

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390084

研究課題名(和文) 糖尿病におけるアテローム血栓症の発症機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of atherothrombosis in diabetes mellitus

研究代表者

浅田 祐士郎 (Asada, Yujiro)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：70202588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病患者の動脈硬化症は、進行が速く、予後も不良であることが指摘されてきたが、その詳細は不明で、有用な指標マーカーも存在しない。本研究では、ヒトと実験動物の病理標本を用いて、糖尿病におけるアテローム血栓症の発症機序の解明と新規治療法への展開を目的とした。家兔の糖尿病性動脈硬化モデルでは、非糖尿病性に比して脂質コアが大きく、血栓形成能の亢進がみられ、ヒトと同様の所見が観察された。メタボローム解析では、糖代謝・アミノ酸代謝を中心に、糖尿病・非糖尿病間で有意に増減が異なる代謝物質 80種類を同定した(特願2012-084684)。これらは糖尿病性動脈硬化症の新規マーカーの候補と期待できる。

研究成果の概要(英文)：It has been well known that atherosclerosis in diabetic patients is quick in progress, and has a poor prognosis, however, the underlying mechanisms are still unclear. In this study, we examined the mechanism of the development of atherothrombosis in diabetic condition using human atherosclerotic specimens and rabbit atherosclerosis model with or without diabetes mellitus. The atherosclerotic lesions of rabbit model with diabetes were larger and higher thrombogenic than with non-diabetes, which were similar to those of human lesions. The metabolome analysis identified about 80 kinds of different metabolites between diabetes and non-diabetes, which were mainly on glucose and amino acid metabolisms. We can expect these metabolites as potential candidates for the new marker of the diabetic atherosclerosis.

研究分野：病理学

キーワード：病理学 糖尿病 動脈硬化 血栓

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳梗塞に代表される心血管イベントは、動脈硬化性プラークが破綻し、血栓が血管内腔を塞ぐことで発症することから「アテローム血栓症」と総称される。この疾患群は、我国の死因の約3割を占め、患者数と医療費は増加の一途を示している。

本疾患の発症においては、多くの疫学研究により糖尿病が独立した強力な危険因子であることが明らかにされている。近年、我国の糖尿病患者数は急激に増加しており、糖尿病におけるアテローム血栓症の病態解明と予防・治療の確立は医療経済的な観点からも急務の課題となっている。

アテローム血栓症は、大きな脂質コアを有するプラークの線維性被膜が破綻することで発症すると理解されている。糖尿病では、脂質コアの形成と破綻のプロセスが促進される、との認識から、この分子機構の研究が世界レベルで進められている。しかし、糖尿病はその罹患期間によって病態や病理像が大きく異なる。また画像検査においても、イベントを発症した糖尿病患者では、脂質コアの減少や強い石灰化の存在、などが指摘されてきており、糖尿病患者におけるアテローム血栓症の発生機序は非糖尿病患者とは異なると考えられるが、その機序は不明である。

2. 研究の目的

糖尿病患者におけるアテローム血栓症の発生機序を解明し、糖尿病性動脈硬化症の新たな診断・治療法の開発に寄与する。

3. 研究の方法

(1) 人体病理標本の解析

心血管イベントを発症した糖尿病（型・型）・非糖尿病患者のプラークと血栓の性状を比較検討する。病理標本は、宮崎大学医学部附属病院と宮崎市郡医師会病院心臓病センターで血管内治療時に採取され

た冠動脈アテレクトミー、血栓吸引標本および病理解剖標本を使用し、病理形態学・免疫組織化学・分子生物学的手法を用いてプラークと血栓の性状を解析する。

(2) 動物モデルでの解析

申請者らが確立した家兎アテローム血栓症モデルならびに組織培養系を用いて糖尿病下でのアテローム血栓症の発症病態を解析する。

4. 研究成果

(1) 人体病理標本の解析

プラーク性状の検討

糖尿病患者と非糖尿病患者の動脈硬化巣を病理組織学的に解析した。その結果、糖尿病の罹患期間が短い症例（罹患10年未満）では脂質コアの形成が非糖尿病に比べて亢進し、マクロファージを中心とする炎症細胞の浸潤も高度であった。一方、罹患期間が長く、冠動脈狭窄を伴う進行病変においては脂質コアが退縮し、マクロファージ浸潤の程度も減弱し、線維性成分に富んだ病変に移行する所見であった。

血栓性状の検討

急性心筋梗塞患者の血栓吸引標本を検討した結果、血栓内にはCD34陽性細胞数が観察され、これは血栓の修復作用に加えて血小板凝集を抑制する酵素 (Ecto-ATPDase) を産生することにより、血栓形成の増大を抑制する作用を有すること示した。糖尿病患者では非糖尿病患者に比して、血栓内のCD34陽性細胞数が有意に低下しており、血糖値と負の相関を示し、これが糖尿病患者での急性心筋梗塞発症に関与していることを明らかにした。

(2) 動物モデルを用いた解析

糖尿病動物モデルの検討

高脂血症ウサギの下肢動脈にバルーン障害とアロキサンにより糖尿病性動脈硬化巣を作成し、病巣の性状を分子病理学的手法と

質量分析法（メタボローム解析）により解析した。その結果、糖尿病では、非糖尿病に比して脂質コアが大きく、虚血に関連した転写因子群・炎症性サイトカイン群の発現亢進が観察され、ヒト糖尿病動脈硬化巣の所見と矛盾しない結果であった。

動脈硬化巣のメタボローム解析

メタボローム解析では、糖代謝・アミノ酸代謝を中心に、約 200 種類の変動する代謝物質が確認され、糖尿病・非糖尿病間で有意に増減が異なる代謝物質 80 種類を同定した。これらは糖尿病性動脈硬化症の新規マーカーの候補と期待できる。（特願 2012-084684）

動脈硬化巣のグルコース取込

メタボローム解析の結果を踏まえて、動脈硬化巣におけるグルコース取込について、硬化巣の組織培養及び動物モデルを用いて検討した。その結果、動脈硬化巣では虚血の程度に正相関してグルコース取込が亢進すること、その主な細胞はマクロファージであること、取込量と硬化巣の血栓形成能が正の相関を示すことを見出した。さらにアイソトープ標識したグルコースアナログ（FDG）と臨床用 PET 機器を用いて、上記動物モデルの動脈硬化病変のイメージングに成功し、グルコース取込量は病巣の炎症と血栓形成能を反映することを示した。この結果は、FDG-PET による動脈硬化のイメージングは、病変の局在に加えて、危険度の高い病変の検出に有用な診断手法となる可能性を示している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 25 件)

Matsuura Y, Yamashita A, Iwakiri T, Sugita C, Okuyama N, Kitamura K, Asada Y. Vascular wall hypoxia promotes arterial thrombus formation via augmentation of vascular thrombogenicity. *Thromb Haemost.* 査読有、2015 in press. PMID:25833755

Yamashita A, Zhao Y, Matsuura Y, Yamasaki K, Moriguchi-Goto S, Sugita C, Iwakiri T, Okuyama N, Koshimoto C, Kawai K, Tamaki N, Zhao S, Kuge Y, Asada Y. Increased metabolite levels of glycolysis and pentose phosphate pathway in rabbit atherosclerotic arteries and hypoxic macrophage. *PLoS One.* 査読有、2014;9:e86426.

Iwakiri T, Sato Y, Matsuura Y, Hatakeyama K, Marutsuka K, Yamashita A, Fujimoto S, Kitamura K, Asada Y. Association between renal vasculature changes and generalized atherosclerosis: An autopsy survey. *J Atheroscler Thromb.* 査読有、2014;21:99-107

山下 篤, 浅田祐士郎 : 動脈硬化巣の代謝と血栓形成能、血栓止血誌、査読有、2014;25:348-356

Nishihira K, Hatakeyama K, Shibata Y, Kitamura K, Asada Y. Organized thrombus in aspirated coronary materials can predict in-hospital mortality of patients with acute myocardial infarction. *Circ J.* 査読有、2013;77:1275-1280

Yamashita A, Zhao Y, Zhao S, Matsuura Y, Sugita C, Iwakiri T, Okuyama N, Ohe K, Koshimoto C, Kawai K, Tamaki N, Kuge Y, Asada Y. Arterial (18)F-fluorodeoxyglucose uptake reflects balloon catheter-induced thrombus formation and tissue factor expression via nuclear factor-kb in rabbit atherosclerotic lesions. *Circ J.* 査読有、2013;77:2626-2635

浅田祐士郎 : アテローム血栓症の発症病理、法医病理、査読有、2013;19:17-22

浅田祐士郎 : 動脈硬化性プラークの形成・破綻と血栓症の病態、血栓止血誌、査読有、2013;24:5-11

浅田祐士郎 : 動脈硬化 revised -動脈硬化

と粥状硬化の病理- Heart View、査読無、
2013;17:638-644

浅田祐士郎、畠山金太、佐藤勇一郎、山下 篤、丸塚浩助：動脈血栓の電子顕微鏡像とアテローム血栓症の発症機序、病理と臨床、査読無、2013;31:1033-1039

Yamashita A, Nishihira K, Matsuura Y, Ito T, Kawahara K, Hatakeyama K, Hashiguchi T, Maruyama I, Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y, Kitamura K, Shibata Y, Asada Y. Paucity of CD34-positive cells and increased expression of high-mobility group box 1 in coronary thrombus with type 2 diabetes mellitus. Atherosclerosis. 査読有、2012;224:511-514

Iwakiri T, Yano Y, Sato Y, Hatakeyama K, Marutsuka K, Fujimoto S, Kitamura K, Kario K, Asada Y. Usefulness of carotid intima-media thickness measurement as an indicator of generalized atherosclerosis: Findings from autopsy analysis. Atherosclerosis. 査読有、

2012;225:359-362

Nishihira K, Hatakeyama K, Kuriyama N, Nomura K, Fukushima Y, Inoue Y, Nakama T, Mine D, Sagara S, Ashikaga K, Matsuyama A, Kitamura K, Shibata Y, Asada Y. Presence of older thrombus in patients with late and very late drug-eluting stent thrombosis. J Cardiol. 査読有、2012;59:57-63

Tsuruda T, Hatakeyama K, Nagamachi S, Sekita Y, Sakamoto S, Endo GJ, Nishimura M, Matsuyama M, Yoshimura K, Sato Y, Onitsuka T, Imamura T, Asada Y, Kitamura K. Inhibition of development of abdominal aortic aneurysm by glycolysis restriction. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 査読有、2012;32:1410-1417

Matsuura Y, Hatakeyama K, Imamura T, Tsuruda T, Shibata Y, Kodama T, Kitamura K, Asada Y. Different distribution of pentraxin 3 and c-reactive protein in coronary atherosclerotic plaques. J Atheroscler Thromb. 査読有、2012;19:837-845

Funatsu T, Yamashita A, Kaku S, Iwatsuki Y, Asada Y. Plasma factor Xa inhibition can predict antithrombotic effects of oral direct factor Xa inhibitors in rabbit atherothrombosis models. Thromb Haemost. 査読有、2012;108:896-902

浅田祐士郎：血管病理からみた血栓形成メカニズム、血栓止血誌、査読無、2012;23:606-610

〔学会発表〕(計 10件)

浅田祐士郎：病理像からみた冠動脈硬化と血栓形成、第15回動脈硬化教育フォーラム、2015-2-8(大阪国際会議場、大阪市、大阪府)

浅田祐士郎：アテローム血栓における凝固系の役割、第44回日本心臓血管作動物質学会、2015-2-6(高松センタービル、高松市、香川県)

山下 篤、趙 莞、松浦祐之介、山崎一諒、盛口清香、越本知大、趙 松吉、久下裕司、浅田祐士郎：動脈硬化血管とマクロファージの代謝解析 - 低酸素による解糖系・ペントースリン酸回路の代謝産物の増加、第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2014-7-10(京王プラザ、新宿区、東京)

Yamashita A, Zhao Y, Matsuura Y, Yamasaki K, Moriguchi-Goto S, Sugita C, Iwakiri T, Okuyama N, Koshimoto C, Kawai K, Tamaki N, Zhao S, Kuge Y, Asada Y. Increased metabolite levels of glycolysis and pentose phosphate pathway

in rabbit atherosclerotic arteries and hypoxic macrophage. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2014, 2014-5-2 (Toronto, Canada)

Asada Y.: Mechanisms of atherothrombosis: Thrombus formation on disrupted atheromatous plaques. The 3rd International Conference of Stem Cells and Regenerative Medicine, 2012-11-10 (Hualien, Taiwan)
浅田祐士郎 : 血栓症の病態・概説、第 44 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2012-7-19 (ヒルトン福岡シーホーク、福岡市、福岡県)

〔図書〕(計 1 件)

Yamashita A, Asada Y.: Pathology and pathophysiology of atherothrombosis: Virchow's triad revisited. In: Traditional and novel risk factors in atherothrombosis. Gaxiola (ed). Intech, pp1-20 (2012)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称 : 動脈硬化の検査方法
発明者 : 浅田祐士郎、北村和雄、山下 篤、松浦祐之介
権利者 : 国立大学法人宮崎大学
種類 : 国際特許
番号 : PCT/JP2013/060103
出願年月日 : 2013 年 4 月 2 日
国内外の別 : 国際

名称 : 動脈硬化の検査方法
発明者 : 浅田祐士郎、北村和雄、山下 篤、松浦祐之介
権利者 : 国立大学法人宮崎大学
種類 : 国内特許
番号 : 特願 2012 - 084684
出願年月日 : 2012 年 4 月 3 日
国内外の別 : 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/patho1/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

浅田 祐士郎 (ASADA, Yujiro)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号 : 70202588

(2) 研究分担者

佐藤 勇一郎 (SATO, Yuichiro)
宮崎大学・医学部・准教授
研究者番号 : 90347055

山下 篤 (YAMASHITA, Atsushi)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号 : 90372797

今村 卓郎 (IMAMURA, Takuroh)
(2011年3月31日付けで本学を退職し、
2012年4月1日付けで研究環境のない病院
へ就職)
宮崎大学・医学部・准教授
研究者番号 : 60203329

(3) 連携研究者

塩見雅志 (SHIOMI, Masashi)
神戸大学・医学部・准教授
研究者番号 : 50226106