

(1) 抗血小板薬に対する responder、non-responder における

microarray 解析：平成 16 年、17 年の検討結果は *in vitro* アスピリン添加の条件下における PFA-100®を用いた解析でその感受性にバラつきが認められること、そのアスピリンに対する good responder 群と poor responder 群に分け microarray を用いた約 11,000 種類の遺伝子多型を網羅的に解析することによりその感受性に強く関与する遺伝子多型を検出した。今回は対象を抗血小板薬服用者とした。同様の網羅的解析を行い平成 17 年度、18 年度のいずれの解析においてもアスピリンの感受性との関連を示したのは Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1、Mannosidase alpha、Potassium voltage-gated channel 1、Tumor protein D52、p53-inducible protein、SLIT and NTRK-like family member 4 であった。これら全て、アスピリンの感受性との関連性について初めての報告であるが、アスピリンの作用機序にこれら因子が直接関連していることを示す報告はまだ無く今後、これら関係の機序を考察するための実験検討を行いたい。

(2) 血小板膜受容体 GPIb alpha の遺伝子多型が血小板のアスピリン反応

性に及ぼす影響：血小板膜受容体は血小板の機能発現において重要な役割を演じている。それらの中でも GPIa、GPIIIa、そして GPIb alpha は「血栓症の危険因子」や「血小板機能」に関連する遺伝子多型を有することが報告されている。最近では、これら多型が「抗血小板薬の有用性にも関連するのでは？」と考えられデータの蓄積が期待されている。これら多型の中で一番多数の研究報告があるのは GPIIIa の多型であるが、この多型には民族差があり、日本人ではこの多型はほとんど見られない。GPIa の遺伝子多型についても抗血小板薬の反応性との検討報告があるが結果の一致をみていない。GPIb alpha は GPIa、GPIIIa とともに動脈血栓形成において重要な働きを有している。GPIb alpha の -5T/C、145Thr/Met とこれに連鎖する反復配列の多型はこれまでに動脈血栓症との関連や GPIb alpha 膜発現量、血小板機能との関連が示されている。本研究において平成 16 年度に 145Thr/Met とこれに連鎖する反復配列の多型の組換え蛋白を培養細胞に発現させて、流動状態下、リガンドである von Willebrand factor (VWF) との反応性を検討した。その結果、この多型が VWF との反応性に関与することを示した。今回、

145Thr/Met がアスピリン反応性と関係することを見いだした。これまでの報告では-5T/C とアスピリン反応性を検討し、「関連なし」と結論した報告があり、これは今回の研究結果と一致する。145Thr/Met に関しては初めての報告となる。今後、抗血小板薬服用者を対象に GPIb alpha と抗血小板療法の効果を前向き研究で検討したい。

E. 結論

抗血小板薬の反応性に関係すると考えられる因子について網羅的検討あるいは候補アプローチを行った。PFA-100®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討した結果、Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1、Mannosidase alpha、Potassium voltage-gated channel 1、Tumor protein D52、p53-inducible protein、SLIT and NTRK-like family member 4 の遺伝子多型を検出した、GP Ib alpha の 145Thr/Met 遺伝子多型が血小板のアスピリン反応性と関連することを見いだした。

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

Yumiko Matsubara, Mitsuru Murata, Kiyooki Watanabe, Ikuo Saito, Koichi Miyaki, Kazuyuki Omae, Mie Ishikawa, Kenichi Matsushita, Shiro Iwanaga, Satoshi Ogawa, Yasuo Ikeda: Coronary artery disease and a functional polymorphism of hTERT. *Biochem Biophys Res Commun.* 348: 669-672, 2006.

Mariko Yabe, Yumiko Matsubara, Shinichi Takahashi, Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano, Koichi Miyaki, Kazuyuki Omae, Gentaro Watanabe, Mitsuru Murata, Yasuo Ikeda: Identification of ADRA2A polymorphisms related to shear-mediated platelet function. *Biochem Biophys Res Commun,* 347: 1001-1005, 2006.

Hiroko Nishida, Mitsuru Murata, Koichi Miyaki, Kazuyuki Omae, Kiyooki Watanabe, Yasuo Ikeda : Gorog Thrombosis Test:analysis of factors influencing occlusive thrombus formation. *Blood Coagul Fibrinolysis,* 17 : 203-207, 2006.

Hidenori Hattori, Akira Sonoda, Hideki Sato, Daisuke Ito, Norio Tanahashi, Mitsuru Murata, Ikuo Saito, Kiyooki Watanabe, Norihiro Suzuki : G501C polymorphism of oxidized LDL receptor gene(OLR1)and ischemic stroke.

BRAIN RESEARCH, 11121: 246-249, 2006

Rina Kimura, Shigenori Honda, Tomio Kawasaki, Hajime Tsuji, Seiji Madoiwa, Yoichi Sakata, Tetsuhito Kojima, Mitsuru Murata, Kazuhiro Nishigami, Masaaki Chiku, Tokio Hayashi, Yoshihiro Kokubo, Akira Okayama, Hitonobu Tomoike, Yasuo Ikeda, Toshiyuki Miyata. Protein S K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese. Blood 107: 1737-1738, 2006

Shinichi Takahashi, Miho Ushida, Risa Komine, Aya Shimizu, Toshihiro Uchida, Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano, Gentaro Watanabe, Yasuo Ikeda, Mitsuru Mitara. Increased basal platelet activity, plasma adiponectin levels, and diabetes mellitus are associated with poor platelet responsiveness to in vitro effect of aspirin. Thromb Res, 119: 517-524, 2007

2. 学会発表

松原由美子、村田満、吉田正、渡邊

清明、斎藤郁夫、宮木幸一、大前和幸、池田康夫：白血球テロメア長に
関係するヒトテロメラーゼ逆転写酵
素(hTERT)の遺伝子多型：2006 68回
日本血液学会

松原由美子、鈴木英紀、清水綾、横
山健次、村田満、池田康夫：超微細構
造像が示す *in vitro* 巨核球分化・血
小板産生：2006 29th 日本血栓止血学
会

牛田美穂、松原由美子、高橋信一、
石原宏朗、芝野俊郎、渡辺徹太郎、
池田康夫、村田満：コラーゲン受容体
遺伝子多型とアスピリンによる血小
板機能抑制：2006 29th 日本血栓止血
学会

磯部浩二、松原由美子、高橋信一、
内田敏弘、石原宏朗、芝野俊郎、石
川美江、松下健一、岩永史郎、小川
聡、渡辺徹太郎、池田康夫、村田満：
P2Y12 受容体遺伝子多型は冠状動脈疾
患リスクと関連する：2006 29th 日本
血栓止血学会

矢部麻里子、松原由美子、高橋信一、
石原宏朗、芝野俊郎、宮木幸一、大
前和幸、渡辺徹太郎、村田満、池田
康夫：Alpha 2A adrenergic receptor
遺伝子多型と血小板機能：PFA-100®

による検討: 2006 29th 日本血栓止血学会

Miho Ushida, Yumiko Matsubara, Shinichi Takahashi, Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano, Gentaro Watanabe, Yasuo Ikeda, Mitsuru Murata: Enhancing effect of collagen receptor polymorphisms on *in vitro* platelet reactivity to aspirin in healthy subjects: 2006 48th The American Society of Hematology. Blood (supl) 327a.

Mariko Yabe, Yumiko Matsubara, Shinichi Takahashi, Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano, Koichi Miyaki, Kazuyuki Omae, Gentaro Watanabe, Mitsuru Murata, Yasuo Ikeda: Identification of ADRA2A polymorphisms related to shear-mediated platelet function by the PFA-100[®] system: 2006 48th The American Society of Hematology. Blood (supl) 55b.

Koji Isobe, Yumiko Matsubara, Shinichi Takahashi, Toshihiro Uchida, Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano, Mie Ishikawa, Kenichi Matsushita, Shiro Iwanaga, Satoshi Ogawa, Gentaro Watanabe, Yasuo Ikeda, Mitsuru Murata: The genotype combination of the P2Y₁₂ gene might confer greater risk for coronary artery disease: 2006 48th The American

Society of Hematology. Blood (supl) 424a.

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>

「雑誌」

村田 満: アスピリンレジスタンスの臨床的意義とその分子基盤 炎症と免疫 vol.14 no.3 2006

村田 満: アスピリン抵抗性 International Review of Thrombosis Vol.1 No.3,2006

横山 健次、村田 満: 大規模臨床試験で示されたアスピリンの有用性 3 日本人におけるアスピリンのエビデンスの構築「治療学」Vol.40 no.3, 2006

松原由美子、村田満: 危険因子としての遺伝的背景、成人病と生活習慣病 36: 230-233, 2006.

村田 満: 遺伝子多型検査は医療に貢献するか?、日本臨床検査専門医学会 24: 97-101, 2006

「書籍」

村田 満: 血小板GP I b/IX/V受

容体『血栓症ナビゲーター』メディ
カルレビュー社, 82-83, 2006

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

「慢性期脳梗塞における抗血小板薬の検討と前向き調査研究の確立」

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

研究要旨

慢性期脳血管障害患者における抗血小板薬の反応性と再発予防効果を検討するための観察集団を登録した。平成18年5月より12月までの間に神経内科専門外来にて通院中の脳血管障害患者のうち抗血小板薬を内服している患者を対象とし、血小板機能の測定と遺伝子多型の研究の同意を得た症例を観察集団として登録を行った。登録されたのは128例であり、男性の割合が69.8%、平均年齢は68.4±10.1歳。臨床病型としては、TIA 10.9%、Branch Atheromatous Disease 3.1%、アテローム血栓性脳梗塞 8.6%、ラクナ梗塞 37.5%、心原性脳塞栓症 0.8%、その他の脳梗塞（病型不明を含む）15.6%、無症候性脳梗塞 22.7%、血管奇形による脳静脈洞血栓症 0.8%であった。抗血小板薬の内服状況はアスピリンとチクロピジン、シロスタゾールの3者に関しては、1剤のみ内服例が90.6%と最も多く、2剤内服が8.6%、3者併用例が1例であった。PFA-100による血小板機能の測定ではCEPI closing timeが正常値の上限以下である症例は22例（27.5%）、CADP closing timeが正常値の上限以下である症例は56例（70.0%）であり、両者ともに正常値の上限以下である症例は21例（26.3%）であった。アスピリン単独内服症例のうちCEPI closing timeが正常値の上限以下である症例は9.3%であった。今後、登録された症例を経時的に経過観察し、抗血小板内服中の血小板機能と臨床的な再発予防効果を検討していく予定である。

A. 研究目的

慢性期脳血管障害患者における抗血小板薬の反応性と再発予防効果を検討するための観察集団を確立する

B. 研究方法

平成18年5月より12月までの間に神経内科専門外来にて通院中の脳血管障害患者のうち抗血小板薬を内服している患者を対象とし、血小板機能の測定と遺伝子多型の研究の同意を得た症例を観察集団として登録を行った。なお、血小板機能の測定のため抗凝固薬内服症例は除外した。登録された症例についてその背景と抗血小板薬の内服内容、測定された血小板機能の結果を解析した。

〈倫理面への配慮〉

本研究は倫理審査委員会にて承認を得た後、研究への参加に関しては、研究の目的、方法、個人情報管理について患者本人に説明し、文書による同意を得ており、倫理的な問題はない。

C. 研究結果

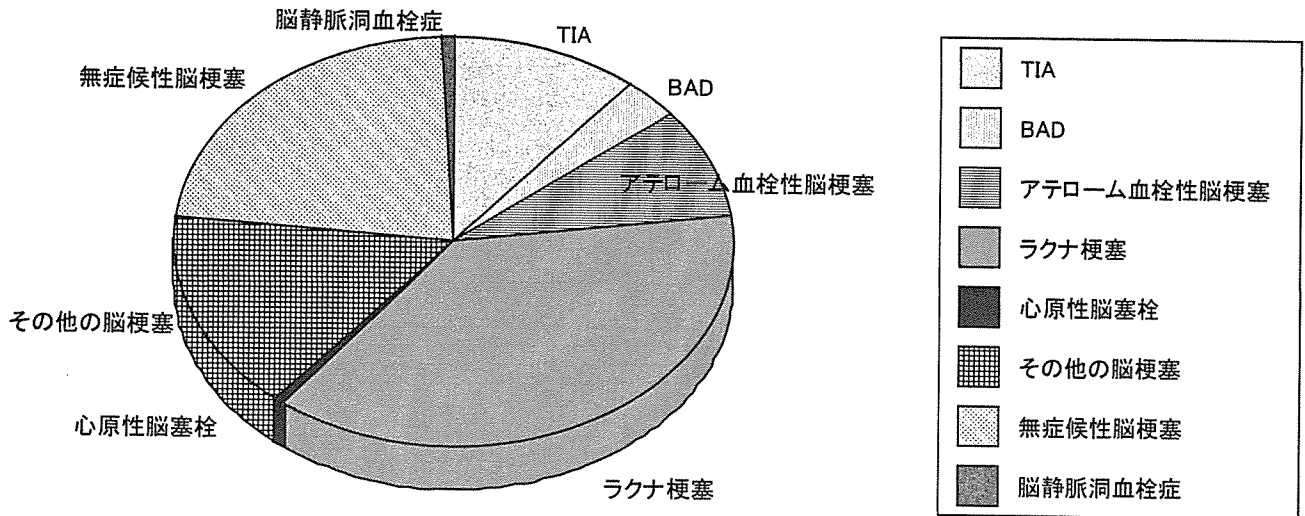
平成18年5月より12月までの間に血小板機能の測定と遺伝子多型の研究の同意が得られ、登録されたのは128例であった。

1. 全症例の臨床的背景（表1）

128例の全体の臨床的背景としては、性別は男性の割合が69.8%、平均年齢は68.4 ±10.1歳。慢性期脳血管障害の臨床

病型は、TIA 14 例 (10.9%), Branch Atheromatous Disease (BAD) 4 例 (3.1%), アテローム血栓性脳梗塞 11 例 (8.6%), ラクナ梗塞 48 例 (37.5%), 心原性脳塞栓症 1 例 (0.8%), その他の脳梗塞 (病型不明を含む) 20 例 (15.6%), 無症候性脳梗塞 29 例 (22.7%), 血管奇

形による脳静脈洞血栓症 1 例 (0.8%) であった。危険因子及び合併症の割合は、高血圧 69.0%, 糖尿病 23.4%, 高脂血症 60.2%, BMI 25 以上の肥満 20.3%, 喫煙習慣 17.9%, 飲酒習慣 45.6%, 心房細動 2.3%, 冠状動脈疾患 8.7%, 閉塞性動脈硬化症 3.2% であった。



2. 臨床病型別の背景 (表 1)

性別では TIA と無症候性脳梗塞で女性の割合が多く、年齢に関しては「その他の脳梗塞」例で統計学的に有意に年齢が若かった。危険因子に関しては、高血圧に関して、TIA とその他の脳梗塞および無症候性脳梗塞例で高血圧の割合が低い傾向を認めた。その他の危険因子に関しては症例数が少なく明らかな差は認められなかった、2 回以

上の脳卒中の既往を認める症例はラクナ梗塞とその他の脳梗塞例、TIA 例であった。脳卒中の発作から登録までの期間は最初の発作も最終発作に関しても BAD とラクナ梗塞で短かった。脳出血の既往例が 3 例含まれていたが、脳梗塞及び無症候性脳梗塞のため再発予防が必要と考えられ、抗血小板薬が処方されていた。

表 1. 対象症例の臨床病型別の背景

症例数	全体	TIA	BAD	ATI	ラクナ	CE	病型不明脳梗塞	無症候性脳梗塞	脳静脈洞血栓症
	128	14	4	11	48	1	19	30	1
男/女 (男の割合)	90/39 (69.8%)	8/6 (57.1%)	3/1 (75.0%)	9/2 (81.8%)	37/11 (77.1%)	0/1	16/3 (84.2%)	15/15 (50.0%)	1/0
年齢 (平均±標準偏差) : 年	68.4±10.1	68.6±2.6	64.8±4.8	74.0±2.9	69.1±1.4	65	61.2±2.2	70.2±1.8	82
高血圧	89/40 (69.0%)	9/5 (64.3%)	4/0 (100.0%)	10/1 (90.9%)	37/11 (77.1%)	0/1	11/8 (57.9%)	16/14 (53.3%)	1/0
糖尿病	30/98 (23.4%)	2/12 (14.3%)	1/3 (25.0%)	1/10 (9.1%)	12/36 (25.0%)	0/1	6/13 (31.6%)	8/22 (26.7%)	0/1
高脂血症	77/51 (60.2%)	11/3 (78.6%)	3/1 (75.0%)	6/5 (54.6%)	29/19 (60.4%)	0/1	11/8 (57.9%)	17/13 (56.7%)	0/1
肥満 BMI25 以上	26/102 (20.3%)	2/12 (14.3%)	2/2 (50.0%)	2/9 (18.2%)	11/37 (22.9%)	0/1	6/13 (31.6%)	3/27 (10.0%)	0/1
喫煙習慣	91/26 (77.8%)	2/10 (20.0%)	1/3 (25.0%)	2/9 (18.2%)	7/35 (16.7%)	0/1	2/16 (11.1%)	6/21 (22.2%)	0/1
飲酒習慣	52/62 (45.6%)	5/7 (41.7%)	1/2 (33.3%)	4/7 (36.4%)	21/21 (50.0%)	0/1	10/8 (55.6%)	10/15 (40.0%)	0/1
心房細動	3/125 (2.3%)	0/14	0/4	1/10 (9.1%)	1/47 (2.1%)	0/1	0/19	1/29 (3.3%)	0/1
冠状動脈疾患	11/116 (8.7%)	0/14	0/4	1/10 (9.1%)	1/47 (2.1%)	0/1	0/19	1/29 (3.3%)	0/1
閉塞性動脈硬化症	4/122 (3.2%)	0/13	1/3 (25.0%)	0/11	0/47	0/1	1/18 (5.3%)	2/28 (6.7%)	0/1
脳卒中既往 2 回以上	9/119 (7.0%)	1/13 (7.7%)	0/4	0/11	5/43 (10.4%)	0/1	3/16 (15.8%)	0/30	0/1
最初の発作からの期間 : 年	8.6±6.3 年 (0.3-28.4)	11.9±1.7	2.1±2.9	11.1±1.8	7.2±0.9	21.4	8.9±1.4	10.3±4.2	
最後の発作からの期間 : 年	7.8±6.0 年 (0.2-28.4)	11.2±1.6	2.1±2.7	11.1±1.6	6.2±0.8	21.4	7.5±1.3	10.3±3.8	
脳出血の既往	3/125 (2.3%)	0/14	0/4	0/11	0/48	0/1	2/17 (10.5%)	1/29 (3.3%)	0/1

TIA : 一過性脳虚血発作, BAD : Branch Atheromatous Disease, ATI : アテローム血栓性脳梗塞, CE : 心原性脳塞栓症
 数字は、ありの症例数/なしの症例数 (ありの割合%) を示す
 期間については、平均±標準偏差 (最小値-最大値) を示す

3.抗血小板薬以外の内服内容 (表 2)

抗血小板薬以外の内服薬については、降圧薬服用例が 68%であり、平均個数は 1.1±0.9 個であった。内訳としては、Angiotensin converting enzyme (ACE)阻害薬 8.6%、Angiotensin Receptor Blocker (ARB) 35.2%、Ca 阻害薬 42.2%、β 遮断薬

7.0%、利尿薬 3.1%と ARB と Ca 阻害薬の内服症例が多かった。高脂血症薬であるスタチン内服例は 34.4%であり、内訳としてはメバロチンとリピトールが多かった。糖尿病の治療薬としてインスリン使用例は 2 例、経口血糖降下剤 12 例であった。

表 2. 抗血小板薬以外の内服内容

	全体	TIA	BAD	ATI	ラクナ	CE	病型不明脳梗塞	無症候性脳梗塞	脳静脈洞血栓症
症例数	128	14	4	11	48	1	19	30	1
降圧薬内服	83/39 (64.0%)	8/0	4/0	9/2 (81.8%)	34/14 (70.8%)	0/1	11/8 (57.9%)	16/14 (53.3%)	1/0
降圧薬の数 (平均±標準偏差):個	1.1±0.9	1.8±0.5	1.38±0.3	1.0±0.3	1.1±0.1	0	1.2±0.2	0.7±0.2	1
降圧薬 (重複あり)									
ACEI	11/117 (8.6%)	2/12 (14.3%)	1/3 (25.0%)	2/9 (18.2%)	2/46 (4.2%)	0/1	3/16 (15.8%)	1/29 (3.3%)	0/1
ARB	45/83 (35.2%)	4/10 (28.6%)	2/2 (50.0%)	2/9 (18.2%)	24/24 (50.0%)	0/1	5/14 (26.3%)	7/23 (23.3%)	1/0
CaCB	54/74 (42.2%)	5/9 (35.7%)	2/2 (50.0%)	6/5 (54.6%)	24/24 (50.0%)	0/1	9/10 (47.4%)	8/22 (26.7%)	0/1
β	9/119 (7.0%)	0/14	0/4	0/11	3/45 (6.3%)	0/1	3/16 (15.8%)	3/27 (10.0%)	0/1
利尿薬	4/124 (3.1%)	0/14	0/4	1/10 (9.1%)	1/47 (2.1%)	0/1	1/18 (5.3%)	1/29 (3.3%)	0/1
スタチン	44/84 (34.4%)	6/8 (45.5%)	3/1 (75.0%)	5/6 (45.5%)	15/33 (31.3%)	0/1	5/14 (26.3%)	10/20 (33.3%)	0/1
糖尿病治療薬									
インスリン (症例数)	2	0	1	0	0	0	0	1	0
経口薬 (症例数)	12	0	0	1	7	0	2	2	0

TIA:一過性脳虚血発作, BAD:Branch Atheromatous Disease, ATI:アテローム血栓性脳梗塞, CE:心原性脳塞栓症
数字は、ありの症例数/なしの症例数(ありの割合%)を示す

4.抗血小板薬の内服内容 (表 3,4)

表 3. 抗血小板薬の内服内容

	全体	TIA	BAD	ATI	ラクナ	CE	病型不明脳梗塞	無症候性脳梗塞	脳静脈洞血栓症
症例数	128	14	4	11	48	1	19	30	1
抗血小板薬の数									
1	116 (90.6%)	11 (78.6%)	4 (100.0%)	9 (81.8%)	43 (89.6%)	1 (100.0%)	19 (100.0%)	28 (93.3%)	1 (100.0%)
2	11 (8.6%)	3 (21.4%)	0 (0.0%)	2 (18.2%)	5 (10.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (3.3%)	0 (0.0%)
3	1 (0.8%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (3.3%)	0 (0.0%)
アスピリン									
97/32 (75.2%)	9/5 (64.3%)	3/1 (75.0%)	9/2 (81.8%)	35/13 (62.9%)	1/0	14/5 (73.7%)	25/5 (83.3%)	0/1	
81mg	34	3	1	3	10	1	7	9	0
100mg	63	6	2	6	25	0	7	16	0
チクロピジン									
30/99 (23.3%)	6/8 (42.9%)	0/4	4/7 (36.4%)	9/39 (18.7%)	0/1	4/15 (21.0%)	6/24 (20.0%)	1/0	
100mg	13	4	0	2	2	0	2	2	1
200mg	17	2	0	2	7	0	2	4	0
シロスタゾール									
15/115 (11.6%)	2/12 (25.0%)	1/3 (25.0%)	0/11	9/39 (18.7%)	0/1	1/18 (5.3%)	1/29 (3.3%)	0/1	
100mg	8	2	0	0	4	0	1	1	0
150mg	1	0	0	0	1	0	0	0	0
200mg	5	0	1	0	4	0	0	0	0
アスのみ									
85 (66.4%)	7 (50.0%)	3 (75.0%)	7 (63.6%)	30 (62.5%)	1 (100.0%)	14 (73.7%)	23 (76.7%)	0 (0.0%)	
チクのみ									
21 (16.4%)	4 (28.6%)	0 (0.0%)	2 (18.2%)	6 (12.5%)	0 (0.0%)	4 (21.0%)	4 (13.3%)	1 (100.0%)	
シロのみ									
10 (7.8%)	0 (0.0%)	1 (25.0%)	0 (0.0%)	7 (14.6%)	0 (0.0%)	1 (5.3%)	1 (3.3%)	0 (0.0%)	
アス+チク									
7 (5.5%)	1 (7.1%)	0 (0.0%)	2 (18.2%)	3 (6.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (3.3%)	0 (0.0%)	
アス+シロ									
3 (2.3%)	1 (7.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (4.2%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
チロ+シク									
1 (0.8%)	1 (7.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
アス+チク+シロ									
1 (0.8%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (3.3%)	0 (0.0%)	

アスピリンとチクロピジン、シロスタゾールの 3 者に関しては、1 剤のみ内服例が 90.6%と最も多く、2 剤内服が 8.6%、3 者併用例が 1 例であった。この 1 例は虚血性心疾患、糖尿病、高脂血症、高血圧を有しており、High risk のためであった。

各抗血小板薬の内服状況については、アスピリンが 75.2%と最も多く、臨床病型別ではアテローム血栓性脳梗塞と無症候性脳梗塞例で内服例が 80%以上であった。用量としては 81mg 内服例が 100mg 内服例の約半数であったが、臨床病型での明らかな特徴は認められなかった、チクロピジン内服

例は登録症例の 23.3%で臨床病型では TIA とアテローム血栓性脳梗塞例で 30%以上と高率であった。用量別では 100mg と 200mg 内服例がほぼ同数であったが、ラクナ梗塞例で 200mg 内服例が多かった。シロスタゾール内服例は全体の 11.6%であり、TIA, BAD, ラクナ梗塞で投与例が多かった。用量は 100mg 投与例が多く、200mg 投与例は BAD とラクナ梗塞例であった。表には示さないが高脂血症薬ではあるが抗血小板作用を持つエパデール内服例は 3 例のみであった。

併用薬の組み合わせでは、アスピリン+チクロピジン 7 例、アスピリン+シロスタゾール 3 例、チクロピジン+シロスタゾール 1 例、アスピリン+チクロピジン+シロスタゾール 1 例であり、臨床病型別では明らかな特徴は認められなかった。

各抗血小板薬の用量と抗血小板数の関係を見ると、チクロピジンとシロスタゾールは単剤で投与される割合が少なく、併用例が多く、そのためか、通常投与量よりも少量投与例が多かった。

表 4. 抗血小板薬の併用

症例数	全体	抗血小板の併用数(個数)		
		1	2	3
アスピリン 0mg	32	31 (24.0%)	1 (0.8%)	0 (0.0%)
81mg	34	29 (22.5%)	4 (3.1%)	1 (0.8%)
100mg	63	57 (44.2%)	6 (4.7%)	0 (0.0%)
チクロピジン 0mg	99	96 (74.4%)	3 (2.3%)	0 (0.0%)
100mg	13	10 (7.8%)	3 (2.3%)	0 (0.0%)
200mg	17	11 (8.5%)	5 (3.9%)	1 (0.8%)
シロスタゾール 0mg	115	107 (93.0%)	7 (5.4%)	1 (0.8%)
100mg	8	5 (3.9%)	3 (2.3%)	0 (0.0%)
150mg	1	0 (0.0%)	1 (0.8%)	0 (0.0%)
200mg	5	5 (3.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

5. 抗血小板薬と臨床背景 (表 5)

臨床背景では、症例数は少ないものの心房細動と閉塞性動脈硬化症で抗血小板薬の併用例が多かった。各血小板薬では、アスピリンは非肥満例で投与例が多く、心房細動例と閉塞性動脈硬化症例では 100mg よりも 81mg 投与例の割合が多かった。チクロピジンに関しては閉塞性動脈硬化症例で

200mg が 100mg よりも多く投与される傾向があり、シロスタゾールに関しては虚血性心疾患例では投与例がなかった。これら臨床背景に関して重回帰分析による名義ロジスティック解析を行ったが、抗血小板薬の投与に関して有意な臨床背景因子は見いだされなかった。

6.PFA-100 の測定結果 (表 6)

2006 年末までに PFA の測定結果の得られた 80 症例について検討した. 全 80 症例のうち CEPI closing time (以下 CEPI-CT) が正常値の上限以下である症例は 22 例 (27.5%) , CADDP closing time (以下

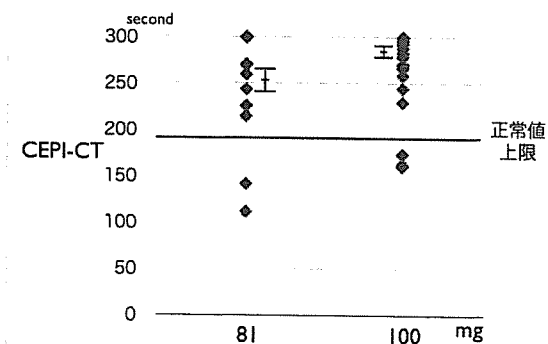
CADP-CT) が正常値の上限以下である症例は 56 例 (70.0%) であり, 両者ともに正常値の上限以下である症例は 21 例 (26.3%) であった.

表 6 .PFA-100 の測定結果

	症例数	CEPI-CT	CEPI-CT193 未満の症例数(%)	CADP-CT	CADP-CT118 未満の症例数(%)	両者正常以内
正常値		94-193		71-118		
全症例	80	241.3±74.7	22 (27.5%)	118.0±63.8	56 (70.0%)	21 (26.3%)
アスピリンのみ	54	273.3±45.6 (112-300)	5 (9.3%)	115.1±59.0 (43-300)	37 (68.5%)	4 (7.4%)
81mg	15	254.0±58.9 (112-300)	2 (13.3%)	114.1±60.2 (43-300)	10 (66.7%)	2 (13.3%)
100mg	39	280.7±37.6 (161-300)	3 (7.7%)	115.4±59.3 (60-300)	27 (69.2%)	2 (5.1%)
チクロピジンのみ	13	150.0±69.5 (91-300)	11 (84.6%)	106.2±54.6 (71-276)	11 (84.6%)	11 (84.6%)
100mg	6	155.3±73.8 (98-300)	5 (83.3%)	98.8±25.6 (75-143)	5 (83.3%)	5 (83.3%)
200mg	7	145.4±71.1 (91-300)	6 (85.7%)	112.6±73.0 (71-276)	6 (85.7%)	6 (85.7%)
シロスタゾールのみ	5	134.0±81.2 (85-278)	4 (80.0%)	96.8±18.2 (86-129)	4 (80.0%)	4 (80.0%)
100mg	3	92.3±6.4 (85-96)	3 (100.0%)	87.6±1.2 (86-88)	3 (100.0%)	3 (100.0%)
200mg	2	196.5±115.3 (115-278)	1 (50.0%)	111.1±25.5 (93-129)	1 (50.0%)	1 (50.0%)
アス+チク	6	254.0±57.1 (160-300)	1 (16.7%)	200±102.3 (89-300)	2 (33.3%)	1 (16.7%)
アス 100+シロ 100	1	250	0 (0.0%)	72	1 (100.0%)	0 (0.0%)
チロ 200+シロ 100	1	151	1 (100.0%)	87	1 (100.0%)	1 (100.0%)

アスピリン単独内服症例において, CEPI-CT の平均値は明らかに延長しており, 81mg 内服群が 254.0±11.5 秒, 100mg 内服群が 280.7±7.1 秒と内服量が多いほど延長していた(p=0.0534) (図). CADP-CT の平均値に関しては明らかな延長は認められなかった.

図 アスピリン単独内服症例における内服用量とCEPI-CT



CEPI-CT が正常値の上限以下である症例はアスピリン単独内服症例の 9.3%であり, 用量別では 81mg 内服例の 13.3%. 100mg 内服例の 7.7%と内服量が多いほど非延長例の割合は少ないことが伺われた. CADP-CT については正常値の上限以下である症例は 68.5%であり用量との関連は認められ

なかった. CEPI-CT と CADP-CT の両者が正常値の上限以下である症例は 7.4%であった.

チクロピジン単独内服に関しては CEPI-CT も CADP-CT の平均値はいずれも正常範囲内であったが, 約 15%の症例では両者の延長が認められた. 内服用量との関連は認められなかった.

シロスタゾール単独内服症例に関しては CEPI-CT の平均値は 200mg 内服群では軽度延長しているのに対して, 100mg 内服症例では CEPI-CT は正常であり, 全症例が正常値の上限以下であった. CADP-CT についても CEPI-CT とほぼ同様の結果であった. シロスタゾールに関しては 100mg の内服では PFA の測定値に関しては正常であり, 200mg 以上の内服が延長に関連していた.

併用群に関しては測定症例数が少なかったが, アスピリンを含む併用群では CEPI-CT は延長しているのに対して, CADP-CT に関しては延長の認められない症例の割合が多かった.

D. 考察

神経内科専門外来に通院している慢性期脳血管障害患者のうち、抗血小板薬を内服している患者を観察集団として登録した。その臨床病型としては、無症候性脳梗塞が22.7%を占め、脳梗塞の臨床病型としてはラクナ梗塞が最も多く37.5%、アテローム血栓性脳梗塞が8.6%、BADが3.1%、その他の脳梗塞が15.6%であり、心原性脳塞栓症はわずかに1例(0.8%)であった。最近の脳梗塞の臨床病型の報告では、ラクナ梗塞とアテローム血栓性脳梗塞、心原性脳塞栓症がほぼ同じ程度の割合を占めていることが報告されている¹が、今回は抗血小板薬を内服している症例のみであることから、心原性脳塞栓症がほとんど含まれていない特徴があった。

脳梗塞の危険因子は脳卒中データベース約13000例の報告からは、高血圧61.9%、糖尿病25.9%、高脂血症24.3%と報告されている²が、今回の対象症例では、高脂血症の割合が高く、心房細動の割合が低かった。心原性脳塞栓症の症例が少ないこと、大都市圏の大学病院通院中の症例であることが関連しているものと考えられた。

臨床病型別の背景では、その他の脳梗塞例で明らかに若年であったが、この中には若年者脳梗塞の重要な要因である動脈解離などが含まれているためと考えられた。今回の対象集団では脳出血既往例が3例しか含まれていないが、脳出血の既往例における脳梗塞再発予防に抗血小板療法が有効かどうかは明らかなデータがないことから症例を蓄積することが必要と考えられる。

抗血小板薬の内服状況は1剤のみが90%と圧倒的に多く、併用されている症例は比較的少なかった。また、薬剤選択としてはアスピリンが最も多く、100mgの内服症例が多かった。チクロピジンとシロスタゾールは併用で用いられる傾向があり、単剤で投与される率は低く、そのため、用量も少ない症例が多かった。抗血小板薬の選択に際して臨床背景や病型との関連では、閉塞性動脈硬化症合併例では用量が多く、虚血

性心疾患合併例にはシロスタゾールが用いられない傾向が認められたが、それ以外には明らかな傾向は認められなかった。

PFA-100はshear stress下での血小板機能、特にadhesionとaggregationを評価できるとされている。今回の検討ではアスピリン投与群の9.3%でCEPI-CTが延長せず、いわゆる「アスピリン抵抗性」であることが示唆された。CEPI-CTの延長しない症例は脳血栓症を対象とした症例(アスピリン75mgあるいは150mg内服)の16.1%³、冠状動脈疾患例(アスピリン325mg内服)の9.5%⁴に認められた事が報告されている。今回の結果では内服用量が多い症例の方が延長する割合が高いことから、CEPI-CTの延長しないという意味での「アスピリン抵抗性」の場合にその用量を検討する事が必要と考えられる。

チクロピジンに関しては、ADP受容体拮抗薬であることからCADP-CTでの延長が期待されるが、85%の症例では延長を認めなかった。クロピドグレルでの検討でも31例のcossover studyで2例にCADP-CTの延長が認められたのみであり³、測定のカートリッジ内のADPの濃度が高いためではないかと考えられている。今回の結果からは用量の差による延長も明らかではなかった。

シロスタゾールに関しては単独投与症例も少なかったが、用量が増加するとCEPI-CTとCADP-CTはいずれも上限をわずかに越える数値を示していた。PFA-100がシロスタゾールの抗血小板作用の指標となるかどうかは症例数を蓄積する事が必要と考えられる。

併用に関しては、これまでにアスピリンとクロピドグレルの併用により約1/4の症例でCADP-CTの著明な延長が認められている³。今回の検討からはアスピリンとチクロピジンの併用例では症例数が少ないが3例中2例では明らかな延長が認められており、両者の併用は抗血小板機能として明らかな相乗効果があるものと考えられた。これまでの報告と同様に両者の併用により一部の症例では明らかな延長が認められてい

るが、同時に他の症例では明らかな延長は認められていない。PFA-100のclosing timeはvon Willebrand factorの濃度に関連しており、炎症による反応でも変化する事が報告されている⁵。今後、我々に症例でもvWFの測定を行う予定であり、これによって新たな知見が得られるものと考えている。

PFA-100は測定方法が簡便であり、血小板機能を定量的に測定できるが、その臨床的な有用性に関してはまだ十分な検討がなされてはいない。PFA-100の結果を元に抗血小板薬の選択や用量を調整する事が臨床的に再発予防に有効かどうかを検討して行くことが必要である。

E. 結論

慢性期脳血管障害患者における抗血小板薬の反応性と再発予防効果を検討するための観察集団を登録した。PFA-100による血小板機能の測定では、アスピリン単独投与群の9.3%で反応性の低下が認められた。今回、登録した症例をコホートとして、経時的に転帰を検討して行くことにより血小板機能の測定結果と臨床的な有用性を検討して行く予定である。

F. 文献

1. 荒木信夫. 急性期脳卒中の実態 病型別・年代別頻度. In: 小林祥泰, ed. *脳卒中データベース2005*. 東京: 中山書店; 2005:24-25.
2. 野田公一, 近藤啓太, 寺澤英夫. 病型別にみた脳梗塞危険因子. In: 小林祥泰, ed. *脳卒中データベース2005*. 東京: 中山書店; 2005:48-49.
3. Grau AJ, Reiners S, Lichy C, Bugge F, Ruf A. Platelet function under aspirin, clopidogrel, and both after ischemic stroke: a case-cross-over study. *Stroke*. 2003;34:849-854.
4. Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, et al. Profile and prevalence of

aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2001;88:230-235.

5. Homoncik M, Blann AD, Hollenstein U, Pernerstorfer T, Eichler HG, Jilma B. Systemic inflammation increases shear stress-induced platelet plug formation measured by the PFA-100. *Br J Haematol*. 2000;111:1250-1252.

G. 健康危険情報

血小板機能の測定と臨床背景調査による観察集団の登録であり、健康危険は伴わない、

H. 研究発表

Iizuka T, Sakai F, Yamakawa K, Suzuki K, Suzuki N: Vasogenic leakage and the mechanism of migraine with prolonged aura in Sturge-Weber syndrome. *Cephalalgia* 24:767-770, 2004.

Kosakai A, Tanaka K, Nogawa S, Nagata E, Ito D, Suzuki S, Dembo T, Suzuki N: Activation of ERK1/2 is associated with neural survival after focal cerebral ischemia in the rat. *Cerebral Blood Flow Metab* 16: 276-287, 2004.

Hattori H, Ito D, Tanahashi N, Murata M, Saito I, Watanabe K, Suzuki N: T280M and V249I polymorphisms of fractalkine receptor CX3CR1 and ischemic cerebrovascular disease. *Neurosci Lett* 374: 132-135, 2005.

Suzuki S, Yamashita T, Tanaka K, Hattori H, Sawamoto K, Okano, Suzuki N: Activation of cytokine signaling through leukemia inhibitory factor receptor (LIFR)/gp130 attenuates ischemic brain injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 685-693, 2005.

Tomita M, Schiszler I, Tomita Y, Tanahashi N, Takeda H, Osada T, Suzuki N: Initial oligemia with capillary flow stop followed by hyperemia during K⁺-induced cortical spreading depression in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 742-747, 2005.

- Suzuki S, Shimoda M, Kawamura M, Sato H, Nogawa S, Tanaka K, Suzuki N, Kuwana M: Myasthenia gravis accompanied by alopecia areata: clinical and immunogenetic aspects. *Eur J Neurol* 12: 566-570, 2005.
- Ogihara T, Matsuzaki M, Matsuoka H, Umemoto S, Shimada K, Rakugi H, Umemoto S, Kamiya A, Suzuki N, Kumagai H, Ohashi Y, Takishita S, Abe K, Saruta T: The combination therapy of hypertension to prevent cardiovascular Events (COPE) trial: rationale and design. *Hypertens Res* 28: 331-338, 2005.
- Tanaka K, Kujuro Y, Suzuki S, Tanahashi N, Hamada J, Nogawa S, Suzuki N: Clinical and laboratory features of in-patients with multiple sclerosis in a University Hospital in Tokyo from 1988-2002. *Intern Med* 44:560-6. 2005
- Yamashita T, Sawamoto K, Suzuki S, Suzuki N, Adachi K, Kawase T, Mihara M, Ohsugi Y, Okano H: Blockade of interleukin-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice: possible involvement of Stat3 activation in the protection of neurons. *J Neurochem* 94:459-468, 2005.
- Suzuki S, Satoh T, Yasuoka H, Hamaguchi Y, Tanaka K, Kawakami Y, Suzuki N, Kuwana M: Novel autoantibodies to a voltage-gated potassium channel Kv1.4 in a severe form of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 170: 141-149, 2005.
- Nagata E, Luo HBR, Saiardi A, Bae BI, Suzuki N, Snyder SH: Inositol hexakisphosphate kinase-2, a physiologic mediator of cell death. *J Biol Chem* 280:1634-40, 2005.
- Abe T, Takahashi S, Suzuki N: Oxidative metabolism in cultured rat astroglia: effects of reducing the glucose concentration in the culture medium and of D-aspartate or potassium stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 153-160, 2006.
- Iizuka T, Sakai F, Suzuki K, Igarashi H, Suzuki N: Implication of augmented vasogenic leakage in the mechanism of persistent aura in sporadic hemiplegic migraine. *Cephalalgia* 26:332-335, 2005.
- Tomita M, Tanahashi N, Takeda H, Schiszler I, Osada T, Unekawa M, Suzuki N: Capillovenous flow in the brain: Significance of intravascular RBC aggregation for venous flow regulation. *Clin Hemorheol Micro* 34 (1-2): 51 – 57, 2006.
- Osada T, Tomita M, Tanahashi N, Takeda H, Nagai T, Suzuki N: Astroglial swelling for removed rat brain enlargement incubated in deoxygenated mock cerebrospinal fluid. *Clin Hemorheol Micro*34 (1-2): 223 – 226, 2006.
- Tomita M, Tanahashi N, Takeda H, Schiszler I, Osada T, Unekawa M, Suzuki N: Capillovenous flow in the brain: significance of intravascular RBC aggregation for venous flow regulation. *Clin Hemorheol Micro* 34:51-57, 2006.
- Osada T, Tomita M, Tanahashi N, Takeda H, Nagai T, Suzuki N: Astroglial swelling for removed rat brain enlargement incubated in deoxygenated mock cerebrospinal fluid. *Clin Hemorheol Micro* 34:223-226, 2006.
- Ito Y, Takaoka R, Ohira M, Abe T, Tanahashi N, Suzuki N: Reactive oxygen species generated by mitochondrial injury in human brain microvessel endothelial cells. *Clin Hemorheol Microcirc.*;34:163-168, 2006.
- Nagata E, Shibata M, Hamada J, Shimizu T, Katoh Y, Gotoh J, Suzuki N: Plasma 5-hydroxytryptamine (5-HT) in migraine during an attack-free period. *Headache* 46:592-596, 2006.
- Abe T, Takahashi S, Suzuki N: Metabolic properties of astrocytes differentiated from rat neurospheres. *Brain Research* 1101:5-11, 2006.
- Hattori H, Sato H, Ito D, Tanahashi N, Murata M, Saito I, watanabe K, Suzuki N: A561C polymorphism of E-selectin is associated with ischemic cerebrovascular diseases in Japanese

population without diabetes mellitus and hypercholesterolemia. Brain Research 2006.

Osada T, Tomita M, Suzuki N: Spindle-shaped constriction and propagated dilation of arterioles during cortical spreading depression. NeuroReport 17:1365-1368, 2006.

Tomita M, Ohtomo M, Suzuki N: Contribution of the flow effect caused by shear-dependent RBC aggregation to NIRS spectroscopic signals. NeuroImage 33:1-10, 2006.

Ishiko A, Shimizu A, Nagata E, Takahashi K, Tabira T, Suzuki N: Notch3 ectodomain is major component of granular osmiophilic material (GOM) in CADASIL. Acta Neuropathol 112:333-339, 2006.

Takao M, Tsuchiya K, Mimura M, Momoshima S, Kondo H, Akiyama H, Suzuki N, Mihara B, Takagi Y, Koto A: Corticobasal degeneration as cause of progressive non-fluent aphasia: Clinical, radiological and pathological study of an autopsy case. Neuropathology 26:569-578, 2006.

I. 知的財産権の出願・登録(予定を含む)

なし

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
平成 18 年度 分担研究報告書

マウス ES 細胞・ヒト造血幹細胞から *in vitro* 分化誘導による巨核球分化・
血小板産生システムを用いた抗血小板薬の反応性と関連する因子の基礎検討

分担研究者 松原由美子 慶應義塾大学医学部内科講師

研究要旨 抗血小板薬の効果に対する遺伝子を同定することが本研究の目的である。この同定のために検診受診者(抗血小板薬非服用者)や抗血小板薬服用者の血液サンプルを用いた血小板機能検査や遺伝子解析を行っている。この遺伝子解析(網羅的解析および候補因子アプローチ)により得られた結果は、遺伝子改変の実験検討による検証が必要とされるが、血小板研究の主要な問題点は血小板は無核であるため遺伝子改変ができないことである。そこで本研究では幹細胞に対して遺伝子改変を行い、それを *in vitro* で分化誘導を行うことにより、遺伝子改変された巨核球・血小板を得る実験システム樹立に着手した。多分化能を有する胚性幹細胞(ES 細胞)から *in vitro* 分化誘導により巨核球・血小板を産生させる。ES 細胞は遺伝子改変が可能であり、非常に強い増殖能を有する。再現性が要求される実験において、ヒト造血幹細胞を個体から得るためにはドナーの負担が大きい。したがって ES 細胞を用いてのプロトコール確立後、ヒト造血幹細胞を用いた実験システムの構築を行った。今回、遺伝子改変において着目した因子は血小板膜受容体の glycoprotein (GP) Ib alpha である。GPIb alpha は血小板特異的に発現しており、その遺伝子多型と血栓症、GPIb alpha の機能、そして血小板のアスピリン反応性の関係を本研究のこれまでの検討において示している。GPIb alpha の強制発現およびノックダウンを検討した結果、ヒト造血幹細胞を用いた際の遺伝子改変巨核球・血小板を得るプロトコールを確立したことを認めた。さらに今回、造血幹細胞から血小板産生の各過程を電子顕微鏡観察ならびに免疫電子顕微鏡観察により検討した結果、血小板産生にアポトーシスが関与すること、血小板産生時に巨核球の global fragmentation が起きることを認めた。以上、今年度の結果からヒト造血幹細胞を用いた際の遺伝子改変巨核球・血小板を得るプロトコールを確立した。血小板産生機序の解明に迫った。

A. 研究目的

抗血小板薬は血小板血栓により発症する心筋梗塞や脳梗塞の再発予防や疾患のハイリスク患者に対しての一

次予防に用いられている。抗血小板療法 of それら動脈血栓症に対する有用性を示す evidence が蓄積されており、事実抗血小板薬は全世界で年間

数十億錠が使用されている。特に日本ではアスピリンが繁用されている。しかし一般人口の約3割はアスピリンが効かない（不応者）といわれる。アスピリンとは異なる作用機序を有するチエノピリジン系薬剤に対しても不応者の報告がある。これら抗血小板薬を服用しているにも関わらず、血小板機能が抑制されない「不応症」の患者では血栓の予防効果が低く再発率が高いことが示されている。したがって、この原因をつきとめることは生命リスクの低減ならびに医療経済性の観点から非常に重要である。しかし抗血小板薬の効果の個体差の原因はほとんど分っていない。本研究では抗血小板薬の反応性に関連する遺伝子の同定することを目的としている。その研究の中で今回、マウスES細胞・ヒト造血幹細胞から *in vitro* 分化誘導による巨核球分化・血小板産生システムを用いた抗血小板薬の反応性に関連する因子の基礎検討を行った。

(1) マウス胚性幹細胞(ES細胞)、ヒト造血幹細胞を用いた遺伝子ターゲティング巨核球・血小板産生システムのプロトコルの確立: 本研究では抗血小板薬の反応性に関連する遺伝子の同定のために検診受診者(抗血小板薬非服用者)や抗血小板薬服用者の血液サンプルを用いた血小板機能検査

や遺伝子解析を行っている。遺伝子解析(網羅的解析および候補因子アプローチ)により得られた結果は、遺伝子改変の実験検討による検証が必要とされるが血小板は無核であるため、遺伝子改変ができない。これは血小板研究の主要な問題点とされている。そこで本研究では幹細胞に対して遺伝子改変を行い、それを *in vitro* で分化誘導を行うことにより、遺伝子改変された巨核球・血小板を得る実験システムを用いることに着手した。マウスES細胞は強い増殖能を有するため、実験プロトコルの検討に適している。一方、ヒト造血幹細胞を個体から得るためにはドナーの負担が大きいため、再現性が要求される実験には適していない。したがって平成17年度までは、マウスES細胞を用いた基礎検討を行ってきた。本年度はこれまでの成果から、ヒト造血幹細胞を用いた実験システムの構築を行った。

(2) 超微細構造像による巨核球分化と血小板産生の研究: アスピリンは血小板のみならず、巨核球に対しても有用性があることが報告されている。我々の平成17年度の研究においても、マウスES細胞、アスピリン存在下での *in vitro* 分化誘導により得られた巨核球と血小板はそれぞれ巨核球と血小板活性化の刺激に対して抑制作

用を示した。アスピリンは細胞アポトーシスに関与していることが報告されているが「巨核球のアポトーシスにアスピリンが関与しているかどうか?」は不明であることに加え、「巨核球分化や巨核球からの血小板分離にアポトーシスに関与しているかどうか?」についても議論中である。

巨核球からの血小板分離には proplatelet theory や explosive fragmentation theory が提唱されているが未だ議論が分かれ、その詳細は十分に解明されていない。これら議論が分かれている理由のひとつとして研究に用いられる造血幹細胞は採取量が少なく、しかも増殖能が乏しいので検討に必要なサンプルの確保が難しいことが指摘されてきた。そこで今回、高い増殖能を持つ ES 細胞を用いて巨核球・血小板へと分化誘導し、その各過程における超微細構造像を検討した。ES 細胞を用いて実験プロトコルを確立した後にヒト造血幹細胞も用いた検討を行った。

B. 研究方法

(1) マウス ES 細胞、ヒト造血幹細胞を用いた遺伝子ターゲティング巨核球・血小板産生システムのプロトコルの確立：ES 細胞から *in vitro* 分化誘導により巨核球や血小板を得るために OP9 培養システムを用いた実

験を行なった。このシステムはマウス ES 細胞を OP9 細胞(大理石病マウスのストロマ細胞)と共培養し、培養 5 日目から巨核球・血小板へ分化誘導を行なうためのサイトカインである トロンボポエチンを加え 15 日間培養する方法である。ヒト造血幹細胞としてのヒト CD34 陽性細胞は cambrex 社より購入した。CD34 陽性細胞にはトロンボポエチン存在下 Serum-free liquid culture システムを用いて巨核球分化、血小板産生のための *in vitro* 分化誘導を約 15 日間行った。巨核球・血小板産生の評価は形態観察に加え、その特異マーカー(CD41)の発現や核の倍数(DNA ploidy)をフローサイトメトリー法にて行なった。

マウス ES 細胞を用いた OP9 培養システムにおいて、培養 5 日目 (mesodermal cells に相当)の細胞に条件検討用に市販されている FITC-GADPH-siRNA をリポフェクタミン法、エレクトロポレーション法にて導入した。導入評価は遺伝子導入細胞から 48 時間後に抽出した RNA に対するリアルタイム定量 PCR あるいはフローサイトメトリー法にて行った。ヒト CD34 陽性細胞はトロンボポエチン存在下 Serum-free liquid culture システムにて培養 4 日目に GPIb alpha に対する siRNA、

negative control siRNA、GPIb alpha の発現ベクター (PCDNA3.1hygro(+))と PCDNA3.1hygro(+)ベクター、ヒト テロメラーゼ逆転写酵素(hTERT) の発現ベクター(pCL neo)と pCL neo ベクターをエレクトロポレーション法にて導入した。導入評価は遺伝子導入細胞から 48 時間後に抽出した RNA に対するリアルタイム定量 PCR あるいはフローサイトメトリー法にて行った。

(2) 超微細構造像による巨核球分化と血小板産生の研究：マウス ES 細胞およびヒト CD34 陽性細胞をそれぞれ巨核球・血小板に *in vitro* 分化誘導を行い、その培養 5 日目、8 日目、12 日目、15 日目の細胞を電子顕微鏡観察、免疫電子顕微鏡観察した。免疫電子顕微鏡観察には抗 GPIb alpha 抗体、抗 GPIb beta 抗体、抗 GPIIb 抗体、抗 von Willebrandfactor 抗体、抗 fibrinogen 抗体を用いた。

C. 研究結果

(1) マウス ES 細胞、ヒト造血幹細胞を用いた遺伝子ターゲティング巨核球・血小板産生システムのプロトコールの確立：OP9 培養システムにおいて ES 細胞から、Serum-free liquid culture システムにおいてヒト CD34 陽性細胞から、巨核球・血小板へ *in*

vitro 分化誘導を行った。形態観察、フローサイトメトリーによる CD41 陽性細胞の検出の結果から培養 8 日で未成熟巨核球、培養 12 日で成熟巨核球、そして培養 15 日で血小板産生が示唆された。マウス ES 細胞を用いた OP9 培養システムにおいて、培養 5 日目 (mesodermal cells に相当)と 8 日目の細胞に FITC-GAPDH-siRNA をリポフェクタミン法、エレクトロポレーション法にて導入した。遺伝子導入細胞から抽出した RNA に対するリアルタイム定量 PCR あるいはフローサイトメトリー法にて行った結果、リポフェクタミン法で遺伝子導入を行った細胞 RNA では siRNA を導入したものと negative-control siRNA を導入したものではその RNA 発現量、FITC レベルに違いを認めなかった。エレクトロポレーション法で遺伝子導入を行った細胞 RNA では siRNA を導入したものと negative-control siRNA を導入したものではその RNA 発現量は siRNA 導入のもので 30%から 55%減を認めた。siRNA 導入のもので FITC レベルは上がっていた。これらマウス ES 細胞を用いた実験結果をもとに、ヒト CD34 陽性細胞への遺伝子導入はエレクトロポレーション法を用いることとした。はじめに hTERT の発現ベクター (pCL neo)と pCL neo ベクターをエ

レクトロポレーション法にて導入した。hTERTはこれまで、細胞株を用いた種々の実験で遺伝子導入、リアルタイムPCRを行っており自験データの蓄積があった為、今回の検討に選んだ。導入細胞からRNAを抽出し、hTERT配列を認識するプライマーと内部コントロールとしてbeta actinを認識するプライマーを用いてリアルタイム定量PCRを行った。hTERTのRNA発現量を内部コントロールのbeta actinRNA発現量で補正して得た結果、ベクター未導入細胞でのhTERT発現を1とした場合、pCL neoベクター導入細胞では0.717、hTERT- pCL neoベクター導入細胞では32516.5であった。これら細胞をそれぞれ培養15日目まで、分化誘導を行なった結果、いずれの細胞においても血小板産生を認めた。これら結果はヒトCD34陽性細胞における遺伝子導入プロトコルが適切であることを示唆している。次にGPIb alphaの発現ベクターのGPIb alpha-PCDNA3.1hygro(+), negative controlとしてのPCDNA3.1hygro(+), GPIb alphaのsiRNAを2種類(ターゲットの配列が異なるものを作成)、negative control siRNAの導入をヒトCD34陽性細胞に上記で用いた遺伝子導入プロトコルにて行った。GPIb alpha

RNAの発現変動を確認後、細胞膜に発現しているGPIb alphaの量を検討するためにフローサイトメトリー法による解析を行った。GPIb alphaの発現ベクターを導入した検討の結果、巨核球を示唆するゲートに入った細胞はPCDNA3.1hygro(+のみを導入した細胞では5.0%であり、GPIb alpha-PCDNA3.1hygro(+を導入したものでは16.2%であった。血小板を示唆するゲートに入った細胞はPCDNA3.1hygro(+のみを導入した細胞では0.4%であり、GPIb alpha-PCDNA3.1hygro(+を導入したものでは3.8%であった。FITCのmeanレベルは巨核球、血小板ともにPCDNA3.1hygro(+のみ導入とGPIb alpha-PCDNA3.1hygro(+を導入した細胞において違いは認めなかった。これら結果はGPIb alpha-PCDNA3.1hygro(+が細胞に導入されており、その結果巨核球分化と血小板産生が促進されたことを示唆している。この導入により巨核球、血小板ひとつあたりのGPIb alpha発現量は変化していないと考えられる。巨核球のploidyを検討した結果、PCDNA3.1hygro(+のみ導入した細胞では2nから16nまでを認めたがGPIb alpha-PCDNA3.1hygro(+導入のものでは2nから4nまでを認めた。PCDNA3.1hygro(+のみ導入し