

長寿医療研究開発費 平成 30 年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

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

3 年間全体について

私共はこれまでに糖尿病(DM)をはじめとする高齢者の代謝性疾患における血小板機能を解析し、2 型 DM 患者では低用量 ADP 刺激時の血小板凝集において P2Y<sub>12</sub> 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 mitogen-activated protein(MAP)キナーゼの活性化が凝集能と正の相関をすること、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正の相関をすること、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-AB(PDGF-AB)の分泌と共役して細胞外に遊離されること等を報告してきた。本研究は、DM におけるこれらの知見を踏まえ、高齢期の代表的な慢性疾患である閉塞性呼吸器疾患(COPD)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た。研究期間中に OSAS 患者 36 例、COPD 他患者 15 例、DM 患者 101 例につき解析を実施した。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。OSAS においても血小板の活性化により HSP27 がリン酸化され細胞外に遊離された。また、ポリグラフィー所見のうち minimum SpO<sub>2</sub> と ADP ED<sub>50</sub> 値あるいはリン酸化 HSP27 の遊離レベルとの間に負の相関が認められた。これらの知見は OSAS と DM との病態的関連性を血小板機能において示唆するとともに、間歇的な低酸素血症に対する一酸化窒素(NO)等の代償機転が血小板凝集能に抑制的に作用している可能性を示唆する結果であると考えられる。一方、ヒト成熟血小板においてスフィンゴシン 1-リン酸(S1P)はコラーゲン刺激による血小板凝集能、HSP27 のリン酸化、血小板からの PDGF-AB 分泌およびリン酸化 HSP27 の遊離を S1P<sub>4</sub> 受容体を介し制御していることを明らかとした。

平成 30 年度について

OSAS36 例の解析結果を臨床情報と統合的に解析した。その結果、OSAS においても DM と同様に血小板の活性化により HSP27 がリン酸化され細胞外に遊離された。また、

ポリグラフィー所見のうち minimum SpO<sub>2</sub> と ADP ED<sub>50</sub> 値あるいはリン酸化 HSP27 の遊離レベルとの間に負の相関が認められた。COPD 等その他の呼吸器疾患では亢進例は計 10 例であり、一定の傾向は見られなかった。これらの知見は OSAS と DM との病態的関連性を血小板機能において示唆するとともに、間歇的な低酸素血症に対する NO 等の代償機転が血小板凝集能に抑制的に作用している可能性を示唆する結果であると考えられる。一方、健常者由来のヒト血小板において、トロンビン刺激によるリン酸化 HSP27 の遊離における低分子量 GTP 結合タンパク質 Rac の役割を検討し、Rac はプロテアーゼ活性化受容体 (PAR) 活性化によるリン酸化 HSP27 の遊離を p38 MAP キナーゼを介して制御することを明らかとした。以上より、OSAS と DM との病態的関連性が血小板機能において明らかとなるとともに、新たな細胞レベルでの知見が得られた。

#### 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)

研究期間 平成 28 年 4 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日

#### 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 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、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 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P2Y<sub>12</sub>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p38MAP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ED<sub>50</sub>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の重症度の間に関係がみられること(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

### 3年間全体について

OSASおよびCOPD患者における血小板機能を、糖尿病患者との病態的関連性において統合的かつ詳細に比較解析し、病的老化の指標として血小板機能評価法・制御法開発に向けた具体的な提言を行うこととした。

### 平成30年度について

平成28年度、平成29年度に引き続き以下の検討を行った。

#### 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10ml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thrombin receptor-activating protein (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  $\mu\text{m}$  未満 small)、中凝集塊(medium, 25-50  $\mu\text{m}$ ) および大凝集塊(large, 50-75  $\mu\text{m}$ )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 $^{\circ}$ C 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、 $\gamma$ -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ー所見を、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)

#### 3 年間全体について

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た。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匿名化を徹底した。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) 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ED<sub>50</sub>値(註：健常者の範囲 1.534-2.022  $\mu\text{M}$ )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ED<sub>50</sub>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の解析では、ADPのED<sub>50</sub>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(SPO<sub>2</sub>)低下指数(3%ODI)、SpO<sub>2</sub> 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 SPO<sub>2</sub>値との間に負の相関関係( $r=-0.39$ ,  $p<0.05$ )を認めた。さらに後述する細胞レベルでの解析に供し得た22例において検討したところ、各パラメータは総睡眠時間(TST): $381.4 \pm 15.1$  分;REM/TST: $13.3 \pm 1.2\%$ ;無呼吸・低呼吸指数(AHI): $47.5 \pm 4.5$  回/時;3%経皮的酸素飽和度(SpO<sub>2</sub>)低下指数(3%ODI): $39.1 \pm 5.5$  回/時;minimum SpO<sub>2</sub>: $80.0 \pm 1.9\%$ (mean  $\pm$  SE)であった。ADPのED<sub>50</sub>値は $1.216 \pm 0.121$   $\mu$ M(mean  $\pm$  SE)で健常者の $1.778 \pm 0.122$   $\mu$ M(mean  $\pm$  SE)より低値を示すとともに、minimum SPO<sub>2</sub>値との間により顕著な負の相関( $R=-0.652$ ,  $p<0.001$ )を認めた。

## 2) 2型DM患者での検討

倫理・利益相反委員会承認後2019年3月末までに計101例を分析した。透過率でみたADP刺激時のED<sub>50</sub>値より、亢進例は68例であった。抗血小板薬は34例(うち亢進17例)に既に投与されていた。これらを除外した67例(亢進群51例、非亢進群16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)所見および血管内皮機能検査(FMD)とも、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の検討を行った。

OSAS患者22例(男性16例/女性6例)について、ADP、リストセチン、collagenおよびTRAP刺激時の血小板内HSP27リン酸化、Aktリン酸化、p38 MAPキナーゼリン酸化および血漿中のリン酸化HSP27レベルを検討した。これらの刺激により細胞内のHSP27リン酸化は血小板凝集とともに促進されたが、ADPあるいはcollagen刺激時の凝集能は血漿中に遊離されたリン酸化HSP27レベルと正の相関が認められた。ADPおよびcollagen刺激時におけるAktリン酸化レベルあるいはp38 MAPキナーゼリン酸化レベルはHSP27のリン酸化レベルと正の相関が認められた。一方、ADPのED<sub>50</sub>値は遊離リン酸化HSP27レベルと負の相関( $R=-0.748$ ,  $P<0.001$ )を示した。さらにDM患者31例(男性19例/女性12例)におけるADPあるいはcollagenにより惹起された遊離リン酸化HSP27レベルはOSAS群より明らかに高値であった。

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、その遊離を促進することを明らかとした。

平成 30 年度について

#### 1) 1) OSAS・COPD患者での検討

OSAS症例のポリグラフィー所見を、後述する細胞レベルでの解析に供し得た22例において検討したところ、各パラメーターは総睡眠時間(TST): $381.4 \pm 15.1$  分;REM/TST: $13.3 \pm 1.2\%$ ;無呼吸・低呼吸指数(AHI): $47.5 \pm 4.5$  回/時; $3\%$ 経皮的酸素飽和度( $SpO_2$ )低下指数( $3\%ODI$ ): $39.1 \pm 5.5$  回/時;minimum  $SpO_2$ : $80.0 \pm 1.9\%$ (mean  $\pm$  SE)であった。ADPのED<sub>50</sub>値は $1.216 \pm 0.121 \mu M$ (mean  $\pm$  SE)で健常者の $1.778 \pm 0.122 \mu M$ (mean  $\pm$  SE)より低値を示すとともに、minimum  $SPO_2$ 値との間に負の相関( $R=-0.652$ ,  $p<0.001$ )を認めた。

#### 2) 2型DM患者での検討

今年度は33例を分析した。透過率でみたADP刺激時のED<sub>50</sub>値より、亢進例は19例であった。抗血小板薬は12例(うち亢進6例)に既に投与されていた。これらを除外した67例(亢進群51例、非亢進群16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PVLは亢進群に多い傾向がみられた。

#### 3) 血小板機能の細胞レベルでの解析

今年度は上記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の検討を行った。即ち、OSAS患者22例(男性16例/女性6例)について、ADP、リストセチン、collagenおよびTRAP刺激時の血小板内HSP27リン酸化、Aktリン酸化、p38 MAP キナーゼリン酸化および血漿中のリン酸化HSP27レベルを検討した。これらの刺激により細胞内のHSP27リン酸化は血小板凝集ともに促進されたが、

ADPあるいはcollagen刺激時の凝集能は血漿中に遊離されたリン酸化HSP27レベルと正の相関が認められた。ADPおよびcollagen刺激時におけるAktリン酸化レベルあるいはp38 MAPキナーゼリン酸化レベルはHSP27のリン酸化レベルと正の相関が認められた。一方ADPのED<sub>50</sub>値は遊離リン酸化HSP27レベルと負の相関(R= -0.748, P<0.001)を示した。さらにDM患者31例(男性19例/女性12例)におけるADPあるいはcollagenにより惹起された遊離リン酸化HSP27レベルはOSAS群より明らかに高値であった。

健常者から調整したplatelet rich plasma (PRP)を用いた検討では、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、その遊離を促進することを明らかとした。

#### D. 考察と結論

##### 3年間全体について

OSASとDMの病態的関連性を血小板機能の視点から検討したところ、OSASにおいてもADPのED<sub>50</sub>値を指標とした血小板凝集能の亢進が高率にみられることが明らかとなった。また、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正の相関があることが確認された。OSASは脳血管障害や虚血性心疾患の危険因子として知られているが、血小板機能の亢進が関与する可能性を示唆する結果として興味深い。さらに細胞レベルでの検討により、OSASにおいてもDMにおけると同様、リン酸化HSP27の遊離が見られること、HSP27のリン酸化とp38 MAPキナーゼとAktのリン酸化が正の相関を示すことが示された。以前、私共はDM患者において、トロンビン受容体刺激時のHSP27リン酸化にAktが関与することを報告したが(Tokuda et al., *Int. J. Mol. Sci.* 17:737;doi:10.3390/ijms17050737,2016)、今回健常者における検討では同様の刺激時におけるリン酸化HSP27遊離においてAktが関与しないことを明らかとした。以上より、血小板刺激時のHSP27リン酸化におけるAktの関与はOSASとDMの病態的な共通性を示唆する知見である可能性がある。また、ADPのED<sub>50</sub>値はminimum SPO<sub>2</sub>値と遊離リン酸化HSP27レベルと負の相関を示した。低酸素により遊離されるNOは血小板凝集能抑制作用を有するが、この作用は低酸素により生じるdeoxyhemoglobinによりさらに増強されること等が報告されている

(Dautov RF et al., *Nitric Oxide* 2014;40:36-44)。従って、OSASにおいては間歇的な低酸素状態によるNO遊離等の代償機転が血小板凝集能に抑制的に作用することを示唆すると考える。OSAS患者に新たにCPAP療法を導入する際は、今回示唆された間歇的な低酸素状態に対する代償機転からの逸脱による血小板凝集能亢進が惹起される可能性を考慮することが必要であると考えられた。DMにおいては、ずり応力刺激モデル

であるリストセチン刺激に着目し、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、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。今日では血液中のHSP27はPDGF-ABとともに動脈硬化に対して促進的に作用すると考えられており、抗血小板薬の投与は抗動脈硬化作用においても有用である可能性が考えられた。

以上、OSASにおいてもリン酸化HSP27が遊離されること、およびDMとの血小板機能における病態的な関連性が明らかとなった。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

平成 28 年度

1. Kainuma S, Otsuka T, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Regulation by AMP-activated protein kinase of PGE<sub>2</sub>-induced osteoprotegerin synthesis in osteoblasts. *Mol. Med. Rep.* 2016;13:3363-3369.
2. Kainuma S, Otsuka T, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Possible involvement of AMP-activated protein kinase in PGE<sub>1</sub>-induced synthesis of osteoprotegerin in osteoblasts. *Exp. Ther. Med.* 2016;11:2042-2048.
3. 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.
4. 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.* 2016;12:1107-1112.

5. Yamamoto N, Tokuda H, Kuroyanagi G, Kainuma S, Matsushima-Nishiwaki R, Fujita K, Kozawa O, Otsuka T. Heat shock protein 22(HSPB8) limits TGF- $\beta$ -stimulated migration of osteoblasts. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2016;436:1-9.
6. Kainuma S, Tokuda H, Fujita K, Kawabata T, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Harada A, Kozawa O, Otsuka T. Attenuation by incretins of thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Biomed. Rep.* 2016;5:771-775.
7. Kuroyanagi G, Tokuda H, Yamamoto N, Kainuma S, Fujita K, Ohguchi R, Kawabata T, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Harada A, Kozawa O, Otsuka T. (-)-Epigallocatechin gallate synergistically potentiates prostaglandin E<sub>2</sub>-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2017;128-129:27-33.
8. Kohnoh T, Hashimoto N, Ando A, Sakamoto K, Miyazaki S, Aoyama D, Kusunose M, Kimura M, Omote N, Imaizumi K, Kawabe T, Hasegawa Y. Hypoxia-induced modulation of PTEN activity and EMT phenotypes in lung cancers. *Cancer Cell Int.* 2016;16:33.
9. Kimura M, Hashimoto N, Kusunose M, Aoyama D, Sakamoto K, Miyazaki S, Ando A, Omote N, Imaizumi K, Kawabe T, Hasegawa Y. Exogenous induction of unphosphorylated PTEN reduces TGF $\beta$ -induced extracellular matrix expressions in lung fibroblasts. *Wound Repair Regen.* 2017;25:86-97.
10. Tanabe K, Kozawa O, Iida H. cAMP/PKA enhances interleukin-1 $\beta$ -induced interleukin-6 synthesis through STAT3 in glial cells. *Cell. Signal.* 2016;28:19-24.
11. Okuno M, Yasuda I, Adachi S, Nakashima M, Kawaguchi J, Doi S, Iwashita T, Hirose Y, Kozawa O, Yoshimi N, Shimizu M, Moriwaki H. The significance of phosphorylated heat shock protein 27 on the prognosis of pancreatic cancer. *Oncotarget.* 2016;7:14291-14299.
12. Matsushima-Nishiwaki R, Toyoda H, Nagasawa T, Yasuda E, Chiba N, Okuda S, Maeda A, Kaneoka Y, Kumada T, Kozawa O. Phosphorylated heat shock protein 20 (HSPB6) regulates transforming growth factor- $\alpha$ -induced migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One.* 2016;11:e0151907.
13. Horibe Y, Adachi S, Yasuda I, Yamauchi T, Kawaguchi J, Kozawa O, Shimizu M, Moriwaki H. Anticancer effect of arsenite on cell migration, cell cycle and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Oncol. Lett.* 2016;12:177-182.
14. Okuno M, Adachi S, Kozawa O, Shimizu M, Yasuda I. The clinical significance of phosphorylated heat shock protein 27 (HSPB1) in pancreatic cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17:137.

15. 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.* 2017;37:123-139.  
平成 29 年度
1. Kuroyanagi G, Tokuda H, Yamamoto N, Kainuma S, Fujita K, Ohguchi R, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T. Attenuation of prostaglandin E<sub>1</sub>-induced osteoprotegerin synthesis in osteoblasts by normoxic HIF inducers. *Mol. Med. Rep.* 2017;15:1847-1852.
  2. Fujita K, Tokuda H, Yamamoto N, Kainuma S, Kawabata T, Sakai G, Kuroyanagi G, Matsushima-Nishiwaki R, Harada A, Kozawa O, Otsuka T. Incretins amplify TNF- $\alpha$ -stimulated IL-6 synthesis in osteoblasts: suppression of the I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B pathway. *Int. J. Mol. Med.* 2017;39:1053-1060.
  3. 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 morphogenic protein-4 in osteoblasts. *Exp. Ther. Med.* 2017;14:417-423.
  4. Fujita K, Tokuda H, Kainuma S, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Harada A, Kozawa O, Otsuka T. Otsuka T. Resveratrol suppresses thyroid hormone-induced osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Mol. Med. Rep.* 2017;16:2881-2886.
  5. 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<sub>2 $\alpha$</sub> -induced IL-6 synthesis via p38 MAP kinase in osteoblasts. *PLoS One.* 2017;12:e0177878.
  6. 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.
  7. 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.

8. 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.
9. 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<sub>2α</sub>-stimulated synthesis of osteoprotegerin in osteoblasts. *Mol. Med. Rep.* 2017;16:6376-6381.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.

平成 30 年度

1. 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.
2. 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.* 2018;592:1202-1210.

3. 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.
4. Fujita K, Otsuka T, Kawabata T, Kainuma S, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. HSP90 limits thrombin-stimulated IL-6 synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells: regulation of p38 MAPK. *Int. J. Mol. Med.* 2018;42:2185-2192.
5. Kawabata T, Tokuda H, Sakai G, Fujita K, Matsushima-Nishiwaki R, Otsuka T, Kozawa O. Repression of IGF-I-induced osteoblast migration by (-)-epigallocatechin gallate through p44/p42 MAP kinase signaling. *Biomed. Rep.* 2018;9:318-326.
6. Uematsu K, Enomoto Y, Onuma T, Tsujimoto M, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Tokuda H, Ogura S, Iida H, Kozawa O, Iwama T. Rac regulates the TRAP-induced release of phosphorylated-HSP27 from human platelets via p38 MAP kinase but not JNK. *Cell. Physiol. Biochem.* 2018;49:1523-1538.
7. Ogama N, Sakurai T, Kawashima S, Tanikawa T, Tokuda H, Satake S, Miura H, Shimizu A, Kokubo M, Niida S, Toda K, Umegaki H, Kuzuya M. Postprandial hyperglycemia is associated with white matter hyperintensity and brain atrophy in older patients with type 2 diabetes mellitus. *Front. Aging. Neurosci.* 2018;10:273.
8. 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 via attenuation of p38 MAPK activity. *Int. J. Mol. Med.* 2018;42:3149-3156.
9. Kawabata T, Tokuda H, Sakai G, Fujita K, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Otsuka T, Kozawa O. HSP70 inhibitor suppresses IGF-I-stimulated migration of osteoblasts through p44/p42 MAP Kinase. *Biomedicines.* 2018;6(4). pii: E109. doi: 10.3390/biomedicines6040109.
10. Kawabata T, Otsuka T, Fujita K, Sakai G, Kim W, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Kozawa O, Tokuda H. HSP70 inhibitors reduce the osteoblast migration by epidermal growth factor. *Curr. Mol. Med.* 2018;18:486-495.
11. 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(3). pii: E319. doi: 10.3390/jcm8030319.
12. 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. in press.

13. Tokuda H, Kusunose M, Senda K, Kojima K, Onuma T, Kojima A, Iida H, Kozawa Q. The release of phosphorylated-HSP27 from activated platelets of obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) patients. in preparation.
14. Nishimura K, Nakamura S, Kusunose M, Nakayasu K, Sanda R, Hasegawa Y, Oga T. Comparison of patient-reported outcomes during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *BMJ Open Respir Res* 2018; 5:e000305.
15. Goda Y, Chen-Yoshikawa TF, Kusunose M, Hamaji M, Motoyama H, Hijiya K, Aoyama A, Date H. Late-onset chest wall abscess due to a biodegradable rib pin infection after lung transplantation. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2018;66:175-178.
16. サブレ森田さゆり、伊藤直樹、木下かほり、小嶋紀子、荒井有紀、道田愛美、山口純世、高道香織、溝神由美子、川嶋修司、谷川隆久、徳田治彦。  
高齢糖尿病患者に対するフレイル予防介入プログラムの評価についての検討-糖尿病教室を用いた多職種連携による介入-。国立医療学会誌 医療, 73(1):12-19, 2019.

## 2. 学会発表

平成 28 年度

1. 谷川隆久、川嶋修司、徳田治彦。高齢者 2 型糖尿病におけるサルコペニアと糖尿病関連因子の検討。  
第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、京都、2016 年 5 月 20 日。
2. 徳田治彦、谷川隆久、原田 敦、新飯田俊平、小澤 修。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 E<sub>1</sub>(PGE<sub>1</sub>)によるオステオプロテジェリン(OPG)産生を減弱する。  
第 58 回日本老年医学会学術集会、金沢、2016 年 6 月 8 日。
3. 千田一嘉、佐竹昭介、西川満則、徳田治彦、三浦久幸、遠藤英俊。高齢閉塞性睡眠時無呼吸症候群患者の CPAP 外来における基本チェックリストを用いたフレイル評価に基づく包括ケアによるアドヒアランス向上。  
第 58 回日本老年医学会学術集会、金沢、2016 年 6 月 8 日。
4. 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。高齢 COPD 患者の呼吸リハビリテーション外来における基本チェックリストによるフレイル評価を活用した包括ケア。  
第 58 回日本老年医学会学術集会、金沢、2016 年 6 月 9 日。
5. 谷川隆久、川嶋修司、徳田治彦。高齢者男性糖尿病におけるサルコペニアに及ぼす因子の検討。

- 第 26 回内分泌 Up date、大宮、2016 年 11 月 19 日.
6. 楠瀬公章, 中村さや, 千田一嘉, 西村浩一. 安定期 COPD 患者におけるフレイルと患者報告アウトカムおよび生理学的指標の関連についての検討.  
第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、京都、2016 年 4 月 9 日.
  7. 楠瀬公章, 中村さや, 千田一嘉, 西村浩一. 安定期 COPD 患者における基本チェックリストと患者報告アウトカムおよび生理学的指標との関係についての検討.  
第 58 回日本老年医学会学術集会、金沢、2016 年 6 月 8 日.
  8. 土井智章, 陰山康成, 小澤 修, 小倉真治. 血小板の炎症誘導作用における Rac の役割.  
第 31 回日本 Shock 学会総会、東京、2016 年 10 月 6 日.
  9. 西脇理英, 豊田秀徳, 熊田 卓, 小澤 修. TNF- $\alpha$  刺激による肝癌細胞遊走および浸潤のリン酸化 HSP20 (HSPB8) による抑制.  
第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、2016 年 10 月 6 日.
  10. Onuma T, Tanabe K, Kozawa O, Iida H. Sphingosine-1-phosphate suppresses collagen-induced human platelet activation. Anesthesiology 2016 Annual Meeting. Chicago, October 22, 2016.
  11. Tanikawa T, Sable-Morita S, Kawashima S, Tokuda H. The prevalence and characteristics of frailty in elderly Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. 2nd Asian Conference for Frailty and Sarcopenia Asian Forum. Nagoya, November 5, 2016.
  12. Senda K, Satake S, Kondo I, Nishikawa M, Tokuda H, Endo H, Miura H. Kihon Checklist predicts adverse outcome in elder outpatients with chronic obstructive pulmonary disease.  
2nd Asian Conference for Frailty and Sarcopenia Asian Forum. Nagoya, November 5, 2016.
  13. Kusunose M, Nakamura S, Senda K, Nishimura K. Frailty assessed by the Kihon Checklist and patient-reported outcomes in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease.  
21st Asian Pacific Society of Respiriology (APSR 2016). Bangkok, November 14, 2016.
  14. 藤田和彦, 徳田治彦, 黒柳 元, 山本尚洋, 貝沼慎悟, 川端 哲, 酒井 剛, 西脇理英, 大塚隆信, 小澤 修. 骨芽細胞において HSP90 阻害剤は p38 MAP kinase を介し PGF $_{2\alpha}$  による IL-6 産生を促進する.  
第 90 回日本薬理学会年会、長崎、2017 年 3 月 15 日.

平成 29 年度

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ー糖尿病教室における多職種介入ー.  
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  $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$ )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. Nishimura K, Nakamura S, Kusunose M, Tsuji Y, Oga T. Comparison between electronic and paper versions of the Evaluating Respiratory Symptoms in COPD (E-RS) and the COPD Assessment Test (CAT). ERS International Congress 2017. Milan, 2017.9.12.
9. 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.
10. 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.
11. 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。  
平成 30 年度

1. Kusunose M. Frailty and patient-reported outcomes in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. World Congress on COPD, Asthma and Lung Health. Osaka. 2018.11.19.
2. 谷川隆久、サブレ森田さゆり、川嶋修司、徳田治彦、荒井秀典。  
高齢者糖尿病におけるフレイルに関連する因子の検討。  
第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2018 年 5 月 25 日。
3. 真野濤、谷川隆久、川嶋修司、徳田治彦、荒井秀典。  
高齢糖尿病入院患者のポリファーマシーへの介入に対する検討。  
第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2018 年 5 月 25 日。
4. 徳田治彦、藤田和彦、原田敦、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 阻害剤はプロスタグランジン F2 $\alpha$ (PGF)F2 $\alpha$ によるインターロイキン(IL)-6 産生を増強する-p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の関与。  
第 60 回日本老年医学会学術集会、京都、2018 年 6 月 15 日。
5. 酒井剛、徳田治彦、小澤修。  
骨芽細胞において HSP22 は TNF- $\alpha$  による IL-6 産生を mTOR を介して抑制する。  
第 91 回日本生化学会、京都、2018 年 9 月 25 日。
6. 酒井剛、徳田治彦、藤田和彦、川端哲、小澤修。  
骨芽細胞において HSP70 は TGF- $\beta$ による VEGF 産生を p38 MAP-kinase を介して抑制的に制御する。第 20 回日本骨粗鬆症学会、長崎、2018 年 10 月 26 日。
7. 藤田和彦、徳田治彦、川端哲、酒井剛、小澤修。  
骨芽細胞において HSP90 の阻害剤は PGF2 $\alpha$  によるインターロイキン (IL)-6 産生を促進する。  
第 20 回日本骨粗鬆症学会、長崎、2018 年 10 月 28 日。
8. 川端哲、徳田治彦、藤田和彦、酒井剛、大塚聖視、小澤修、大塚隆信。  
Resveratrol は SAPK/JNK および Akt を阻害し epidermal growth factor(EGF)による骨芽細胞の遊走を抑制する。  
第 20 回日本骨粗鬆症学会、長崎、2018 年 10 月 28 日。
9. 千田一嘉、佐竹昭介、近藤和泉、徳田治彦、松井康素。  
呼吸リハビリテーション外来の COPD 患者と「フレイル予防：CGA 外来」の老年症候群患者のフレイルの比較。  
第 29 回日本老年医学会東海地方会、名古屋、2018 年 11 月 3 日。
10. 佐々木由美、山田茜、谷川隆久、川嶋修司、徳田治彦。  
糖尿病チーム医療での臨床検査技師としての取り組み。

第 32 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、名古屋、  
2018 年 9 月 2 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