts: regulation of ERK and SAPK/JNK. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2015;101:23-29.
- 8) Yamamoto N, Tokuda H, Kuroyanagi G, Kainuma S, Ohguchi R, Fujita K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T. Amplification by (-)-epigallocatechin gallate and chlorogenic acid of TNF- α -stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *Int. J. Mol. Med.* 2015;36:1707-1712.
- 9) Kuroyanagi G, Otsuka T, Yamamoto N, Kainuma S, Ohguchi R, Fujita K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Mimosine suppresses PGF₂ α -stimulated synthesis of osteoprotegerin but not interleukin-6 in osteoblasts. *Int. J. Mol. Med.* 2016;37:533-541.
- 10) Tsujimoto M, Kuroyanagi G, Matsushima-Nishiwaki R, Kito Y, Enomoto Y, Iida H, Ogura S, Otsuka T, Tokuda H, Kozawa O, Iwama T. Factor Xa inhibitor suppresses the release of phosphorylated HSP27 from collagen-stimulated human platelets: inhibition of HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAP kinase. *PLoS*

One 2016;11:e0149077.

- 11) Kainuma S, Otsuka T, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Regulation by AMP-activated protein kinase of PGE₂-induced osteoprotegerin synthesis in osteoblasts. *Mol. Med. Rep.* 2016;13:3363-3369.
- 12) Kainuma S, Otsuka T, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Possible involvement of AMP-activated protein kinase in PGE₁-induced synthesis of osteoprotegerin in osteoblasts. *Exp. Ther. Med.* 2016;11:2042-2048.
- 13) Tokuda H, Kuroyanagi G, Tsujimoto M, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Enomoto Y, Iida H, Otsuka T, Ogura S, Iwama T, Kojima K, Kozawa O. Thrombin receptor-activating protein (TRAP)-activated Akt is involved in the release of phosphorylated-HSP27 (HSPB1) from platelets in DM patients. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17:737;doi:10.3390/ijms17050737.
- 14) Tsujimoto M, Tokuda H, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Kainuma S, Matsushima-Nishiwaki R, Onuma T, Iida Y, Kojima A, Sawada S, Doi T, Enomoto Y, Tanabe K, Akamatsu S, Iida H, Ogura S, Otsuka T, Kozawa O, Iwama T. AICAR reduces collagen-stimulated secretion of PDGF-AB and release of soluble CD40 ligand from human platelets: suppression of HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAP kinase. *Exp. Ther. Med.* in press
- 15) Kuroyanagi G, Tokuda H, Yamamoto N, Kainuma S, Fujita K, Ohguti R, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T. Attenuation by normoxic HIF inducers on prostaglandin E₁-induced osteoprotegerin synthesis in osteoblasts. *Mol. Med. Rep.* in press
- 16) Fujita K, Tokuda H, Kainuma S, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Harada A, Kozawa O, Otsuka T. Resveratrol suppresses thyroid hormone-induced osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Mol. Med. Rep.* in press
- 17) Kamita M, Mori T, Sakai Y, Ito S, Gomi M, Miyamoto Y, Harada A, Niida S, Yamada T, Watanabe K, Ono M. Proteomic analysis of ligamentum flavum from patients with lumbar spinal stenosis. *Proteomics* 2015;15:1622-1630.
- 18) Hida T, Shimokata H, Sakai Y, Ito S, Matsui Y, Takemura M, Kasai T, Ishiguro N, Harada A. Sarcopenic and sarcopenic leg as potential risk factors for acute osteoporotic vertebral fracture among older women. *Eur Spine J* 2015 Epub ahead of print.
- 19) Sakai Y, Ito K, Hida T, Ito S, Harada A. Neuropathic pain in elderly patients with

chronic low back pain and effects of pregabalin; A preliminary study. *Asian Spine J.* 2015;9:254-262.

- 20) Sakai Y, Ito K, Hida T, Ito S, Harada A. Pharmacological management of chronic low back pain in older patients: a randomized controlled trial of the effect of pregabalin and opioid administration.. *Eur Spine J.* 2015;24: 1309-1317.
- 21) Yamada A, Nakamura E, Sato N, Morita Y, Ito T, Sakai Y, Yamazaki K. Postural Sway Response to Local Vibratory Stimulation in Young, Middle-aged and Elderly People in Standing Position. *Journal of Robotics, Networks and Artificial Life* 2015;2: 17-21.
- 22) Ito T, Sakai Y, Nakamura E, Yamazaki K, Yamada A, Sato N, Morita Y. Relationship between paraspinal muscle crosssectional area and relative proprioceptive weighting ratio of older persons with lumbar spondylosis. *J Phys Ther Sci* 2015;27: 2247-2251.
- 23) Kamita M, Mori T, Sakai Y, Ito S, Gomi M, Miyamoto Y, Harada A, Niida S, Yamada T, Watanabe K, Ono M. Proteomic analysis of ligamentum flavum from patients with lumbar spinal stenosis. *Proteomics.* 2015;15:1622-1630.
- 24) Tauchi R, Imagama S, Inoh H, Yukawa Y, Kanemura T, Sato K, Matsubara Y, Harada A, Sakai Y, Hachiya Y, Kamiya M, Yoshihara H, Ito Z, Ando K, Hirano K, Muramoto A, Matsui H, Matsumoto T, Ukai J, Kobayashi K, Shinjo R, Nakashima H, Ishiguro N. Appropriate timing of surgical intervention for the proximal type of cervical spondylotic amyotrophy. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* 2015;25 Suppl 1:S107-113.
- 25) Kamiya Y, Horii E, Sakai Y, Inoue H. Cervical cord compression in pediatrics with hereditary multiple exostoses: a report of two cases and review of the literature. *J Pediatr Orthop B.* 2016;25:267-270.
- 26) Nagasawa T, Matsushima-Nishiwaki R, Yasuda E, Matsuura J, Toyoda H, Kaneoka Y, Kumada T, Kozawa O. Heat shock protein 20 (HSPB6) regulates TNF- α -induced intracellular signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 2015;565:1-8.
- 27) Suzuki M, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Suzuki N, Takamatsu R, Furui T, Yoshimi N, Kozawa O, Morishige KI. Regulation by heat shock protein 22 (HSPB8) of transforming growth factor- α -induced ovary cancer cell migration. *Arch. Biochem. Biophys.* 2015;571:40-49.
- 28) Takagi T, Imai T, Mishiro K, Ishisaka M, Tsujimoto M, Ito H, Nagashima K, Matsukawa H, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshimura S, Kozawa O, Iwama T, Hara H. Cilostazol ameliorates collagenase-induced cerebral hemorrhage by

protecting the blood-brain barrier. J. Cereb. Blood Flow Metab. in press

2. 学会発表

平成25年度

- 1) 徳田治彦、小澤 修、西脇理英、水野孝彦、榊原誠子. 2型糖尿病(T2DM)患者における血小板凝集能の亢進は低分子量ストレス蛋白質(HSP)27のSer-78におけるリン酸化レベルと相関する
第56回日本糖尿病学会年次学術集会.
2013年5月17日 熊本.
- 2) 徳田治彦、原田 敦、細井孝之、新飯田俊平. 骨芽細胞におけるインターロイキン-1(IL-1)によるIL-6産生制御機構-AMP-activated protein kinase (AMPK)の役割
第55回日本老年医学会学術集会.
2013年6月6日 大阪.
- 3) 山本尚洋, 加藤 賢治, 近藤 章, 黒柳 元, 水谷 潤, 徳田治彦, 小澤 修, 大塚隆信. 骨芽細胞においてSAPK/JNKはinterleukin-1によるinterleukin-6産生を抑制的に制御している
第28回日本整形外科学会基礎学術集会.
2013年10月17日 千葉.
- 4) 黒柳 元, 近藤 章, 水谷 潤, 西脇理英, 徳田治彦, 小澤 修, 大塚隆信. 骨芽細胞においてカテキンはinterleukin-1(IL-1)によるIL-6産生を促進的に制御している
第28回日本整形外科学会基礎学術集会.
2013年10月17日 千葉.
- 5) 酒井義人他. 腰部脊柱管狭窄症におけるサルコペニア
第86回日本整形外科学会学術集会.
2013年5月24日 広島.
- 6) 酒井義人他. 高齢者慢性腰痛症における神経障害性疼痛の関与
第50回日本リハビリテーション医学会. 2013年6月15日 東京.
- 7) 酒井義人他. サルコペニアによるADL低下における体幹筋の影響
第55回日本老年医学会.
2013年6月6日 大阪.
- 8) 酒井義人. Lipo PGE1製剤の腰部脊柱管狭窄症に伴う腰痛に対する効果
第21回日本腰痛学会.
2013年11月2日 東京.
- 9) 酒井義人. 高齢者慢性腰痛症に対する薬物療法—ランダム化試験によるプレガバリンとオピオイドの比較試験— (シンポジウム)
第21回日本腰痛学会.
2013年11月2日 東京.

- 10) 酒井義人 原田 敦 伊藤定之. Lipo PGE1 製剤の腰部脊柱管狭窄症に伴う腰痛に対する効果
第 37 回東海プロスタグランディン研究会.
2013 年 5 月 18 日 名古屋.
- 11) 新畑 豊、鷺見幸彦、武田章敬ほか.
"脳血管性認知症における脳アミロイド病変の合併についての検討"
第 54 回日本神経学会学術集会,
2013 年 5 月 30 日 東京.
- 12) Doi T、Kozawa O、Ogura S
Analysis of the anti-inflammatory effects of antithrombinIII on human blood.
Thirty-sixth Annual Conference on Shock .
2013.6.4. San Diego.
平成 26 年度
 - 1) 徳田治彦、原田 敦、新飯田俊平. 骨芽細胞におけるインターロイキン-1(IL-1)による IL-6 産生制御機構・Stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK)による抑制
第 56 回日本老年医学会学術集会・総会.
2014 年 6 月 12 日 福岡.
 - 2) 山本尚洋、近藤 章、黒柳 元、貝沼慎悟、水谷 潤、徳田治彦、小澤 修.
大塚 隆信. 骨芽細胞において Rho-kinase は BMP-4 による osteocalcin 産生を抑制的に制御している
第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会.
2014 年 10 月 9 日 鹿児島.
 - 3) 貝沼慎悟、黒柳 元、近藤 章、山本尚洋、水谷 潤、徳田治彦、小澤 修.
大塚 隆信.骨芽細胞において resveratrol は PGF_{2α}による osteoprotegerin 産生を抑制する
第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会.
2014 年 10 月 9 日 鹿児島.
 - 4) 谷川隆久、川嶋修司、徳田治彦.
早期の卵巣機能不全、アルコール多飲による両側脛骨遠位端の骨壊死に対してテリパラチドにて加療した 1 例
第 14 回日本内分泌学会東海支部学術集会.
2015 年 1 月 24 日 岐阜.
 - 5) 酒井義人、伊藤定之、原田敦、飛田哲朗、伊藤研悠. 腰痛とサルコペニア
第 43 回 日本脊椎脊髄病学会.
2014 年 4 月 18 日 京都.

- 6) 酒井義人. 腰部脊柱管狭窄症に対する固定術と除圧術における腰痛改善
第 43 回 日本脊椎脊髄病学会.
2014 年 4 月 18 日 京都.
- 7) 酒井義人、伊藤定之、原田敦、飛田哲朗、伊藤研悠.腰部脊柱管狭窄症における腰痛
に対する Lipo PGE1 製剤の効果と動脈硬化の関与
第 43 回 日本脊椎脊髄病学会.
2014 年 4 月 18 日 京都.
- 8) 酒井義人. 高齢者慢性腰痛症に対するランダム化試験によるプレガバリンとオピオ
イドの比較. 第 88 回日本整形外科学会学術集会
2014 年 5 月 24 日 神戸.
- 9) 酒井義人、原田敦. 腰椎手術後の筋萎縮と腰痛
第 51 回日本リハビリテーション医学会.
2014 年 6 月 5 日 名古屋.
- 10) 酒井義人、伊藤定之、原田敦. 骨格筋量と腰痛—四肢および体幹筋の腰痛に与える影
響—
第 56 回日本老年医学会.
2014 年 6 月 12 日 福岡.
- 11) 酒井義人、原田敦. 腰部脊柱管狭窄症におけるカルシトニン製剤の効果—ランダム
化試験における血流増加と骨量減少の影響の評価—
第 16 回日本骨粗鬆症学会.
2014 年 10 月 25 日 東京.
- 12) 酒井義人. 腰痛における体幹筋量および筋活動の及ぼす影響 (シンポジウム)
第 22 回日本腰痛学会.
2014 年 11 月 15 日 幕張.
- 13) 酒井義人. 高齢者慢性腰痛症に対するアセトアミノフェンの効果
第 22 回日本腰痛学会.
2014 年 11 月 15 日 幕張.
- 14) 酒井義人. 腰部脊柱管狭窄症におけるサルコペニアの影響 (主題)
第 22 回日本腰痛学会.
2014 年 11 月 15 日 幕張.
- 15) 新畑 豊、鷺見幸彦、武田章敬、武田章敬、堀部賢太郎、山岡朗子、川合圭成、梅
村想、文堂昌彦、加藤隆司、岩田香織、伊藤健吾.
"Subcortical vascular dementia におけるアミロイド沈着と MRI 病変、脳血流"
第 55 回日本神経学会学術集会.
2014 年 5 月 23 日 福岡.
- 16) 土井智章、陰山康成、小澤 修、小倉真治.血小板機能における Rac の役割 : 抗炎症

作用の分子機序解析

第 29 回日本 Shock 学会.

2014 年 5 月 17 日 松山.

- 17) 西脇理英、永澤友章、安田鋭介、豊田秀徳、熊田 卓、小澤 修. 肝がん細胞増殖における HSP20 の役割 : MAP kinase および AKT シグナル経路の抑制
第 73 回日本癌学会学術集会.
2014 年 9 月 25 日 横浜

平成 27 年度

- 1) 櫻井 孝、徳田治彦、佐竹昭介、谷川隆久、川嶋修司.
高齢者糖尿病の認知症障害/フレイルと居宅での日内血糖変動との関連
第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会
平成 27 年 5 月 21 日山口.
- 2) 谷川隆久、川嶋修司、徳田治彦.
2 型糖尿病を有する高齢者男性における四肢骨格筋肉量に及ぼす因子の検討
第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会
平成 27 年 5 月 21 日山口.
- 3) サブレ森田さゆり、佐竹昭介、谷川隆久、川嶋修司、徳田治彦.
高齢糖尿病患者とサルコペニアの関連についての検討
第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会
平成 27 年 5 月 21 日 山口.
- 4) 千田一嘉、佐竹昭介、西川満則、徳田治彦、三浦久幸、遠藤英俊.
CPAP 外来における高齢睡眠時無呼吸症候群患者の大府研究基準を用いたフレイルの評価
第 57 回日本老年医学会学術集会
平成 27 年 6 月 13 日 横浜.
- 5) 千田一嘉、佐竹昭介、西川満則、徳田治彦、近藤和泉、三浦久幸、遠藤英俊.
包括的呼吸リハビリテーション外来における高齢 COPD 患者の大府研究基準を用いたフレイルの評価
第 57 回日本老年医学会学術集会
平成 27 年 6 月 13 日 横浜.
- 6) サブレ森田さゆり、杉浦彩子、内田育恵、佐竹昭介、川嶋修司、谷川隆久、中島 務、徳田治彦.
高齢糖尿病患者のフレイルに対する難聴の影響
第 57 回日本老年医学会学術集会
平成 27 年 6 月 14 日 横浜.
- 7) 徳田治彦、谷川隆久、原田 敦、新飯田俊平.

- レスベラトロール(RES)は骨芽細胞におけるプロスタグランジン $F_2\alpha$ (PGF₂α)によるオステオプロテジェリン(OPG)生産を抑制する
第 57 回日本老年医学会学術集会
平成 27 年 6 月 14 日 横浜.
- 8) 川嶋修司、櫻井 孝、佐竹昭介、サブレ森田さゆり、谷川隆久、徳田治彦.
フレイル及び認知機能低下に注目した高齢者糖尿病の臨床的特徴
第 57 回日本老年医学会学術集会
平成 27 年 6 月 14 日 横浜.
- 9) サブレ森田さゆり、谷川隆久、伊藤直樹、松葉桃子、今泉良典、小嶋紀子、山口純世、松井むつみ、川嶋修司、徳田治彦.
高齢者のフレイルを予防しよう！-糖尿病教室における転倒予防介入-
第 29 回東海糖尿病治療研究会 糖尿病患者教育担当者セミナー
平成 27 年 9 月 6 日 愛知.
- 10) 大釜典子、徳田治彦、佐竹昭介、川嶋修司、谷川隆久、三浦幸久、清水敦哉、小久保 学、鳥羽研二、櫻井 孝.
高齢者糖尿病における低血糖・血糖の変動と老年症候群・大脳皮質下病変との関連
第 34 回日本認知症学会学術集会
2015 年 10 月 2 日 青森.
- 11) 安藤悦子、絆川牧子、杉野綾子、板谷恵美子、伊藤直樹、徳田治彦、竹村真理枝、近藤和泉. 高齢者の転倒転落事故防止の取り組み 2 ～改訂転倒転落アセスメントシートおよび対策表の有効性～
第 39 回国立病院総合医学会
2015 年 10 月 2 日, 札幌.
- 12) 黒柳 元、山本 尚洋、貝沼慎悟、大口怜央、藤田和彦、徳田治彦、小澤 修、大塚隆信. 骨芽細胞において Rac は TGF-βによる VEGF 生産を抑制的に制御している
第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会
2015 年 10 月 22 日, 富山.
- 13) 黒柳 元、山本 尚洋、貝沼慎悟、大口怜央、藤田和彦、徳田治彦、小澤 修、大塚隆信. 骨代謝における Rac の TGF-βによる VEGF 生産への役割の検討
第 1 回日本骨免疫学会 ウィンターセミナー
2016 年 1 月 28 日, 軽井沢.
- 14) Ito S, Watanabe K, Mori T, Arai E, Kanai Y, Harada A, Niida S, Sakai Y.
Genome-wide DNA methylation analysis of ligamentum flavum in patients with lumbar spine stenosis.
ORS 2015 Annual meeting.
March28-March31, 2015. Las Vegas, Nevada, USA
- 15) 酒井義人. 脊椎変性疾患におけるサルコペニアの関与-痛みの改善と ADL 向上を

- 目指してー
- 第 19 回日本神経麻酔集中治療学会
2015 年 4 月 10-11 日 岐阜
- 16) 酒井義人、原田 敦、伊藤定之、伊藤研悠、飛田哲朗. 腰部脊柱管狭窄症における黄色靭帯肥厚の影響-保存治療における新しい分類-
第 44 回 日本脊椎脊髄病学会
2015 年 4 月 16-19. 福岡
- 17) 酒井義人、原田 敦、伊藤定之、伊藤研悠、飛田哲朗. 脊椎変性疾患とサルコペニア
第 44 回 日本脊椎脊髄病学会
2015 年 4 月 16-19 日 福岡
- 18) 伊藤定之、酒井義人、原田敦. 後期高齢者におけるうつが頸髄症手術成績に及ぼす影響.
第 44 回日本脊椎脊髄病学会
2015 年 4 月 18 日 福岡
- 19) 酒井義人、原田 敦、伊藤定之、飛田哲朗、伊藤研悠. 高齢者慢性腰痛症における神経障害性疼痛の関与
第 88 回日本整形外科学会学術集会
2015 年 5 月 21 日 神戸
- 20) 酒井義人、原田 敦. 腰部脊柱管狭窄症における治療成績とサルコペニア
第 52 回日本リハビリテーション医学会
2015 年 5 月 28 日 新潟
- 21) Ito S, Sakai Y, Harada A. Electrophysiological and morphological of cervical trapezius muscle in neck pain patients with cervical myelopathy.
31th Annual Meeting CSRS-ES Cervical Spine Research Society-European Section
May 27-28, 2015. London, UK.
- 22) 伊藤定之、原田敦、松井康素、竹村真里枝、酒井義人. サルコペニアに対するアレンドロネートとアルファカルシドールの効果検討
第 57 回日本老年医学会学術集会
2015 年 6 月 13 日 横浜
- 23) 酒井義人、原田 敦、伊藤定之. 高齢者脊椎手術における術後成績とサルコペニア
第 57 回日本老年医学会
2015 年 6 月 14 日横浜
- 24) 酒井義人. IT を活用した診断・治療から薬剤適正使用を考える～医療を支える Web Communication～ (パネルディスカッション)
第 69 回国立病院総合医学会
2015 年 10 月 2 日 札幌

- 25) 伊藤定之、酒井義人、原田敦. 頸髄症における僧帽筋萎縮の要因
第 125 回中部日本整形外科災害外科学会・学術総会
2015 年 10 月 2 日 名古屋
- 26) 酒井義人. 脊椎変性疾患とサルコペニア (シンポジウム)
第 125 回中部日本整形外科災害外科学会
2015 年 10 月 3 日 名古屋
- 27) 伊藤定之、渡辺 研、森 大気、原田 敦、新飯田俊平、酒井義人. 腰部脊柱管狭窄症における肥厚黄色靭帯のトランスクリプトーム解析
第 30 回日本整形外科学会基礎学術総会
2015 年 10 月 22 日 富山
- 28) 酒井義人. 高高齢者慢性腰痛症に対するオピオイドとアセトアミノフェンの効 (優秀演題候補)
第 23 回日本腰痛学会
2015 年 11 月 14 日 東京
- 29) 酒井義人. 腰部脊柱管狭窄症における黄色靭帯肥厚を基盤とした新しい分類と治療成績
第 23 回日本腰痛学会
2015 年 11 月 14 日 東京
- 30) 酒井義人. 高齢者の腰痛における固有感覚受容と姿勢制御
第 23 回日本腰痛学会
2015 年 11 月 15 日 東京
- 31) 酒井義人. 慢性腰痛症におけるサルコペニア (優秀演題賞)
第 23 回日本腰痛学会
2015 年 11 月 15 日 東京
- 32) 伊藤定之、酒井義人、原田敦. 脊椎固定術後のアクネ菌感染症
第 84 回東海脊椎脊髄病研究会学術集会
2015 年 12 月 5 日 名古屋
- 33) Ito S, Watanabe K, Mori T, Harada A, Niida S, Sakai Y. Transcriptomic Analysis of Ligamentum Flavum in Patients with Lumbar Spinal Stenosis.
ORS 2016 Annual meeting.
March5-March8, 2016. Orlando, Florida, USA
- 34) 新畑 豊、鷺見幸彦、武田章敬、山岡朗子、辻本昌史、梅村想、岩田香織、加藤隆司、伊藤健吾、中村昭範.
小血管型血管性認知症における脳アミロイド沈着と脳血流変化
第 34 回日本認知症学会学術集会
2015 年 10 月 2 日 青森

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