

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591323

研究課題名(和文) 糖尿病血管合併症の克服に向けた治療戦略構築のための早期血小板活性異常の臨床的意義

研究課題名(英文) Abnormal platelet activation in patients with type 2 diabetes mellitus

研究代表者

荒木 信一 (Araki, Shin-ichi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：80378455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病患者の心血管合併症の発症阻止を目指した新たな治療戦略を構築するため、311例の2型糖尿病患者の自然誘発微小血小板凝集塊の形成ならびに血小板細胞膜表面抗原発現量を測定し、経年的臨床検査データの蓄積と脳・心血管疾患の発症についてのデータファイルの構築を行った。アスピリン不応性症例を対象に、アスピリンからシロスタゾールへ抗血小板薬を変更することにより早期血小板活性異常を抑制できる症例が少なからず存在することを報告した。遺伝素因が早期血小板活性異常に影響を及ぼす可能性を探索するため、既報の6個のSNPsと早期血小板活性化指標との関連を検討したが、有意な関連は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Prevention of cardiovascular disease is an important therapeutic goal in patients with type 2 diabetes. The aim of this study was to investigate the abnormal platelet activation, evaluated by the formation of spontaneous microaggregation of platelets (SMAP) and the expression of active GPIIb/IIIa and P-selectin on the surface of platelets in diabetic patients. First, we measured these index in 311 patients and continuously collected the annual clinical data and outcome. Second, we conducted an open label, single arm, uncontrolled trial of antiplatelet treatment with cilostazol as an alternative to aspirin in 23 Japanese patients with type 2 diabetes mellitus who had SMAP despite treatment with aspirin for at least 1 year. As results, cilostazol significantly attenuated the degree of the SMAP formation. Seventeen patients had a SMAP reduction of > 50% when compared with baseline values. Platelet expression of active GPIIb/IIIa and P-selectin was also attenuated by cilostazol.

研究分野：糖尿病性腎症

キーワード：糖尿病 血小板活性 抗血小板薬 アスピリン

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者の生命予後を改善させるためには、冠動脈疾患や脳血管障害などの血管合併症の発症を阻止することが重要な治療目標となる。研究代表者は、心腎連関の基盤病態に関与する因子として早期血小板活性化異常に着目し、従来の測定方法では検出が困難であった血小板活性化早期に形成される微小血小板凝集異常と血管合併症との関連に関する臨床研究をおこなってきた。

血小板活性化の初期過程においては、血小板膜糖蛋白の発現増加と微小血小板凝集塊の形成が惹起される。従来の測定方法では、凝集惹起薬存在下での血小板活性化後期に形成される大血小板凝集塊のみが検出され、早期血小板活性化異常を検出することができなかった。近年、レーザー散乱粒子計測法による血小板凝集塊の検出法が新たに開発され、血小板活性初期に惹起される微小血小板凝集塊の形成を経時的に検出すること、さらに血小板膜糖蛋白発現をサイトメトリー法により定量化することが可能となり、何ら刺激物質による外因刺激を必要とすることが無く、生体内で生じている血小板活性化初期に惹起される軽微な変化をとらえることが可能となった。

既に研究代表者は、これら新たな血小板活性化評価指標を用いて、断面研究の成績ではあるが、2型糖尿病患者(401症例)では、健常者(30名)では検出できなかった早期血小板活性化・微小血小板凝集塊の形成が亢進していること、この微小な早期血小板凝集塊の形成は、尿中アルブミン排泄量とbaPWV値と正の相関関係を認めること、低用量アスピリン(100mg/日)内服においてもその形成を十分に抑制できない症例が53%存在すること、特にアルブミン尿を合併する症例においてその抑制効果が弱いことを見出した(Araki S, *Diabetes Care* 2009)。

このことは、早期血小板活性化異常が、糖

尿病状態で高頻度に惹起されるのみならず、心腎連関の共通基盤病態として、アルブミン尿の増加が血小板活性化異常をさらに促進することにより血管合併症の発症に関与している可能性が考えられた。一方、アスピリン内服症例の約半数において、十分に早期血小板活性化異常を抑制できていない事実(アスピリン不応性)も明らかとなった。アスピリン抵抗性は心血管イベント発症の危険因子であるため、消化管出血などのアスピリンによる副作用出現を最小限に抑え、より効果的に血管合併症の発症を抑制するためには、薬剤反応性に応じた適切な治療戦略の方策も必須であるとの課題も明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究課題では、これまでの研究代表者の研究成果をさらに発展させるべく、以下の検討を実施する。

早期血小板活性化異常が心血管合併症の発症予知因子となる可能性を前向き追跡研究により検証するとともに、経過観察期間中の、血糖・血圧・脂質代謝指標の変動と早期血小板活性化指標との関連性について検討をおこなう。

1年以上の低用量アスピリン内服下においても早期血小板活性化を十分に抑制できていない症例(アスピリン不応性症例と定義)を対象に、抗血小板薬の変更による早期血小板活性化異常に及ぼす影響を検証する。

効率的な治療戦略の構築のため、遺伝素因の違いによる早期血小板活性化異常の影響と抗血小板薬に対する反応性について遺伝子関連研究による検証をおこなう。

これら心腎連関の基盤における早期血小板活性化異常の意義を検証することより、血管合併症発症のハイリスク糖尿病症例の早期同定と、個々の症例背景に応じた適切な治療法の選択を探索し、個別化医療による糖尿病患者の血管合併症の発症阻止に向けた新たな糖尿病治療戦略の構築を目指すことを

目的とした。

3. 研究の方法

2 型糖尿病患者における早期血小板活性化異常を新たな手法でとらえ、糖尿病血管合併症の発症阻止を目指した新たな治療戦略の構築を目指すことを目的に、これまでの断面研究での成績をさらに発展させ、以下の前向き追跡研究・薬剤反応性研究・遺伝子関連研究を実施した。

前向き追跡研究：

2 型糖尿病患者を対象に、下記の早期血小板活性化指標の測定と各種臨床検査を経年的に実施する。評価項目として、早期血小板活性化指標の経年変化と、糖尿病血管合併症の進展・改善との関連性を検証する。さらに、5 年間の経過観察中に発症した心血管疾患の発症と観察開始時における早期血小板活性化指標との関連を検討する。

アスピリン抵抗性症例を対象とした薬剤反応性の検証研究：

低用量アスピリン（100mg/日）内服にもかかわらず、経年的測定においても早期血小板活性化指標が抑制されていない症例を抽出し、アスピリンとは血小板機能抑制機序の異なる抗血小板薬であるシロスタゾール（200mg/日）へ薬剤変更を行い、薬剤変更 1 ヶ月・2 ヶ月後に、再度、早期血小板活性化指標を測定し、抗血小板薬変更による早期血小板活性化指標に及ぼす影響を検討した。

遺伝子関連研究：

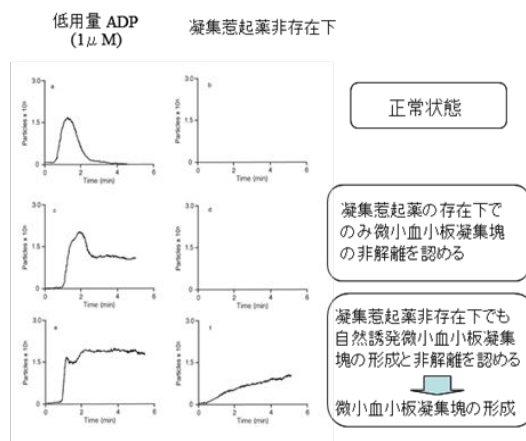
血小板凝集に関与すると考えられる血小板膜糖蛋白遺伝子、接着因子、凝固・線溶系に関連する遺伝子に関し、既報の SNP による遺伝子多型の同定をおこない、早期血小板活性化評価指標との関連、ならびに薬剤反応性の差異との関連性を検証した。

早期血小板活性化指標の測定：

1) 自然誘発血小板凝集異常の測定：

凝集惹起薬非存在下で、9-25 μm 径の自然誘発微小血小板凝集塊の形成・解離過程を、レーザー散乱粒子計測型血小板凝集能測定装置を用いて検出・定量化をおこなう(図 1)。

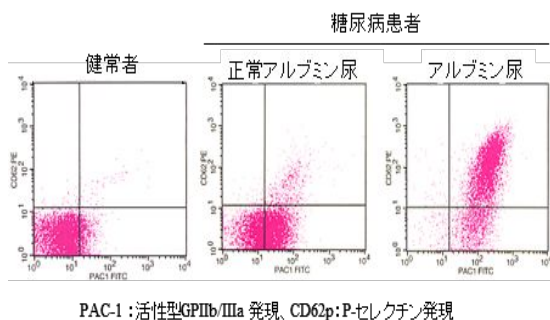
図1. レーザー粒子測定装置による微小血小板凝集の形成・解離過程の測定例



2) 血小板膜糖蛋白発現の定量：

血小板膜糖蛋白（active GPIIb/IIIa, P-selectin）発現を、蛍光色素標識された抗体（CD62P, PAC-1）を用いたフローサイトメトリー法により検出・定量化をおこなう(図 2)。

図2. 血小板膜糖蛋白GPIIb/IIIa and P-selectin の発現



PAC-1 : 活性化GPIIb/IIIa 発現、CD62p:P-セレクチン発現

4. 研究成果

前向き追跡研究：

311 例の 2 型糖尿病患者の早期血小板活性化指標の経年測定を実施した。現在、観察開始後より 3 年が終了し、これら症例の臨床検査データの蓄積と予後調査を経年的に実施し、データファイルを経年的に構築し現在進行中である。今後、5 年間の臨床データを蓄

積するとともに、5年間で腎・脳・心血管疾患の発症に早期血小板活性化指標の程度が及ぼす影響を検証する。

アスピリン抵抗性症例を対象とした薬剤反応性の検証研究：

1年以上のアスピリン服薬下においても持続的に自然誘発微小血小板凝集塊を認めた2型糖尿病患者23例(アスピリン不応性症例)を対象に、アスピリンからシロスタゾール(200mg/日)へ変更し、1ヶ月後および2ヶ月後の自然誘発微小血小板凝集塊の形成程度を観察した。

観察開始時にアスピリン内服下においても十分に抑制されなかった自然誘発微小血小板凝集塊の形成は、アスピリンからシロスタゾールへ薬剤を変更した1ヶ月後より統計学的に有意に抑制され(図3)、2ヶ月後でもその抑制効果は継続して認められた。

対象症例23例中、17症例(74%)で、アスピリン内服時よりも自然誘発微小血小板凝集塊の形成程度を50%以上減少させることができ、中でも7症例(30%)で自然誘発微小血小板凝集塊の形成を完全に抑制させることができた。

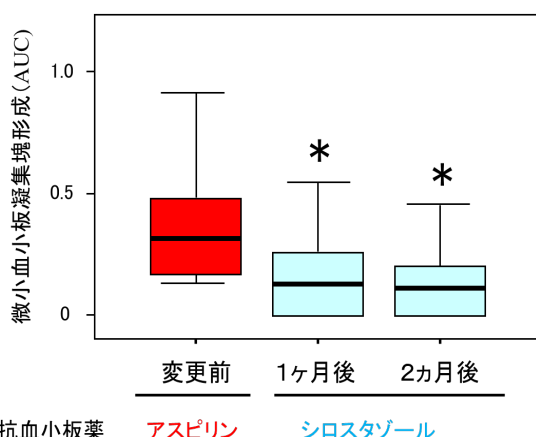


図3. アスピリンからシロスタゾールへ抗血小板薬の変更による微小血小板凝集塊の形成抑制効果。

* $P < 0.017$ vs 観察開始時(アスピリン内服下)

また、自然誘発微小血小板凝集塊の形成抑制

効果と同様に、血小板膜表面の P-selectin (CD62p) および PAC-1(GPIIb/IIIa)発現量も、アスピリンからシロスタゾールへの変更により有意に抑制することができた(図4)。

つまり、血小板活性抑制にアスピリン不応性を示す糖尿病症例の中でも、抗血小板薬の変更により、適切に血小板活性を抑制できる症例が少ないことを明らかにすることができた。

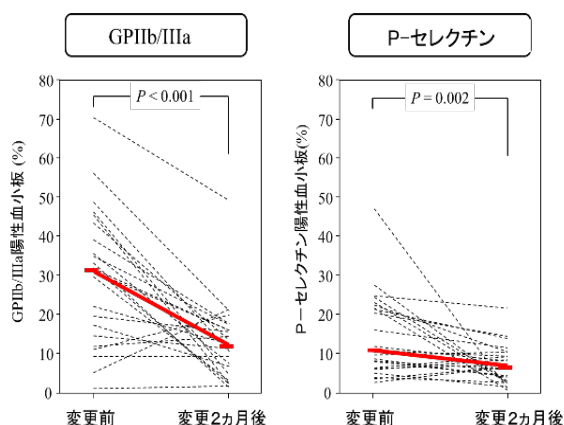


図4. アスピリンからシロスタゾールへ抗血小板薬の変更による血小板膜表面のGPIIb/IIIaとP-セレクチン発現抑制効果。

既に我々は、アスピリン服薬下においても、2型糖尿病患者の約半数で自然誘発微小血小板凝集塊の形成を十分に抑制できていないことを報告してきた。そのようなアスピリン不応性症例に、漫然とアスピリンを投与し続けても、心血管系疾患の発症を効果的に抑制することは困難であり、逆に副作用の出現リスクを増大させる結果となる可能性が考えられる。そのため、2型糖尿病患者でアスピリン不応性を示す症例を適切に同定し、症例個々に適した抗血小板薬を投与することが、効率的に糖尿病患者の心血管疾患の発症抑制において重要となることを示唆している。

遺伝子関連研究：

対象患者から採取したDNAを用いて、血小板凝集に関与すると考えられる血小板膜糖蛋白遺伝子、接着因子、凝固・線溶系に関連す

る遺伝子に関し、既報の Glycoprotein IIB/IIIa C1565T, E-selectin G98T, Ser128Arg, Glycoprotein Ia C807T, Glycoprotein IV Ser219Pro 遺伝子多型を同定し、遺伝子多型と早期血小板活性異常との関連を検証した。しかしながら、少なくともこれら遺伝子多型と早期血小板活性異常との相関関係は認められず、また、断面研究ではあるが、使用されている抗血小板薬の薬剤反応性にも差異は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1) Araki S, Matsuno H, Haneda M, Koya D, Kanno Y, Kume S, Isshiki K, Araki H, Ugi S, Kawai H, Kashiwagi A, Uzu T, Maegawa H: Cilostazol attenuates spontaneous microaggregation of platelet in type 2 diabetic patients with insufficient platelet response to aspirin. *Diabetes Care* 36: e92-93, 2013 (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

1) 荒木信一・糖尿病腎症のバイオマーカー・第49回糖尿病学の進歩(岡山)・2015年2月20日-21日・シンポジウム

2) 荒木 信一：腎症における新たなバイオマーカーと治療法の探索：第57回日本糖尿病学会年次学術集会(大阪)・2014年5月22日-24日・シンポジウム

3) 荒木 信一, 松野 浩之, 羽田 勝計, 古家 大祐, 柏木 厚典, 宇津 貴, 前川 聡：シロスタゾールは、2型糖尿病患者のアスピリン不応性自然誘発微小血小板凝集塊の形成を減弱させる：第56回日本糖尿病学会年次学術集会(熊本)・2013年5月16日-18日

6. 研究組織

(1)研究代表者

荒木 信一 (ARAKI SHIN-ICHI)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：80378455