

高齢者の慢性呼吸器疾患と糖代謝異常の病態的関連性に基づく血小板機能の解明(28-9)

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

本研究は、糖尿病患者におけるこれまでの知見を踏まえ、高齢期の代表的な慢性疾患である閉塞性呼吸器疾患および睡眠時無呼吸症候群(OSAS)を対象として血小板機能を検討し、詳細な臨床情報と統合的に解析することにより、病的老化の指標としての血小板機能評価・制御法開発の一助とすることを目的としている。55 歳以上の OSAS、慢性閉塞性呼吸器疾患(COPD)および糖尿病(DM)患者より静脈血を採取し、多血小板血漿を調整し、各種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。平成 29 年度までに OSAS 患者 36 例、COPD 他患者 15 例、DM 患者 68 例につき解析を実施した。呼吸器疾患では亢進例は計 38 例(OSAS28 例、他 10 例)であり、OSAS 群で ADP 刺激時の ED₅₀値が低い傾向がみられた。OSAS では総睡眠時間と ADP 刺激時の ED₅₀値との間に正の相関が見られた。DM 由来の血小板において、リストセチン刺激による血小板凝集は抗血小板薬投与で何ら影響されないが、リン酸化 HSP27 および血小板由来成長因子(PDGF)-AB の遊離は著明に抑制されることが明らかとなった。一方、健常者由来の血小板において、コラーゲン刺激による血小板活性化に対する sphingosine 1-phosphate (S1P)の影響を検討し、S1P はコラーゲン刺激による血小板凝集、HSP27 のリン酸化、血小板からの PDGF-AB 分泌およびリン酸化 HSP27 遊離を S1P1 受容体ではなく S1P4 受容体を介して制御していることを明らかとした。以上より、OSAS における血小板凝集能亢進の特性が明らかとなるとともに、細胞レベルでの検討により DM 患者における抗血小板薬の有用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 (部長)

分担研究者

楠瀬 公章 国立長寿医療研究センター 内科総合診療部 (医師)

小澤 修 岐阜大学大学院医学系研究科 (教授)

A. 研究目的

血小板は外傷時の止血および創傷治癒過程において極めて重要な役割を果たしているが、一方で高齢期における動脈硬化等の血管老化、各種代謝性疾患あるいは悪性腫瘍等の慢性炎症の進展を助長することが知られている。言い換えれば血小板機能の亢進は病的老化現象の指標といえる。従って血小板機能異常を適切に評価・制御することができれば、様々な加齢性疾患を早期から管理することが可能と考えられる。加齢とともに増加する代表的疾患である糖尿病(DM)は、脳梗塞・心筋梗塞等の危険因子として知られ、重大な後遺障害の原因となることから、高齢者における大きな健康上の課題である。私共はこれまでに、DMをはじめ高齢者の代謝性疾患において血小板機能を解析し、様々な新知見を得てきた。一方、睡眠時無呼吸症候群(OSAS)はDMをはじめ様々な代謝性疾患と病態関連性を有し、脳梗塞・心筋梗塞等の重要な危険因子として知られている。本研究は、高齢期の代表的な慢性疾患である閉塞性呼吸器疾患および睡眠時無呼吸症候群(OSAS)を対象として血小板機能をDMとの病態的関連性において検討し、詳細な臨床情報と統合的に解析することにより、病的老化の指標としての血小板機能評価・制御法開発の一助とする成果を得ることを目的としている。本研究の成果をもとに高齢者の血小板機能が適切に制御されれば、病的老化の効率的な進捗防止により健康寿命の延伸が大いに期待できると考えられ、その重要性は極めて高い。

私共はこれまでに、2型DM患者では低用量ADP刺激時の血小板凝集においてP2Y₁₂受容体を介するシグナルが病態に関与すること、コラーゲン刺激時のp38 MAPキナーゼの活性化が凝集能と相関すること、ADP刺激時の低分子量ストレス蛋白質HSP27のリン酸化が凝集能亢進と相関すること、コラーゲン刺激時にリン酸化されたHSP27が血小板由来増殖因子(PDGF)-ABと共役して細胞外に遊離されること等を報告している(Matsuno H, et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2005;90:920-927; Hanai Y, et al., *Life Sci.*, 2009;85:386-394; Tokuda H, et al., *Int. J. Mol. Med.*, 2012;30:1387-1395; Tokuda H., et al., *PloS One* 2015;10:e0128977)。また、脳梗塞の再発予防としての抗血小板療法において、血小板凝集におけるADPおよびコラーゲンのED₅₀値を有効性の指標として確立している。一方OSASの血小板機能については、持続陽圧呼吸療法(CPAP)により血小板凝集能の改善がみられること(Sanner BM et al., *Eur. Respir. J.* 2000;16:648-652)や、ADP刺激時の血小板凝集能とOSASの重症度間に相関がみられること(Alkhiary W., et al., *Clin. Appl. Thromb. Hemost* 2015: pii:1076029615600790)等が報告されているが、代謝性疾患との病態的関連性あるいは細胞レベルでの機序については未だ判然としていない。本研究は、私共のこれまでの研究成果を踏まえて実施するものであり、極めて独創性が高い。

B. 研究方法

1)対象

55歳以上のOSAS、慢性閉塞性呼吸器疾患および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 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、OSAS の追加項目としてポリグラフィ所見を、2 型 DM 患者の追加項目として、DM 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収集した。

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。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。

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。

(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

1) OSAS・COPD患者での検討

倫理・利益相反委員会承認後2018年3月末までに計51例(OSAS36例、COPD他14例、1例除外)を分析した。透過率でみたADP刺激時のED₅₀値(註：健常者の範囲 1.534-2.022 μM)より明らかな亢進とされたものは計39例(OSAS29例、COPD他10例)であった。OSAS群は他疾患群よりED₅₀値が低い傾向が見られた。またOSASのうち17例において、非刺激時に微小凝集塊の出現(spontaneous micro-aggregation)が見られ、そのうち3例はDM合併症例であった。OSAS症例についてポリグラフィー所見との解析を開始した。これまでに解析した36例においては、ADPのED₅₀値は総睡眠時間との間に有意な正の相関関係($r=0.410$, $p<0.05$)を認めたが、中途覚醒時間および無呼吸・低呼吸指数(AHI)との間には相関関係は見られなかった。一方、3%経皮的酸素飽和度(SPO₂)低下指数(3%ODI)、SpO₂ 90%/総睡眠時間%との間にもそれぞれ有意な正の相関関係($r=0.34$, $p<0.05$; $r=0.54$, $p<0.05$)を、minimum SPO₂値との間に負の相関関係($r=-0.39$, $p<0.05$)を認めた。なお、ADP刺激時、コラーゲン刺激時、リストセチン刺激時およびthrombin receptor-activating protein (TRAP)刺激時の凝集パターンはDMと異なる傾向が見られた。

2) 2型DM患者での検討

倫理・利益相反委員会承認後2018年3月末までに計68例を分析した。透過率でみたADP刺激時のED₅₀値より、亢進49例、非亢進18例であった。このうち非刺激時の微小凝集塊出現(spontaneous micro-aggregation)は亢進32例、非亢進13例にみられた。抗血小板薬は22例(うち亢進11例、非亢進11例)に投与されていた。これらを除外した46例(亢進群38例、非亢進群7例)において、頭部MRI所見、頸部エコー所見および呼吸機能検査所見を比較した。頭部MRIにおけるperiventricular leukomalacia (PVL)は亢進群に多い傾向がみられたが、頸部エコー検査における内膜中膜複合体厚(IMT)所見は、亢進群と非亢進群の間に差はみられなかった。また、呼吸機能検査における%肺活量および1秒率も、この2群間に差は見られなかった。

3) 血小板機能の細胞レベルでの解析

上記1)2)にて収集された検体において、各種刺激により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/プロテインキナーゼ 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)、Rho/Rhoキナーゼ、Rac、Ca⁺⁺動員等]の検討を行った。

DM患者46例(男性25例/女性21例)について、リストセチン刺激前後の血小板内HSP27リン酸化レベル、血漿中のリン酸化HSP27レベルおよびPDGF-ABレベル

を解析した。リストセチン(1.5 mg/ml)刺激時のHSP27(serine 78)のリン酸化レベルは、血漿中に遊離されるリン酸化HSP27レベルと正の相関を認めた。抗血小板薬の投与例は15例(男性6例/女性9例)であったが、リストセチン刺激による血小板凝集は抗血小板薬投与の有無の2群間で相違が見られなかった。一方、リストセチン刺激により血漿中に遊離されるリン酸化HSP27レベルおよびPDGF-ABレベルは、抗血小板薬投与群では非投与群との比較において著明に抑制されていた。

健常者から調整した platelet rich plasma (PRP)を用いた検討では、sphingosine 1-phosphate (S1P)はS1P1受容体ではなくS1P4受容体を介してコラーゲン刺激による血小板凝集、PDGF-ABの分泌、sCD40 ligandの遊離、HSP27のリン酸化およびリン酸化HSP27の遊離を抑制すること、TRAPはトロンビン受容体のうちPAR1受容体およびPAR4受容体を介し、低分子量GTP結合蛋白質の一つであるRacを活性化すること、その下流でp38 MAPキナーゼを介しHSP27をリン酸化し、HSP27の遊離を促進することを明らかとした。

D. 考察と結論

OSASとDMの発症に関連する肥満およびインスリン抵抗性の病態において、関連が深いことが知られている。OSASの病態において臨床的に重要な総睡眠時間と血小板凝集能の亢進との間に相関があることが確認された。一方、AHIとの関連性は明らかとはならなかったが、今回の検討事例は精査入院患者が主体で重症例が多かったことに起因すると考えられた。また3%ODIおよびSPO₂/総睡眠時間%との間に正の相関関係を、minimum SPO₂値との間に負の相関関係が認められたが、これらの結果はOSASにおけるSPO₂低下については、その持続時間より低下レベルが血小板凝集能の亢進に強く影響する可能性を示唆するものと考えられた。一方、DM患者との比較において、OSAS事例は各刺激時の反応性に相違があることが示唆されたが、さらに詳細な分析が必要である。昨年度の本研究では、DM事例においてずり応力刺激モデルであるリストセチン刺激により血小板からHSP27が遊離されることを示した。今年度は、抗血小板薬投与の影響について検討し、抗血小板薬はリストセチン刺激時の血小板凝集に影響しないが、リン酸化HSP27およびPDGF-ABの遊離を抑制することを明らかとした。また、健常者由来の血小板の解析によりコラーゲン刺激に対するS1Pの制御機構、およびTRAP刺激におけるHSP27遊離の機序を明らかとした。HSP27がマクロファージなどから細胞外に遊離され、動脈硬化防御作用を有すること(Myrikov EV et al., *Physiol. Rev.* 91:1123-1159, 2011; Reddy VS et al., *Cell Stress Chaperones* 23:441-454, 2018; Rayner K et al., *Circ. Res.* 103:133-141, 2008)、細胞外のHSP27は、血管内皮細胞において動脈硬化促進因子として知られる血管内皮細胞

増殖因子の発現を亢進すること(Thuringer D et al., FASEB J. 27:4169-4183, 2013)、マクロファージにおいてHSP27がIL-10等のanti-inflammatory factorsに加えてインターロイキン(IL)-1 β 等のpro-inflammatory factorsを促進的に制御すること(Salari S et al., Cell Stress Chaperones 18:53-63, 2013)等が報告されている。以上を踏まえ、DM患者における今回の成果は、血小板刺激時に遊離されるHSP27は動脈硬化促進因子として知られるPDGF-ABの遊離と共役して動脈硬化性変化を促進している可能性、並びにアスピリンを初めとする抗血小板薬がこの機序を抑制する可能性を示唆した、極めて重要な新知見であると考えられる。以上、OSASにおける血小板凝集能亢進の特性が明らかとなるとともに、細胞レベルでの検討によりDM患者における抗血小板薬の有用性が強く示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujita K, Otsuka T, Yamamoto N, Kainuma S, Ohguchi R, Kawabata T, Sakai G, Kuroyanagi G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. (-)-Epigallocatechin gallate but not chlorogenic acid up-regulates osteoprotegerin synthesis by bone morphogenetic protein-4 in osteoblasts. *Exp. Ther. Med.* 2017;14:417-423.
- 2) 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.* 2017;16:2881-2886.
- 3) Fujita K, Tokuda H, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Kainuma S, Kawabata T, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T. HSP90 inhibitors potentiate PGF_{2 α} -induced IL-6 synthesis via p38 MAP kinase in osteoblasts. *PLoS One.* 2017;12:e0177878.
- 4) Onuma T, Tanabe K, Kito Y, Tsujimoto M, Uematsu K, Enomoto Y, Matsushima-Nishiwaki R, Doi T, Nagase K, Akamatsu S, Tokuda H, Ogura S, Iwama T, Kozawa O, Iida H. Sphingosine 1-phosphate (S1P) suppresses the collagen-induced activation of human platelets via S1P4 receptor. *Thromb. Res.* 2017;156:91-100.

- 5) Kainuma S, Tokuda H, Yamamoto N, Kuroyanagi G, Fujita K, Kawabata T, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T. Heat shock protein 27 (HSPB1) suppresses PDGF-BB-induced migration of osteoblasts. *Int. J. Mol. Med.* 2017;40:1057-1066.
- 6) Kawabata T, Tokuda H, Fujita K, Kainuma S, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T. Resveratorol inhibits the epidermal growth factor-induced migration of osteoblasts: The suppression of SAPK/JNK and Akt. *Cell. Physiol. Biochem.* 2017;43:1025-1036.
- 7) Sakai G, Otsuka T, Fujita K, Kainuma S, Kuroyanagi G, Kawabata T, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Amplification by (-) epigallocatechin gallate of prostaglandin F_{2α}-stimulated synthesis of osteoprotegerin in osteoblasts. *Mol. Med. Rep.* 2017;16:6376-6381.
- 8) Kawabata T, Otsuka T, Fujita K, Kainuma S, Yamamoto N, Kuroyanagi G, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Suppression by HSP90 inhibitors of BMP-4-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts: attenuation of p70 S6 kinase. *Mol. Med. Rep.* 2017;16:8507-8512.
- 9) Sakai G, Tokuda H, Fujita K, Kainuma S, Kawabata T, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T. Heat shock protein 70 negatively regulates TGF-β-stimulated VEGF synthesis via p38 MAP kinase in osteoblasts. *Cell. Physiol. Biochem.* 2017;44:1133-1145.
- 10) Tokuda H, Kuroyanagi G, Onuma T, Enomoto Y, Doi T, Iida H, Otsuka T, Ogura S, Iwama T, Kojima K, Kozawa O. Ristocetin induces phosphorylated-HSP27 (HSPB1) release from the platelets of type 2DM patients: Anti-platelet agent-effect on the release. *Biomed. Rep.* 2018;8:365-372.
- 11) Sable-Morita S, Sugiura S, Uchida Y, Tanikawa T, Tokuda H, Arai H. Relationship between hearing impairment and frailty in older patients with diabetes mellitus. *J. Aging Geriatr. Med.* 2018;2:1. doi:10.4172/2576-3946.1000114
- 12) Sakai G, Tokuda H, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Fujita K, Kawabata T, Kozawa O, Otsuka T. Association of HSP22 with mTOR in osteoblasts: regulation of TNF-α-stimulated IL-6 synthesis. *FEBS Lett.* doi:10.1002/1873-3468.13028.
- 13) Fujita K, Otsuka T, Kawabata T, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Inhibitors of heat shock protein 90 (HSP90; HSPC) augment endothelin-1-induced heat shock protein27 (HSP27; HSPB1) through SAPK/JNK in osteoblasts. *Mol. Med. Rep.* 2018;17:8542-8547.
- 14) Kawabata T, Otsuka T, Fujita K, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. (-)-Epigallocatechin gallate but not chlorogenic acid suppresses

EGF-stimulated migration of osteoblasts: attenuation of p38 MAP kinase. *Inter. J. Mol. Med.* in press

- 15) Kusunose M, Oga T, Nakamura S, Hasegawa Y, Nishimura K. Frailty and patient-reported outcomes in subjects with chronic obstructive pulmonary disease: are they independent entities? *BMJ Open Resp. Res.* 2017;4:e000196. doi:10.1136/bmjresp-2017-000196.
- 16) Nakamura S, Kusunose M, Satou A, Senda K, Hasegawa Y, Nishimura K. A case of pulmonary actinomycosis diagnosed by transbronchial lung biopsy. *Respir. Med. Case Rep.* 2017;21:118-120.
- 17) Matsushima-Nishiwaki R, Toyoda H, Takamatsu R, Yasuda E, Okuda S, Maeda A, Kaneoka Y, Yoshimi N, Kumada T, Kozawa O. Heat shock protein 22 (HSPB8) reduces the migration of hepatocellular carcinoma cells through the suppression of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT pathway. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* 2017;1863:1629-1639.

2. 学会発表

- 1) サブレ森田さゆり、荒井有紀、道田愛美、徳田治彦、谷川隆久。高齢糖尿病患者のフレイルを予防できるか—糖尿病教室における多職種介入—。
第60回日本糖尿病学会年次学術集会、名古屋、2017年5月18日。
- 2) 谷川隆久、サブレ森田さゆり、川嶋修司、徳田治彦、佐竹昭介、荒井秀典。基本チェックリストは高齢者糖尿病におけるフレイルのスクリーニングに有用である。
第60回日本糖尿病学会年次学術集会、名古屋、2017年5月20日。
- 3) 小出由美子、溝神文博、サブレ森田さゆり、徳田治彦、谷川隆久。高齢者糖尿病患者におけるフレイルとポリファーマシーに関する検討。
第60回日本糖尿病学会年次学術集会、名古屋、2017年5月20日。
- 4) 徳田治彦、黒柳 元、原田 敦、新飯田俊平、小澤 修。骨芽細胞においてミモシン(MIM)は低酸素誘導因子(HIF)を介してプロスタグランジン F_{2α}(PGF_{2α})によるオステオプロテジェリン(OPG)産生を抑制する。
第59回日本老年医学会学術集会、名古屋、2017年6月15日。
- 5) サブレ森田さゆり、杉浦彩子、内田育恵、谷川隆久、徳田治彦、荒井秀典。高齢糖尿病患者の難聴とフレイルの関連。
第59回日本老年医学会学術集会、名古屋、2017年6月16日。
- 6) 谷川隆久、サブレ森田さゆり、川嶋修司、徳田治彦、荒井秀典。高齢者糖尿病患者におけるフレイルに関する因子についての検討。
第59回日本老年医学会学術集会、名古屋、2017年6月16日。
- 7) Kusunose M, Nakamura S, Senda K, Nishimura K. Medication Adherence And

Patient Reported Outcomes in Subjects with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. American Thoracic Society International Conference. Washington, 2017.5.21.

- 8) 楠瀬公章、中村さや、千田一嘉、西村浩一. 安定期 COPD 患者における服薬アドヒアランスと患者報告アウトカムおよび生理学的指標との関連についての検討.
第 57 回日本呼吸器学会学術講演会、東京、2017 年 4 月 22 日.
- 9) 楠瀬公章、千田一嘉、松井康素. 当院ロコモフレイル専門外来を受診した高齢の慢性呼吸器疾患患者における呼吸困難および安静時代謝量とフレイルとの関連 の検討.
第 59 回日本老年医学会学術集会、名古屋、2017 年 6 月 16 日.
- 10) 西村浩一、三田亮、楠瀬公章、辻洋介、小賀徹. E-RS および CAT 日本語版における電子版と質問紙との比較検討.
第 27 回日本呼吸ケア・リハビリテーション学会学術集会、仙台、2017 年 11 月 18 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