

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590565

研究課題名（和文） 糖尿病患者における血栓形成亢進機序の解明と簡便な血小板凝集能の検査法の確立

研究課題名（英文） Molecular mechanism of platelet hyper-aggregation in patients with type 2 diabetes and development of method for the diagnosis

研究代表者

徳田 治彦 (TOKUDA HARUHIKO)

岐阜大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：10397325

研究成果の概要（和文）：血小板の細胞内情報伝達機構の視点より、血小板凝集能亢進と最も相関が良く、普遍性の高い情報伝達物質を同定することおよび簡便かつ安定した測定検査法を確立することを目的とし、154例のII型糖尿病患者において解析し検討した。

その結果、血小板活性化物質であるコラーゲン刺激による p38 mitogen-activated protein (MAP) キナーゼのリン酸化レベルおよび p44/p42 MAP キナーゼのリン酸化レベルが血小板凝集能と著明に相関した。以上より、コラーゲン刺激による p38 MAP キナーゼおよび p44/p42 MAP キナーゼの活性化が糖尿病患者の血小板凝集能亢進のマーカーとなることが明らかとなり、治療へ応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel diagnostic method of platelet hyper-aggregation in patients with type 2 diabetes mellitus (DM). Our results strongly suggest that the phosphorylation levels of collagen-induced p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and p44/p42 MAPK represent the hyperaggregability of platelets, and the quantification of phospho-p38 MAPK would be a new and useful diagnostic biomarker of platelet hyper-aggregation in DM patients.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：糖尿病・血小板・血栓

1. 研究開始当初の背景

主要な生活習慣病として知られる糖尿病は代表的代謝疾患であり、その予備軍を含めるとわが国において現在約2,210万人が罹患していると推計されている。人工透析導入にいたる慢性腎不全の原疾患として現在最も頻度が高い糖尿病性腎症、後天的失明の主因

である糖尿病性網膜症および糖尿病性神経障害は本症の三大合併症としてよく知られているが、その発症・進展の予防は患者の Quality of Life (QOL)の維持において極めて重要である。これらはいずれも糖尿病に起因する全身性の細小血管障害によるものと考えられているがその血管障害の機序に関し

ては未だ判然としていない。一方、その発症が直接患者の生命予後に係わる脳梗塞および狭心症・心筋梗塞等の急性冠症候群を惹起する大血管障害は、糖尿病の未病状態と考えられるいわゆるメタボリックシンドロームの段階よりその進行が始まることが知られるに至り、その予防・対策が医学的および社会的に極めて重要な課題となっている。これら血管障害の発症は血栓形成がそのトリガーであると考えられているが、最近、血栓形成において中心的役割を担う血小板の凝集能が糖尿病の患者において亢進していることが報告された。しかし外来受診において通常の血小板凝集能検査は煩雑であり、その亢進を適確に推測できるより利便性の高い指標の確立が求められている。また治療において現在、米国糖尿病学会では成人の糖尿病患者に対して予防的なアスピリン製剤の投与を推奨している。しかし、抗血小板療法を施行しているにもかかわらず脳梗塞等の血管障害を反復する症例が多数存在しており、アスピリンの予防的投与のみでは十分な効果が得られているとは言い難い。従って、糖尿病発症の早期より凝集能亢進を捉え、安全・確実な血小板機能の制御を実施することの重要性は血管障害の予防およびその治療、ひいては総国民医療費抑制の観点から論を待たないが、その手順は残念ながら確立されているとは言い難い。

2. 研究の目的

簡便な血小板凝集能亢進の検査法及び有効性の高い血小板機能の制御法の確立には、糖尿病患者における血小板機能異常の全容を明らかにすることが必要であると考えられる。そのためには臨床検体を用いた詳細な基礎的検討およびトランスレーショナルリサーチによる検証が不可欠であるが、既に私共は平成14年7月より、通院あるいは入院加療中のII型糖尿病患者における血小板凝集能の解析を、最新の解析システムであるレーザー光スキャタリング法を用いて非糖尿病群との対比のもとに実施し、登録患者は既に350例を超えている。最近、これまでの解析から、以下の点を見出し報告している。血糖値の正常群では全く見られないが、糖尿病患者ではシェアーストレス(ずり応力)のみにより血小板の微小凝集塊形成が惹起されること、シェアーストレス(ずり応力)のみにより血小板微小凝集塊形成の程度が糖尿病患者における血糖コントロールの指標でHbA1c値との有意な相関を示すこと、ADP受容体はGTP結合蛋白質共役型受容体

(GPCR)であり、ヒトの血小板では二種類あるが、そのうちのP2Y1受容体はGqに共役することが、一方P2Y12受容体はGiに共役することが知られている。血小板凝集の生理的刺激因子であるADPにより惹起される血小板凝集において、ADP受容体の阻害剤を用いた検討し、血糖値正常群では受容体が主として関与すること、一方、糖尿病患者における血小板凝集能の亢進にはP2Y1受容体ではなくP2Y12受容体が関与することを世界で初めて明らかとした。さらに、最近、糖尿病性腎症の病期進行とシェアーストレス(ずり応力)による血小板微小凝集塊形成の程度が相関することを見出している。しかし、糖尿病患者において亢進した血小板凝集に関する細胞内情報伝達機構の詳細は未だ明らかとされていない。言い換えれば、これらの解明は、糖尿病患者において亢進している微小凝集塊形成を抑制することによる血管障害発症の予防に資すると考えられる。

以上の点を踏まえ本研究では、まず初めに血小板におけるADP受容体以降の細胞内情報伝達機構の詳細について検討する。次に、ADPに加えて、強力な血小板凝集の促進因子であるコラーゲン及びトロンビンにより惹起される血小板凝集における細胞内情報伝達機構の詳細について検討を行う。血糖値正常群との比較によりII型糖尿病患者に見られる血小板凝集における主要な情報伝達機構を解明することにより、本病態の発症機序の解明に直接結びつく重要な新知見が得られ、血小板凝集能亢進状態を捉えることが可能な簡便かつ新たな検査法の確立を図ることが出来る可能性が極めて高い。加えて、II型糖尿病動物モデルであるOLETFラットを用いて、糖尿病性腎症発症と血小板凝集の因果関係の検討を行う。さらにこれらの血小板凝集能に関する基礎的検討を基に、アスピリン、チクロピジン、シロスタゾール、エイコサペント酸等による抗血小板療法を施行されている症例を抽出し、血小板凝集解析とともに高感度CRP、 $\alpha 2$ アンチプラスミン、アディポネクチン、plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)、尿中微量アルブミン、糖尿病性網膜症の進展、脳梗塞・虚血性心血管発症等の各種臨床指標ならびに病態の詳細な追跡調査を行い、これら抗血小板療法の臨床的有用性の検討、各種抗血小板薬による糖尿病患者の血小板凝集の細胞内情報伝達機構の変化の解析等を主体としたトランスレーショナルリサーチを推し進める。

3. 研究の方法

(1) レーザースキャタリング法による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II型糖尿病患者の血小板凝集能を血糖値正常群との比較において検討した。

(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⁺⁺動員等]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の刺激により分泌・遊離されるplatelet-derived growth factor-AB、セロトニンおよびsoluble CD40 ligandをELISA法で検討した。

4. 研究成果

(1) II型糖尿病患者(154例)において解析し、血小板活性化物質であるコラーゲン刺激によるp38 mitogen-activated protein (MAP)キナーゼのリン酸化レベルおよびp44/p42 MAPキナーゼのリン酸化レベルが血小板凝集能と著明に相関した。以上より、コラーゲン刺激によるp38 MAPキナーゼおよびp44/p42 MAPキナーゼの活性化が糖尿病患者の血小板凝集能亢進のマーカーとなることが明らかとなり、治療へ応用できる可能性が示唆された。

(2) 低分子量HSPファミリーの一つである α Bクリスタリンの血小板機能に及ぼす細胞外作用を検討した。その結果、 α BクリスタリンがADP刺激による血小板凝集能には殆ど影響を及ぼさないが一方、血小板活性化に伴うplatelet-derived growth factor-AB及びserotoninの顆粒分泌を抑制することを明らかとした。

(3) コラーゲン刺激による血小板活性化を、p44/p42 MAP kinaseとHSP27との関連において検討した。その結果、コラーゲンはp44/p42 MAP kinaseを活性化し、この下流においてHSP27をリン酸化すること、さらに、このシグナル伝達を介し血小板顆粒分泌およびsCD40L遊離を惹起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10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. 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
3. 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
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 A₂ promotes soluble CD40 ligand release from human platelets. *Atherosclerosis* 2010;209:415-421. 査読 有
5. Tokuda H, Harada A, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Natsume H, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T and Kozawa O. Raloxifene enhances spontaneous microaggregation of platelets through up-regulation of p44/p42 MAP kinase: a case report. *Osteoporosis Int.* 2010;21:189-193. 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. α 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. Minamitani C, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Hanai Y, Otsuka T, Kozawa O and Tokuda H. A case of raloxifene-induced acceleration of platelet aggregation. *Internal Med.* 2008;47:1523-1528. 査読 有
10. 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 3 件)

- ① 発表者名: 土井智章、小澤 修、加藤久晶、足立政治、小倉真治
発表標題: 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
学会名: 第 38 回日本集中治療医学会学術集会

発表年月日: 2011 年 2 月 26 日

発表場所: 神奈川県横浜市

- ② 発表者名: Tomoaki Doi, Seiji Adachi, Hisaaki Kato, Osamu Kozawa, Shinji Ogura
発表標題: Analysis of new molecular mechanisms and the anti-inflammatory effects of antithrombin III in human platelets.
学会名: Thirty-Third Annual Conference on Shock
発表年月日: June 13, 2010
発表場所: Portland, Oregon, U.S.A.

- ③ 発表者名: 土井智章、小澤 修、加藤久晶、足立政治、小倉真治
発表標題: 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
学会名: 第 24 回日本 shock 学会総会
発表年月日: 2009 年 5 月 30 日
発表場所: 石川県金沢市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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◇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

徳田 治彦 (TOKUDA HARUHIKO)

岐阜大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号: 10397325

(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
なし