

血小板機能に着目した代謝性疾患におけるアルツハイマー型認知症の発症に至る
機序の解明 (22-19)

主任研究者 徳田 治彦 国立長寿医療研究センター 代謝・内分泌研究部 (部長)

研究要旨

私共はこれまで主に糖尿病(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 mitogen-activated protein (MAP)キナーゼの役割、ADP 刺激時の低分子量ストレス蛋白質 27(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成長因子(PDGF)分泌に共役したリン酸化 HSP27 の細胞外への遊離等を詳細に解析・報告してきた。これら活性化された血小板から分泌・遊離された生理活性化物質は動脈硬化の進展に深く関与すると考えられる。また、健常人において血小板凝集における ADP の ED₅₀ 値を詳細に検討し、抗血小板薬の有効性判定の指標として確立、臨床に供している。一方、DM はアルツハイマー型認知症(AD)をはじめとする認知症のリスクファクターとしてよく知られている。Amyloid β protein (A β)の脳組織への蓄積は AD の病理学的所見として知られているが、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 に豊富に含まれており、血液中の A β の大部分は血小板に由来する。私共は、健常者由来の血小板においてトロンビン刺激時の血小板活性化が A β により強く抑制され、その作用がトロンビン受容体の PAR1/PAR4 の下流で p38 MAP キナーゼおよび JNK の上流で発揮されること、DM 患者由来の血小板ではトロンビン刺激時の血小板活性化が A β により抑制されない事例が存在し、A β による血小板凝集変化比率[A β (+)/A β (-), P/N 比]が MRI による脳萎縮所見と相関することを報告している。本研究は、これらの知見を踏まえ、対象を DM 以外の代謝性疾患患者に広げ、脂質異常症をはじめとする代謝性疾患における血小板活性化機能の A β による修飾とその機序を解析し、MRI をはじめとする臨床情報と統合的に解析するものである。2023年3月31日までに 55 歳以上の非 DM 患者 45 例、DM 患者 17 例より空腹時に採取した静脈血から多血小板血漿(platelet-rich plasma: PRP)を調整し、A β (1-40)を作用させた後、トロンビン受容体を刺激し、レーザー光スキャタリング法にて血小板凝集能を検討した。結果として、非 DM 患者の P/N 比は既報の DM 患者における P/N 比より低値であり、大脳白質病変と関連する傾向が見られた。引き続き症例を集積して解析する予定である。

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 研究所 (研究所長)

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ーセチン刺激による 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、Aβ の脳内での蓄積がよく知られているが、Aβ 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 Aβ 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)。私共は先行研究において、健常者由来の血小板ではトロンビン刺激時の血小板活性化が Aβ により抑制されること、その作用点はトロンビン受容体の PAR1/PAR4 の下流で p38 MAP キナーゼおよび JNK の上流であることを報告した。一方 DM 患者由来の血小板ではトロンビン刺激時の血小板活性化が Aβ により抑制されない、あるいはむしろ亢進を示す事例が存在すること、MRI による脳萎縮所見と相関することを最近見出した。DM 患者では 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、Aβ 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。さらに Aβ による血小板機能の修飾は、すでに血管壁に蓄積した Aβ によりもたらされる結果である可能性があるとともに、血小板活性化に伴い α granule から Aβ が遊離されることから、血管壁ひいては組織中への Aβ の蓄積をもたらす原因である可能性がある。一方、血小板活性化の亢進自体は動脈硬化の促進因子であり、血管性認知症とも関連すると考えられる。以上より、Aβ による血小板機能の修飾は、多くの AD 患者に併発するアミロイドアングリオパチー等の AD 関連病態や血管性認知症に関連する新たな病的老化の指標 (マーカー) である可能性が極めて高いと考えられる。本研究ではこれらの知見を踏まえ、対象を DM 以外の代謝性疾患に広げ、代謝性疾患における血小板活性化機能の Aβ による修飾とその機序を解析し、MRI をはじめとする臨床情報と統合的に解析するものである。

DM とそれ以外の代謝性疾患の比較検討により、血小板機能からみた代謝性疾患における AD およびアミロイドアンギオパチー等の関連病態あるいは血管性認知症の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。

B. 研究方法

(1)血小板機能の解析

1)対象

国立長寿医療研究センター代謝内科に通院している 55 歳以上の脂質異常症(DL)、高尿酸血症(HUA)、骨粗鬆症(OP)、甲状腺機能低下症等の代謝性疾患の患者のうち、DM 治療薬を使用することなく HbA1c 値が 6.5%未満である者を非 DM 群とした。一方、J-MIND (AMED 櫻井班)やモニタリング研究(20-22 杉本班)に参加した DM 患者を DM 群とした。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、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 Aβ(1-40)あるいはコントロールにて前処置した後、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 μm 未満)、中凝集塊(medium, 25-50 μm)および大凝集塊(large, 50-75 μm)が識別、表示できるが、定量的な比較検討が可能な Trans %における Area under curve (AUC)を数量化し、Aβによる凝集能変化比率[Aβ(+)/Aβ(-), P/N 比]を算出、解析に用いた。反応停止後の PRP を 20,000×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°C で保管し、細胞レベルでの解析に供することとした。

4)臨床情報の収集

年齢、性別、身長、体重、血圧、主要疾患、治療期間、治療内容、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、尿酸値、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、血糖、HbA1c、および頭部 MRI 所見を収集した。

5)頭部 MRI 画像における大脳白質病変(White matter hyperintensity; WMH)および脳萎縮の解析

2023 年 1 月まで脳 MRI を実施した非 DM 群 43 例において、コンピューターによる容

積分析(SNIPPER)を実施した。

6)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。相関関係は Pearson の相関係数により、2 群間の比較は paired-t test により行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

(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「人を対象とする生命科学・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。検体収集にあ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) 代謝性疾患患者からの試料・情報収集および解析

2023年3月31日までに45例の患者(DL: 31例、DL以外: 14例; HUA2例、OP6例、甲状腺機能低下症6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 μ M)より亢進とされたものは29例、抑制とされたものは10例、それ以外は正常範囲内であった。なお抗血小板薬の投与は2例で、全て抑制を示した。これら45例におけるP/N比を算出したところ、DL例: 0.474 ± 0.257 (mean \pm SD), n=31; 非DL例: 0.420 ± 0.281 , n=14でありこの2群間では有意差を認めなかった($p=0.533$)。非DM群のP/N比は 0.457 ± 0.262 であったが、この値はこれまでに検討したDM患者におけるP/N比 0.887 ± 0.369 (n=96)より有意に低値であった($p < 0.001$)。また非DM群のP/N比は、血小板数ではなく赤血球数との間に有意な正の相関を認めた($R=0.405$, $p=0.007$)。その他のパラメーターとの相関は認められなかった。

一方、非DM群におけるP/N比の中央値は0.4437であったが、それより高値を示したP/N高値群(H群, n=22)とそれ以下であったP/N低値(L群, n=23)に分けて比較検討を行った。ADP ED₅₀値(mean \pm SD)はH群: 1.102 ± 0.803 μ M、L群: 1.655 ± 0.931 μ Mであり、H群が有意に低値であった($p=0.039$)。それ以外のパラメーターには有意差を認めなかった。

2023年1月31日までに非DM群45例のMRI所見を収集し、WMHと脳萎縮についてSNIPPERを用いてそれぞれWMH/IC、PAR/ICとして分析した。4例は解析に不適切とされた。WMH/ICは $0.433 \pm 0.643\%$ 、PAR/ICは $77.9 \pm 5.4\%$ であった。P/N比はWMH/ICと関連する傾向($R=0.271$, $p=0.087$)が見られたが、PAR/ICとの間には関連がなかった($R=0.057$, $p=0.725$)。H群($n=19$)、L群($n=22$)の比較では、WMH/ICはH群: $0.559 \pm 0.754\%$ 、L群: $0.324 \pm 0.524\%$ ($p=0.132$)、PAR/ICはH群: $78.4 \pm 6.69\%$ 、L群: $77.6 \pm 4.32\%$ ($p=0.339$)と差が見られなかった。

2) DM患者からの資料・情報収集および解析

現在進行中のDMモニタリング研究に登録された患者から、主任研究者の外来に通院している87例を抽出し、MOCA-J (Japan version of Montreal Cognitive Assessment)値を収集した。MOCA-J値は13点~29点に分布し、 22.89 ± 3.08 点 (mean \pm SD)であった。当該患者より血小板機能の解析を開始しており、2023年3月31日までに17例を実施した。このうち4例でP/N比が0.7以上を示し、最高値は1.120であった。MOCA-J値が23点以下と24点以上の2群に分けてP/N比を比較したが、ほとんど差は見られなかった(23点以下: 0.400 ± 0.287 , $n=8$; 24点以上: 0.403 ± 0.320 , $n=9$)。

3) 血小板機能の細胞レベルでの解析

今年度は試料の保管を優先して行うこととした。今後反応上清中に分泌されたPDGF-ABや遊離されたHSP27などの生理活性物質をELISA法にて解析する計画としている。また、細胞質画分中のPI3-キナーゼ、Akt、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、JNK)、Rho/Rhoキナーゼ、Racの活性化については、Western blot法により解析する計画としている。

健常人を用いた解析では、低用量コラーゲンとトロンボポエチンによる血小板活性化の相乗作用には、ノルアドレナリントランスポーターではなく、セロトニントランスポーターの活性化が促進的な役割を果たしていること、およびその作用点はRacおよびRho/Rhoキナーゼの上流であることが明らかとなった。

D. 考察と結論

昨年度までの研究により、健常人においてはトロンビン刺激時の血小板凝集能に対して $A\beta(1-40)$ が抑制的に作用し、その作用点がJNKおよびp38 MAPキナーゼの上流であること(Mizutani *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2022;86:185-198)、DM患者においては同様の検討において亢進あるいは不変を示す事例が存在し、 $A\beta(1-40)$ に対する抑制作用の減弱が脳萎縮に対して保護的に関与する可能性があること(Hori T *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23:14100)を報告した。今年度の研究では、非DM患者において、トロンビン刺激時の血小板凝集に対する $A\beta(1-40)$ の作用をDM患者との比較において検討した。結果として

非 DM 患者の P/N 比は DM 患者のものより低値であることが示されたが、健常人におけるものよりは高値であると考えられた。従って代謝性疾患の患者においては、健常人と DM 患者の中間的な A β 応答性を示す可能性が示唆された。また、SNIPPER による解析の結果、大脳白質病変と関連する傾向が見られたため、さらに症例を集積することが必要である。代謝性疾患の間での相違は明らかではなく、この点においてもさらに症例を蓄積する予定である。一方、DM モニタリング研究参加者の検討は 15 例実施に留まった。MOCA-J 値で 2 群に分けて P/N 比を検討したが、差は見られなかった。P/N 比は認知機能よりは器質的な変化に関連する可能性があることを示唆するとも考えうるが、細胞レベルにおける解析を含む今後の検討が必要である。

健常人における血小板機能の基礎的な解析においては、低用量コラーゲンとトロンボポエチンの相乗作用においてセロトニントランスポーターの重要性が示された。近年、セロトニンレシジョンは血小板機能制御において特に注目を集めている。また臨床的に選択的セロトニン再取り込み阻害剤およびセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬は糖尿病性神経疼痛をはじめ慢性疼痛治療に広く用いられている。今回はその機序において Rac および Rho/Rho キナーゼの上流に作用点があることも明らかとしており、より有用性が高くかつ副作用の少ない薬剤の開発の一助となることが期待できる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuroyanagi G, Tokuda H, Fujita K, Kawabata T, Sakai G, Kim W, Hioki T, Tachi J, Matsushima-Nishiwaki R, Otsuka T, Iida H, Kozawa O. Upregulation of TGF- β -induced HSP27 by HSP90 inhibitors in osteoblasts. BMC Musculoskelet Disord. 2022;23:495.
- 2) Doi T, Hori T, Onuma T, Mizutani D, Ueda K, Enomoto Y, Matsushima-Nishiwaki R, Tanabe K, Hioki T, Tokuda H, Iwama T, Iida H, Kozawa O, Ogura S. Thrombopoietin and collagen in low doses cooperatively induce human platelet activation. Acute. Med. Surg. 2022;9:e769.
- 3) Kuroyanagi G, Kawabata T, Tokuda H, Fujita K, Matsushima-Nishiwaki R, Sakai G, Tachi J, Hioki T, Kim W, Iida H, Otsuka T, Kozawa O. Attenuation by HSP90 inhibitors of EGF-elicited migration of osteoblasts: involvement of p44/p42 MAP kinase. Connect. Tissue Res. 2022;63:359-369.

- 4) Nishikimi A, Watanabe K, Watanabe A, Yasuoka M, Watanabe R, Fujiwara M, Oshima H, Nakagawa T, Kitagawa Y, Tokuda H, Washimi Y, Niida S, Kojima M. Immune response to COVID-19 vaccine BNT162b2 in workers at a research institute in Japan: 6-month follow-up survey. *J. Infect.* 2022;85:174-211.
- 5) Yamamoto S, Tanaka A, Ohmagari N, Yamaguchi K, Ishitsuka K, Morisaki N, Kojima M, Nishikimi A, Tokuda H, Inoue M, Tanaka S, Umezawa J, Okubo R, Nishimura K, Konishi M, Miyo K, Mizoue T. Use of heated tobacco products, moderate alcohol drinking, and anti-SARS-CoV-2 IgG antibody titers after BNT162b2 vaccination among Japanese healthcare workers. *Prev. Med.* 2022;161:107123.
- 6) Hori T, Mizutani D, Onuma T, Okada Y, Kojima K, Doi T, Enomoto Y, Iida H, Ogura S, Sakurai T, Iwama T, Kozawa O, Tokuda H. Relationship between the responsiveness of amyloid β protein to platelet activation by TRAP stimulation and brain atrophy in patients with diabetes mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23:14100.
- 7) Hioki T, Matsushima-Nishiwaki R, Tokuda H, Kozawa O. Selective estrogen receptor modulators, acting as agonists of estrogen receptor α in osteoblasts, reduce the TGF- β -induced synthesis of macrophage colony-stimulating factor via inhibition of JNK signaling pathway. *Biomed. Res.* 2022;43:211-221.
- 8) Doi T, Hioki T, Tachi J, Ueda K, Matsushima-Nishiwaki R, Iida H, Ogura S, Kozawa O, Tokuda H. Oncostatin M reduces the synthesis of macrophage colony-stimulating factor stimulated by TGF- β via suppression of p44/p42 MAP kinase and JNK in osteoblasts. *Biomed. Res.* 2022;43:41-51.
- 9) Kuroyanagi G, Tachi J, Fujita K, Kawabata T, Sakai G, Nakashima D, Kim W, Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Otsuka T, Iida H, Kozawa O, Tokuda H. HSP70 inhibitors upregulate prostaglandin E_1 -induced synthesis of interleukin-6 in osteoblasts. *PLoS One.* 2022;17:e0279134.
- 10) Iida H, Onuma T, Nakashima D, Mizutani D, Hori T, Ueda K, Hioki T, Kim W, Enomoto Y, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Yamaguchi S, Tachi J, Tanabe K, Ogura S, Iwama T, Kozawa O, Tokuda H. Tramadol regulates the activation of human platelets via Rac but not Rho/Rho-kinase. *PLoS One.* 2023;18:e0279011.
- 11) Sugimoto T, Tokuda H, Miura H, Kawashima S, Ando T, Kuroda Y, Matsumoto N, Fujita K, Uchida K, Kishino Y, Sakurai T. Cross-sectional association of metrics derived from continuous glucose monitoring with cognitive performance in older adults with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2023;25:222-228.
- 12) Nishikimi A, Nakagawa T, Fujiwara M, Watanabe K, Watanabe A, Komatsu A, Yasuoka M, Watanabe R, Naya M, Oshima H, Kitagawa Y, Tokuda H, Kondo I,

Niida S, Sakurai T, Kojima M, Arai H. Humoral and cellular responses to the third COVID-19 BNT162b2 vaccine dose in research institute workers in Japan. *J. Infect.* 2023;86:e33-e35.

- 13) Hioki T, Kuroyanagi G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Oncostatin M attenuates tumor necrosis factor- α -induced synthesis of macrophage colony-stimulating factor via suppression of Akt in osteoblasts. *Connect. Tissue Res.* 2023;64:139-147.
- 14) Kuroyanagi G, Hioki T, Tachi J, Matsushima-Nishiwaki R, Iida H, Kozawa O, Tokuda H. Oncostatin M stimulates prostaglandin D2-induced osteoprotegerin and interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* in press

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