

代謝性疾患における血小板機能等の病態・診断・治療に関する研究（22-4）

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

高齢者代謝性疾患における血小板凝集能亢進の機序について解析し、診断・治療への応用に資することをその目的とした。55歳以上の2型糖尿病患者、骨粗鬆症患者および脂質異常症患者より静脈血を採取し、多血小板血漿を調整、ADPにより惹起される血小板凝集を詳細に解析した。また細胞内情報伝達系についてはWestern blot法にて解析した。平成23年度末までに糖尿病検体90件、骨粗鬆症検体70件について、血小板凝集能の解析を実施した。非糖尿病コントロール群について既に検討済みであったADPのED₅₀値（1.778 ± 0.244 μM）を指標として、糖尿病患者を血小板凝集能亢進群（Group 1: ED₅₀ < 1.534 μM）および血小板凝集能非亢進群（Group 2: ED₅₀ ≥ 1.534 μM）に分類、ADPにより惹起される血小板中の低分子量ストレス蛋白質（HSP27）のリン酸化、血小板より遊離・分泌されるsCD40 ligand（sCD40L）および血小板由来細胞増殖因子（PDGF）-ABについて検討した。ADPによるHSP27のリン酸化（Ser-78、Ser-82）は両群で観察されたが、低用量ADP（1 μM）によるSer-78のリン酸化、sCD40L遊離およびPDGF-AB分泌はGroup 1で特に顕著で、個々の血小板凝集におけるADPのED₅₀値とHSP27（Ser-78）のリン酸化レベルは強い相関を示すこと、アスピリン投与により低用量ADPによるHSP27（Ser-78）のリン酸化が消失すること等の所見を得た。また、骨粗鬆症患者における検討では、新しい選択的エストロゲン受容体モジュレーター（SERM）製剤であるバゼドキシフェン酢酸塩が投与された5例において、投与前に亢進を示した1例で開始後正常化が確認された一方、投与前に亢進のなかった1例において、投与後亢進が認められた。これらの検体で細胞内情報伝達経路につき解析を行ったところ、改善が見られた1例では1 μM ADPにより惹起されるp38 MAPKのリン酸化が、投与後著明に減弱していた。亢進が新たに見られた1例では、Aktおよびfocal adhesion kinase（FAK）のリン酸化の増強が見られた。以上の結果から、2型糖尿病患者においてADPにより惹起されるHSP27のリン酸化（Ser-78）は血小板凝集能の亢進に関連すること、骨粗鬆症治療薬バゼドキシフェン酢酸塩の血小板機能に対する双方向性作用の存在が示唆された。さらに検討を進めることにより、高齢者代謝性疾患における血小板機能の安全な管理に向けた簡便な臨床指標の提示が可能となると考える。

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

酒井 義人 国立長寿医療研究センター 脊椎外科 (医長)

小澤 修 岐阜大学大学院 医学系研究科 (教授)

研究協力者

榊原 孝夫 医療法人榊原 榊原整形外科 理事長

A. 研究目的

血小板は生理的な止血の制御に中心的な役割を果たしていることは周知のことである。一方、高齢者では血小板機能が亢進し、血栓形成が循環不全を起し多様な疾患（脳梗塞、狭心症、悪性腫瘍等）の発症に関与していると考えられている。加齢とともに糖尿病の有病率は増加し、70歳以上では三人に一人が糖尿病に罹患していると推計されている。高齢者の糖尿病では微小血管障害による三大合併症とともに脳梗塞・心筋梗塞等の大血管障害も多く発症し、これらはいずれも重大な後遺障害を招くことから、有効な予防対策は高齢化の著しい我が国において喫緊の課題である。私共はこれまでに、国立療養所中部病院および国立長寿医療センターで治療中の2型糖尿病患者における血小板凝集能の解析を行い、①大部分の糖尿病患者でシェアーストレス（ずり応力）により血小板微小凝集塊形成が惹起され、糖尿病患者における血糖コントロールの指標である HbA1c 値との有意な相関を示すこと、②ADP 刺激による血小板凝集反応において、血糖値正常群では ADP 受容体のうち P2Y1 受容体が主として関与するが、一方糖尿病患者における血小板凝集能の亢進状態では P2Y12 受容体が関与すること、③糖尿病患者におけるコラーゲン刺激による凝集亢進には p44/p42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) および p38 MAPK の活性化が関与すること、④血小板における p38 MAPK 活性の定量化が臨床指標となることを報告した (J.Clin.Endocrinol.Metab.2005;90:920-927, Life Sci.2009;85:386-394)。抗血小板剤であるアスピリンは、糖尿病患者において血栓性疾患の主要な二次予防薬であるが、その効果は限定的でアスピリン抵抗性の存在が示唆されている。従って、糖尿病患者の血小板凝集亢進に関する細胞内情報伝達機構を解析し、異常の早期発見・制御が可能となれば健康寿命の延伸に資するところ大と考えられる。

一方、骨粗鬆症性骨折は寝たきり状態の主因であり、骨粗鬆症の効果的かつ安全な予防・治療法の確立が求められる。本症に対する薬物療法として、SERM である塩酸ラロキシフェンが広く使用されているが、本剤により深部静脈血栓症、肺塞栓症、網膜血栓症等の静脈血栓塞栓症 (vein thromboembolism: VTE) の発生リスク増加が知られている。私共は、閉経後骨粗鬆症患者における血小板凝集能を塩酸ラロキシフェン投与との関連において検討し、7例中2例に血小板凝集能の亢進を認め、それぞれ異なる機序 (p44/p42 MAPK 或い

は Akt の活性化亢進) が関与することを報告した (Intern.Med.2008;47:1523-1528, Osteoporosis Int. 2010; 21:189-193)。

本研究の目的は、糖尿病や骨粗鬆症をはじめとする高齢者の代謝性疾患における血小板凝集能亢進の機序についての解析から、その診断・治療への応用に資することである。代謝性疾患の患者における血小板機能につき治療経過との関連において詳細に解析し、簡便な臨床指標を提示する。成果として、代謝性疾患を有する高齢者の生命・社会的予後を規定する大血管障害を含む主要な合併症に対する有効な予防・治療体制の確立が期待できる。

B. 研究方法

55 歳以上の 2 型糖尿病患者、骨粗鬆症患者および脂質異常症患者を対象とした。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) を分離調整したのち、ずり応力 (シェアストレス) あるいは ADP 等で刺激し、レーザー粒子径測定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。刺激前後の PRP は分取し、血小板からの生理的活性化物質 (PDGF-AB および sCD40L) を ELISA 法にて測定し、これらの遊離に関する解析に供するとともに、血小板細胞質画分を調整し、ADP により刺激され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/protein kinase B、MAPK スーパーファミリー (p44/p42 MAPK、p38 MAPK、SAPK/JNK)、FAK、Ca⁺⁺ 動員等]、HSP27 を Western blot 法で検討した。

患者情報については全疾患共通項目として身長、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、血糖、HbA1c、2 型糖尿病患者項目として糖尿病罹病期間・治療期間、網膜症の有無・病期、尿中アルブミン値、骨粗鬆症患者項目として腰椎・大腿骨骨密度 (YAM%・T-score)、骨代謝マーカー (骨型 ALP、血清 NTx など) を収集することとした。

さらに追跡調査を計画した。即ち 2 型糖尿病あるいは脂質異常症で CT 等により脳梗塞(無症候性を含む)と診断された患者のうち、二次予防治療としての抗血小板療法が新規に開始された場合は、開始後 1 ヶ月後 (4 週)、3 ヶ月後 (12 週)、6 ヶ月後 (24 週) に追跡調査を実施することとした。それ以外については 6 ヶ月後 (12 週) に調査することとした。骨粗鬆症患者については、治療開始後 1 ヶ月後 (4 週)、3 ヶ月後 (12 週) に追跡調査を実施することとした。

(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

平成 22 年 8 月 10 日付で倫理・利益相反委員会の承認を得、同年 9 月より臨床検体の採取を開始した。平成 24 年 3 月末現在、糖尿病検体 90 件、骨粗鬆症検体 70 件について血小板凝集能分析を実施している。

1) 糖尿病患者における血小板機能解析

55 才以上の 2 型糖尿病患者について、63 名の同意を得た。ADP により惹起される血小板凝集能をレーザー光スキャタリング法により解析し、ADP に対する ED₅₀ 値をその指標とした (表 1)。初回検討時に既に 18 名が抗血小板剤を服用していた。14 名 (26 件) については 2 回以上の解析を実施し、抗血小板剤の効果を観察した。これらのケースではシロスタゾールの投与例で改善作用が見られなかったが、アスピリン、クロピドグレル、エチルエイコサペンタイン酸のいずれの投与でも改善が見られた (表 2)。さらに非糖尿病コントロール群について既に岐阜大学において検討済みであった ADP の ED₅₀ 値 (mean ± 2 SEM=1.778 ± 0.244 μM, n=52) より、糖尿病患者を血小板凝集能亢進群 (Group 1: ED₅₀ < 1.534 μM, n=13) および血小板凝集能非亢進群 (Group 2: ED₅₀ ≥ 1.534 μM, n=10) に分類、ADP により惹起される血小板中の HSP27 のリン酸化 (Ser-15、Ser-78、Ser-82)、血小板より遊離・分泌される sCD40L および PDGF-AB について検討した。なお、血小板凝集能に影響を与える可能性のある薬剤 (NSAIDs、スタチン、ACE 阻害剤、AR 遮断剤) を使用している者および悪性腫瘍、B 型肝炎、C 型肝炎、自己免疫性疾患に罹患している者は予め検討対象から除外した。両群において ADP による Ser-78 および Ser-82 における HSP27 のリン酸化が観察されたが、低用量 ADP (1 μM) による Ser-78 のリン酸化、sCD40L 遊離および PDGF-AB 分泌は Group 1 において顕著であった。個々の血小板凝集における ADP の ED₅₀ 値と HSP27 (Ser-78) のリン酸化レベルとは強い相関を示した。

Group 1 における 1 μM ADP による HSP27 (Ser-78) のリン酸化は、MEK1/2 阻害剤である PD98059 および p38 MAPK 阻害剤である SB203580 により抑制された。さらに、Group 1 のうち ADA の勧奨に従いアスピリン投与を希望した症例において、投与 4 週後の血小板凝集能を検討したところ、血小板凝集能の顕著な改善が確認されるとともに、1 μM ADP による HSP27 (Ser-78) のリン酸化は観察されなかった。

2) 骨粗鬆症患者における血小板機能解析 (表 3)

55 歳以上の新規に診断、要治療とされた骨粗鬆症患者について、23 名の同意を得た。投与が開始された薬剤は塩酸ラロキシフェン 8 例、バゼドキシフェン酢酸塩 6 例、テリパラ

チド 6 例、ミノドロン酸 1 例であった。新しい SERM 製剤であるバゼドキシフェン酢酸塩が投与された 5 例において、細胞内情報伝達経路につき解析を行った。投与前に亢進を示した 1 例で開始後正常化が確認された一方、新たに亢進となった事例が 1 例確認された。改善した事例については、バゼドキシフェン酢酸塩の投与前には 1 μ M ADP により p38 MAPK のリン酸化が促進されたが、投与後では本リン酸化は著明に減弱していた。一方、新たに亢進・増悪を認めた事例においては ADP の ED₅₀ 値と Akt および FAK のリン酸化との間に負の相関があった。

表 1

	Total (N=63)	Male (N=34)	Female (N=29)
age	68.0 \pm 7.5	67.3 \pm 7.4	68.8 \pm 7.5
Glu (mg/dl)	155.9 \pm 52.3	161.8 \pm 53.9	148.8 \pm 49.3
HbA1c (NGSP %)	8.88 \pm 1.99	8.95 \pm 2.15	8.80 \pm 1.78
sBP (mmHg)	124.2 \pm 16.1	124.8 \pm 18.7	123.6 \pm 12.4
dBp (mmHg)	71.4 \pm 9.7	71.5 \pm 10.4	71.3 \pm 9.0
Plt (\times 10000)	21.5 \pm 5.8	21.0 \pm 6.0	22.1 \pm 5.5
ADP ED ₅₀ (μ M)	1.732 \pm 0.927	1.833 \pm 1.085	1.614 \pm 0.677
drug なし	36	23	13
drug あり	27	11	16
抗血小板剤	18	8	10
スタチン	13	6	7
ARB or ACEI	14	9	5

表 2

case No.	ADP ED ₅₀ 値 (μ M)				drug
	1	2	3	4	
1	2.181	2.677			
2	0.658	0.729			
3	2.214	2.612	2.470		A
4	0.790	2.885			A
5	0.791	1.750	2.375		A
6	0.745	2.428	4.000		A
7	0.208	2.210	3.060		A
8	0.730	2.200	2.187		A
9	0.658	2.421	3.560		A
10	0.698	0.741	3.300	1.866	A
11	0.907	1.790			E
12	0.672	2.200	1.960		E
13	0.724	1.888	2.024		E
14	0.762	2.806			C
15	0.711	0.737	2.000		Ci→A

A : Aspirin, C : Clopidogrel, Ci : Cilostazol, E : Ethyl icosapentate

表 3

	N	mean ± SD	
age	23	71.3	± 7.7
ALP (IU/L)	23	285.9	± 73.3
BAP (IU/L)	22	20.0	± 8.5
sNTx (nmol/BCE)	13	20.3	± 10.9
uNTx (nm/MMC)	9	55.9	± 22.2
%YAM (L2-L4)	22	64.1	± 8.4
Plt (× 10000)	22	20.81	± 3.73
ADP ED ₅₀ (μM)	23	1.740	± 0.930

D. 考察と結論

これまでの糖尿病患者における解析結果から、ADPにより惹起されるHSP27のリン酸化(Ser-78)は2型糖尿病患者における血小板凝集能の亢進に関連することが示唆された。またこのリン酸化反応はPD98059およびSB203580により抑制されたことから、p44/p42 MAPKあるいはp38 MAPKを介すると考えられた。低分子量HSPは高分子量HSPと同様に分子シャペロンとして機能すると考えられているが、その詳細は未だ明らかではない。ヒト血小板においては、刺激に依存する細胞骨格の機能性の変化に関連すること、HSP27のリン酸化により迅速・強力なアクチン重合化が見られることが知られている。今回の結果は、臨床レベルにおいて初めてHSP27リン酸化の関与を明らかとしたもので、極めて重要な新知見である。既に私どもは、2型糖尿病患者における低用量ADP(1 μM)刺激による血小板凝集能の亢進にはADP受容体のうちP2Y12受容体を介する経路が主に関与することを報告しており、今回明らかとなったHSP27リン酸化においてもP2Y12受容体が関与すると考えられる。2型糖尿病患者において動脈硬化の進展が臨床上大きな問題となることはよく知られている。今回、HSP27のリン酸化(Ser-78)が血小板凝集能および動脈硬化促進因子として知られるsCD40L遊離あるいはPDGF-AB分泌との関連を示したことは、高齢者糖尿病患者における動脈硬化性疾患の進展・発症機序を解明する上でも重要であると考えられる。また、抗血小板剤による治療効果とよく関連したことから、糖尿病患者における臨床上の問題となっているアスピリン抵抗性の解析をはじめ、新しい治療法の開発或いは検査法への応用が期待できる。さらに、各種抗血小板剤の投与効果についての解析およびADP以外の刺激による血小板活性化機序、あるいは糖尿病性腎症と血小板機能の関連につき研究を推し進め、高齢者糖尿病患者のより安全な病態管理に資する予定である。

一方、骨粗鬆症患者における解析結果では、新しいSERM製剤であるバゼドキシフェン酢酸塩の投与により血小板機能亢進が改善する事例を認めるとともに、新たに亢進・像悪を認める1例を確認した。既に私どもはSERM製剤である塩酸ラロキシフェン投与により血小板凝集能の亢進が見られる事例を報告しているが、今回の結果からは個々のSERM製

剤における特殊性を考慮する上で興味深い新知見と考えられる。さらに事例を集積して、解析を継続する予定である。

以上のように、高齢者糖尿病患者および骨粗鬆症患者において血小板凝集能とその機序についての解析を継続し、糖尿病患者における HSP27 (Ser78) のリン酸化と血小板凝集能の亢進との関連性を強く示唆する知見をはじめ重要な示唆を得た。今後、さらに高齢者代謝性疾患におけるより簡便な血小板機能に関する臨床指標の提示に向けての解析を遂行する予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Natsume H, Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T, Kozawa O. Wnt3a regulates tumor necrosis factor- α -stimulated interleukin-6 release in osteoblasts. *Mol.Cell. Endocrinol.* 2011;331:66-72.
- 2) Kato K, Otsuka T, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Natsume H, Kozawa O, Tokuda H. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Mol.Med.Rep.* 2011;4:297-300.
- 3) Kato K, Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Yamauchi J, Natsume H, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T, Kozawa O. Role of heat shock protein 27 in transforming growth factor- β -stimulated vascular endothelial growth factor release in osteoblasts. *Int.J.Mol.Med.* 2011;27:423-428.
- 4) Enomoto Y, Adachi S, Doi T, Natsume H, Kato K, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Tokuda H, Yoshimura S, Otsuka T, Ogura S, Kozawa O, Iwama T. cAMP regulates ADP-induced HSP27 phosphorylation in human platelets. *Int.J.Mol.Med.* 2011;27:695-700.
- 5) Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Natsume H, Otsuka T, Kozawa O. Enhancement of basic fibroblast growth factor-stimulated VEGF synthesis by Wnt3a in osteoblasts. *Int.J.Mol.Med.* 2011;27:859-864.
- 6) Kato K, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Natsume H, Mizutani J, Tokuda H, Kozawa O, Otsuka T. Regulation by heat shock protein 27 of osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Endocrinology.* 2011;152:1872-1882.

- 7) Natsume H, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Yamakawa K, Otsuka T, Kozawa O. Wnt3a up-regulates transforming growth factor- β -stimulated VEGF synthesis in osteoblasts. *Cell.Biochem Funct.* 2011;29:371-377.
- 8) Kato K, Otsuka T, Matsushima-Nishiwaki R, Natsume H, Kozawa O, Tokuda H. Rho-kinase regulates thrombin-stimulated interleukin-6 synthesis via p38 mitogen-activated protein kinase in osteoblasts. *Int.J.Mol.Med.* 2011;28:653-658.
- 9) Kato K, Tokuda H, Mizutani J, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Natsume H, Kozawa O, Otsuka T. Role of HSP27 in tumor necrosis factor- α -stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *Int. J. Mol. Med.* 2011;28:887-893.
- 10) Doi T, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Cuong NT, Kageyama Y, Iida Y, Kondo A, Akamatsu S, Otsuka T, Iida H, Kozawa O and Ogura S. Effect of antithrombin III on glycoprotein Ib/IX/V activation in human platelets: suppression of thromboxane A₂ generation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* in press
- 11) Tokuda H, Kato K, Kasahara S, Matsushima-Nishiwaki R, Mizuno T, Sakakibara S, Kozawa O. Significant correlation between the acceleration of platelet aggregation and phosphorylation of HSP27 at Ser-78 in diabetic patients. *Thrombosis Res.* submitting

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