

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590560

研究課題名（和文）末梢血全血解析法による血小板・白血球機能由来の動脈硬化指標の確立

研究課題名（英文）Establishment of arteriosclerosis index related with leukocyte and platelet function measured by whole blood analysis method

研究代表者

武田 裕司（TAKEDA YUJI）

山形大学・医学部・助教

研究者番号：90302299

研究成果の概要（和文）：

動脈硬化症に伴う心筋梗塞や脳梗塞は、わが国の様な高度高齢化社会で更に増加する事が確実視されている。近年、動脈硬化は、動脈壁に生じる慢性炎症であることが明らかとなってきたが、炎症に関わる白血球・血小板に着目した動脈硬化の指標は全くない。そこで、動脈硬化の危険因子となる糖尿病・高脂血症モデル動物および血液乱流形成時において、白血球と血小板の機能を血液中で直接測定し、動脈硬化の新たな指標となるか検討した。その結果、動脈硬化進展現象と関連していた機能は、単球・顆粒球の食食能低下と血小板-単球複合体形成の選択的上昇であった。これらの機能変化は、新たな早期介入治療機会の指標として使用できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Increase in myocardial and cerebral infarction caused by arteriosclerosis is an important issue in Japan, since the Japanese population is aging faster than any other in the world. Recently, pathology of arteriosclerosis is known as chronic inflammation of an arterial wall. However, there is no arteriosclerosis index using the function of leukocyte and platelet, which induce the progression of arteriosclerosis via inflammatory responses. In this study, the cell functions were measured in the model of diabetes, hyperlipidemia and turbulent blood flow, which are risk factors for arteriosclerosis, to examine whether the cell functions can be used for a new index of arteriosclerosis. The phagocytic activity of monocyte and granulocyte were down-regulated in the diabetes and hyperlipidemia. Furthermore, a platelet-monocyte complex formation was selectively increased by turbulent blood flow. Therefore, these functional changes will be useful for an index to prevent the progression of arteriosclerosis by an early intervention.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

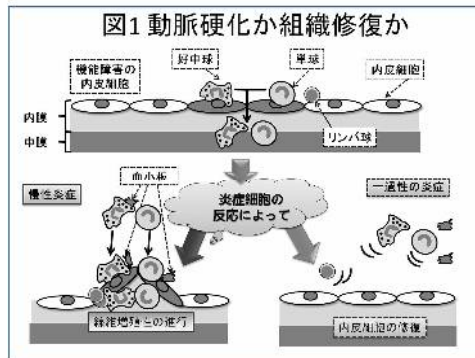
科研費の分科・細目：社会医学

キーワード： 予防医学・動脈硬化症・糖尿病合併症・

1. 研究開始当初の背景

日本において、動脈硬化症に伴う心筋梗塞や脳梗塞などは、死因統計上 30%となり、がんに並ぶ死因がある。日本では高齢化が進んでいることから、将来、増加することは確実である。このことから、動脈硬化症の予防・治療対策は、日本の医療にとって、必須の課題である。

糖尿病・高脂血症・高血圧は、動脈硬化症発症のリスクを高くすることが既に知られている。一方、動脈硬化巣形成には、①好中球が動脈血管壁に慢性炎症を誘導して粥腫の成長を誘導、②単球が泡沫細胞マクロファージとして脂質を取り込んでプラーク形成を誘導、③血小板の血栓形成能が促進、という血液細胞の反応が必要である。(図 1 参照)。



動脈硬化症を回避する方法として、予防医学的アプローチによる発生抑制と進展阻止が重要である。現在、日本では、動脈硬化発生抑制の方法として、平成 27 年度末までに、中年男性で約 2000 万人といわれているメタボリックシンドローム予備軍を 25%削減する目標を立てている。厚生労働省では、これにより医療費 2 兆円を削減できると試算している(「医療制度改革大綱」平成 17 年 12 月 1 日 政府・与党医療改革協議会)。しかし、発生抑制を目標とした、血糖値・血圧・血栓形成のコントロール治療に失敗すれば、**silent killer** の名の通り、それら予備軍は心筋梗塞・脳梗塞発症を待つばかりのことが多い。そこで、発生抑制以降の進展阻止を目的とした早期介入治療を行う指標があれば、早期介入治療が可能となり、より多くの救命と医療費削減を確実化することができる。

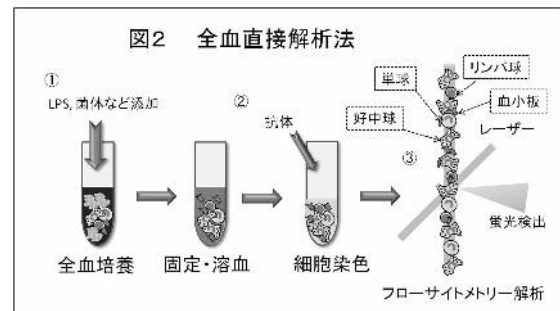
現在、末梢血の血小板・白血球を用いた動脈硬化進行度を推測する指標は全くない。このような指標が得られれば、炎症状態を適正な状態に保つことを目的とした治療も可能となり、動脈硬化症進展阻止を目的とした新たな早期介入治療の機会を得ることができる。このことから、末梢血の血小板・白血球による動脈硬化指標は、医療経済的・予防医学的意義が極めて高い。

2. 研究の目的

- (1) 炎症性細胞・細胞内シグナル・表面抗原・血小板を全血法にて調べ、2 型糖尿病ラット、高脂血症マウス及びヒト末梢血において、動脈硬化症の指標候補を同定する。
- (2) 上記の動脈硬化指標候補の内、食餌により変動するものを同定する。
- (3) 各モデルでの変動を明らかにし、動脈硬化指標の選別を行う。

3. 研究の方法

- (1) 細胞表面抗原・貪食能などの測定
 - ① 末梢血にリポポリサッカライド(LPS)や菌体を添加・培養する。
 - ② 全血のまま固定-溶血操作を行う。
 - ③ 特異抗体を用いて染色を行う。
 - ④ Flow cytometryにて各細胞分画の蛍光を測定する。(図 2 参照)



- (2) 食餌処置による変動因子の確認
ラットを低カロリー食餌下にて飼育し、指標候補の変動を確認する。
- (3) 動脈硬化巣の解析
心臓と大動脈起始部を摘出し、Oil red O 染色を行い、粥状動脈硬化巣を染色し、画像解析により面積を求め、動脈硬化巣の比率を算出する。
- (4) 血小板-白血球複合体の測定
白血球上に存在する血小板由来抗原を測定し、複合体形成率を測定する。

4. 研究成果

- (1) 2 型糖尿病ラットにおける変化

① 単球貪食能変化

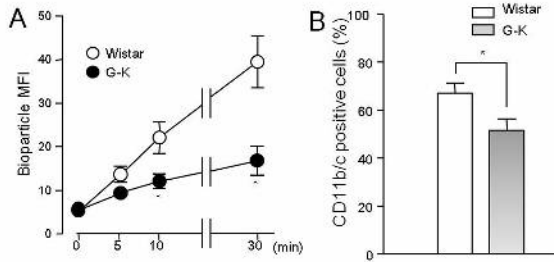
糖尿病は、動脈硬化の原因となる疾患である。そこで、2 型糖尿病ラット (G-K) の末梢血を用い、動脈硬化の指標候補の検討を行った。最初に、末梢血中の好中球・単球を LPS で刺激し、細胞内シグナルの ERK および NF- κ B のリン酸化レベルを測定した。その結果、G-K と対照群ラットの Wistar との間で ERK, NF- κ B のリン酸化に有意差を認めなかった。すなわち、炎症応答に対するシグナル伝達系に、異常は認められなかった。

次に、G-K 由来の単球の機能について調べ

た。その結果はG-K由来の単球は、Wistarに比べて貪食能(Bioparticle MFI)が有意に低下していた(図3A)。さらに、細胞膜表面抗原の変化を調べた結果、貪食レセプターの1つである貪食に関与するCD11b/cの発現(CD11b/c positive cells(%))が、Wistarに比べてG-Kで有意に低下していた(図3B)。

食事制限を施行し、G-Kの血糖値を長期間Wistarと同レベルに維持したが、単球の貪食能およびCD11b/c発現の低下は改善しなかった。

図3

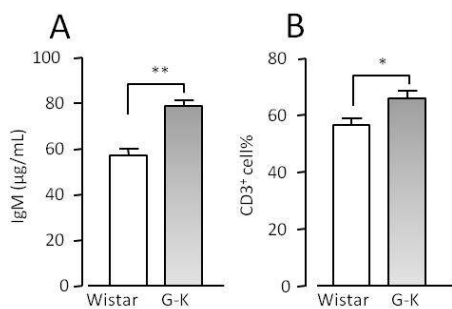


G-K群の単球機能低下は食事制限による血糖コントロールにより回復しなかったことから、高血糖や高インスリン状態が原因であるとは考えにくく、遺伝的要因との関連が疑われた。

②G-Kラットにおける自然IgMの増加とTh2応答の亢進

G-Kにおけるその他の免疫系の異常を検討したところ、G-Kでは4週齢から既に自然IgM(natural IgM, nIgM)が高く(図4A)、T細胞(CD3⁺cell%)比率が高かった(図4B)。

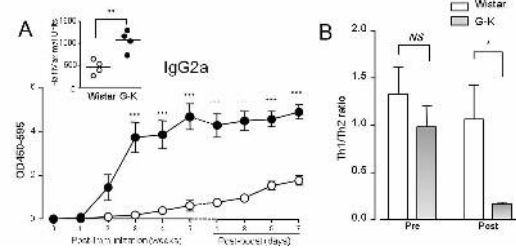
図4



そこで、オブアルブミン(OVA)を免疫し、OVAに対する抗体産生の違いを検討した。その結果、OVAに対する特異的IgG2aがG-Kで著しく上昇した(図5A)。

ラットの場合、ヘルパーT細胞のTh2によりIgG2aクラススイッチが誘導されやすいことが知られている。そこで、OVA投与後のTh1/2比を検討したところ、G-KではWistarと比較し、Th2優位の状態になっていた(図5B)。

図5



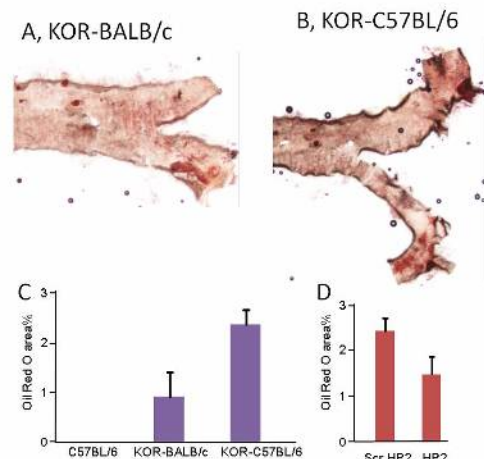
これらのことから、2型糖尿病モデルラットの白血球においては、炎症性刺激のシグナル伝達系に異常は認められないが、i)白血球貪食能の低下、ii)貪食レセプターの低下、iii)T細胞比率増加、iv)Th2優位 v)nIgM上昇の5つの候補が確認できた。

(2)高脂血症マウスでの検討

高脂血症も、糖尿病と同じく、動脈硬化発症リスクを上昇させる。そこで、高脂血症自然発症マウスKOR(ApoE自然欠損マウス)を、遺伝的背景の異なるBALB/cとC57BL/6の2系統とそれぞれ交配し、動脈硬化巣形成に差があるか、Oil red O染色にて検討した(代表例を図6A, Bに示す)。

その結果、KOR-C57BL/6において、動脈硬化巣が有意に形成されていることが確認できた(図6C)。

図6

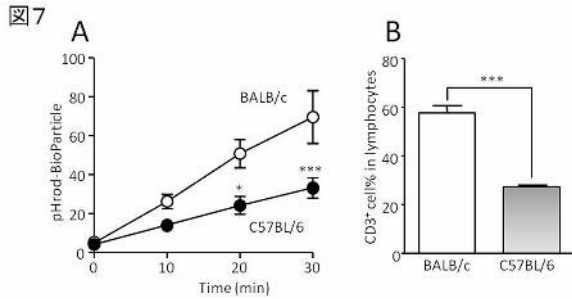


KOR-C57BL/6の動脈硬化巣形成は、炎症性サイトカイン産生を抑制する補体由来の合成ペプチド『HP2』を投与すると、対象となるスクランブルペプチド(Scr.HP2)投与と比較し、有意に動脈硬化が抑制された(現在投稿中)。このことから、KOR-C57BL/6の動脈硬化形成には、炎症応答が動脈硬化巣形成に関わっていることが確認できた(図6D)。

そこで、動脈硬化感受性のC57BL/6と動脈硬化抵抗性のBALB/cにおいて、ラットで得られた知見をもとに、白血球の貪食能とT細胞比率について検討した。

その結果、動脈硬化感受性のC57BL/6にお

いて顆粒球における貪食能が有意に低下していた。一方、G-K とは異なり、C57BL/6 においては、T 細胞比率が有意に低下していた。C57BL/6 は、以前より Th2 ではなく、Th1 優位になるマウスとして知られていることから、T 細胞の変化は、糖尿病ラットモデルの G-K とは異なることが明らかとなった。



(3) 血小板-白血球複合体

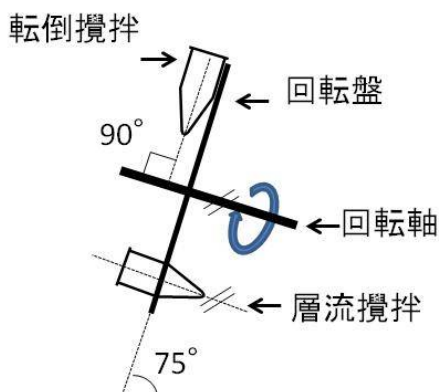
動脈硬化巣は、血液の乱流発生部位に好発することが知られている。乱流による物理刺激は血小板を活性化することが知られている。血小板-白血球複合体形成率は、非常に有望である。

当初、動物モデルにおいて血小板-白血球複合体形成を検討したが、血液凝固が生じ易く、血小板を扱う上で適当な血液量の確保が難しかった。そこで、まず、ヒト末梢血における血小板-白血球複合体形成モデルの構築を試みた。

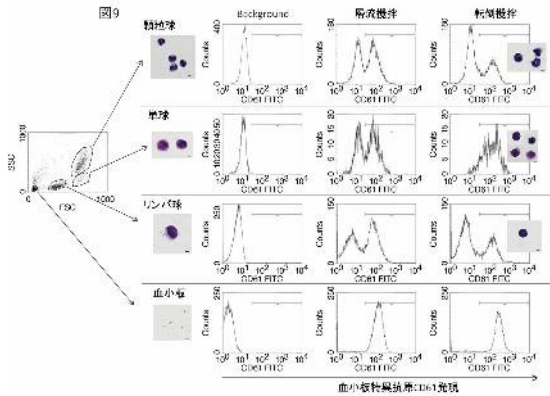
その結果、末梢血を LPS で刺激しても、血小板-白血球複合体は形成されず、炎症性刺激による複合体形成は、末梢血中では生じにくいと考えられた。

そこで、ヒト末梢血をマイクロチューブに入れ、1 分間に 5 回の転倒攪拌し、乱流を発生させたときの血小板-白血球複合体形成率の変動を観察した(図 8)。

図8

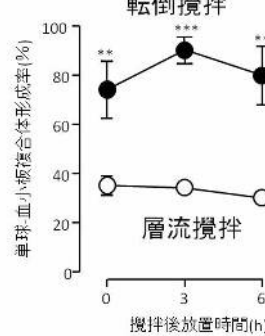


その結果、この乱流形成モデルにおいて、単球特異的に血小板が結合することが認められた(図 9)。



更に、この複合体形成は、安定であり不可逆的反応であった(図 10) (現在投稿準備中)。今後、この単球に着目した血小板-単球複合体形成率が、動脈硬化指標に有望であると考えられた。

図10



(4) 結語

糖尿病モデルでは、単球の貪食能低下が認められ、動脈硬化感受性マウスでは、顆粒球の貪食能が低下していた。一方、T 細胞の挙動には、共通性が見いだせなかった。

意外なことに、貪食能低下は、食餌により制御不可能であったことから、遺伝的要因の可能性が考えられた。これらのことから、単球・顆粒球の貪食能低下が動脈硬化指標(遺伝的要因とすれば危険因子)として使用できると考えられた。

また、乱流発生により単球特異的に血小板が結合することから、単球-血小板複合体形成も、動脈硬化進展に関与していると考えられた。

以上より、単球・顆粒球の貪食能低下と血小板-単球複合体形成上昇は、新たな早期介入治療機会の指標として使用できると考えられる。

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)

- (1) Takeda Y, Wakabayashi I., 査読有,
Alteration in lymphocyte population
and humoral immune response in type 2
diabetic Goto-Kakizaki rats. Life Sci
2012; 90:545-52.
DOI:S0024-3205(12)00077-X [pii]
- (2) Takeda Y, Marumo M, Wakabayashi I.,
査読有, Attenuated phagocytic
activity of monocytes in type 2
diabetic Goto-Kakizaki rats.
Immunobiology 2011; 216:1094-102.
DOI:S0171-2985(11)00095-7 [pii]

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 武田裕司, 浅尾裕信, 丸茂幹雄, 若林
一郎. 2 型糖尿病自然発症ラットにおけ
る単球貪食能と液性免疫反応の変化.
第 66 回日本細菌学会 東北支部, 2012
年 8 月 23 日 仙台 東北大学片平さくら
ホール
- (2) 武田裕司, 丸茂幹雄, 若林一郎. 2 型
糖尿病自然発症ラットにおける末梢血
中の好中球・単球機能のフローサイトメ
トリー解析. 第 21 回日本サイトメトリ
ー学会学術集会 2011 年 6 月 25 日 京都
京都市国際交流会館
- (3) 武田裕司, 丸茂幹雄, 若林一郎. 2 型
糖尿病自然発症ラットにおける単球機
能の変化. 第 80 回日本衛生学学会
2010 年 5 月 9 日 仙台 仙台国際センタ
ー

[図書] (計 1 件)

- (1) 武田裕司, 丸茂幹雄, 若林一郎. 医学
図書出版株式会社, 2012 年, エンドトキシ
ン・自然免疫研究 15 巻, 49-52 項

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 裕司 (TAKEDA YUJI)
山形大学・医学部・助教
研究者番号: 90302299

(2) 研究分担者

丸茂 幹雄 (MARUMO MIKIO)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号: 40333950

若林 一郎 (WAKABAYASHI ICHIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70220829