

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20002

研究課題名(和文) 糖尿病に対するシロスタゾールによる血栓症・動脈硬化予防効果解析

研究課題名(英文) The effect of cilostazol on thrombosis and atherosclerosis in DM patients

研究代表者

宮居 雅文(Miyai, Masafumi)

岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60613502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シロスタゾール投与前後においてコラーゲン刺激による血小板凝集能、ウェスタンブロット法によるHSP27のリン酸化レベル、血小板から遊離されるplatelet factor 4および、soluble CD 40ligandをELISA法にて解析を行った。血小板凝集能および細胞内情報伝達におけるHSP27のリン酸化は低下傾向が見られた。血小板から放出されるplatelet factor 4、soluble CD 40ligandは抑制傾向がみられた。以上の結果からシロスタゾールはコラーゲン刺激における血小板内におけるHSP27のリン酸化を抑制し生理活性化物質の放出を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we conducted an investigation into the effect of cilostazol on the phosphorylation of heat shock protein 27 (HSP27) and the release of platelet factor 4 and soluble CD 40ligand from collagen-activated platelets in type 2 diabetes mellitus (DM) patients. It was demonstrated that the rate of platelet aggregation was reduced up to 1.0 micro M, and the levels of phosphorylated-HSP27 (Ser-78 and Ser-82) were also attenuated after cilostazol administration. The released platelet factor 4 and soluble CD 40ligand levels from collagen-stimulated platelets were reduced by administration of cilostazol. These results strongly suggest that cilostazol inhibit collagen-induced activation of platelets through attenuation of phosphorylated-HSP27 and release of platelet factor 4 and soluble CD 40ligand in type 2 DM patients.

研究分野：脳神経外科

キーワード：シロスタゾール 糖尿病 血小板活性化 血小板凝集能検査

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は血小板活性化および動脈硬化により脳梗塞、心筋梗塞の危険因子であることは広く知られており、予防には血栓症・動脈硬化に対する治療を同軸に考える必要がある。血栓症に対して、抗血小板剤による脳・心血管系のイベント抑制が期待されるが、最大の問題点として抗血栓作用に相応する重篤な出血性合併症が挙げられている。抗血小板剤による血栓イベント低減効果はそれに応じる致死的事件を含む重篤な出血イベントが増加するため、現段階での抗血小板剤による血栓塞栓症の完全な予防は不可能とされており、血小板凝集能以外の治療ターゲットが模索されている。

PDE(Phosphodiesterase) 阻害薬であるシロスタゾールは他の抗血小板剤と比較し出血性合併症が少ないことが大規模臨床試験にて示されている。また血小板凝集抑制だけでなく血管内皮や血管平滑筋にも作用するため、頭蓋内動脈狭窄や頸動脈狭窄の進展予防、冠動脈ステント留置後の再狭窄の抑制効果などが報告されている。シロスタゾールは血栓症・動脈硬化への効果が期待されている薬剤である。当教室ではシロスタゾールを健康人血小板に対して *in vitro* に投与することによってADP刺激時における血小板由来生理活性物質分泌を抑制することをすでに報告している。血栓形成においては血液成分、血流、血管壁の3徴が複雑に関与している。血液(血小板・凝固線溶)、血流(血圧、流速)についてはある程度評価が可能であったが血管壁の機能については十分な評価が困難であった。近年注目されている血管内皮機能検査としてFMD(flow mediated vasodilation)が挙げられる。上腕動脈を駆血させるとNO・アデノシン・内皮由来過分極因子(EDHF)の増加、交感神経脱分極などにより駆血部より遠位である前腕部に reactive hyperemia が起こる。血流増加は上腕動脈内面の shear stress となり、内皮型NO合成酵素を活性化して上腕動脈血管内皮細胞でのNO産生を増大させ、さらに隣接する平滑筋に作用を及ぼしてグアニル酸シクラーゼ(cGMP)を活性化し、cGMPを介して血管を拡張させる。駆血解除後の血管径を超音波検査にて計測し変化率を計算することで血管内皮機能を測定することができる。喫煙患者に対してシロスタゾールを内服させることで血管内皮機能が改善したとの報告がなされている。

2. 研究の目的

シロスタゾールはこれまでにアラキドン酸やADP刺激に対して強い凝集能抑制効果が報告されているが、コラーゲンに対する凝集能抑制は比較的弱いとされている。血管損傷時に血小板が内皮下組織に露出されるとコラーゲンと血小板が粘着し血小板はコラーゲン上をrollingしながら減速する。この間に活性化が起こり最終的に血小板膜上に存

在するコラーゲン受容体であるGPと結合し生理活性物質を分泌、自身および周囲の血小板を活性化し2次凝集へと至る。この点から、コラーゲン刺激時における血小板凝集は、生体内において最も考えうる活性化機序を反映していると考えられる。今回、生体内でもっとも想定される機序であるコラーゲン刺激での血小板凝集能および凝集能以外の観点として血小板由来生理活性物質分泌抑制効果についてシロスタゾールの内服前後における *ex vivo* での評価を行う。

3. 研究の方法

シロスタゾール内服前後における血管内皮機能および血小板凝集能の検討

血管内皮機能および血小板凝集能検査は内服前、1ヶ月後に実施する。FMDの改善効果と血小板凝集能の変化、相関性についての検討を行う。また、患者基本情報として年齢、性別、基礎疾患(高血圧、高脂血症、糖尿病、冠動脈疾患、閉塞性動脈硬化症等)、使用中の薬剤名、血小板数、高感度CRP、頸動脈エコーによるIMT、画像所見等を収集し臨床情報との関連を解析する。

シロスタゾールの新たな抗血小板作用機序の解明

血小板を分離し、Western Blotting法にて経時的な変化を解析する。上清はELISA法にて血小板由来生理活性物質の変化を解析する。血小板凝集能検査については、糖尿病患者のシロスタゾール内服前および1ヵ月後における採血サンプルを低速にて遠心分離しPRP(plate poor plasma)を調整する。270マイクロIのサンプルに対してコラーゲンを添加しレーザーキャタリング法にて血小板凝集能を測定する。

次に各sampleを遠心分離、上清はELISA用として-80℃で保存する。血小板はこれまで薬理学教室の研究において血小板凝集への関与が認められたHSP(Heat Shock protein)について解析する。血小板凝集能検査にて得られた上清をELISA法にて解析する。血小板活性化マーカーとして可溶性CD40 ligand、PF4(Platelet Factor 4)の測定を行う。

シロスタゾール内服前および1ヵ月後においてFMD測定を行う。駆血により一定時間動脈血流を完全に遮断した後の上腕動脈血管径の変化率を計測して評価する。通常、前腕動脈血流量は駆血解除後5~10秒程度で最大値を示し、前腕血管径はそれに遅れて駆血解除45~60秒後に最大値となる。その径変化は導管血管レベルでの血管内皮機能を反映する。血管径の計測は超音波法で行い、駆血後の最大血管拡張径-安静時血管径を安静時血管径で除してFMDを求める。

4. 研究成果

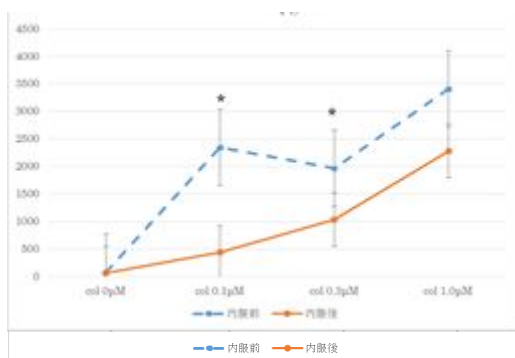
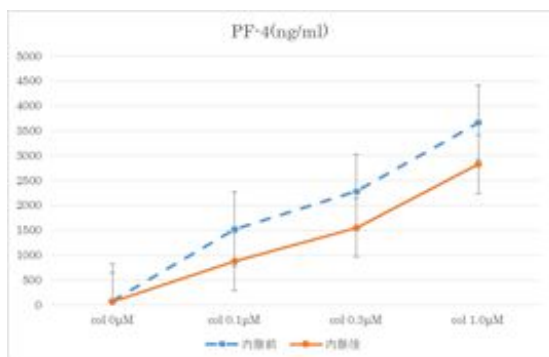
投与後のコラーゲン刺激(0.1、0.3、1.0 mg/ml)による血小板凝集能は投与前と比し低下傾向が見られ、コラーゲン0.3 mg/mlに

において有意に抑制した。細胞内情報伝達においてはシロスタゾール投与後のコラーゲン刺激による血小板は投与前と比しHSP27(Ser-78、82)のリン酸化について有意差は認められないが、低下傾向が見られた。血小板から放出される生理活性化物質についてplatelet factor 4はシロスタゾール投与前と比し抑制傾向がみられ、soluble CD40ligandについてはコラーゲン 0.1 および 0.3 mg/ml 刺激において有意に低下が認められた。

以上の結果からシロスタゾールはコラーゲン刺激における血小板内におけるHSP27のリン酸化を抑制し生理活性化物質の放出を抑制する可能性が示唆された。

動脈硬化の指標につてFMD(flow mediated vasodilation)による解析を予定していたが本機材を導入後からシロスタゾールが導入となる対象患者が数名しかいないため統計手技を用いた解析ができなかった。

以上から得られた成果の一部を基に下記論文を作成した。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

Tsujimoto M, Enomoto Y, Miyai M, Egashira Y, Iwama T: Optimal platelet function test for in-stent tissue protrusion following carotid artery stenting. J Int Med Res 46: 1866-1875, 2018 doi: 10.1177/0300060518762949. 査読あり

Miyai M, Tomita H, Soeda A, Yano H, Iwama T, Hara A: Current trends in mouse models of glioblastoma. J NeuroOncol 135:423-432, 2017. doi: 10.1007/s11060-017-2626-2. 査読あり

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
岐阜大学医学部脳神経外科
<http://www.med.gifu-u.ac.jp/neurosurgery/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮居 雅文 (MIYAI, Masafumi)
岐阜大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：60613502

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()