

血小板機能に着目した糖尿病からアルツハイマー型認知症の発症に至る機序の解明
(19-21)

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

糖尿病(DM)はアルツハイマー型認知症(AD)の危険因子としてよく知られているが、その機序は未だ判然としていない。本研究はDM患者由来の血小板を用いて、その機能における amyloid β -peptide (A β)の作用を検討し、詳細な臨床情報と統合的に解析することにより、DMからAD発症にいたる機序の一端を解明することを目的としている。また、バイオバンクに登録されたDMに併発するADに由来する患者情報とその試料を解析し、機序解明の一助とする。55歳以上のDM患者より早朝空腹時に静脈血を採取し多血小板血漿を調整し、A β を作用させた後、トロンビン受容体を刺激し血小板凝集能を検討した。2020年3月末までに67例を検討した。A β の作用は事例によって相違しており、増強を示したものが31例、不変であったものが16例、減弱を示したものが20例であった。抗血小板薬使用例においても増強を示すものが10例認められた。MRIにおける大脳白質病変(WMH)について、38例(不適切例7例を除く)のSNIPPERによる解析を実施し、白質病変を示すLES/ICは $0.6 \pm 0.8\%$ を示した。同時に刺激時の上清と細胞質画分は分離調整しており、今後血小板より分泌・遊離される生理的活性化物質および刺激時に活性化される細胞内情報伝達系の変化を検討することとしている。もの忘れセンター外来からバイオバンクに登録されたAD患者のうち、DM合併例および非合併例各60例を抽出し、血漿中のリン酸化HSP27を測定したところDM群において高値を示す傾向が見られた。次年度以降に詳細を解析する予定である。健常人由来の血小板を用いた検討では、オリーブポリフェノールであるhydroxytyrosolおよびoleuropeinがコラーゲン刺激時の血小板凝集、リン酸化HSP27遊離およびPDGF-AB遊離を抑制することを示した。この結果はオリーブポリフェノールの新たな抗動脈硬化作用として注目される。

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

櫻井 孝 国立長寿医療研究センター もの忘れセンター (センター長)

小澤 修 岐阜大学大学院医学系研究科 (教授)

A. 研究目的

私共はこれまでに DM 患者における血小板機能を解析し、低用量 ADP 刺激時の血小板凝集亢進における P2Y₁₂ 受容体を介するシグナルの役割、コラーゲン刺激時の血小板凝集における p38 MAP キナーゼの役割、ADP 刺激時の低分子量ストレス蛋白質 HSP27 のリン酸化と凝集能亢進との関連性、コラーゲン刺激、トロンビン刺激およびリストセチン刺激による血小板由来細胞増殖因子(PDGF)分泌に共役したリン酸化 HSP27 の細胞外への遊離等の新しい知見を明らかとし、血小板凝集における ADP およびコラーゲンの ED₅₀ 値を抗血小板薬有効性の指標として確立した。また、睡眠時無呼吸症候群患者由来の血小板において、正常では見られない Akt 活性の亢進に伴うリン酸化 HSP27 の遊離が観察されるが、DM 患者よりそのレベルは低いことを示した。一方、AD の病態として、A β の脳内での蓄積がよく知られているが、A β の前駆物質である amyloid 前駆体タンパク質は血小板の α granule に豊富に含まれ、血液中の A β の大部分が血小板由来であることから、血小板は AD における新たな治療戦略上の標的として注目されている(Inyushin et al., Biomed. Res. Int. 2017;2017:3948360)。ごく最近私共は、健常者由来の血小板においてトロンビン刺激による反応性が A β により増強されることを見出した(未発表データ)。DM 患者は AD の発症頻度が高いことがよく知られているが、リスクに関与する機序については未だ解明されておらず、A β の血小板活性化に対する修飾作用は DM における AD 発症リスクの一つである可能性がある。本研究では、これらの知見を踏まえ、DM 患者における血小板機能の A β による修飾を解析し、MRI をはじめ詳細な臨床情報と統合的に分析する。また、もの忘れセンターからバイオバンクに登録された DM に併発する AD 由来の患者情報および臨床検体を収集し、加えて血小板からのリン酸化 HSP27 等の新しいバイオマーカーの遊離の変化を分析する。以上の詳細な解析により DM から AD に至る機序の一端を血小板機能から明らかとし、DM 患者における AD ハイリスク群の選別方法の提示など、AD 発症予防に対する有効な検査法・治療法の開発の一助とすることを目的としている。本研究は、私共の知見を AD の危険因子としての DM という観点から発展させるものであり、極めて独創性が高い。A β が血小板凝集能を修飾するとの報告はあるが、その臨床的意義に関する検討は十分ではなく、質の高いバイオバンク試料・情報を活用する本研究は極めて有意義と考えられる。

B. 研究方法

(1)血小板機能の解析

1)対象

55 歳以上の DM 患者を解析の対象とした。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) および乏血小板血漿 (platelet-poor plasma: PPP) を分離調整した。

3)血小板凝集能の解析

PRP を AB β にて前処置したのち、トロンビンで刺激し、レーザー光スキャタリング法(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)、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

年齢、性別、身長、体重、血圧、DM 罹病期間、治療期間、治療内容、網膜症の有無および病期、認知機能(MMSE)、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、尿中アルブミン値、頭部 MRI 所見を収集した。

5)頭部 MRI 画像における大脳白質病変および脳萎縮の解析

2019 年 12 月までに脳 MRI を実施した DM 患者 38 名において、コンピューターによる容積分析(SNIPPER)を実施した。

6)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。反応上清中の 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。

7)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。

(2)もの忘れセンター (バイオバンク) 試料の解析

もの忘れセンターからバイオバンクに登録されたAD患者のうち年齢、性別を一致させたDM合併例、非合併例を各60例ずつ抽出し、血漿中のリン酸化HSP27を測定した。これらのうちメディカルゲノムセンターにおいてAPOE遺伝子型が解析済みであったDM合併例34例、非合併例47例について、遺伝子型情報を収集した。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、「ヘルシンキ宣言」ならびに「人を対象とする医学系研究

に関する倫理指針」を遵守するものとし、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。検体収集に当たっては委員会で承認された説明文書、患者同意書の書式を用いて患者へのインフォームドコンセントを行い、患者の自由意思に基づく同意を得て血液試料を得るとともに、匿名化の上で解析に用いることとしており、供給された試料は倫理委員会による規定にそって、鍵のかかる冷凍庫に保管するなどの適切な処置を行うこととした。

C. 研究結果

1) 血小板機能の解析

2020年3月末までに67例のDM患者(1型:5例;2型:62例)について、LS法による血小板凝集解析を行った。ADP刺激時のED₅₀値(註:健常者の範囲1.534-2.022 μM)より亢進とされたものは25例、抑制とされたものは33例であった。(1件測定不能)なお抗血小板薬の投与は22例で、うち16例が抑制を、不変が4例を示し、亢進例は2例であった。これらにおいて、引き続きトロンビン刺激時の血小板凝集に対するAβの作用を検討した。その結果、トロンビン刺激時の血小板凝集に対するAβの作用は事例により相違を示すことが判明したため、Aβ処置がトロンビン刺激によるレーザー光透過量(AUC)の増加分(Δ)に与えた変化を変化率:ΔAβ(+)/ΔAβ(-)×100(%)として半定量化し、<90%を減弱群、90~110%を不変群、>110%を増強群とした。減弱群が27例、不変群が21例、増強群が14例であった。ADP ED₅₀値はそれぞれ2.017 ± 0.717 μM、1.589 ± 0.921 μM、1.436 ± 0.806 μMであり、増強群と減弱群の間に統計学的有意差(p=0.025)を認めた。なお、抗血小板薬投与例では減弱群11例、不変群5例、増強群5例であった。

2019年12月末までに、45例のMRI所見を収集し、大脳白質病変(WMH)と萎縮について、SNIPPERを用いて分析した。7例は解析に不適切とされた。WMHを示すLES/ICは0.541 ± 0.775%、萎縮を示すPAR/ICは79.7 ± 5.0%であった。

2) もの忘れセンター(バイオバンク)からの情報収集

2019年8月末までに、もの忘れセンターからバイオバンクに登録されたAD患者のうちDM合併例、非合併例を各60例ずつ抽出し、血漿中のリン酸化HSP27を測定した。DM群では3,216 ± 434.3 pg/ml、非DM群では2,670.1 ± 407.9 pg/mlで、DM群が高値である傾向がみられた。このうちDM群34例および非DM群47例について、メディカルゲノムセンターよりApo E遺伝子型の情報を入手したが、E4を有するもの(E4/E4、E4/E3あるいはE4/E2)の割合はDM群で41.2%、非DM群で36.2%であった。

3) 細胞レベルでの解析

糖尿病患者40例(男20例/女20例)の血小板細胞内のリン酸化Akt(p-Akt)およびリン酸化p38 MAP kinase(p-p38 MAP kinase)レベルをWestern blotで解析したところ、非刺激時において既にリン酸化を認める事例が少なからず認められた。この現象に着目し、その他の臨床情報と統合的に解析した結果、MRIにおいて海馬の萎縮を反映するVSRAD値がp-Akt/GAPDHレベルと逆相関する傾向($R=-0.268$, $p=0.094$)を示した。次にp-Akt/p-p38 MAP kinaseレベルとの関係を解析したところ、有意な逆相関($R=-0.374$, $p=0.018$)を認めた。

健常人由来の血小板において、オリーブオイルに豊富に含まれるポリフェノールであるhydroxytyrosolおよびoleuropeinの作用を検討した。その結果、hydroxytyrosolおよびoleuropeinはコラーゲン刺激によるHSP27のリン酸化、血小板からのPDGF-ABの分泌、sCD40 ligandの遊離およびリン酸化HSP27の遊離を抑制することが明らかとなった。

D. 考察と結論

今回、DM患者由来の血小板におけるトロンビン刺激時の血小板凝集能に対する $A\beta$ の影響には、増強、不変および減弱のいずれも見られることが示された。この結果は、 $A\beta$ に対する血小板の反応が事例により多様性を有することを示している。疫学的にはDMにおいてはADも血管性認知症も多いとされるが、病理学的な解析からは、AD病理の割合は非DMと比較して高くはない。今回の血小板機能の解析結果は、DM患者の中で $A\beta$ に対する反応性が異なることを示しており、ADリスクの個人差を示唆する可能性を有する所見として注目される。また、バイオバンク試料におけるApoE4の割合が、DM群と非DM群で差が見られなかったことは、遺伝的リスクはAD病理と同様、DM群と非DM群で相違がなく、後天的な要因が病態を修飾することを示唆する知見と考えられる。リン酸化HSP27の遊離については、特にDM群での検討が必要と考えられた。今回明らかとなった血小板における $A\beta$ の作用の多様性は、DMからADに至る機序を考える上で解明すべき興味深い知見と考える。今後これらの対象患者における頭部MRI所見、頸部エコー所見、血管機能検査所見、および身体所見・DMに関する一般的な検査所見等の臨床情報を検討する予定である。

一方、非刺激時の血小板において、p-Akt/p-p38 MAP kinaseレベルがVSRAD値と逆相関を示す可能性が示唆された。Aktを介したシグナルはインスリンの細胞内伝達系において機能するが、2型DMの原因として知られるインスリン抵抗性はAktシグナル伝達の障害と関連すると考えられている(Samuel and Shulman. Cell 2012;148:852-871)。一方、インスリン抵抗性は海馬の萎縮に関与する可能

性が示唆されている(Anan et al., Neuroimage 2010;49:57-62)。非刺激時の血小板におけるAktのリン酸化は、Aktシグナルが常に増強している可能性を示唆する。従ってp-Akt/p-p38 MAP kinaseレベルの低下は、2型DMにおける海馬萎縮のリスクを示す新しい指標となる可能性があると考えられた。

健常者由来の血小板において、オリーブポリフェノールであるhydroxytyrosolおよびoleuropeinが、コラーゲン刺激による血小板凝集、PDGF-ABの分泌、sCD40 ligandおよびリン酸化HSP27の遊離を抑制したことは、オリーブオイルのもつ抗炎症作用および抗動脈硬化作用を裏付ける新しい知見である。さらに、検討を進め、DMにおけるアルツハイマー型認知症の予防に資する生理的活性化物質の探求を遂行する所存である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kim W, Tokuda H, Kawabata T, Fujita K, Sakai G, Nakashima D, Tachi J, Kuroyanagi G, Matsushima-Nishiwaki R, Tanabe K, Otsuka T, Iida H, Kozawa O. Enhancement by HSP90 inhibitor of PGD₂-stimulated HSP27 induction in osteoblasts: suppression of SAPK/JNK and p38 MAP kinase. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2019;1;143:106327. doi: 10.1016/j.prostaglandins. 2019.03.002.
2. Fujita K, Otsuka T, Kawabata T, Sakai G, Kim W, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Wnt3a downregulates thyroid hormone-induced osteocalcin expression in osteoblasts. Exp. Ther. Med. 2019;18:1921-1927.
3. Kawabata T, Tokuda H, Fujita K, Matsushima-Nishiwaki R, Sakai G, Tachi J, Hioki T, Kim W, Iida H, Otsuka T, Kozawa O. HSP90 inhibitors diminish PDGF-BB-induced migration of osteoblasts via suppression of p44/p42 MAP kinase. Biomed. Res. 2019; 40: 169-178.
4. Kito Y, Iida M, Tanabe K, Onuma T, Tsujimoto M, Nagase K, Tokuda H, Iwama T, Kozawa O, Iida H. Smoking cessation affects human platelet activation induced by collagen. Exp Ther. Med. 2019;18:3809-3816.
5. Ogama N, Sakurai T, Kawashima S, Tanikawa T, Tokuda H, Satake S,

- Miura H, Shimizu A, Kokubo M, Niida S, Toba K, Umegaki H, Kuzuya M. Association of glucose fluctuations with sarcopenia in older adults with Type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Med.* 2019;8:pii: E319. doi: 10.3390/jcm8030319.
6. Tokuda H, Kusunose M, Senda K, Kojima K, Onuma T, Kojima A, Mizutani D, Enomoto Y, Iwama T, Iida H, Kozawa O. The release of phosphorylated-HSP27 from activated platelets of obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) patients. *Respir. Investig.* 2020; 58: 117-127.
 7. Mizutani D, Onuma T, Tanabe K, Kojima A, Uematsu K, Nakashima D, Doi T, Enomoto Y, Matsushima-Nishiwaki R, Tokuda H, Ogura S, Iida H, Kozawa O, Iwama T. Olive polyphenol reduces the collagen-elicited release of phosphorylated HSP27 from human platelets. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2020; 84: 536-543.
 8. Kawabata T, Tokuda H, Kuroyanagi G, Fujita K, Sakai G, Kim W, Matsushima-Nishiwaki R, Iida H, Yata K, Wang S, Mizoguchi A, Otsuka T, Kozawa O. Incretin accelerates platelet-derived growth factor-BB-induced osteoblast migration via protein kinase A: The upregulation of p38 MAP kinase. *Sci Rep.* 2020 11;10:2341. doi: 10.1038/s41598-020-59392-7.
 9. Onuma T, Iida M, Kito Y, Tanabe K, Kojima A, Nagase K, Uematsu K, Enomoto Y, Doi T, Tokuda H, Ogura S, Iwama T, Kozawa O, Iida H. Cigarette smoking cessation temporarily enhances the release of phosphorylated-HSP27 from human platelets. *Intern. Med.* doi:10.2.69/internalmedicine. 4000-19,2020.
 10. Mizutani D, Tokuda H, Kojima K, Onuma T, Enomoto Y, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Ueda K, Nakashima D, Tachi J, Ogura S, Iida H, Sakurai T, Kozawa O, Iwama T. Inverse correlation of Akt activity in platelets with hippocampal atrophy: a pilot study in diabetes mellitus patients. *Thrombosis Res.* submitting.

2. 学会発表

1. 真野濤、谷川隆久、川嶋修司、徳田治彦、荒井秀典。
高齢者糖尿病における DASC-8 を使用したカテゴリー分類別の使用薬剤調査。
第 62 回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、2019 年 5 月 23 日。
2. 大釜典子、櫻井孝、川嶋修司、谷川隆久、徳田治彦、佐竹昭介、三浦久幸、清水敦哉、小久保学、新飯田俊平、鳥羽研二、梅垣宏行、葛谷雅文。
高齢者糖尿病における血糖コントロールとサルコペニアの関連。
第 62 回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、2019 年 5 月 23 日。
3. 徳田治彦、藤田和彦、新飯田俊平、小澤修。

骨芽細胞においてストレス蛋白質(HSP)90 はトロンビンによるインターロイキン (IL)-6 産生を制御する-p38 mitogen-activated protein kinase(MAPK)の関与-

第 61 回日本老年医学会学術集会、仙台、2019 年 6 月 7 日.

4. サブレ森田さゆり、谷川隆久、川嶋修司、徳田治彦、荒井秀典.
高齢者糖尿病患者の足病変とサルコペニアおよびダイナペニアの検討.
第 61 回日本老年医学会学術集会、仙台、2019 年 6 月 7 日.

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