

る遠心分離法による PRP の分離では白血球の混在が多いことを認め、その混在は白血球除去フィルターの使用で約 1/2000、血小板は約 1/2 となることから今回の検討では白血球除去フィルター処理により得た PRP を用いた。したがって今回の検討で認めたミトコンドリア遺伝子は血小板由来と考えられる。今後、ミトコンドリア遺伝子の塩基配列の欠失による遺伝子多型が既に報告されている細胞をコントロールとしての遺伝子解析や機能解析を進める予定である。

(4) ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) の冠状動脈内皮細胞における役割 : 血栓症に対するアスピリンの効果に関与する因子として hTERT に着目した。アスピリンによる内皮細胞の抗老化作用、テロメラーゼ活性増加作用が報告されている。テロメラーゼ活性サブユニットの hTERT の遺伝子多型はテロメラーゼ活性に影響を及ぼす。これはこれはアスピリンによる内皮細胞のテロメラーゼ活性増加作用において個体差が存在する可能性を示唆していると考え、今回は基礎検討の in vitro 実験として正常冠状動脈内皮細胞に hTERT 遺伝子を導入した際の遺伝子プロファイリングを解析した。その結果、ICAM2 や VWF の発現減少を認めた。これら粘着タンパクは血栓形成において重要な役割を演じている。

さらにこれらの発現調節に caspase1、GATA6 がそれぞれ関与していることが推察された。今後 caspase1 や GATA6 を阻害する条件下での検討、そしてアスピリン添加時の内皮細胞が示す遺伝子プロファイリングを検討する必要がある。

(5) マウス ES 細胞を用いた血小板の産生機序の解明とその血小板の機能解析 : 本課題研究における基礎検討として ES 細胞由来の巨核球・血小板を用いる研究である。前年度に確立した ES 細胞から巨核球・血小板産生の in vitro 分化誘導系を用いて今回はアスピリン添加時のそれら細胞の機能を検討した。その添加は巨核球、血小板いずれにおいても機能抑制をもたらした。これまでの報告においてアスピリンは巨核球にも作用することが示されているがこれを検討するための造血幹細胞を個体から得るためにはドナーへの負担が大きいことに加え、検討の再現性を得ることが困難である。この問題を解決するために増殖能の高い ES 細胞を用いることは好都合である。今後、アスピリンの巨核球や血小板の機能抑制に関与する因子の検出、アスピリンの巨核球の機能に影響を及ぼす機序の解明が必要と考えられる。また実験の検証をヒト造血幹細胞やヒト血小板を用いた microarray 解析を行うためには少量

のサンプルで行う必要がある。今回この予備検討のひとつとして、microarray の販売元である affymetrix のプロトコールに従い、ES 由来血小板を用いて従来の約 1/130 量の RNA から PCR 増幅を行い microarray 解析を試み新しいプロトコールを得ていることは今後の検討を容易に行える可能性が高いと考えられる。今回、ES 細胞から巨核球・血小板産生の in vitro 分化誘導系を用いた検討において血小板産生機構にはアポトーシスが関与していることを示した。この関与には caspase が重要な役割を演じていることを示唆する結果を得た。ここで分化誘導の培養 5 日目で caspase 阻害剤添加した場合には血小板産生への影響が見られず、培養 8 日、12 日目ではその影響が著明に観察されたこと、さらに血小板産生に関与する caspase の活性化経路の検討では caspase3 を中心としたその経路の上流である caspase12、9 の活性が培養 8 日目でピークを示したこと、caspase 3 は培養 12 日目でピークを示したことから、血小板産生機構に対するアポトーシスの関与はその各分化過程において特徴的な機序を有していると考えられている。そして今回の結果はこれまで血小板産生機構に対するアポトーシスの関与について、報告により一致をみななかった理由のひとつとして

提唱できる可能性がある。

## E. 結論

抗血小板薬の反応性と関係する分子について網羅的検討あるいは候補因子アプローチを行った。

PFA-100<sup>®</sup>で評価したアスピリン感受性に関連する遺伝子多型を網羅的解析により検出した。

CVD の疾患感受性に関与する遺伝子多型を網羅的解析により検出した。

血小板ミトコンドリア遺伝子多型を検出するための予備検討を行い、そのプロトコール作成に着手した。

hTERT の正常冠状動脈内皮細胞への遺伝子導入は ICAM2 と VWF の発現低下に関与していた。

マウス ES 細胞から in vitro 分化誘導法により得られた巨核球と血小板はアスピリン存在下で ADP あるいはトロンビン刺激によるフィブリノーゲン結合が抑制された。

微量サンプルから microarray 解析を行うプロトコールを得た。

巨核球分化と血小板の産生機構にアポトーシス、caspase 活性化の関与が示唆された。

## F. 健康危険情報

現段階では上記の結果は実際の臨床の現場で疾病予防・治療に還元できるものではない。今後の更なる検討が必

要と考えられる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Matsubara Y, Murata M, Yoshida T, Watanabe K, Saito I, Miyaki K, Omae K, Ikeda Y. Telomere length of normal leukocytes is affected by a functional polymorphism of hTERT. *Biochem Biophys Res Commun.* 341 (2006) 128-131.

### 2. 学会発表

Yumiko Matsubara, Mitsuru Murata, Hidenori Suzuki, Tamihiko Kamata, Aya Shimizu, Andrew D Leavitt, Yasuo Ikeda. Ultrastructural evidences of caspase-dependent platelet generation in ES cell-differentiation system. 2005 47th The American Society of Hematology.

松原由美子、村田満、池田康夫. ヒトテロメラーゼ逆転写酵素の正常ヒト冠状動脈内皮細胞における役割: 2005 28<sup>th</sup> 日本血栓止血学会

## H. 知的所有権の取得

特許取得 なし

実用新案登録 なし

その他 なし

<研究成果の刊行に関する一覧>

「書籍」

松原 由美子 血栓症と遺伝子多型  
池田康夫 血栓症ナビゲーター メ  
ディカルレビュー社 東京 (2006)  
202-203

「雑誌」

松原 由美子 血栓症と遺伝子型につ  
いて 血栓と循環 13: 53-55 (2005)

松原 由美子、村田 満 アテローム  
破綻に血小板はどこまで関与してい  
るのか? *Vascular Medicine* 1: 58-64  
(2005)

松原 由美子、村田 満 総説—血栓  
形成の分子機構 血栓と循環 13:  
12-16 (2005)

厚生労働科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)  
分担研究報告書

全ゲノム解析による抗血小板薬の薬効を規定する遺伝子の同定

分担研究者 猪子 英俊 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

研究要旨

抗血小板薬への反応性の個体差の遺伝的要因を調べる為、我々が開発した3万個のマイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析により、抗血小板薬反応性(凝集能など定量的値)を指標にしたQTL (quantitative trait locus)マッピングを予定している。そのため、本年度はマイクロサテライトによるゲノムワイドなマッピングの基盤技術を完成させることを、目的とした。すなわち、1) 質量分析法によるマイクロサテライト多型検索のためのDNAチップ技術(MSチップ)の開発、2) ゲノムワイドな多型マイクロサテライト30,000個の設定と各対立遺伝子の頻度の検索に関する研究、3) 多型マイクロサテライトの抽出プログラムの作成とデータベースの構築に関する研究、を遂行し、疾患関連遺伝子をマッピングするための方法論を確立し、ゲノムワイドな解析に向けて一貫した流れの構築・システム化を行った。

A. 研究目的

抗血小板薬への反応性の個体差(responderとnon-responder)を規定している責任遺伝子を全ゲノムアプローチによるマッピング・同定することを計画している。具体的には、我々がヒトゲノム塩基配列より収集した、3万個の多型マイクロサテライト(1個/100kbの密度)を用いた相関解析によるマッピングを行い、責任遺伝子候補領域を100kb以内に絞り込む。この候補領域についてSNP(single nucleotide

polymorphism)解析および発現解析により責任遺伝子の同定を行い、抗血小板薬への反応性の機構を解明することが本研究の最終的な目的である。

このヒトゲノム多様性解析研究遂行のために、まず設定した多型マイクロサテライトマーカーを利用して、ゲノム上の組換え頻発部位、ハプロタイプ、多型のホットスポット、連鎖不平衡をしめす距離、脆弱部位、物理的距離と遺伝的距離との関係、日本人集団の遺伝的均質的な

どといった、マッピングの基礎となるゲノム上の遺伝学的知見を集積する。次にミニゲノム領域モデルとして3.6MbからなるHLA領域を選び、同領域に関連遺伝子を有する遺伝的複合性疾患のマッピングを行う。これにより疾患関連遺伝子をマッピングするための方法論を確立し、ゲノムワイドな解析に向けて一貫した流れの構築・システム化を目指す。

## B. 研究方法

1. 質量分析法によるマイクロサテライト多型検索のためのDNAチップ技術(MSチップ)の開発に関する研究:

マイクロサテライトのPCR産物について、MALDI-TOFMSを用いて質量測定を行った。高密度DNAチップの開発のため、インクジェット方式のスポットティングを行った。

2. ゲノムワイドな多型マイクロサテライト30,000個の設定と各対立遺伝子の頻度の検索に関する研究:

本研究への参加について同意を得られた日本人健常者100人(男性45人、女性55人)のボランティアより各10-20mlの末梢血を採取し、QIAamp DNA Blood Maxi Kit(QIAGEN)を用いてゲノムDNAの抽出・精製を行った。これらを鋳型にし、蛍光標識したプライマーセットによって

PCR増幅を行い、自動シーケンサーABI 3700または3730 DNA analyzerにて電気泳動により、多型検索を行った。また、相関解析のための日本人集団の遺伝的均一性に関する統計学的研究を行った。

3. 多型マイクロサテライトの抽出プログラムの作成とデータベースの構築に関する研究:

公開されている整列済みヒトゲノム配列データを利用して収集済み多型マイクロサテライトの位置を決定し、それまで未設定であった領域に効率よく設定が行えるよう、多型マイクロサテライトの抽出アルゴリズムを改良した。それらをもとに、多型マイクロサテライトデータベースの構築を試みみた。

(倫理面への配慮)

試料提供者には全て遺伝子研究に対する同意を得た上で、採血を行った。

## C. 研究結果と考察

1. 質量分析法によるマイクロサテライト多型検索のためのDNAチップ技術(MSチップ)の開発に関する研究:

ゲノムワイドに収集した約30,000個の多型マイクロサテライトについて、迅速なPCR増幅産物の分子量測定を可能とする、高密度にサンプルを搭載したMSチ

チップ作成のため、MALDI-TOFMS用サンプルを微小スポットに搭載するためのスポットティング条件を検討した結果、1,000スポット/cm画密度をもつチップの作製に成功した。また、この高密度MSチップ（微小スポット）におけるイオン化条件の検討を行っており、一部条件下において分子量の測定が可能となった。現在、これら高密度MSチップ搭載時の測定を自動的に行うにあたって、サンプルプレート動作制御を行う試作機器の開発を行っている。

MALDI-TOFMSの手法によってマイクロサテライトの多型を識別するために重要な、分解能向上のために、イオン化時に発生するフラグメンテーションを抑制する生化学的手法の検討をさらに推し進めた。これまで、同手法ではPCR増幅効率の低下が問題となる場合が認められたが、アニーリング温度の検討、使用酵素の検討により、通常の70%程度と、分子量測定に十分な増幅量が得られる温度条件を見出した。

## 2. ゲノムワイドな多型マイクロサテライト 30,000 個の設定と各対立遺伝子の頻度の検索に関する研究：

マイクロサテライトを検索するもととなる整列化ゲノム配列には、Human Genome Project の成果によ

るもの (GoldenPath (<http://genome.ucsc.edu/>)) を使用した。昨年度までに多型マイクロサテライトが設定できていない領域を検索し、それらのゲノム領域についてマイクロサテライトの検出、PCR増幅を行うためのプライマー設計を行った。

健常人血液サンプルを用いて遺伝子解析を実施するにあたっては、東海大学のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会で審査を受け、研究実施の承認を受けた上で、研究開発を行った。本研究への参加について同意を得られた日本人健常者 100 人（男性 45 人、女性 55 人）のボランティアより各 10~20 mL の末梢血を採取し、QIAamp DNA Blood Maxi Kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA の抽出・精製を行った。次に、昨年度と同様の手順にて DNA 定量及び混合 DNA (Pooled DNA) 溶液の調製を行った。この DNA サンプルについて、設計したプライマーセットによって PCR 増幅を行い、自動シーケンサーABI 3700 DNA analyzer にて電気泳動に供した。得られた蛍光シグナルの波形パターンから、各マイクロサテライトマーカーの多型有無を判定した。多型有りとは判定されたマーカーについては、検出されたピーク数より対立遺伝子数をカウントし、全ピークの高さの和に

対する各ピークの高さの比率から、推定対立遺伝子頻度及びヘテロ接合率を算出した。

これらの多型マイクロサテライトについては、随時整列化ゲノム配列上での位置を検索することによって、最新のゲノム配列における設定状況を反映しつつ新規設定作業を行えるものとした。現在、34,270個を収集することができた。

現在、ヒトゲノム上に多くの遺伝的多型マーカーが同定され、これを利用したゲノムワイド連鎖不平衡マッピングによって、多遺伝子性疾患関連遺伝子の同定が試みられようとしている。一方で、そのような解析に必須となる人類集団のゲノムワイドな遺伝的特性に関する知見は少なく、特に日本人など東アジア人は比較的均質な遺伝的背景を持つとされているが、詳細な情報は非常に少ない。そこで、本研究では、日本人、韓国人、ハルハモンゴル人、ヨーロッパ系アメリカ人の4集団について、Y染色体から26個、X染色体上から9個、常染色体上から24個の多型マイクロサテライトを用いて対立遺伝子頻度分布の比較を行い、集団の遺伝的特性に関する調査を行った。4集団間の対立遺伝子頻度分布の比較から、Y染色体26マーカーに関しては、日本人-韓国人集団間で有意差を示すマ

ーカーが8座位(30.8%)であったのに対し、他の集団ペア間では61.5-88.5%の座位で有意差が認められた。また、常染色体24マーカーにおいては、日本人-韓国人集団間で有意差を示すマーカーは1座位(4.2%)に過ぎなかったのに対し、他の集団ペア間では12.5-62.5%で有意差が認められた。これらの結果は、日本人集団と韓国人集団が互によく似た遺伝的組成を持つことを示唆する。

さらに、Y染色体マーカーを用いた系統解析から、日本人集団には、遺伝的に異なる複数の系統が含まれていることが示唆された。そこで、日本人集団についてはY染色体を用いた系統解析に基づいて集団をグループ分けし、常染色体マーカーの対立遺伝子頻度分布の違いを調べることで、集団内部の階層化の有無を検討した。その結果、日本人内部で観察されたY染色体の2系統間では、常染色体マーカー全てにおいて対立遺伝子頻度分布に有意差が認められなかった。このことは、少なくとも現在の日本人集団では遺伝的混合が十分になされており、集団の階層化は生じていないことを示唆する。

3. 多型マイクロサテライトの抽出プログラムの作成とデータベースの

#### 構築に関する研究：

平成14年度では、随時更新され、公開されている整列済みヒトゲノム配列データ（Human Genome Projectの成果）を利用して収集済み多型マイクロサテライトの位置を決定し、それまで未設定であった領域に効率よく設定が行えるよう、多型マイクロサテライトの抽出アルゴリズムを改良し、再び解析を行った。また、アルゴリズム改良により、これまでと比較して効率的かつ正確にマイクロサテライトの配列をゲノム配列上から抽出できるようになった。さらに、疾患解析時の実験情報、タイピング結果を格納し、統計的な解析手法が導入されたデータベースの構築を進めており、このようなシステムのデータベースによって大量のデータを効率的に管理・利用することが可能となっている。

#### D. 結論

抗血小板薬反応性（凝集能など定量的値）を指標にしたQTLマッピングのための、3万個のマイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析の準備が整った。

#### E. 健康危険情報

特記事項なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ando A, Shigenari A, Kulski JK, Renard C, Chardon P, Shiina T, Inoko H. Genomic sequence analysis of the 238-kb swine segment with a cluster of TRIM and olfactory receptor genes located, but with no class I genes, at the distal end of the SLA class I region. Immunogenetics in press.
- 2) Gourraud PA, Mano S, Barnetche T, Carrington M, Inoko H, Cambon-Thomsen A: Integration of microsatellite characteristics in the MHC region: a literature and sequence based analysis. Tissue Antigens 64: 543-555, 2004.
- 3) Matsuzaka Y, Okamoto K, Mabuchi T, Iizuka M, Ozawa A, Oka A, Tamiya G, Kulski JK, Inoko H: Identification, expression analysis and polymorphism of a novel RLTPR gene encoding a RGD motif, tropomodulin domain and proline/leucine-rich regions. Gene 343: 291-304, 2004.
- 4) Matsuzaka Y, Okamoto K, Mabuchi T, Iizuka M, Ozawa A, Oka A, Tamiya G, Kulski JK, Inoko H: Identification and characterization of novel variants of the thioredoxin reductase 3 new transcript



- TXNRD3NT1. *Mamm Genome* 16: 41-49, 2005.
- 5) Ando A, Ota M, Sada M, Katsuyama Y, Goto R, Shigenari A, Kawata H, Anzai T, Iwanaga T, Miyoshi Y, Fujimura N, Inoko H: Rapid assignment of the swine major histocompatibility complex (SLA) class I and II genotypes in Clawm miniature swine using PCR-SSP and PCR-RFLP methods. *Xenotransplantation* 12: 121-126, 2005.
  - 6) Shiina T, Dijkstra JM, Shimizu S, Watanabe A, Yanagiya K, Kiryu I, Fujiwara A, Nishida-Umehara C, Kaba Y, Hirono I, Yoshiura Y, Aoki T, Inoko H, Kulski JK, Ototake M: Interchromosomal duplication of major histocompatibility complex class I regions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a species with a presumably recent tetraploid ancestry. *Immunogenetics* 56: 878-893, 2005.
  - 7) Katoh T, Munkhbat B, Tounai K, Mano S, Ando H, Oyungerel G, Chae GT, Han H, Jia GJ, Tokunaga K, Munkhtuvshin N, Tamiya G, Inoko H: Genetic features of Mongolian ethnic groups revealed by Y-chromosomal analysis. *Gene* 346: 63-70, 2005.
  - 8) Suzuki K, Tanaka H, Sahara H, Tanaka N, Tamura Y, Naruse T, Inoko H, Tsushima K, Kubo K, Abe S, Sato N: HLA class II DPB1, DQA1, DQB1, and DRB1 genotypic associations with occupational allergic cough to Bunashimeji mushroom. *Tissue Antigens* 65: 459-466, 2005.
  - 9) Kikkawa EF, Tsuda TT, Naruse TK, Sumiyama D, Fukuda M, Kurita M, Murata K, Wilson RP, Lemaho Y, Tsuda M, Kulski JK, Inoko H: Analysis of the sequence variations in the Mhc DRB1-like gene of the endangered Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*). *Immunogenetics* 57: 99-107, 2005.
  - 10) Fukami-Kobayashi K, Shiina T, Anzai T, Sano K, Yamazaki M, Inoko H, Tateno Y: Genomic evolution of MHC class I region in primates. *Proc Nat Acad Sci USA* 102: 9230-923, 2005.
  - 11) Tamiya G, Shinya M, Imanish T, Ikuta T, Makino S, Okamoto K, Furugaki K, Matsumoto T, Mano S, Ando S, Nozaki Y, Yukawa W, Nakashige R, Yamaguchi D, Ishibashi H, Yonekura M, Nakami Y, Takayama S, Endo T, Saruwatari T, Yagura M, Yoshikawa Y, Fujimoto K, Oka A, Chiku S, Linsen SEV,

- Giphart MJ, Kulski JK, Fukazawa T, Hashimoto H, M Kimura, Hoshina Y, Suzuki Y, Hotta T, Mochida J, Minezaki T, Komai K, Shiozawa S, Taniguchi A, Yamanaka H, Kamatani N, Gojobori T, Bahram S, Inoko H: Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27,039 microsatellites. *Hum Mol Genetics* 14: 2305–2321, 2005.
- 12) Kulski JK, Anzai T, Inoko H: ERVK9, transposons and the evolution of MHC class I duplicons within the alpha-block of the human and chimpanzee. *Cytogenetic and Genome Research* 110: 181–192, 2005.
- 13) Shichi D, Kikkawa EF, Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Matsumori A, Kulski JK, Naruse TK, Inoko H: The haplotype block, NFKBIL1–ATP6V1G2–BAT1–MICB–MICA, within the class III – class I boundary region of the human major histocompatibility complex may control susceptibility to hepatitis C virus-associated dilated cardiomyopathy. *Tissue Antigens*. 66: 200–208, 2005.
- 14) Katoh T, Mano S, Munkhbat B, Tounai K, Oyungerel G, Chae GT, Han H, Jia GJ, Tokunaga K, Munkhtuvshin N, Tamiya G, Inoko H: Genetic features of Khoton Mongolians revealed by SNP analysis of the X chromosome. *Gene* 357: 95–102, 2005.
- 15) Itoh Y, Mizuki N, Shimada T, Azuma F, Itakura M, Kashiwase K, Kikkawa E, Kulski JK, Satake M, Inoko H: High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. *Immunogenetics* 57: 1–13, 2005.
- 16) Bahram S, Inoko H, Shiina T, Radosavljevic M: MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Curr Opin Immunol* 17: 505–509, 2005.
- 17) Kimura T, Yoshida K, Shimada A, Jindo T, Sakaizumi M, Mitani H, Naruse K, Takeda H, Inoko H, Tamiya G, Shinya M. Genetic linkage map of medaka with polymerase chain reaction length polymorphisms. *Gene* 363: 24–31, 2005
- 18) Ogawa Y, Kodama H, Kameyama K, Yamazaki K, Yasuoka H, Okamoto S, Inoko H, Kawakami Y, Kuwana M: Donor fibroblast chimerism in the pathogenic fibrotic lesion of human chronic graft-versus-Host disease. *Investigative Ophthalmology &*

- Visual Science 46: 4519-4527, 2005.
- 19) Kulski JK, Kenworthy W, Bellgard M, Taplin R, Okamoto K, Oka A, Mabuchi T, Ozawa A, Tamiya G, Inoko H: Gene expression profiling of Japanese psoriatic skin reveals an increased activity in molecular stress and immune response signals. *J Mol Med* 83: 964-975, 2005.
- 20) Mizutani A, Ostuka M, Kimira M, Tanaka M, Inoko H: An EYFP insertion mutant containing a modified lox sequence for potential use as a recombination indicator. *Nucleic Acid Symposium Series* 49: 297-298, 2005.
2. 学会発表
- 1) Shiina T, Goto RM, Inoko H, Miller MM: Contigs and sequences for B and Y regions of the chicken major histocompatibility complex. *Workshop on chicken genome & Development in Cold Spring Harbor Laboratory*, 2005.
- 2) Inoko H: A comprehensive methodology for whole genome association studies using microsatellites, *The 1st Annual Workshop on the Genetics, Genomics & Bioinformatics of Microsatellites & VNTRs*, 2005.
- 3) Inoko H: Genome-wide association analysis using 30,000 microsatellites for identification of common disease genes. *21th century human being and health forum・Harping*, 2005.
- G. 知的財産権の出願・登録状況など
1. 特許出願
- 1) 発明の名称: 高血圧症の検査用マーカー遺伝子
- ① 発明者: 猪子英俊、水木信久、岡晃、梅村敏、三木哲郎
- ② 出願日: 2005年8月21日
- ③ 出願人: 東海大学、横浜市立大学、愛媛大学
- ④ 国内出願番号: 2005-267657
- 2) 発明の名称: 関節リウマチ検査用マーカー遺伝子
- ① 発明者: 田宮元、猪子英俊、五條堀隆
- ② 出願日: 2005年3月29日
- ③ 出願人: 猪子英俊、東海大学
- ④ 国際出願番号: PCT/JP2005/5904
2. 実用新案登録  
登録はなし
3. データベース/ソフトウェア
- 1) 3万個のマイクロサテライトの位置、PCRプライマー、多型頻度などの情報に関するデータベース  
<http://www.jbirc.aist.go.jp/gd>

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

「脳梗塞再発予防における抗血小板薬のエビデンスの検討」

分担研究者 鈴木則宏 慶応義塾大学医学部内科教授  
研究協力者 星野晴彦 慶応義塾大学医学部内科専任講師

研究要旨

TIA と脳梗塞に関して、抗血小板薬（通常はアスピリン）は、平均 29 ヶ月の観察で虚血性脳卒中、心筋梗塞、血管死亡の発症を 22% 軽減する。しかし、その絶対値は 1000 例 3 年間の治療により非致死性脳卒中の再発を 25 軽減させるにすぎない。ADP 受容体阻害薬、PDE 阻害薬など、アスピリンとは別の機序による抗血小板薬はアスピリンよりも臨床的な有効性が高いことが報告されてきている。アスピリンに反応性の低い症例の存在が注目されているが、症例毎の抗血小板薬の選択、また、作用機序の異なった抗血小板薬の併用が期待される。

A. 研究目的

脳梗塞患者における抗血小板薬の反応性を検討するにあたり、これまでに報告された脳梗塞の再発予防に対する抗血小板薬の臨床的な効果のエビデンスを明らかにすること。

B. 研究方法

脳梗塞に対する抗血小板薬の臨床試験結果の報告を文献検索し、それぞれの薬剤について臨床的な有効性を調査検討した。

<倫理面への配慮>

既に文献として公表された内容であり、倫理的な問題はない。

C. 研究結果

1. 抗血小板薬全体のメタアナリシス

Antithrombotic Trialists' Collaboration (ATT) によるメタアナリシスの結果では、TIA と脳梗塞に関して、21 の randomized control の臨床試験、23000 例の解析が行われ、抗血小板薬（通常はアスピリン）とプラセボとの比較では、平均 29 ヶ月の観察で虚血性脳卒中、心筋梗塞、血管死亡を合わせた発症率は 17.8% 対 21.4% であり、統計学的に有意な 22% のオッズ比の低下 ( $p < 0.001$ ) が認められた。つまり、1000 例 3 年間の治療により非致死性脳卒中の再発は 25 ( $p < 0.0001$ )、非致死性心筋梗塞は 6 ( $p = 0.0009$ )、血管死亡率は 7 ( $p = 0.04$ ) の減少が得られている<sup>1</sup>。

## 2. アスピリン

プラセボと比較したメタアナリシスによると、TIA や脳梗塞の既往例において、血管性死亡と心筋梗塞と脳卒中を合わせた相対的な危険率低下は13% (6-19) であった<sup>2</sup>。1次予防まで含めたアスピリン投与全体の16の臨床試験、55462例の解析からは、平均273mg/日、37ヶ月間の内服により、脳梗塞は10000例あたり39 (17-61,  $p < 0.001$ ) イベントの低下が得られるが、脳出血は3年間の治療により10000例あたり12 (5-20) イベント、つまり年間1000例あたり0.4例の脳出血 ( $p < 0.001$ )、別の見方では3年間833例の治療で1例の脳出血の発症の危険性があることが報告されている<sup>3</sup>。

## 3. ADP 受容体阻害薬

Thienopyridine であるチクロピジンとクロピドグレルはADP受容体阻害薬であり、P2Y<sub>12</sub>を遮断する薬剤である。4つのトライアルをまとめた血管病変を持つ高危険群22566例のメタアナリシスによれば、Thienopyridineはアスピリンよりも有効性が高く、脳卒中+心筋梗塞+血管性死亡を9%減少させた(オッズ比0.91, 0.84-0.98,  $2p = 0.01$ )。つまり、2年間の治療で1000人あたり11 (2-19) 多くのイベントを予防することができた。脳卒中の発症はThienopyridine群5.7%, ア

スピリン群6.4%でそのオッズ比は0.88 (0.79-0.98)であり、2年間に1000名の治療により7 (1-13) 多くの脳卒中イベントを予防できることが示された。他の転帰のオッズ比は、虚血性および不明の脳卒中0.90 (0.81-1.01), 心筋梗塞0.88 (0.76-1.01), 血管性および原因不明の死亡0.93 (0.82-1.06), 全死亡0.95 (0.85-1.05)であり、差はなかった。22566例のうち9840例がTIA/脳梗塞の既往例であり、この群のみの解析では、脳卒中の発症率は10.4%対12.0%であり、Thienopyridine群の方がオッズ比にして0.86 (0.75-0.97)と有意に発症を抑制し、2年間1000例の治療により14 (-1から29) 多くのイベントを予防できることが示されている<sup>4</sup>。

### チクロピジン (Ticlopidine)

TIAまたは脳卒中の既往のある1072例でプラセボとチクロピジン500mg/日を投与し、平均24ヶ月の比較試験 (CATS: Canadian American Ticlopidine Study) のintention-to-treat解析によると、脳卒中と心筋梗塞と血管死亡を合わせた転帰が11.3%対14.0%で、23%の危険率低下 ( $p = 0.02$ ) が得られた<sup>5</sup>。さらに、TIAまたは軽症脳卒中3069例でチクロピジン500mg/日とアスピリン1300mg/日投与3年間の経過観察での比較試験

(TASS: Ticlopidine Aspirin Stroke Study)でも、非致死性脳卒中または死亡が17%対19%で12%の危険率低下(-2から26,  $p=0.048$ )。致死性および非致死性脳卒中が10%対13%で21%(4-38)の危険率の有意な低下( $p=0.024$ )であった<sup>6</sup>。しかし、その一方で、白人よりも日本人に体質が近いと考えられる黒人を対象として、非心原性脳梗塞1809人にチクロピジン500mg/日とアスピリン650mg/日を中央値で710日あまり経過観察した結果では、脳卒中再発+心筋梗塞+血管性死亡は、チクロピジン群14.7%、アスピリン群12.3%でオッズ比は1.22(0.94-1.57)と差を認めず、2次エンドポイントである致死性および非致死性脳卒中はKaplan-Meierの解析ではアスピリン群で発症が少ない傾向( $p=0.08$ )であり<sup>7</sup>、チクロピジンのアスピリンを上回る有効性は認められなかった。

#### クロピドグレル (Clopidogrel)

CAPRIE (Clopidogrel versus Aspirin in Patients At Risk of Ischaemic Events)では、19185例の最近の虚血性脳卒中やその他のアテローム硬化性疾患を有する患者を対象とし、平均1.91年の経過観察で、アスピリン325mg/日よりクロピドグレル75mg/日の方が虚血性脳卒中や血管イ

イベントを軽減することが示された。血管性死亡、脳卒中、心筋梗塞を合わせたエンドポイントの年間発症率は、クロピドグレル群5.32%、アスピリン群で5.83%であり、この結果、8.7%(0.3-16.5)の相対的な危険率低下、0.51%の絶対危険率低下が認められた( $p=0.043$ )。症例の血管病変毎の解析では、脳梗塞例ではクロピドグレル群7.15%、アスピリン群で7.71%であり、相対的危険率低下は7.3%(-5.7から18.7  $p=0.26$ )であった<sup>8</sup>。

#### 4. Phosphodiesterase (PDE) 阻害薬

血小板にはPDE3AとPDE5が主として存在し、PDE3AはcAMP分解酵素、PDE5はcAMPよりcGMPを主として分解する酵素である。これらPDEを阻害することにより抗血小板機能が発揮される。

#### ジピリダモール (Dipyridamole)

PDE5を抑制して血小板内のcGMP濃度を上昇させるのみならず、赤血球から産生されたアデノシンの再取り込みを抑制することにより抗血小板機能を発揮する。Cochraneのメタアナリシスでは26の臨床試験、19842症例の検討が行われ、致死性および非致死性血管イベントはジピリダモールとプラセボの比較で相対危険率0.90(0.83-0.98)、アスピリンとの併

用対アスピリン単独の比較では 0.90 (0.80-1.00), アスピリンとの併用対プラセボで 0.74 (0.68-0.80) であった<sup>9</sup>.

#### シロスタゾール (Cilostazol)

シロスタゾールは血小板中の PDE3A を特異的に強力に阻害することにより, 細胞内 cAMP 濃度を増加させ血小板機能を抑制する.

脳梗塞への臨床試験としては, 発症 1-6 ヶ月の脳梗塞 1095 例を対象とし, シロスタゾール 200mg/日とプラセボを比較した CSPS (Cilostazol Stroke Prevention Study) が本邦で行われた. その結果, 脳梗塞の年間発症率はシロスタゾール群 3.37%, プラセボ群 5.78% と相対的危険率は 41.7% (9.2-62.5) の減少であった. この CSPS の特徴として, 登録された脳梗塞の約 3/4 はラクナ梗塞であったこと, 致死性頭蓋内出血はシロスタゾール群では 1 例もなく, プラセボ群 1 例で, 頭蓋内出血性合併症が少なかったことであった<sup>10</sup>. また, CSPS の後解析で, 糖尿病患者においても非糖尿病患者と同様に再発予防効果があることが報告されている.

#### 5. 抗血小板薬の併用療法

##### アスピリン+クロピドグレル

MATCH (Management of Atherothrombosis with Clopidogrel in

High-risk patients) では, 40 歳以上の 3 ヶ月以内に TIA か虚血性梗塞の既往を有する 7599 例を対象として, 18 ヶ月間経過観察され, 併用群とクロピドグレル単独群との比較が行われた. 心筋梗塞+脳梗塞+血管性死亡+虚血性イベントによる再入院が併用群 15.7%, 単独群 16.7% で, 絶対危険率低下 1.0%(0.6-2.7), 相対危険率低下 6.4%(-4.6 から 16.3%, p=0.24)であった. 大出血が 2%対 1% (p<0.001), 命に関わるような出血イベントが 2.6% 対 1.3% で絶対危険率 1.3%(0.6-1.9, p<0.001)の増加, 出血全体としては, 1.15 倍 (1.01-1.30, p=0.03), 絶対危険率増加 1.7%であった<sup>11</sup>. MATCH では血管イベントの危険因子を有する症例が登録された結果, 糖尿病 68%, 高血圧 78% と small-vessel のイベント 52%の症例が組み込まれており, 出血性合併症が多かった原因かもしれないと考えられている. MATCH の結果から重要なのは, 早期の投与の有効性が高いことが示されたことであり, 単独群と比べて 7 日以内に組み込まれた患者では絶対危険率が 3.1%併用群で減少しており, 7-31 日に投与された群の 1.4%, 1 ヶ月以後に組み込まれた群-0.6%と比較して有効性が高い傾向があった. 脳出血の危険性が高くなるのは 3 ヶ月以後だけであることから, 超早期の再

発予防のための治療として有効な可能性がある<sup>11,12</sup>.

#### アスピリン+長時間作用型ジピリダモール

6602 人に低用量アスピリン 50mg/日と徐放型ジピリダモール 400mg/日を投与した ESPS-2 (European Stroke Prevention Study 2) では、脳卒中と TIA はアスピリン群ではプラセボ群と比べて 18%, 徐放型ジピリダモール群はプラセボ群と比べて 16%, 併用群はプラセボ群と比べて 37%の低下が認められた ( $p<0.05$ ). 全体の出血及び消化管出血は、プラセボ群あるいは徐放型ジピリダモール群に比較してアスピリン群で明らかに多かったが、アスピリン群と比べると併用群では統計学的に有意な増加は認められなかった<sup>13</sup>.

ATT の解析ではアテローム硬化疾患のある 10404 例、25 の臨床試験でアスピリン単独と併用での比較では、非致死性脳卒中、心筋梗塞、血管死亡は 11.8% 対 12.4%, オッズ比 0.95 (0.86-1.05  $p=0.32$ ) で 0.6%の危険率低下にすぎなかった<sup>1</sup>. この結果と ESPS-2 の結果の差は ESPS-2 で用いられたのが徐放剤であったためかもしれないと説明されている.

#### アスピリンとシロスタゾールの併

用

TOSS (Treatment on Symptomatic Intracranial Stenosis) では、症候性の頭蓋内狭窄 160 例についてアスピリン 100mg とシロスタゾール 200mg かプラセボを 6 ヶ月間投与し、狭窄病変の変化について検討された. 狭窄進行は MRA で 6.7% 対 28.8%, 経頭蓋超音波検査法 (TCD) で 2.4% 対 25.5% と有意に少なかった. 狭窄が退縮改善したのは、MRA で 24.2% 対 15.4%, TCD で 28.6% 対 15.7% とシロスタゾール群で狭窄の改善率が高い結果であった<sup>14</sup>. このことは、シロスタゾールが抗血小板作用ばかりでなく、平滑筋細胞増殖抑制作用など多面的な作用を持っていることを臨床的に示しているものと考えられる.

#### アスピリンとクロピドグレルとシロスタゾールの併用

3 者の併用に関しては、冠動脈疾患を対象とした CREST (Cilostazol Restenosis Trial) が報告されている. 705 例の PCI 後にアスピリンとクロピドグレルに加えてシロスタゾールかプラセボを投与したところ、6 ヶ月間の追跡調査ではセグメントとステント部の再狭窄率は有意に低く、有効であった. 脳血管障害に関する 3 者併用の有効性はまだ明らかではない.

#### D. 考察と結論



本邦の脳卒中ガイドラインにおいては、脳梗塞急性期のアスピリン投与と慢性期の抗血小板薬投与は、臨床的なエビデンスのあるグレード A で推奨されている<sup>15</sup>。統計学的に有意な有効性ではあるが、これまで述べてきたように絶対値からすると決して十分な効力とはいえない。

アスピリン以外の抗血小板薬に関してはアスピリンを上回る有効性が認められているものもあるが、その有効性もわずかである。

血小板への作用機序は、各薬剤でそのターゲットとなる部分が異なっていることから、併用により、抗血小板機能が增強されるが、併用療法に関しては臨床的なエビデンスは不十分であり、MATCH にみるように、むしろ出血性合併症が増加した結果、臨床的な有用性が示されていないのが現状である。

#### E. 文献

1. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Bmj*. 2002;324:71-86.
2. Algra A, van Gijn J. Cumulative meta-analysis of aspirin efficacy after cerebral ischaemia of arterial origin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999;66:255.
3. He J, Whelton PK, Vu B, Klag MJ. Aspirin and risk of hemorrhagic stroke: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Jama*. 1998;280:1930-1935.
4. Hankey GJ, Sudlow CL, Dunbabin DW. Thienopyridines or aspirin to prevent stroke and other serious vascular events in patients at high risk of vascular disease? A systematic review of the evidence from randomized trials. *Stroke*. 2000;31:1779-1784.
5. Gent M, Blakely JA, Easton JD, et al. The Canadian American Ticlopidine Study (CATS) in thromboembolic stroke. *Lancet*. 1989;1:1215-1220.
6. Hass WK, Easton JD, Adams HP, Jr., et al. A randomized trial comparing ticlopidine hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high-risk patients. Ticlopidine Aspirin Stroke Study Group. *N Engl J Med*. 1989;321:501-507.
7. Gorelick PB, Richardson D, Kelly M, et al. Aspirin and ticlopidine for prevention of recurrent stroke in black patients: a randomized trial. *Jama*. 2003;289:2947-2957.
8. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic

- events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet*. 1996;348:1329-1339.
9. De Schryver ELLM, Algra A, van Gijn J. Dipyridamole for preventing stroke and other vascular events in patients with vascular disease *The Cochrane Database of Systemic Reviews 2003 Issue 1*. Art. No.:CD001820. DOI: 10.1002/14651858.CD001820; 2003.
10. Gotoh F, Tohge H, Hirai S, et al. Cilostazol Stroke Prevention Study: A placebo-controlled double-blind trial for secondary prevention of cerebral infarction. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2000;9:147-157.
11. Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM, et al. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2004;364:331-337.
12. Rothwell PM. Lessons from MATCH for future randomised trials in secondary prevention of stroke. *Lancet*. 2004;364:305-307.
13. Diener HC, Cunha L, Forbes C, Sivenius J, Smets P, Lowenthal A. European Stroke Prevention Study. 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke. *J Neurol Sci*. 1996;143:1-13.
14. Kwon SU, Cho YJ, Koo JS, et al. Cilostazol prevents the progression of the symptomatic intracranial arterial stenosis: the multicenter double-blind placebo-controlled trial of cilostazol in symptomatic intracranial arterial stenosis. *Stroke*. 2005;36:782-786.
15. 脳卒中治療ガイドライン委員会. *脳卒中治療ガイドライン2004*. 東京: 協和企画; 2004.
- F. 健康危険情報  
 文献調査であり、健康危険情報に該当するものではない。
- G. 研究発表  
 なし
- H. 知的財産権の出願・登録  
 なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Tamiya G, Shinya M, Imanish T, Ikuta T, Okamoto K, Matsumoto T, Mano S, Nozaki Y, Ishibashi H, Yonekura M, Nakami Y, Endo T, Oka A, Gojobori T, Bahram S, Inoko H	Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27,039 microsatellites.	<i>Hum Mol Genetics</i>	14	2305-2321	2005
Kulski JK, Kenworthy W, Bellgard M, Taplin R, Okamoto K, Oka A, Mabuchi T, Ozawa A, Tamiya G, Inoko H	Gene expression profiling of Japanese psoriatic skin reveals an increased activity in molecular stress and immune response signals	<i>J Mol Med</i>	83	964-975	2005
Matsuzaka Y, Okamoto K, Mabuchi T, Iizuka M, Ozawa A, Oka A, Tamiya G, Kulski JK, Inoko H	Identification and characterization of novel variants of the thioredoxin reductase 3 new transcript TXNRD3NT1	<i>Mamm Genome</i>	16	41-49	2005
Yumiko Matsubara, Mitsuru Murata, Tadashi Yoshida, Kiyooki Watanabe, Ikuo Satio, Koichi Miyaki, Kazuyuki Omae, Yasuo Ikeda	Telomere length of normal leukocytes is affected by a functional polymorphism of hTERT	<i>Biochem &amp; Biophys Res Commun</i>	341	128-131	2006
Shigeaki Suzuki, Toru Yamashita, Kortaro Tanaka, Hidenori Hattori, Kazunobu Sawamoto, Hideyuki Okano, Norihiro Suzuki	Activation of cytokine signaling through leukemia inhibitory factor receptor (LIFR)/gp130 attenuates ischemic brain injury in rats	<i>J of cerebral Blood Flow &amp; Metablism</i>	25	685-693	2005
Minoru Tomita, Istvan Schiszler, Yutaka Tomita, Norio Tanahashi, Hidetaka Takeda, Takashi Osada, Norihiro Suzuki	Initial oligemia with capillary flow stop followed by hyperemia during K <sup>+</sup> -induced cortical spreading depression in rats	<i>J of cerebral Blood flow &amp; metablism</i>	25	742-747	2005