

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10771

研究課題名(和文)冠動脈バイパス手術における血小板凝集能に及ぼすインスリンの影響

研究課題名(英文)Effect of insulin on platelet aggregation in coronary artery bypass grafting

研究代表者

山本 隆一 (Yamamoto, Ryuichi)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：10094111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：5-HT受容体は血小板膜に発現し、それ自体や他の血小板から放出される5-HTによって活性化され、急速な血小板凝集を引き起こすことが知られている。5-HTによって誘発される血小板凝集に対するインスリンの阻害効果は、ウサギ血小板で確認された。しかし、ヒト血小板では、5-HTによって誘発される血小板凝集に対するインスリンの阻害効果は確認されなかった。したがって、糖尿病患者の血管で観察される5-HTに対する血管収縮反応の増強は血管収縮筋細胞に限定され、血小板への5-HT単独刺激の寄与は小さいと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はこれまで、糖尿病におけるグラフト血管れん縮の増大には、インスリンによる細胞膜からの5-HT<sub>2A</sub>受容体インターナリゼーション作用の減弱が関連することを明らかにしてきた。しかし、この反応が血小板でも同様に起こるかは分かっていない。現在、周術期の血管れん縮抑制にはCa拮抗薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬等が使用され、治療成績は改善されつつあるが、より有効で安全な予防法の確立が必要とされている。食生活の変化や高齢化社会の進展などにより、糖尿病患者に対する冠動脈バイパス手術施行回数が年々増加する中で、本研究の社会的意義は大きいと思われる。

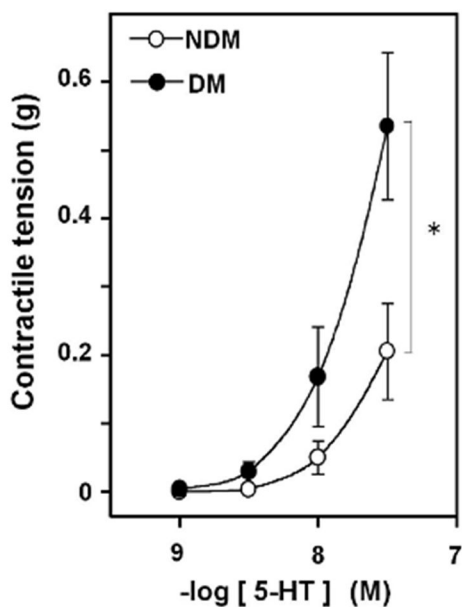
研究成果の概要(英文)：It is likely that the increased contractile response to serotonin (5-HT) found in the blood vessels of diabetic patients may be due to the relative increase in the number of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the vascular smooth muscle cell membrane by the deficiency of insulin. The inhibitory effect of insulin on platelet aggregation induced by 5-HT was confirmed in rabbit platelets. However, in human platelets, the inhibitory effect of insulin on platelet aggregation induced by 5-HT was not confirmed. Platelet aggregation by 5-HT stimulation was observed after collagen stimulation, and its action was confirmed to be much smaller than that of ADP, which is another platelet-derived substance. Therefore, it is likely that the enhanced vasoconstrictor responsiveness to 5-HT observed in the blood vessels of diabetic patients is limited to vasoconstrictor muscle cells, and the contribution of 5-HT alone stimulation to platelets is small.

研究分野：薬理学

キーワード：冠動脈バイパス手術 糖尿病 血小板 インスリン 伏在静脈 スパズム セロトニン(5-HT)

### 1. 研究開始当初の背景

重症の冠動脈疾患には冠動脈バイパス手術が適用されるが、糖尿病患者においては、移植される血管のれん縮や閉塞が生じやすく、手術の成功率が低いことが知られている。そこで我々は、糖尿病患者の血管平滑筋の病態に着目して、セロトニン(5-HT)に対する血管収縮反応を摘出ヒト伏在静脈(冠動脈バイパスグラフトとして用いられる血管)を用いて薬理的に検討してきた。その結果、糖尿病患者の伏在静脈では、非糖尿病患者と比較して5-HTに対する血管収縮反応性が有意に高いこと、そして糖尿病血管ではミオシン軽鎖脱リン酸化酵素(収縮した血管を弛緩させる酵素)の障害が引き起こされていることを報告した<sup>1)</sup>。我々はさらに、インスリンが血管平滑筋の細胞膜上に存在する5-HT<sub>2A</sub>受容体を細胞質内に引き込む(インターナリゼーション)作用を示すことをヒト摘出血管において明らかにし<sup>2)</sup>、インスリン作用不全がみられる糖尿病患者では、5-HTに対する反応性が亢進し、その結果としてグラフト血管の攣縮が生じやすい状態にある事を、世界で初めて科学的に証明した。



ヒト伏在静脈でのセロトニン誘発血管収縮反応

糖尿病患者(DM)では、非糖尿病患者(NDM)と比較して血管収縮反応が増強しており、これが冠動脈バイパス手術の周術期において血管れん縮を惹起する要因の一つと考えられる

移植された血管は、血管内皮細胞が脱落しているため、血小板の活性化が生じやすい状態にある。活性化された血小板から放出される5-HTなどのケミカルメディエータは、さらなる血小板の活性化を惹き起こすとともに、周囲の血管を収縮させる。したがって、インスリン作用不全が血管平滑筋のみならず血小板の反応性をも亢進することを証明できれば、糖尿病患者でバイパス手術後に血管閉塞が生じやすい原因の解明につながるのと同時に、より安全なバイパス手術の予後改善に寄与できると考えた。そこで本研究では、糖尿病と血小板活性化の関連を明らかとする目的で、インスリンがヒト血小板の凝集に及ぼす影響と、その分子メカニズムを解明する。

### 2. 研究の目的

これまでの研究で、5-HT誘発性の血管収縮反応が糖尿病患者の摘出伏在静脈において増強されることを見出し、糖尿病が冠動脈バイパス手術におけるグラフト血管れん縮のリスクファクターであることを明らかにしてきた。さらに、インスリンは血管平滑筋細胞膜表面の5-HT<sub>2A</sub>受容体を細胞内に取り込むインターナリゼーション作用によって、5-HT刺激による血管収縮反応を低下させることを報告した。グラフト血管のれん縮には、血小板の細胞膜表面5-HT<sub>2A</sub>受容体刺激等による活性化と、それにより放出される5-HTによる血管収縮作用が関与する。そこで今回の研究では、糖尿病と血小板活性化の関連を明らかとする目的で、血小板細胞膜表面の5-HT<sub>2A</sub>受容体等刺激による血小板凝集に対するインスリンの抑制効果と、その分子メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

採血後のクエン酸加末梢血を900回転10分間遠心し、platelet rich plasma (PRP)を採取した。沈査をさらに3500回転10分間遠心し、platelet poor plasma (PPP)を採取した。次に、PRPをPPPで希釈し、血小板数20万/μLに調整したヒト多血小板血漿を作製し実験に供した。インスリン(3 μM)を20分間前処置させた後、コラーゲン(0.1 μg/mL)処置後の5-HT刺激による血小板凝集について検討した。ヒト血小板の提供を受ける際には、十分な事前説明を行った後、本人の同意が書面により得られた場合にのみ、静脈血の採取を行った(本学倫理委員会承認済み 受理番号10-005)。

### 4. 研究成果

これまでに、糖尿病患者(DM)の伏在静脈は、非糖尿病患者に比し、5-HTによる血管収縮作用が有意に増強していることを見出し、その分子メカニズムとしてミオシン軽鎖脱リン酸化酵素

(収縮血管を弛緩させる役割を担う酵素)の障害が引き起こされていることを明らかとし報告した。また、インスリンには5-HT<sub>2A</sub>受容体をヒト血管平滑筋細胞膜から細胞質に引き込むインターナリゼーション作用があることを報告してきた。グラフト血管のれん縮には、血小板の細胞膜表面5-HT<sub>2A</sub>受容体刺激等による活性化と、それにより放出される5-HTによる血管収縮作用が関与する。そこで、糖尿病と血小板活性化の関連を明らかとする目的で、血小板細胞膜表面の5-HT<sub>2A</sub>受容体刺激による血小板凝集に対するインスリンの抑制効果について検討した。ウサギ血小板において、5-HT刺激による血小板凝集に対するインスリンの抑制効果が確認された。しかしながら、ヒト血小板においては、5-HT刺激による血小板凝集に対するインスリンの抑制効果は確認されなかった。5-HT刺激による血小板凝集は、コラーゲン刺激後に観察され、その作用は他の血小板由来物質であるADPよりも非常に小さいことが確認された。以上のことから、糖尿病患者の血管で見られる5-HTに対する収縮反応性亢進は、血管平滑筋細胞での限定的なものであり、血小板においては、5-HT単独刺激の寄与は少なく、5-HT以外の血小板由来物質等が血小板凝集に関与する可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) The defective protein level of myosin light chain phosphatase (MLCP) in the isolated saphenous vein, as a vascular conduit in coronary artery bypass grafting (CABG), harvested from patients with diabetes mellitus (DM). Matsuo Y., Kuwabara M., Tanaka-Totoribe N., Kanai T., Nakamura E., Gamoh S., Suzuki A., Asada Y., Hisa H., Yamamoto R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 412 (2), 323-327, 2011
- 2) Insulin Induces Internalization of the Plasma Membrane 5-Hydroxytryptamine(2A) (5-HT(2A)) Receptor in the Isolated Human Endothelium-Denuded Saphenous Vein via the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. Kanai T., Kuwabara M., Tanaka-Totoribe N., Nakamura E., Matsuo Y., Gamoh S., Suzuki A., Asada Y., Hisa H., Yamamoto R. *J. Pharmacol. Sci.*, 118 (2), 178-185, 2012

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Naoko Tanaka-Totoribe, Muneaki Hidaka, Shuji Gamoh, Atsuko Yokota, Eisaku Nakamura, Masachika Kuwabara, Jun Tsunozumi, Ryuichi Yamamoto	4. 巻 43
2. 論文標題 Effects of M-1, a major metabolite of sarpogrelate, on 5-HT-induced constriction of isolated human internal thoracic artery.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1979-1982
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Gamoh S, Shiba T, DiPette DJ, Yamamoto R	4. 巻 46
2. 論文標題 Differences in the response to periarterial nerve stimulation or exogenous noradrenaline infusion in the mesenteric vascular bed with the intestinal tract harvested from commonly used rat models of hypertension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Exp Pharmacol Physiol.	6. 最初と最後の頁 427-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1440-1681.13068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shiba T., Yokota A., Gamoh S., Tanaka-Totoribe N., Kuwabara M., Nakamura E., Hayase T, Nakamura K., Yamamoto R.	4. 巻 41
2. 論文標題 Diabetes mellitus induces hyperreactivity of 5-hydroxytryptamine (5-HT)-induced constriction in human internal thoracic artery and is associated with increase in the membrane protein level of 5-HT <sub>2A</sub> receptor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 820-823
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b17-01000	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Chihiro Sugita, Atsushi Yamashita, Shigetoshi Tsutsumi, Hisahiro Kai, Tohru Sonoda, Hiroki Yoshida, Ryuichi Yamamoto, Yujiro Asada, Masahiko Kurokawa.	4. 巻 75
2. 論文標題 Brazilian propolis (AF-08) inhibits collagen-induced platelet aggregation without affecting blood coagulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of natural medicines	6. 最初と最後の頁 975-984
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-021-01518-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鳥取部直子、蒲生修治、日高宗明、比佐博彰、山本隆一
2. 発表標題 冠動脈バイパス手術（CABG）における内胸動脈バイパスグラフトの血管れん縮を予防するパパペリンの至適濃度の検討
3. 学会等名 日本薬学会141年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 杉田千泰、山下篤、堤重敏、吉田裕樹、山本隆一、浅田祐士郎、黒川昌彦
2. 発表標題 ブラジル産プロポリス（AF-08）と成分フラボノイドの血栓症に対する有効性評価 血小板凝集と血液凝固に対する抑制作用の検討
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 鳥取部直子、蒲生修治、日高宗明、比佐博彰、山本隆一
2. 発表標題 Naloxone, an antagonist of alpha receptors, significantly inhibits extra-junctional alpha-1 receptor-mediated response, but not intra-junctional alpha-1 receptor mediated response, in rat isolated perfused intestinal vasculatures
3. 学会等名 日本薬学会140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuo Shiba, Atsuko Yokota, Shuji Gamoh, Naoko Tanaka-Totoribe, Masachika Kuwabara, Eisaku Nakamura, Takairo Hayase, Kunihide Nakamura, Hiroaki Hisa, Ryuichi Yamamoto
2. 発表標題 In patients with diabetes mellitus(DM), but not in patients without DM, angiotensin II is a vasospasm inducer in both venous and arterial conduits under coronary artery bypass grafting
3. 学会等名 18th WORLD CONGRESS OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY(国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芝達雄、鳥取部直子、蒲生修治、横田敦子、中村栄作、桑原正知、比佐博彰、山本隆一
2. 発表標題 慢性動脈閉塞症治療薬 サルボグレラート（選択的5-HT <sub>2</sub> 受容体拮抗薬）の主要代謝産物 M-1の血管収縮抑制効果
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳥取部直子、芝達雄、蒲生修治、横田敦子、中村栄作、桑原正知、比佐博彰、山本隆一
2. 発表標題 下肢静脈瘤の進展メカニズム -血管内径と収縮力の関係-
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉田千泰、中馬祥子、吉田桂二郎、山下篤、吉田裕樹、渡辺渡、山本隆一、黒川昌彦
2. 発表標題 フラボンに分類されるフラボノイドの血小板および血液凝固系に対する影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	蒲生 修治	九州保健福祉大学・薬学部・教授	
	(Gamoh Shuji)		
	(20273930)	(37604)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------