

高齢者の臓器保護に資する至適な血小板機能制御方法に関する研究（25-4）

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

高齢者の臓器保護に資する至適な血小板機能制御法の策定を目指すことをその目的とし、55歳以上の糖尿病、骨粗鬆症、脳梗塞患者より静脈血を採取し、多血小板血漿を調整し、ADP刺激、ずり応力刺激およびコラーゲン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。細胞画分における機能性蛋白質の解析はウェスタンブロット法にて、血小板刺激時の platelet-derived growth factor-AB 濃度およびリン酸化 HSP27 濃度は ELISA にて検討した。平成25年度は糖尿病患者54例、骨粗鬆症患者6例、脳梗塞患者24例（うち新鮮脳梗塞事例8例）につき解析を実施した。糖尿病患者における検討では、抗血小板薬投与例(26例)と非投与例(37例)の平均27.1か月における観察から、抗血小板薬の eGFR への影響は有意ではなかった。コラーゲン刺激時の ED<sub>50</sub> 値をもとに亢進とされた事例は34例で、このうち10例が脳梗塞を認め抗血小板薬の投与を希望・開始した。頭部 MRI における periventricular lucecy(PVL)所見との関連では、男性においてコラーゲンコントロール刺激時（ずり応力刺激時）の最大遮光率(Trans%)が PVL を有する群で有意に高値を示した。また1 μM ADP 刺激における Trans AUC と ADP ED<sub>50</sub> 値、0.3 μg/ml コラーゲン刺激における Trans AUC とコラーゲン ED<sub>50</sub> 値との間にそれぞれ有意な回帰直線が得られた。一方、コラーゲン刺激により、細胞外のリン酸化 HSP27 レベルが PDGF-AB 遊離および大凝集塊と関連して挙動することを見出した。骨粗鬆症患者における解析では、投与開始例6例に加え、治療継続中の20例の情報収集を開始した。脳梗塞患者の解析では ADP の ED<sub>50</sub> 値が抑制レベルを示す事例で深部皮質下白質病変が軽症である傾向が示唆された。コラーゲン刺激時の細胞内情報伝達機構についての検討により、インテグリンβ1の下流においてシグナルを伝達する Rac1 が p44/p42 MAP キナーゼの活性化および HSP27 のリン酸化を制御し、PDGF-AB の分泌および sCD40ligand の遊離に関与することを明らかとした。これらの新知見は、より簡便な血小板機能測定法、ひいては適切な血小板機能制御法への応用が期待できるものとする。以上のように、高齢者の血小板機能を多角的に捉えるとともに臨床情報を収集・分析しうる体制が構築された。

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

酒井 義人 国立長寿医療研究センター 脊椎外科 (医長)

新畑 豊 国立長寿医療研究センター 脳機能診療部(部長)

小澤 修 岐阜大学大学院医学系研究科 (教授)

## A. 研究目的

アスピリン、チクロピジン、クロピドグレル等の抗血小板薬は、脳梗塞の再発予防あるいは糖尿病患者等のハイリスク群における血管障害の一次予防の目的で広く使用され、その有用性はよく知られている。しかしながら、これまでに行われた疾患別解析は高齢者を対象としたものではなかった。また抗血小板薬の薬理作用自体の検討もまた十分ではなかった。脳梗塞はラクナ梗塞とアテローム性梗塞の2種類に大別され、穿通枝領域のラクナ梗塞と中・大血管が主体となるアテローム性梗塞では病態が異なることが知られている。高齢者では加齢に伴い血管は脆弱となるが、その傾向は細血管においてより顕著となる。細血管病変が主体のラクナ梗塞を発症した高齢者に対し、その再発予防に壮年者と同様に血小板機能を抑制すれば、出血性疾患を惹起する可能性が高まることも否定できない。一方、腎硬化症あるいは糖尿病性腎症有症者における抗血小板療法の評価は未だ十分とは言い難い。このように高齢者に対する血小板機能制御については、客観的な安全性が確保された状態であるとは言い難い。高齢者を対象として、薬剤選択あるいは用法・用量の妥当性を客観的指標に基づき詳細に解析する必要性は極めて高いと考えられる。本研究は、高齢者の臓器保護に資する至適な血小板機能制御法の策定を目指すことをその目的として、臨床的ならびに基礎的検討を行うものである。

## B. 研究方法

### 1)対象

55歳以上の糖尿病、骨粗鬆症、脳梗塞患者を疾患レベル解析の対象とした。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) および一般血漿 (platelet-poor plasma: PPP) を分離調整した。

### 3)血小板凝集能の解析

PRP を ADP(0.3  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M, 3.0 $\mu$ M)、ずり応力(非刺激)あるいはコラーゲン(0.1  $\mu$ g/ml,

0.3 µg/ml, 1.0 µg/ml)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 µm未満 small)、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。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×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、2 型糖尿病患者の追加項目として、糖尿病罹病期間、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、骨粗鬆症患者の追加項目として治療期間・治療内容、腰椎・大腿骨骨密度 (YAM%・T-score)、骨代謝マーカー (骨型 ALP、血清 NTx、等) を、脳梗塞患者追加項目として、治療期間・治療内容、有害イベントの発生状況を収集することとした。

#### 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。上清中の platelet-derived growth factor-AB (PDGF-AB)濃度およびリン酸化 HSP 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) 糖尿病患者における解析

2 型糖尿病患者のうち、レーザースキャタリング法により検出される血小板凝集塊の形成における ADP 刺激に対する ED<sub>50</sub> 値を検討した事例を収集し、血小板機能亢進群 (ADP ED<sub>50</sub><1.534 µM)、正常群 (1.534µM≤ADP ED<sub>50</sub>≤2.022µM)、抑制群 (ADP ED<sub>50</sub>

>2.022  $\mu\text{M}$ )の3群に分類した。これら3群において血中シスタチンC、尿中アルブミン排泄、eGFR値等の経時的な解析を開始した。2013年12月末までに、63例を収集したが、亢進群は19例、正常群は24例、抑制群は20例であった。抗血小板薬の投与状況について、亢進群でエイコサペンタイン酸投与例が、正常群でアスピリン投与例がそれぞれ1例見られたのみであったが、抑制群ではアスピリン投与例が8例、サルボグレラート投与例、シロスタゾール投与例およびチクロピジン投与例が各1例と半数以上が抗血小板薬投与事例であった。亢進群において脳梗塞所見を認め、抗血小板薬が開始された13例を加え、抗血小板薬投与例26例と非投与例37例において、eGFRの変化率を検討した。平均観察期間は $27.1 \pm 8.8$ カ月であったが、投与前を100%として投与例では $100.2 \pm 25.1\%$ 、非投与例では $93.9 \pm 17.3\%$ と有意な変化は見られなかった。

ADP刺激以外の刺激としてシェアーストレス(ずり応力)とコラーゲン刺激について、今年度は54例、うち初回検討事例44例(年齢 $71.6 \pm 6.7$ 歳、空腹時血糖 $166.7 \pm 55.4$  mg/dl、HbA1c  $7.97 \pm 2.17\%$ )の分析を遂行した。健常人のコラーゲン刺激におけるED<sub>50</sub>値は $0.460 \pm 0.082$  mg/mlであることから、collagen ED<sub>50</sub><0.378  $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示した事例を血小板凝集能亢進例としたところ、初回検討事例44例中34例であった。これらのうち、脳梗塞の既往または頭部MRIにて無症候性脳梗塞が確認され、抗血小板薬の投与を希望された事例は10例であった。一方、正常ないし抑制を示した事例は9例であったが、うち3例がアスピリン投与例、1例がクロピドグレル投与例、1例がシロスタゾール投与例であった。なお、ずり応力刺激による凝集は21例に認められた。

MRI所見としてperiventricular lucency (PVL)は虚血性変化の一つとして知られている。そこで、コラーゲン刺激下に血小板機能を解析した抗血小板薬が未投与でMRIを検討し得た37例をPVLの有無による2群とし、血小板凝集につき検討を行った。PVL(+)群で男女とも有意に年齢が高かった(表1)。コラーゲンED<sub>50</sub>値については有意な相違を認めなかった(表1)。血小板凝集塊を含む詳細な解析を行ったところ、コラーゲン刺激時の血小板凝集には両群間に有意差を認めなかったが、男性において非刺激時の最大遮光率(Trans MAX)がPVL(+)群において有意に高値であった(図1)。

これまでに検討したADP刺激事例は90例、コラーゲン刺激事例は106例に及んでいるが、ED<sub>50</sub>値の算定には用量依存性の検討が必要であったため、サンプル量の制約からこれらを同時に解析することが困難であった。そこで、1  $\mu\text{M}$  ADP刺激時のTrans AUCとADP ED<sub>50</sub>値および0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  コラーゲン刺激時のTrans AUCとコラーゲンED<sub>50</sub>値との単回帰分析を行った。ADPについては決定係数 $R^2=0.613$ 、標準化回帰係数 $\beta=-0.783$ 、有意確率 $p<0.001$ をもって以下の回帰直線が得られた。

$$\text{ED}_{50} \text{ of ADP} = -0.916 \times \text{Trans AUC}(1 \mu\text{M})/1000 + 2.959 \mu\text{M} \quad (1)$$

(1)式の成立条件は $\text{AUC} \leq 3230$ であるが、逸脱例は見られなかった。さらに亢進群に分類されるED<sub>50</sub>値<1.534  $\mu\text{M}$ に相当する $\text{AUC} > 1555$ を呈した事例は合計23例であったが、全例がED<sub>50</sub>値より亢進事例と判定されていた。一方で、抑制群に分類されるED<sub>50</sub>

値>2.022  $\mu\text{M}$  に相当する  $\text{AUC}<1022$  を呈した事例は 47 例で、 $\text{ED}_{50}$  値より抑制と判定された事例が 29 例(61.7%)、正常と判定された事例が 17 例(36.2%)、亢進と判定された事例が 1 例(2.1%)にみられた。

コラーゲンについては決定係数  $R^2=0.586$ , 標準化回帰係数 $\beta=-0.766$ , 有意確率  $p<0.001$  をもって以下の回帰直線が得られた。

$$\text{ED}_{50} \text{ of collagen} = -0.845 \times \text{Trans AUC}(0.3 \mu\text{g/ml})/1000 + 1.833 \mu\text{g/ml} \quad (2)$$

(2)式の成立条件は  $\text{AUC}\leq 2169$  であるが、 $\text{AUC}>2169$  を呈した逸脱例は 16 例で、 $\text{ED}_{50}$  値からは全例が亢進事例と判定されていた。さらに亢進群に分類される  $\text{ED}_{50}$  値 $<0.378 \mu\text{g/ml}$  に相当する  $\text{AUC}>1721$  を呈した事例は合計 44 例であったが、全例が  $\text{ED}_{50}$  値より亢進事例と判定されていた。一方で、抑制群に分類される  $\text{ED}_{50}$  値 $>0.542 \mu\text{g/ml}$  に相当する  $\text{AUC}<1527$  を呈した事例は 40 例で、 $\text{ED}_{50}$  値より抑制と判定された事例が 23 例(57.5%)、正常と判定された事例が 3 例(7.5%)、亢進と判定された事例が 14 例(35%)にみられた。

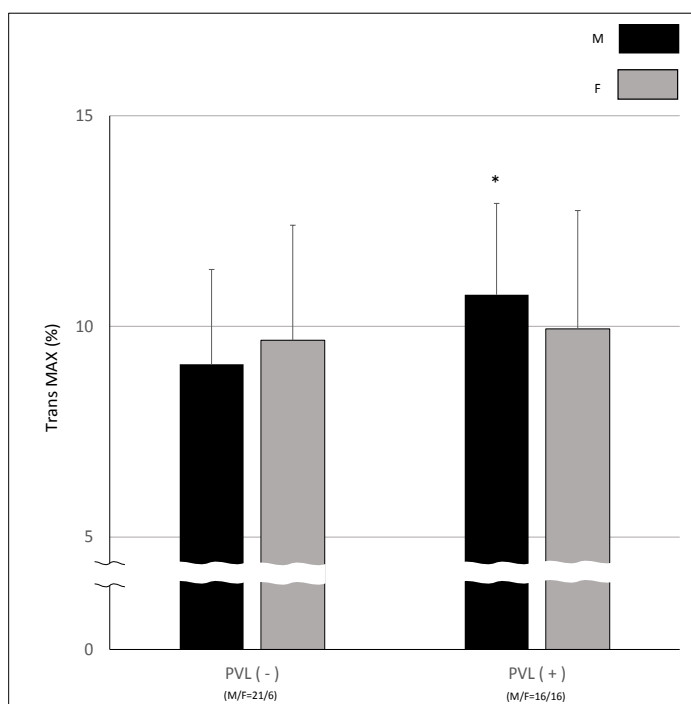
さらに、糖尿病患者 36 例(男性 23 例/女性 13 例)についてコラーゲン刺激後の HSP27 のリン酸化レベルと、刺激後の血漿中のリン酸化 HSP27 レベルおよび PDGF-AB レベルを解析した。コラーゲン  $0.3 \mu\text{g/ml}$  刺激時の HSP27(serine 78)のリン酸化レベルは、細胞内の HSP27 レベルと負の相関を、血漿中のリン酸化 HSP27 レベルおよび PDGF-AB レベルと正の相関を認めた。さらに、刺激後の血漿中のリン酸化レベルは、血小板凝集のうち  $50 \mu\text{m}\sim 75 \mu\text{m}$  を示す大凝集塊の形成と正の相関を認めた。

表 1. PVL(-)群およびPVL(+ )群のパラメーター

	sex	PVL(-)	PVL(+)	P
N	M	21	16	
	F	6	16	
Age (years)	M	65.1 $\pm$ 6.5	72.5 $\pm$ 7.0*	0.003
	F	65.8 $\pm$ 4.6	75.8 $\pm$ 5.7*	0.001
Glu (mg/dl)	M	171.6 $\pm$ 72.6	172.8 $\pm$ 55.0	n.s
	F	145.8 $\pm$ 62.2	149.6 $\pm$ 52.4	n.s
HbA1c (%)	M	9.29 $\pm$ 3.09	8.03 $\pm$ 2.20	n.s
	F	8.6 $\pm$ 1.64	7.613 $\pm$ 1.25	n.s
sBP (mmHg)	M	114.5 $\pm$ 20.4	123.6 $\pm$ 15.1	n.s
	F	116.6 $\pm$ 11.3	119.5 $\pm$ 15.6	n.s
dBP (mmHg)	M	69.9 $\pm$ 13.7	69.3 $\pm$ 10.3	n.s
	F	66.6 $\pm$ 13.6	66.2 $\pm$ 10.6	n.s
T-Chol (mg/dl)	M	207.6 $\pm$ 42.9	192.0 $\pm$ 23.4	n.s
	F	211.8 $\pm$ 14.2	195.3 $\pm$ 30.2	n.s
HDL (mg/dl)	M	48.7 $\pm$ 17.8	49.8 $\pm$ 10.6	n.s
	F	50.0 $\pm$ 4.6	55.3 $\pm$ 14.0	n.s
LDL(F) (mg/dl)	M	125.7 $\pm$ 39.4	118.4 $\pm$ 17.7	n.s
	F	136.4 $\pm$ 18.7	117.9 $\pm$ 20.9	n.s
TG (mg/dl)	M	165.6 $\pm$ 91.1	118.9 $\pm$ 56.0	n.s
	F	127.1 $\pm$ 34.0	110.2 $\pm$ 39.0	n.s
ED50 of Collagen (mg/ml)	M	0.251 $\pm$ 0.238	0.182 $\pm$ 0.137	n.s
	F	0.178 $\pm$ 0.886	0.447 $\pm$ 0.755	n.s

\* $P<0.01$

図 1. コラーゲン非刺激時の Trans MAX %と PVL の関係



## 2) 骨粗鬆症患者における解析

新規に骨粗鬆症と診断された患者より多血小板血漿を採取し、レーザースキャタリング法により検出される微小血小板凝集塊の形成における ADP 刺激に対する ED<sub>50</sub> 値を指標として、血小板機能亢進群、正常群、抑制群の 3 群に分類、これら 3 群において新しい SERM であるバゼドキシフェンを始めとする薬物治療の影響について、頭部 MRI 所見、血中シスタチン C、尿中アルブミン・蛋白質排泄、eGFR 値等を経時的に解析することとした。今年度はバゼドキシフェン 3 例、ラロキシフェン 3 例の計 6 例につき検討を開始した。投与開始時点では亢進群 3 例、抑制群 3 例で、正常群は見られなかった。一方、既に治療中の 20 例について、情報収集を開始した。ADP 以外の刺激としてはシェアーストレス（ずり応力）の検討を開始した。

## 3) 脳梗塞患者における解析

新たに脳梗塞を発症した患者あるいは脳梗塞の再発予防として抗血小板療法を施行中の患者より多血小板血漿を採取し、レーザースキャタリング法により検出される微小血小板凝集塊を解析し、ADP 刺激による ED<sub>50</sub> 値の治療による経時的な推移を追跡することとし、今年度は新規脳梗塞患者 8 例を解析した。興味深いことに新規脳梗塞発症の 3 例はアスピリンまたはシロスタゾールを投与中であつたが、ADP 刺激による ED<sub>50</sub> 値では正常群の水準であつた。また、抗血小板療法を施行中の陳旧性脳梗塞患者を加えた

24 例を血小板凝集能抑制群と非抑制群の 2 群に分け、MRI 上の脳室周囲病変(PVH)および深部皮質下白質病変(DSWMH)の重症度とを解析したところ、DSWMH が抑制群でやや低値の傾向がみられた。

#### 4) 血小板機能の細胞レベルでの解析

ヒト血小板におけるコラーゲン刺激時の細胞内情報伝達機構について、コラーゲンレセプターの一部であるインテグリン $\beta 1$  の下流においてシグナルを伝達する役割を果たしている Rac1 に注目し、血小板の活性化に対する Rac1 の分子的機能について解析を行った。コラーゲン刺激後時間依存的に Rac1 が活性化されること、Rac1 活性化の特異的阻害薬(NSC23766)が濃度依存性にコラーゲン刺激後の血小板凝集を抑制すること、コラーゲン刺激により惹起される p44/p42 MAP キナーゼの活性化および HSP27 のリン酸化が NSC23766 により抑制されることが明らかとなった。さらに、血小板からの PDGF-AB の分泌および sCD40 ligand の遊離は血小板に添加した NSC23766 により抑制されることがあきらかとなった。

#### D. 考察と結論

本研究は高齢者の臓器機能に着目し、至適な血小板機能制御法を開発することを目的としている。糖尿病患者において、これまでに収集してきた ADP 刺激による血小板凝集能の分析結果をもとに、抗血小板薬投与における推算糸球体濾過量を解析したが、有意な悪影響は見られなかったことは、アスピリン投与をはじめとする血小板機能制御が高齢者においても有用である可能性を示唆している。今年度はコラーゲン刺激による血小板凝集を中心にデータを収集したが、亢進事例が 70%以上にのぼった。新たに 10 例が抗血小板薬の投与を開始しており、引き続きデータ追跡が可能である。一方抑制事例は過半数が抗血小板薬の投与例で、治療効果を反映したものと考えられた。なお、非刺激時の自発的な血小板凝集(spontaneous aggregation)は、亢進事例の約半数にみられたが、未だその機序は明らかではない。ずり応力は非刺激時の凝集能亢進であることから、細小動脈における微小血栓の形成に直結する重要な所見と考えられる。頭部 MRI 所見における PVL の解析では、男性においてコラーゲン非刺激時の Trans MAX と PVL との関連性が示唆された。非刺激時の Trans MAX はずり応力刺激下の spontaneous aggregation の指標の一つと考えられるため、適切な制御法の検討が重要である。今後、ずり応力を反映するとされるリストセチン刺激による血小板凝集を加えた詳細な解析が必要と考える。

コラーゲン凝集は ADP 凝集に比べ ED<sub>50</sub> 値の正常範囲が狭く、亢進と判定される事例が多くみられるため、ADP 刺激による血小板凝集能を同時に評価することが望ましい。今回、これまでに収集した血小板解析結果を活用し、ADP およびコラーゲンそれぞれ単一用量で刺激した時の透過光 AUC と ED<sub>50</sub> 値との単回帰分析から、それぞれに有意な回帰式を得ることができた。これにより ADP およびコラーゲンの血小板凝集推算 ED<sub>50</sub>

値の算出が可能となった。いずれの推算 ED<sub>50</sub> 値も亢進例の判定には十分活用できると考えられた。一方、抑制事例の判定にはやや不十分で、特に ED<sub>50</sub> 値の正常範囲が狭いコラーゲン刺激においてその傾向が強かった。同一症例においてこれら 2 種の刺激による凝集反応を比較検討することで、さらに判定精度の改善が可能と考える。

骨粗鬆症患者および脳梗塞患者の治療経過と血小板凝集についても解析を開始した。脳梗塞患者では深部皮質下白質病変(DSWMH)と ADP 凝集との関連が示唆され、前述の Trans MAX との関連において事例の収集が必要と考えられる。さらに、糖尿病事例を含めて eGFR やシスタチンの推移について分析を遂行する。

既に我々は血小板における HSP27 のリン酸化が、PDGF-AB や 5-HT の分泌に関与しており、糖尿病患者における血小板凝集能の亢進に重要な役割を果たしている可能性を報告している。今回、糖尿病患者において、コラーゲン刺激時にリン酸化 HSP27 が細胞外に遊離することが示唆された。細胞外への HSP27 遊離はマクロファージにおいて報告があるが、血小板においては知られていない。また、血小板凝集反応との関連も示唆され、HSP27 がリン酸化されることによって血小板外に遊離されること及びその臨床的意義を示唆した貴重な新知見であると考えられる。さらに、コラーゲン刺激時の細胞内情報伝達機構について、インテグリンβ1 の下流でシグナル伝達に関与する Rac1 による制御が明らかとなった。これらの新しい知見は、より簡便な血小板機能測定法、ひいては適切な血小板機能制御法への応用が期待できると考える。

以上のように、高齢者の血小板機能を多角的に捉えるとともに臨床情報を収集・分析しうる体制が構築された。

## E. 健康危険情報

なし。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kondo A, Tokuda H, Kato K, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T. Rho-kinase negatively regulates thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Biochimie* 2013;95:719-724.
- 2) Kondo A, Otsuka T, Matsushima-Nishiwaki-R, Kuroyanagi G, Mizutani J, Wada I, Kozawa O, Tokuda H. Inhibition of SAPK/JNK lead to enhanced IL-1-induced IL-6 synthesis in osteoblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 2013;535:227-233.
- 3) Kondo A, Otsuka T, Kato K, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Mizutani



- J, Tokuda H, Kozawa O. AMP-activated protein kinase regulates thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Int. J. Mol. Med.* 2013;31:1457-1462.
- 4) Cuong NT, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Kuroyanagi G, Kondo A, Mizutani J, Wada I, Otsuka T, Tokuda H, Kozawa O, Ogura S. Thrombopoietin amplifies ADP-induced HSP27 phosphorylation in human platelets: Importance of pre-treatment. *Int. J. Mol. Med.* 2013;31:1291-1297.
  - 5) Kondo A, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Kuroyanagi G, Mizutani J, Fukuoka M, Wada I, Kozawa O, Otsuka T. Unphosphorylated heat shock protein 27 suppresses fibroblast growth factor-2-stimulated vascular endothelial growth factor release in osteoblasts. *Mol. Med. Rep.* 2013;8:691-695.
  - 6) Kuroyanagi G, Otsuka T, Kondo A, Matsushima-Nishiwaki R, Mizutani J, Kozawa O, Tokuda H. (-)-Epigallocatechin gallate amplifies interleukin-1-stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Biochimie* 2013;95:1933-1938.
  - 7) Kageyama Y, Doi T, Akamatsu S, Kuroyanagi G, Kondo A, Mizutani J, Otsuka T, Tokuda H, Kozawa O, Ogura S. Rac regulates collagen-induced HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAP kinase in human platelets. *Int. J. Mol. Med.* 2013;32:813-818.
  - 8) Kuroyanagi G, Yamada K, Imaizumi T, Mizutani J, Wada I, Kozawa O, Tokuda H, Otsuka T. Leg lymphedema caused by iliopsoas bursitis associated with destruction of a rheumatoid hip joint. *Exp. Ther. Med.* 2013;6:887-890.
  - 9) Iida Y, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T. (-)-Epigallocatechin Gallate selectively inhibits ADP-stimulated human platelet activation: suppression of HSP27 phosphorylation via p38 MAP kinase. *Mol. Med. Rep.* in press
  - 10) Sakai Y, Imagama S, Ito Z, Wakao N, Matsuyama Y. Outcome of back exercise for flexion and extension-provoked low back pain. *Orthopedics and Muscular System.* 2013;1:119-124.
  - 11) Ito Z, Imagama S, Kanemura T, Hachiya Y, Miura Y, Kamiya M, Yukawa Y, Sakai Y, Katayama Y, Wakao N, Matsuyama Y, Ishiguro N. Bone union rate with autologous iliac bone versus local bone graft in posterior lumbar interbody fusion (PLIF): a multicenter study. *Eur Spine J.* 2013;22:1158-63.
  - 12) Tauchi R, Imagama S, Sakai Y, Ito Z, Ando K, Muramoto A, Matsui H, Matsumoto T, Ishiguro N. The correlation between cervical range of motion and misplacement of cervical pedicle screws during cervical posterior spinal fixation surgery using a Ct-based navigation system. *Eur Spine J.* 2013;22:1504-1508.

- 13) Imagama S, Ito Z, Wakao N, Seki T, Hirano K, Muramoto A, Sakai Y, Matsuyama Y, Hamajima N, Ishiguro N, Hasegawa Y. Influence of spinal sagittal alignment, body balance, muscle strength, and physical ability on falling of middle-aged and elderly males. *Eur Spine J.* 2013;22:1346-53.
- 14) 酒井義人. 筋肉と脊柱管狭窄症—ロコモティブシンドロームの関連. *Bone Joint Nerve.* 2013;3:111-117.
- 15) 加藤隆司, 新畑豊, 伊藤健吾. 【FDG-PETのがん診療以外への応用】 脳疾患への応用(認知症)映像情報Medical. 2013;45:393-398.
- 16) Osawa Y, Suetsugu A, Matsushima-Nishiwaki R, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Seishima M, Kozawa O. Liver acid sphingomyelinase inhibits growth of metastatic colon cancer. *J. Clin. Invest.* 2013;123:834- 843.
- 17) Iida M, Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Iida H. Adenosine monophosphate-activated protein kinase regulates platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell migration. *Arch. Biochem. Biophys.* 2013;530:83-92.
- 18) Osawa Y, Hoshi M, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Kozawa O. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in hepatic stellate cells. *PLoS One.* 2013;8:e65251.
- 19) Matsushima-Nishiwaki R, Kumada T, Nagasawa T, Suzuki M, Yasuda E, Okuda S, Maeda A, Kaneoka Y, Toyoda H, Kozawa O. Direct association of heat shock protein 20 (HSPB6) with phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in human hepatocellular carcinoma: regulation of the PI3K activity. *PLoS One.* 2013;8:e78440.
- 20) Nagasawa T, Matsushima-Nishiwaki R, Toyoda H, Matsuura J, Kumada T, Kozawa O. Heat shock protein 20 (HSPB6) regulates apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells: direct association with Bax. *Oncol. Rep.* in press
- 21) Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Iida H. Dexmedetomidine suppresses interleukin-1 $\beta$ -induced interleukin-6 synthesis in rat glial cells. *Int. J. Mol. Med.* in press

## 2. 学会発表

- 1) 徳田治彦, 小澤 修, 西脇理英, 水野孝彦, 榊原誠子. 2型糖尿病(T2DM)患者における血小板凝集能の亢進は低分子量ストレス蛋白質(HSP)27のSer-78における

- リン酸化レベルと相関する。  
第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会。  
平成 25 年 5 月 17 日。熊日生涯学習プラザ。熊本。
- 2) 徳田治彦、原田 敦、細井孝之、新飯田俊平。骨芽細胞におけるインターロイキン-1(IL-1)による IL-6 産生制御機構-AMP-activated protein kinase (AMPK) の役割。第 55 回日本老年医学会学術集会。  
平成 25 年 6 月 6 日。大阪国際会議場。大阪。
- 3) 山本尚洋, 加藤 賢治, 近藤 章, 黒柳 元, 水谷 潤, 徳田治彦, 小澤 修, 大塚隆信。骨芽細胞において SAPK/JNK は interleukin-1 による interleukin-6 産生を抑制的に制御している。  
第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会。  
平成 25 年 10 月 17 日。幕張メッセ。千葉。
- 4) 黒柳 元, 近藤 章, 水谷 潤, 西脇理英, 徳田治彦, 小澤 修, 大塚隆信。骨芽細胞においてカテキンは interleukin-1(IL-1)による IL-6 産生を促進的に制御している。  
第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会。  
平成 25 年 10 月 17 日。幕張メッセ。千葉。
- 5) 酒井義人他。腰部脊柱管狭窄症におけるサルコペニア。第 86 回日本整形外科学会学術集会。2013.5.24. 広島。
- 6) 酒井義人他。高齢者慢性腰痛症における神経障害性疼痛の関与。第 50 回日本リハビリテーション医学会。2013.6.15. 東京。
- 7) 酒井義人他。サルコペニアによる ADL 低下における体幹筋の影響。第 55 回日本老年医学会。2013.6.6. 大阪。
- 8) 酒井義人。Lipo PGE1 製剤の腰部脊柱管狭窄症に伴う腰痛に対する効果。第 21 回日本腰痛学会。2013.11.2. 東京。
- 9) 酒井義人。高齢者慢性腰痛症に対する薬物療法—ランダム化試験によるプレガバリンとオピオイドの比較試験—(シンポジウム)。第 21 回日本腰痛学会。2013.11.2. 東京。
- 10) 酒井義人 原田 敦 伊藤定之。Lipo PGE1 製剤の腰部脊柱管狭窄症に伴う腰痛に対する効果。第 37 回東海プロスタグランディン研究会。2013.5.18. 名古屋。
- 11) 新畑豊、鷺見幸彦、武田章敬ほか。  
"脳血管性認知症における脳アミロイド病変の合併についての検討"  
第 54 回日本神経学会学術集会, 2013.5.30. 東京。
- 12) Doi T, Kozawa O, Ogura S  
Analysis of the anti-inflammatory effects of antithrombinIII on human blood.  
Thirty-sixth Annual Conference on Shock . 2013.6.4. San Diego.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし