

平成23年5月18日現在

機関番号：13701  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591825  
 研究課題名（和文） 心血管系における過大侵襲に対するストレス応答の分子基盤の解析  
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of responses to stress in cardiovascular system  
 研究代表者  
 赤松 繁（AKAMATSU SHIGERU）  
 岐阜大学・医学系研究科・非常勤講師  
 研究者番号：20167828

## 研究成果の概要（和文）：

アンチトロンビン III によるトロンビン分解作用は良く知られているが、最近、アンチトロンビンが血小板に直接作用し、その凝集活性を抑制することが報告されたが、その機序の詳細は明らかではない。今回、アンチトロンビン III の血小板機能に及ぼす直接作用およびその作用機序を検討した。本解析により、アンチトロンビン III が ADP 刺激による血小板活性化において直接作用し、その凝集および顆粒分泌反応を抑制することを明らかとした。この結果より抗炎症・抗動脈硬化作用を示す可能性を示した。

## 研究成果の概要（英文）：

Antithrombin III (AT-III), an anticoagulant, has recently been reported to directly affect human platelet functions. However, the exact mechanism of AT-III in platelets remains to be clarified. Our results strongly suggest that AT-III directly acts on platelets and suppresses ADP-induced platelet granule secretion such as platelet-derived growth factor-AB and serotonin due to inhibiting HSP27 phosphorylation via p44/p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase and p38 MAP kinase.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000   | 1,950,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：心血管、血栓、血小板

## 1. 研究開始当初の背景

生体は手術、外傷、ショックなどの侵襲を受けると様々なストレス反応を示すことが知られている。過大な侵害刺激を受けると、容易に全身性炎症反応症候群(systemic

inflammatory re-sponse syndrome;SIRS) が惹起される。そして SIRS から周術期心筋虚血や敗血症、多臓器不全に陥ることが知られている。循環虚脱を招くことのある過大な侵襲に対して、生体は心血管系にお

けるストレス反応を起こすがその詳細は明らかではない。本研究は、この過大な侵害刺激による侵襲に対し、反応する生体の心血管系におけるストレス応答の分子基盤の解析を目的とする。

侵害刺激は生体に心血管反応や神経内分泌反応をひきおこすが、生体防御反応と臓器障害は表裏一体と考えられる。侵襲によって組織破壊が起こると高サイトカイン血症が発現し、組織を修復するための生体防御系が作動する。血中には種々のサイトカインが分泌され、サイトカイン・ストームと呼ばれる状態となる。サイトカインは、好中球を重要臓器に集積し SIRS の状態を惹起する。この状態でショックや低酸素血症を合併すると臓器不全に陥る。近年下垂体後葉ホルモンであるバソプレシン (AVP) は、心肺蘇生時や血管拡張性ショックに対して有効であると報告されている。私共は、これまで心肺停止や敗血症性ショック時の AVP の有用性とその作用メカニズムの検討を行ってきた。そして、AVP やトロンビンなどの血管作動物質と生体防御機構との関連について明らかにしてきた。

血小板は血管が損傷を受けると速やかに粘着・凝集反応を起こし、この結果、血栓が形成され血管損傷部位が塞がれる。この生理的な止血機構において血小板が中心的な役割を担っていることは周知のことである。一方、種々の病態において病的な血栓形成がその発症のトリガーであると考えられており、この病的血栓形成においても血小板が重要な役割を果たしていると推測されている。しかし、その病的血栓形成の機序の詳細は未だ明らかではない。

一方、ストレス蛋白質 (heat shock protein:HSP) は生体において生体防御という極めて重要な役割を担っていることは良く知られている。種々の外的環境の変化に対する生体反応をストレス応答と呼んでおり、環境の変化に対し生体は迅速に反応する。ストレス蛋白質は、熱や化学物質などのストレスにより組織・細胞内に誘導される一群のタンパク質の総称である。ストレス蛋白質が誘導された組織・細胞は、再度のストレス負荷に対して耐性を獲得する。すなわち、ストレス応答に対するストレス蛋白質の誘導は生体が外部環境の変化に適応するための必須のシステムであると考えられる。ストレス蛋白質は、その分子量が 70kDa の HSP70 や 90kDa の HSP90 などの高分子量ストレス蛋白質および分子量が 10kDa-30kDa の HSP27、 $\alpha$ B クリスタリンや HSP20 などの低分子量ストレス蛋白質に大きく分類されている。高分子量ストレス蛋白質はストレス応答に際し、分子シャペロンとして作用することはよく知られ

ている。一方、低分子量ストレス蛋白質も高分子量ストレス蛋白質と同様に分子シャペロンとして作用すると推測されているが、その詳細は未だ明らかとされていない。さらに低分子量ストレス蛋白質は高分子量ストレス蛋白質には認められないリン酸化によって修飾されるという特徴があることが知られているが、その生理的意義は未だ判然としていない。

## 2. 研究の目的

生体の外的環境変化に対するストレス応答の機序、特に分子シャペロンとして生体防御機構の中心的役割を担うと考えられているストレス蛋白質(HSP)に注目し検討をしてきた。この過程で、血管平滑筋細胞において血管作動物質が低分子量 HSP の HSP27 および  $\alpha$ B クリスタリンを特異的に誘導すること、その誘導機構において MAP キナーゼの活性化が促進的な役割を果たしていることを明らかとしてきた。こうした HSP の誘導に関する研究の過程で、従来、分子シャペロンとして細胞内で作用すると考えられてきた HSP が細胞外において作用することを私共は、世界で初めて見出した。血管平滑筋細胞から遊離された  $\alpha$ B クリスタリンおよび HSP20 が血小板の粘着・凝集を抑制することを明らかとした。さらに現在までに  $\alpha$ B クリスタリンおよび HSP20 の活性部位を明らかとした。 $\alpha$ B クリスタリンおよび HSP20 による抑制作用は、血小板凝集促進物質の中で glycoprotein (GP) IIb/IIIa 活性化に繋がる PAR-1 受容体を介したトロンビンおよび vWF による GPIIb/IIIa の活性化に特異的であることを明らかとしている。今回、血小板のストレス応答の観点から血小板における HSP27 の役割を明らかとする目的で検討した。

生体には凝固活性を抑制する機序として血漿中にアンチトロンビン III (AT-III) プロテイン C 等のフィブリン活性化抑制物質が存在する。アンチトロンビン III (AT-III) によるトロンビン分解作用は良く知られているが、最近、アンチトロンビンが血小板に直接作用し、その凝集活性を抑制する事が報告された。この報告からアンチトロンビン III (AT-III) が全く新たな抗血小板作用を有することが推測されるが、その機序の詳細は明らかではない。今回、アンチトロンビン III (AT-III) の血小板機能に及ぼす直接作用およびその作用機序を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) レーザースキャタリング法による血

血小板凝集能解析装置を用い、ADP、コラーゲンおよびリストセチンによる血小板凝集能を検討した。

(2) ADP、コラーゲンおよびリストセチン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、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)、Ca<sup>++</sup>動員等]と HSP27 のリン酸化を Western blot 法で検討した。

(3) ADP、コラーゲンおよびリストセチンにより刺激される血小板顆粒分泌物質である platelet-derived growth factor-AB およびセロトニンを ELISA 法で検討した。

(4) ADP、コラーゲンおよびリストセチンにより刺激され遊離される物質である soluble CD40 ligand を ELISA 法で検討した。

(5) フィブリン活性化抑制物質であるアンチトロンビン III (AT-III) の ADP、コラーゲンおよびリストセチンによる血小板活性化への影響を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 血小板における低分子量 HSP ファミリーの一つである HSP27 及びそのリン酸化の役割を明らかにする目的で検討した。その結果、血小板活性化物質である ADP 刺激による血小板活性化において HSP27 のリン酸化は血小板凝集反応ではなく血小板 $\alpha$ 顆粒からの platelet-derived growth factor-AB 分泌反応及び dense 顆粒からのセロトニン分泌反応と著明に相関することを明らかにした。

(2) フィブリン活性化抑制物質であるアンチトロンビン III (AT-III) の血小板に対する作用機序を血小板活性化物質である ADP 刺激との関連において解析することによって、凝固異常に対する新たな予防、治療法を確立することを目的として検討した。その結果、AT-III はヒト血小板に直接作用し、p44/p42 MAP キナーゼおよび p38 MAP キナーゼを介した HSP27 のリン酸化を抑制し、ADP 刺激による血小板 $\alpha$ 顆粒からの platelet-derived growth factor-AB 分泌及び dense 顆粒からのセロトニン分泌と soluble CD40 ligand の遊離を抑制する

ことを明らかとした。

(3) フィブリン活性化抑制物質であるアンチトロンビン III (AT-III) の血小板に対する作用機序を血小板活性化物質であるコラーゲン刺激との関連において検討した。その結果、AT-III はコラーゲンによる血小板凝集能を抑制し、その作用機序として p44/p42 MAP キナーゼを介した HSP27 のリン酸化を抑制し、コラーゲン刺激による platelet-derived growth factor-AB の血小板 $\alpha$ 顆粒分泌と soluble CD40 ligand の遊離を抑制することを明らかとした。

#### 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 11 件)

1. 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 and Iwama T. cAMP regulates ADP-induced HSP27 phosphorylation in human platelets. *Int. J. Mol. Med.* in press 査読 有
2. Akamatsu S, Kondo Y, Ueda N, Kojima A, Fukuoka N, Takada M, Dohi S, and Hashimoto S. Continuous cardiac output measurement with a Doppler-equipped pulmonary artery catheter. *Anesth Analg* 2011;112:851-857. 査読 有
3. Doi T, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato H, Enomoto Y, Natsume H, Kato K, Mizutani J, Otsuka T, Tokuda H, Akamatsu S, Iwama T, Kozawa O and Ogura S. Antithrombin III reduces collagen-stimulated granule secretion of PDGF-AB and the release of soluble CD40 ligand from human platelets. *Int. J. Mol. Med.* 2010;26:387-392. 査読 有
4. Enomoto Y, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Doi T, Niwa M, Akamatsu S, Tokuda H, Ogura S, Yoshimura S, Iwama T and Kozawa O. Thromboxane A<sub>2</sub> promotes soluble CD40 ligand release from human platelets. *Atherosclerosis* 2010;209:415-421.

- 査読 有
5. Kato H, Adachi S, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Akamatsu S, Enomoto Y, Tokuda H, Otsuka T, Iwama T, Kozawa O and Ogura S. Mechanism of collagen-induced release of 5-HT, PDGF-AB and sCD40L from human platelets: role of HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAPK. *Thromb. Res.* 2010;126:39-43. 査読 有
  6. Doi T, Adachi S, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato H, Enomoto Y, Minamitani C, Otsuka T, Tokuda H, Akamatsu S, Iwama T, Kozawa O and Ogura S. Antithrombin III suppresses ADP-induced platelet granule secretion: inhibition of HSP27 phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 2009;489:62-67. 査読 有
  7. Enomoto Y, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Niwa M, Tokuda H, Akamatsu S, Doi T, Kato H, Yoshimura S, Ogura S, Iwama T and Kozawa O.  $\alpha$ B-crystallin extracellularly suppresses ADP-induced granule secretion from human platelets. *FEBS Lett.* 2009;583:2464-2468. 査読 有
  8. Hanai Y, Adachi S, Yasuda I, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato H, Enomoto Y, Akamatsu S, Sakakibara S, Ogura S, Iwama T, Kozawa O and Tokuda H. Level of collagen-induced p38 MAP kinase activation is a biomarker of platelet hyper-aggregation in patients with diabetes mellitus. *Life Sci.* 2009;85:386-394. 査読 有
  9. 赤松 繁, 橋本慎介: 心臓麻酔 Q & A 経食道心エコー (TEE) 基本原理とアーチファクト. 麻酔科学レクチャー 2009;1: 831-837. 査読 有
  10. Fukuoka N, Iida H, Akamatsu S, Nagase K, Iwata H, Dohi S. The association between the initial end-tidal carbon dioxide difference and the lowest arterial oxygen tension value obtained during one-lung anesthesia with propofol or sevoflurane. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2009;23:775-779. 査読 有
  11. Kato H, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Minamitani C, Otsuka T, Tokuda H, Akamatsu S, Doi T, Ogura S and Kozawa O. HSP27 phosphorylation is correlated with ADP-induced platelet granule secretion. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008;475:80-86. 査読 有
- [学会発表] (計 38 件)
1. 小牧千人, 丹羽 崇, 赤松 繁: 高度の肺高血圧を制御し得なかった肺動脈性肺高血圧症の1剖検例. 第38回日本集中治療医学会, 横浜, 2011年2月26日.
  2. 土井智章, 小澤 修, 加藤久晶, 足立政治, 小倉真治: アンチトロンビンⅢの血小板に対する抗炎症作用の解析. 第38回日本集中治療医学会学術集会, 横浜, 2011年2月26日.
  3. 田邊 淳, 小島明子, 田中亜季, 丹羽 崇, 橋本慎介, 野垣晴彦, 赤松 繁: トロンボモジュリンを投与し救命した電撃性紫斑病を呈した敗血症性ショック症例. 第38回日本集中治療医学会, 横浜, 2011年2月25日.
  4. 丹羽 崇, 林 慶州, 田邊 淳, 小島明子, 田中亜季, 橋本慎介, 小牧千人, 野垣晴彦, 赤松 繁: ヘルメット型 NPPV マスク使用時の加湿についての検討. 第38回日本集中治療医学会, 横浜, 2011年2月25日.
  5. 野垣晴彦, 小島明子, 田中亜季, 橋本慎介, 赤松 繁: ミカファンギン投与後に発症した重篤な急性溶血反応. 第38回日本集中治療医学会, 横浜, 2011年2月24日.
  6. 小島明子, 田中亜季, 橋本慎介, 松波紀行, 塚原郁夫, 赤松 繁: 術前に肺血栓塞栓症をきたした巨大卵巣腫瘍患者の周術期管理. 第30回日本臨床麻酔学会, 徳島市, 2010年11月4日.
  7. 赤松 繁: 非心臓手術における TEE, TEE ワークショップ. 日本心臓血管麻酔学会第15回学術集会. 東京, 2010年10月10日.
  8. 橋本慎介, 小島明子, 赤松 繁: 大動脈弁狭窄症, 心室中隔欠損症患者の麻酔導入後の TEE で診断された感染性心内膜炎. 日本心臓血管麻酔学会第15回学術

- 集会. 東京, 2010年10月10日.
9. 橋本慎介, 赤松 繁, 小島明子, 田中亜季, 松波紀行, 塚原郁夫: 大動脈弁置換術中に著しいアルカローシスを呈した慢性透析患者の一例. 日本麻酔科学会東海北陸支部第8回学術集会, 福井, 2010年9月4日.
  10. 田中亜季, 赤松 繁, 小島明子, 橋本慎介, 松波紀行, 塚原郁夫: 術中不整脈から術後難治性心室細動に陥った外傷患者. 日本麻酔科学会東海北陸支部第8回学術集会, 福井, 2010年9月4日.
  11. 小島明子, 田中亜季, 橋本慎介, 松波紀行, 塚原郁夫, 赤松 繁: 抗凝固療法の中絶により発症した上腸間膜動脈血栓症の管理. 日本麻酔科学会東海北陸支部第8回学術集会, 福井, 2010年9月4日.
  12. 田邊 淳, 小島明子, 田中亜季, 丹羽崇, 森下健太郎, 野垣晴彦, 荒木恒敏, 赤松 繁: 急性腎盂腎炎から敗血症性ショック, DIC, 指趾切断に至り救命し得た1例. 第17回日本集中治療医学会東海北陸地方会, 2010年6月26日.
  13. Tomoaki Doi, Seiji Adachi, Hisaaki Kato, Osamu Kozawa, Shinji Ogura: Analysis of new molecular mechanisms and the anti-inflammatory effects of antithrombin III in human platelets. Thirty-Third Annual Conference on Shock. Portland, Oregon, U.S.A. June 13, 2010.
  14. 丹羽 崇, 橋本慎介, 小牧千人, 赤松 繁: 悪性症候群が原因であると考えられた来院時心配停止例. 第37回日本集中治療医学会, 広島, 2010年3月6日.
  15. 田中亜季, 小島明子, 橋本慎介, 野垣晴彦, 赤松 繁: 内頸動脈内膜剥離術後に急性肺水腫をきたした一例. 第37回日本集中治療医学会, 広島, 2010年3月6日.
  16. 小牧千人, 丹羽 崇, 赤松 繁: 急激な経過をたどり救命し得なかった肺癌合併肺線維症の肺癌手術後急性増悪の一例. 第37回日本集中治療医学会, 広島, 2010年3月4日.
  17. 橋本慎介, 赤松 繁, 田中亜季, 小島明子, 松波紀行, 塚原郁夫: 外傷性肝細胞癌破裂の一例. 第29回日本臨床麻酔学会, 浜松, 2009年10月30日.
  18. 赤松 繁: 心エコー図法の進歩と麻酔科医としての経胸壁心エコーの使い方. 第29回日本臨床麻酔学会, 浜松, 2009年10月29日.
  19. Yamamoto T, Akamatsu S: A case of suspected heparin-induced thrombocytopenia (HIT) after cardiac surgery. The 8th meeting of Asian Society of Cardiothoracic Anesthesia. 第14回日本心臓血管麻酔学会, 東京, 2009年9月11日.
  20. Akamatsu S, Kojima A, Hashimoto S, Tanaka A, Yamamoto T, Fukuoka N, Iida M, Dohi S: Perioperative management of exploratory laparotomy for retroperitoneal hemorrhage following placement of an IVC filter. The 8th meeting of Asian Society of Cardiothoracic Anesthesia. 第14回日本心臓血管麻酔学会, 東京, 2009年9月10日.
  21. 松浦郁恵, 佐藤裕子, 赤松 繁: 経口気管挿管患者におけるバイトブロックによる口唇・口角潰瘍形成について. 第17回日本集中治療医学会東海北陸地方会, 金沢, 2009年6月27日.
  22. 土井智章, 小澤 修, 加藤久晶, 足立政治, 小倉真治: 血小板におけるアンチトロンビンⅢの新たな分子作用機序の解析: 抗炎症作用. 第24回日本 shock 学会総会, 金沢, 2009年5月30日.
  23. 橋本慎介, 赤松 繁: 非臓器提供施設の当院でドナーカードの提出を受けて. 第36回日本集中治療医学会, 大阪, 2009年2月28日.
  24. 河田 陵, 小林建司, 赤松 繁, 佐藤知洋, 東 雅朗, 湯澤浩之, 上田修久, 花立史香, 清水幸雄, 松波英寿: 胃癌術後に褥瘡感染から壊死性筋膜炎, 敗血症性ARDSを発症, PMX-DHPを施行し救命できた1例. 第70回日本臨床外科学会, 東京, 2008年11月29日.
  25. 山本拓巳, 赤松 繁: 左室自由壁破裂に合併したNOMIの1症例. 第13回日本心臓血管麻酔学会, 宜野湾, 2008年11月1日.
  26. 赤松 繁: 「周術期循環管理に求められる麻酔科医の役割 多様なモニタリングデバイスの理解と活用」「周術期循環管理におけるモニタリング ～経食道心エコー法と低侵襲モニタリングデバイスの活

- 用～」第6回日本麻酔科学会東海北陸地方会，岐阜，2008年9月13日。
27. 赤松 繁：科学し連携する集中治療。第16回日本集中治療医学会東海北陸地方会，岐阜，2008年7月5日。
28. 森下健太郎，小島好修，森田則彦，丹羽 崇，赤松 繁：産褥性心筋症の一例。第16回日本集中治療医学会東海北陸地方会，岐阜，2008年7月5日。
29. 田中亜季，赤松 繁，野垣晴彦，小島明子，橋本慎介，松波紀行，塚原郁夫：CABG術後の難治性不整脈に対し，アミオダロン長期投与を要した一例。第16回日本集中治療医学会東海北陸地方会，岐阜，2008年7月5日。
30. 丹羽 崇，森下健太郎，野垣晴彦，赤松 繁：グリホサートの大量服用後に急性肝不全を来した一例。第16回日本集中治療医学会東海北陸地方会，岐阜，2008年7月5日。
31. 小島明子，赤松 繁，田中亜季，橋本慎介，八十川雄図，澤田元史，川口雅裕，岩井知彦，山川弘保：当院における急性期脳梗塞に対するrt-PA静注療法の現状。第16回日本集中治療医学会東海北陸地方会，岐阜，2008年7月5日。
32. 中村さつき，丹羽 崇，松波邦洋，多賀 収，野垣晴彦，赤松 繁：速やかなNPPV療法導入により救命し得たニューモシスチス肺炎～ARDSの一例。第16回日本集中治療医学会東海北陸地方会，岐阜，2008年7月5日。
33. 酒井孝則，大野智子，佐藤裕子，赤松 繁：観血的動脈圧測定ラインによる皮膚損傷予防に向けて，適切な固定方法の検討。第16回日本集中治療医学会東海北陸地方会，岐阜，2008年7月5日。
34. 桑原小百合，小林健司，赤松 繁：ICU入室患者における手術部主体のSSIサーベイランスの検討。第16回日本集中治療医学会東海北陸地方会，岐阜，2008年7月5日。
35. 棚町祐子，大野智子，佐藤裕子，赤松 繁：ICUにおける面会に関する家族の心情を踏まえた面会時間のあり方について。第16回日本集中治療医学会東海北陸地方会，岐阜，2008年7月5日。
36. 長柄敦子，佐藤裕子，赤松 繁：集中治療室における家族看護の充実を目指して～「CNS-FACE 家族アセスメントツ

ール」を使用した現状分析より～。第16回日本集中治療医学会東海北陸地方会，岐阜，2008年7月5日。

37. 山本拓巳，鈴木 照，高田基志，赤松 繁：人工呼吸管理の実際～VALIをふまえた肺保護戦略。第16回日本集中治療医学会東海北陸地方会，岐阜，2008年7月5日。

38. 小澤 修：血栓形成機序と抗血小板薬の作用機序。第16回日本集中治療医学会東海北陸地方会，岐阜，2008年7月5日。

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

赤松 繁 (AKAMATSU SHIGERU)  
岐阜大学・医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：20167828

### (2) 研究分担者

小澤 修 (KOZAWA OSAMU)  
岐阜大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：90225417

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：