

Table 1 – Clinical characteristics of patients with CVD and controls

	Controls (n=301)	Patients with CVD (n=235)	P ^a
Male, %	77.1	77.9	NS ^b
Age, mean±SD, years	58.7±4.4	58.3±7.8	NS ^b
Hypertension, %	25.5	56.2	<0.001
Hypercholesterolemia, %	32.6	38.6	0.146
Diabetes mellitus, %	6.31	25.8	<0.001
Smoking, %	37.9	53.3	<0.001
Body mass index >27.3kg/m ² , %	5.17	9.02	0.155
Family history, %	24.2	29.3	0.296

^a χ^2 tests were used to compare values of patients with CVD and controls for all parameters except for age, which was compared by Student's *t* test.

^b Not significant.

2003). Although several studies have showed the positive relationship between E-selectin A561C polymorphism and atherosclerotic disease (Mlekusch et al., 2004; Wenzel et al., 1994), the association between the polymorphism and ischemic stroke remains unclear. The primary aim of this study was to determine whether the E-selectin single nucleotide polymorphism is associated with cerebrovascular disease in the Japanese population.

We analyzed 235 unrelated Japanese patients with ischemic cerebrovascular disease (CVD) and 301 age- and sex-matched controls. All patients with CVD had attended the outpatient clinic of Keio University Hospital, Tokyo, for regular follow-up examinations. All controls who worked for Keio University had visited to Keio University Hospital for their annual health check-up. We selected patients with CVD aged ≤ 70 years at the onset of CVD. On the basis of the Classification of Cerebrovascular Diseases III report from the committee established by the National Institute of Neurological Disorders and Stroke, patients with CVD and a diagnosis of atherothrombotic infarction (AT), lacunar infarction, or transient ischemic attack (TIA) were enrolled in this study. Those with cardioembolic cerebral infarction or cerebral hemorrhage were excluded. Controls were patients who had had regular check-ups. Those with a clinical history of CVD, myocardial infarction, or peripheral vascular disease were excluded. Written informed consent was obtained from all subjects after a full explanation of the study and a guarantee of total confidentiality. Brain computed tomography (CT) and/or magnetic resonance imaging (MRI) studies were performed on all patients with CVD. Hypertension, hypercholesterolemia, and smoking were defined as described previously (Ito et al., 2000).

To analyze the A561C polymorphism of E-selectin, polymerase chain reaction (PCR) was carried out as described previously (Ito et al., 2000). Briefly, amplification of a 358-bp fragment of the E-selectin gene was performed with the 5' primer 5'-ATGGCACTCTGTAGGACTGCT-3' and 3' primer 5'-GTCTCAGCTCAGATCACCAT-3'. Amplification by PCR consisted of an initial 3min denaturation at 94 °C, 35 cycles of 30s at 94 °C, 1min at 60 °C, and 1min at 72 °C, followed by 7min at 72 °C in a Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Foster

City, CA, USA). The PCR product (5 μ l) was cleaved with 15 U PstI restriction enzyme (Takara Shuzo, Ohtu, Shiga, Japan). The digested PCR products yielded bands of 221 and 137bp in AA homozygotes, and 358, 221, and 137bp in AC heterozygotes. There were no CC homozygotes among our subjects.

The differences in genotype frequencies and other risk factors were analyzed by the χ^2 test. Mean age and allele frequencies in the two groups were compared by Student's *t* test. Multiple logistic regression methods were used to control for possible confounding factors. All statistical analyses were performed using Statview software (version 5.0 for Windows, SAS Institute, Cary, NC, USA).

The 235 patients with CVD and 301 controls were well matched in terms of age and sex (Table 1). The risk factors hypertension, diabetes mellitus, and smoking were significantly more common in patients with CVD than in controls ($P < 0.001$). The frequencies of the A561C polymorphism showed no deviation from Hardy–Weinberg equilibrium.

The frequencies of AC genotype carrier were not statistically different between patients with CVD and controls: 9.4% vs. 8.3%, odds ratio (OR)=1.14 [95% confidence interval (CI)=0.63–2.05, $P=0.669$]. The C allele frequencies were not significantly different between patients with CVD and controls: 4.7% vs. 4.2%, OR=1.13 (95% CI=0.64–2.03, $P=0.705$) (Table 2).

The frequency of AC genotype carrier without diabetes mellitus and hypercholesterolemia was statistically higher in patients with CVD compared with healthy controls: 12.7% vs. 5.8%, OR=2.37 (95% CI=1.03–5.44, $P=0.040$). The C allele excluding diabetes mellitus and hypercholesterolemia was significantly more frequent in CVD patients than healthy controls: 6.4% vs. 2.9%, OR=2.28 (95% CI=1.04–4.99, $P=0.045$) (Table 2).

Table 2 – Genotype and allele frequencies of the Ser128Arg (A561C) polymorphism of the E-selectin gene in patients with CVD and controls

Genotype	All patients (n=235)	AT (n=69)	Lacunar (n=142)	TIA (n=24)	Controls (n=301)
AC, %	9.4 (22)	11.6 (8)	7.7 (11)	12.5 (3)	8.3 (25)
AA, %	90.6 (213)	88.4 (61)	92.3 (131)	87.5 (21)	91.7 (276)
P*	0.669	0.402	0.840	0.504	–
C, %	4.7	5.8	3.9	6.3	4.2
A, %	95.3	94.2	96.1	93.7	95.8
P*	0.705	0.414	0.843	0.516	–
Without diabetes mellitus and hyperlipidemia					
AC, %	12.7 (14)	13.8 (4)	10.9 (7)	17.6 (3)	5.8 (11)
AA, %	87.3 (96)	86.2 (25)	89.1 (57)	82.4 (14)	94.2 (179)
P*	0.040	0.150	0.184	0.108	–
C, %	6.4	6.9	5.5	8.8	2.9
A, %	93.6	93.1	94.5	91.2	97.1
P*	0.045	0.159	0.193	0.118	–

The number of subjects (X). * χ^2 tests were used to compare genotype and allele frequencies between controls and all patients with CVD and between controls and individual groups of patients with CVD.

In logistic regression analysis, sex, age, hypertension, hypercholesterolemia, diabetes mellitus, current smoking, body mass index, family history of stroke, and E-selectin genotypes (AA vs. AC or A allele vs. C allele) were included as independent variables. This analysis revealed that presence of the C allele was independent of these acquired risk factors.

The present study examined the relation between ischemic CVD and E-selectin single nucleotide polymorphisms, and the results indicated that A561C single nucleotide polymorphism was one of the genetic risk factors of ischemic CVD in Japanese persons without diabetes mellitus and hypercholesterolemia.

The A561C polymorphism within the epidermal growth factor-like domain of the human E-selectin gene results in the substitution of arginine for serine at position 128 (Ser128Arg) of the mature protein (Wenzel et al., 1994). The A561C polymorphism has a profound effect on ligand recognition and binding (Ellsworth et al., 2001). There is evidence that human umbilical vein endothelial cells carrying the A561C mutation shows more rolling and adhesion of neutrophils and mononuclear cells than the wild-type cells (Yoshida et al., 2003). Additionally, Mlekusch et al. (2004) demonstrated that E-selectin plasma levels in subjects with the A561C mutation were statistically higher than in subjects with wild-type A561A. In summary, A561C polymorphism could facilitate the attachment between neutrophils and endothelial cells in the first stage of atherosclerosis and increase the expression of E-selectin in the human body, suggesting that A561C is one of the genetic risk factors in atherothrombotic CVD.

Our study failed to show the relation between ischemic CVD and A561C in all participants, including those with diabetes mellitus and/or hypercholesterolemia. The two groups in Japan showed that serum levels of soluble E-selectin were higher in patients with type 2 diabetes mellitus and hyperlipidemia or other complications than in healthy controls (Nomura et al., 2003; Matsumoto et al., 2002). On the other hand, smoking did not increase serum E-selectin level in the acute or chronic phases (Patiar et al., 2002). These facts indicated that the expression of E-selectin levels could be essentially increased in diabetes mellitus and/or hypercholesterolemia even if the participants in our study had the wild-type A561A genotype; therefore, the genetic effect of E-selectin genotype may be attenuated in these patients.

In conclusion, this study revealed a significant association between A561C polymorphisms in the E-selectin gene and ischemic CVD without diabetes mellitus and hypercholesterolemia. Although further studies are needed to evaluate whether E-selectin may play a role in the pathogenesis of CVD, our results and those of recent studies indicate that E-selectin polymorphism and expression levels in the human body may have an effect on the occurrence of ischemic CVD.

Acknowledgments

The encyclopedic PCR knowledge of Akira Sonoda was gratefully appreciated. This study was supported by a grant-in-aid for scientific research No. H13-genome-006 from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

REFERENCES

- Bevilacqua, M.P., 1993. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 767–804.
- Cherian, P., Hankey, G.J., Eikelboom, J.W., Thom, J., Baker, R.I., McQuillan, A., Staton, J., Yi, Q., 2003. Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes. *Stroke* 34, 2132–2137.
- Ellsworth, D.L., Bielak, L.F., Turner, S.T., Sheedy 2nd, P.F., Boerwinkle, E., Peyser, P.A., 2001. Gender- and age-dependent relationships between the E-selectin S128R polymorphism and coronary artery calcification. *J. Mol. Med.* 79, 390–398.
- Fassbender, K., Bertsch, T., Mielke, O., Muhlhauser, F., Hennerici, M., 1999. Adhesion molecules in cerebrovascular diseases. Evidence for an inflammatory endothelial activation in cerebral large- and small-vessel disease. *Stroke* 30, 1647–1650.
- Haring, H.P., Berg, E.L., Tsurushita, N., Tagaya, M., del Zoppo, G.J., 1996. E-selectin appears in nonischemic tissue during experimental focal cerebral ischemia. *Stroke* 27, 1386–1392.
- Ito, D., Murata, M., Tanahashi, N., Sato, H., Sonoda, A., Saito, I., Watanabe, K., Fukuuchi, Y., 2000. Polymorphism in the promoter of lipopolysaccharide receptor CD14 and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 31, 2661–2664.
- Jilma, B., Marsik, C., Kovar, F., Wagner, O.F., Jilma-Stohlawetz, P., Endler, G., 2005. The single nucleotide polymorphism Ser128Arg in the E-selectin gene is associated with enhanced coagulation during human endotoxemia. *Blood* 105, 2380–2383.
- Matsumoto, K., Sera, Y., Ueki, Y., Inukai, G., Niuro, E., Miyake, S., 2002. Comparison of serum concentrations of soluble adhesion molecules in diabetic microangiopathy and macroangiopathy. *Diabet. Med.* 19, 822–826.
- Mlekusch, W., Exner, M., Schillinger, M., Sabeti, S., Mannhalter, C., Minar, E., Wagner, O., 2004. E-selectin and restenosis after femoropopliteal angioplasty: prognostic impact of the Ser128Arg genotype and plasma levels. *Thromb. Haemostasis* 91, 171–179.
- Nomura, S., Kanazawa, S., Fukuhara, S., 2003. Effect of eicosapentaenoic acid on platelet activation markers and cell adhesion molecules in hyperlipidemic patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes Its Complicat.* 17, 153–159.
- Patiar, S., Slade, D., Kirkpatrick, U., McCollum, C.N., 2002. Smoking causes a dose-dependent increase in granulocyte-bound L-selectin. *Thromb. Res.* 106, 1–6.
- Wenzel, K., Felix, S., Kleber, F.X., Brachold, R., Menke, T., Schattke, S., Schulte, K.L., Glasser, C., Rohde, K., Baumann, G., Speer, A., 1994. E-selectin polymorphism and atherosclerosis: an association study. *Hum. Mol. Genet.* 3, 1935–1937.
- Yoshida, M., Takano, Y., Sasaoka, T., Izumi, T., Kimura, A., 2003. E-selectin polymorphism associated with myocardial infarction causes enhanced leukocyte-endothelial interactions under flow conditions. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 23, 783–788.

特集

循環器疾患における遺伝子診療の現状と将来

血小板, 凝固異常における
遺伝子診療*横山 健次**
池田 康夫**Key Words : protein S, plasminogen, plasminogen activator inhibitor 1, ADAMTS 13, GPIIb α

症などの血栓症発症と関連する可能性がある遺伝子多型を中心に紹介し解説を加える。

はじめに

心筋梗塞などの動脈血栓症, 肺血栓症などの静脈血栓症は, 遺伝的要因, 後天的要因が複雑に絡み合って発症すると考えられている。血栓症発症に関与する可能性がある遺伝的要因としてはさまざまなものが考えられるが, 凝固線溶系因子あるいは血小板膜蛋白の先天性異常により血液が過凝固状態になることも, その一つと考えられる。これらの異常をきたす遺伝子変異には, 頻度は低いが病的意義がほぼ明らかにされている病的変異[アンチトロンビンIII欠損症, プロテインC(protein C: PC)欠損症など]と, 比較的頻度が高いが必ずしも病的意義の有無は明らかではない遺伝子多型がある。血栓症発症の遺伝的要因を明らかにすることを目的として, 遺伝子多型と血栓症発症との関連の有無を検討する多数の疫学的研究, *in vitro*の実験が行われてきた。しかし, それらの結果は報告により相反することも稀ではなく, 現時点ではそれぞれの遺伝子多型と血栓症発症の関連の有無に関しては一定の見解が得られていないものが多い。本稿では, これらの凝固線溶系因子, あるいは血小板膜蛋白の遺伝子多型の中で, 日本人に特異的, あるいは頻度が高く, 心筋梗塞, 肺血栓

プロテイン S(PS)

PSは主に肝臓で合成されるビタミンK依存性の糖蛋白質であり, PS分子はアミノ末端から順にGlaドメイン, トロンビン感受性ドメイン, 4個の上皮増殖因子(epidermal growth factor: EGF)様ドメイン, カルボキシ末端の性ホルモン結合グロブリン(sex hormone binding globulin: SHBG)様ドメインの各ドメインで構成されている。PSは, ヒト血漿中には遊離型, およびC4b結合蛋白質(C4BP)と結合した結合型として存在しており, 活性型プロテインC(activated protein C: APC)と結合し, 補酵素として抗凝固作用を示す。また, PSは直接活性化第X因子(Xa)の活性を抑制し, さらにプロトロンビン(prothrombin: PT)の活性化第V因子(Va)への結合を抑制することによっても抗凝固作用を示す。PS欠損症にはPS抗原量, 活性ともに低下するI型, PSの分子異常により抗原量は正常ながら活性のみ低下するII型, 遊離型PS抗原量が低下するIII型があり, PS欠損症患者では深部静脈血栓症(deep venous thrombosis: DVT)を発症しやすいと考えられている。日本人ではPS欠損症の頻度が1.12~2.04%と報告されており¹⁾²⁾, 白人の0.03~0.13%に比し高い³⁾。なかでも日本人ではII型PS欠損症が多く, 日本人でみられるII型PS欠損症の大部分はEGF

* Genetic analysis of platelet and coagulation disorders.

** Kenji YOKOYAMA, M.D., Ph.D. & Yasuo IKEDA, M.D., Ph.D.: 慶應義塾大学医学部内科[〒160-8582 東京都新宿区信濃町35]; Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University, Tokyo 160-8582, JAPAN

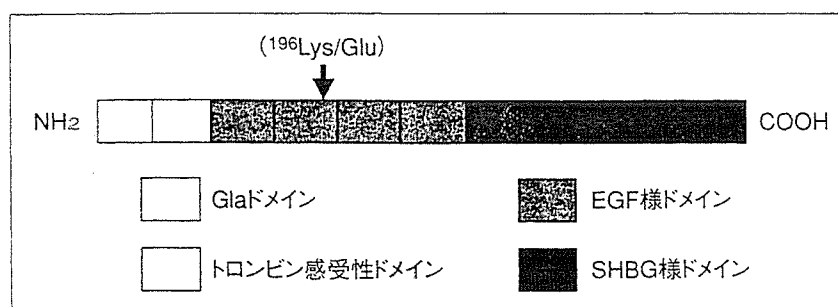


図1 PS分子の構造と遺伝子多型

PS分子はアミノ末端から順にGlaドメイン、トロンビン感受性ドメイン、4個のEGF様ドメイン、カルボキシ末端のSHBG様ドメインの各ドメインで構成されている。PS K196E(PS Tokushima)では2番目のEGF様ドメイン内の196番目のLysがGluに置換されている。

表1 PS K196Eの機能

低下	正常
APC補酵素活性	リン脂質への結合
APCへの結合	C4BPへの結合
Xaへの結合	Vaへの結合
XaとVaの結合促進	

リコンビナントPS K196Eを用いた*in vitro*の実験の結果では、PS K196EではAPC補酵素活性、APCへの結合、Xaへの結合、XaとVaの結合を促進する作用が低下している。一方、リン脂質への結合、C4BPへの結合、Vaへの結合は野生型と差がない。

様ドメイン内の196番目のLysがGluに置換されたPS K196Eである(図1)⁴⁾。このPS K196Eは、以前はPS K155EあるいはPS Tokushimaと呼ばれていたが⁵⁾、アミノ酸番号の付け方が替わりPS K196Eと呼ばれるようになったものであり、日本人の1.65~1.3%がPS K196Eのヘテロのキャリアーであることが報告されている⁶⁾⁷⁾。リコンビナントPS K196Eを用いた実験によりPS K196EはAPC補酵素活性を失い、APCあるいはXaに結合しないことなどが示されている(表1)⁸⁾⁹⁾。日本人DVT患者161人中13人がヘテロ、2人がホモのPS K196Eキャリアーであったこと⁷⁾、などが報告されており、日本人DVT患者の10%程度がPS K196E変異を有するII型PS欠損症と考えられる。これらの結果からは、PS K196Eは日本人におけるDVT発症の危険因子であるといつてよいと思われる。今後は前向き臨床研究を行い、実際にII型PS欠損症、あるいはPS K196EキャリアーでDVTを発症する危険性はどの程度か、危険性が高いの

であれば手術、妊娠などDVT発症の危険性が増す際にはあらかじめ予防策をとる必要はあるか、またDVTのみならず心筋梗塞、脳梗塞などの動脈血栓症の危険因子となる可能性はあるか、などを明らかにしていくことが必要であろう。

プラスミノーゲン(PLNG)

プラスミノーゲン(plasminogen: PLNG)は、組織プラスミノーゲンアクティベーター(tissue plasminogen activator: t-PA)により酵素活性を発現するプラスミンに変化する。血栓形成に重要な役割を果たしているフィブリンが、プラスミンにより分解されてフィブリン分解産物となり、その結果血栓が溶解するのが線溶系の主要な反応である。PLNG分子はアミノ末端から順にプレアクティベーションペプチド、5個のクリングルドメイン、カルボキシ末端のセリンプロテアーゼドメインの各ドメインで構成されている。日本人の再発性のDVT患者で発見された620番目のAlaがThrに置換されたPLNG A620Tのヘテロのキャリアーでは、PLNG活性が50~60%に低下している(図2)¹⁰⁾。このPLNG A620Tは、以前はPLNG A601TあるいはPLNG Tochigiと呼ばれていたものであり、日本人ではアリル頻度が1.1~2.1%、中国人では1.5%、韓国人では1.6%と東洋人には高頻度で見られ、一方白人にはみられない¹¹⁾¹²⁾。PLNGは線溶系開始の重要な因子であり、PLNG A620TはDVT患者で最初に発見されたが、その後施行された4,517人を対象とした大規模な臨床研究の結果、日本人では抗原量、活性とも

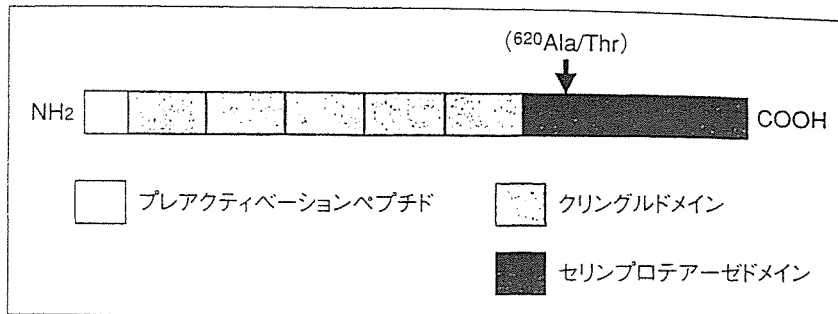


図2 PLNG分子の構造と遺伝子多型

PLNG分子はアミノ末端から順にプレアクティベーションペプチド、5個のクリングルドメイン、カルボキシ末端のセリンプロテアーゼドメインの各ドメインで構成されている。PLNG A620T(PLNG Tochigi)ではセリンプロテアーゼドメイン内の620番目のAlaがThrに置換されている。

に低下する I 型PLNG欠損症の頻度が0.42%、抗原量は正常であるが活性が低下している II 型PLNG欠損症(この中にはPLNG A620Tが含まれる)の頻度がヘテロ3.83%、ホモ0.04%と II 型PLNG欠損症の頻度が高いが、PLNG欠損症群と対象群でDVTないし動脈血栓症発症の危険性に差はないことが示された¹²⁾。

プラスミノゲンアクティベーターインヒビター 1(PAI-1)

プラスミノゲンアクティベーターインヒビター 1(plasminogen activator inhibitor 1 : PAI-1)はt-PAを阻害して線溶系を抑制する。したがって、血漿PAI-1が高値となればフィブリン分解が阻害され血栓形成が進行することが予測される。実際、動脈硬化病変部位ではPAI-1 mRNA発現量が亢進していること、心血管死にはPAI-1高値が関連すること、などが報告されており、PAI-1高値は血栓症発症に関与すると考えられている¹³⁾。PAI-1発現量は種々のサイトカイン、ホルモン、増殖因子、などにより調節されているが、さらにPAI-1遺伝子のプロモーター領域-675bpにある4G(GTGGGGGAGTC)/5G(GTGGGGGAGTC)の遺伝子多型がPAI-1発現量に影響することが知られている。In vitroの実験では、4Gアレルには転写抑制因子が結合できないためPAI-1発現量が亢進することが示されており、4G/4Gのキャリアーでは5G/5Gのキャリアーよりも約25%PAI-1値が高値となることが報告されている¹⁴⁾。PAI-1[-675]4G/5G遺伝子多型と血栓症の関連はいくつかの報

告で解析されている。Erikssonらは、45歳以前に心筋梗塞を発症した男性患者では4Gのキャリアーが有意に多いことを報告した¹⁵⁾。しかし、その後報告された高齢男性を対象としたUS Physician's Health Studyでは、心筋梗塞と4G/5G遺伝子多型の間に関連はみられなかった¹⁶⁾。その他のいくつかの報告でも、4G/5G遺伝子多型と心筋梗塞発症あるいはDVT発症との関連の有無に関する解析結果はさまざまである¹⁴⁾。さらに、日本人を対象としてYamadaらが施行した候補遺伝子アプローチ法を用いた解析では、5Gキャリアーが女性の心筋梗塞発症の危険因子であった¹⁷⁾。これらの結果から、現時点ではPAI-1[-675]4G/5G遺伝子多型と血栓症発症の関連に関しては結論できないと考えるのが妥当であろう。

ADAMTS 13

ボンヴィレブランド因子(von Willebrand factor : vWF)を分解する酵素であるADAMTS 13は、アミノ末端から順に、プレプロペプチドドメイン、メタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリン様ドメイン、トロンボスポンジン様ドメイン、システインリッチドメイン、スペーサードメイン、さらに7個のトロンボスポンジン様ドメイン、カルボキシ末端のCUBドメインで構成されている。アミノ酸変異により活性を失ったADAMTS 13分子異常の患者では、先天性の血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura : TTP)を発症することが知られている¹⁸⁾。ADAMTS 13の遺伝子

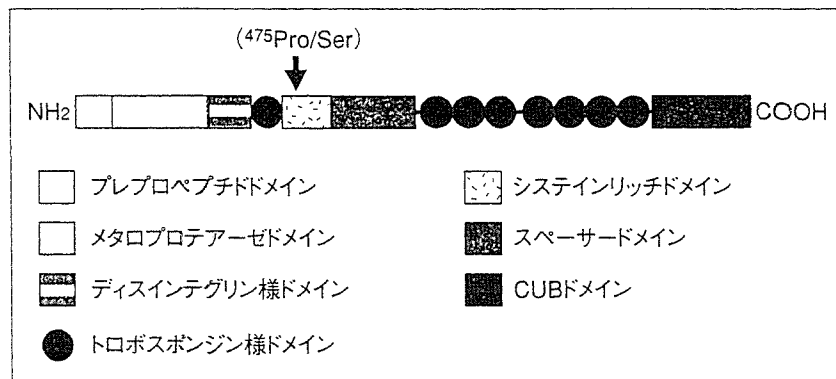


図3 ADAMTS 13の構造と遺伝子多型

ADAMTS 13はアミノ末端から順に、プレプロペチドドメイン、メタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリン様ドメイン、トロンボスポンジン様ドメイン、システインリッチドメイン、スペーサードメイン、さらに7個のトロンボスポンジン様ドメイン、カルボキシ末端のCUBドメインで構成されている。ADAMTS 13 P475Sではシステインリッチドメイン内の475番目のProがSerに置換されている。

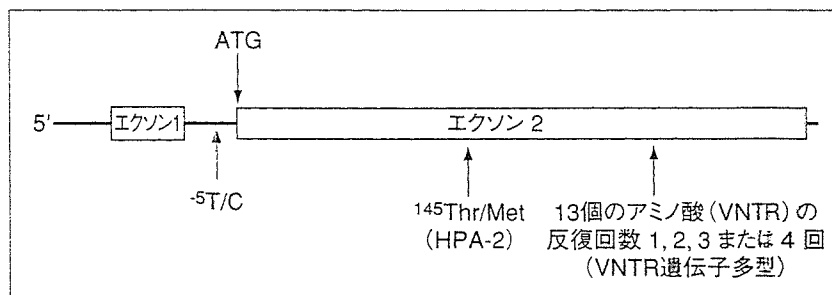


図4 GPIbαの遺伝子多型

GPIbαにはいくつかの遺伝子多型が報告されているが、本図に示すKozak配列の⁻⁵T/C, 145番目のThr/Met, 13個のアミノ酸の繰り返し配列(VNTR)の反復回数の遺伝子多型と血栓症との関連について研究されている。

表2 GPIbαの¹⁴⁵Thr/MetとVNTRの反復回数の人種差

	¹⁴⁵ Thr	¹⁴⁵ Met	VNTRの反復回数			
			1	2	3	4
日本人	92.0	8.0	33.9	59.8	0.6	5.7
白人	92.4	7.6	8.4	84.0	7.6	0.0

日本人ではGPIbαの145番目のアミノ酸がThrの場合、VNTRは1回または2回の反復であり、Metの場合には3回または4回の反復である。一方白人では、145番目がMetの場合にはほとんどが3回の反復である。(文献²³⁾²⁴⁾を参照して作成)

多型はいくつか報告されているが、日本人に頻度が多いものはシステイン-リッチドメイン内の475番目のProがSerに置換されたADAMTS 13 P475Sである(図3)¹⁹⁾。この遺伝子多型の日本人でのアリル頻度は5.1%であるが、中国人では1.5%²⁰⁾、さらに白人ではみられないと報告されてい

る²¹⁾。また、リコンビナントADAMTS 13 P475Sを用いた*in vitro*の実験では酵素活性が低下していることが示されているが¹⁹⁾、われわれのグループで行った解析では、心血管疾患患者、脳梗塞患者でこの変異を有する割合は健常人と有意差はなかった²²⁾。vWFが血栓形成に重要な役割を果たしているのはよく知られているが、その分解酵素と血栓症の関連に関する研究は始まったばかりである。今後さらに大規模な前向き研究を行い、ADAMTS 13 P475Sを含めたADAMTS 13の遺伝子多型の臨床的意義を明らかにしていくことが必要であろう。

GPIbα

GPIbαはGPIbβ, GPV, GPIXと複合体を形成している血小板膜蛋白である。この複合体は、

表3 最近報告された血栓症と遺伝子多型のメタ解析の結果

	DVT再発の危険比	冠動脈疾患発症の危険比	白人/日本人でのアリル頻度(%)
FV Leiden	1.41	1.17	3/0
PT G20210A	1.72	1.31	1/0
PAI-1[-675]4G/5G	—	1.06	49/39*
GPIIbα[-5]T/C	—	1.05	13/20**

*5Gアリルの頻度, **5Gアリルの頻度. 最近報告されたメタ解析の結果, FV Leiden およびPT G20210AはDVT再発との間に関連があり, CAD発症にも弱い関連があった. 一方, 本文中で紹介したPAI-1[-675]4G/5GとCAD発症にも弱い関連がある可能性があるが, この結果は選択した論文のバイアスの影響があると考えられている. 図4に示したGPIIbα[-5]T/Cの遺伝子多型とCAD発症の間には関連はなかった. (文献²⁸⁾²⁹⁾より改変して作成)

高ずり応力下ではvWFと結合して血小板粘着, 血栓形成に重要な役割を果たしている. GPIIbαにはいくつかの遺伝子多型が報告されているが, 145番目のThr/Metの遺伝子多型と13個のアミノ酸の繰り返し配列(VNTR)の反復回数の関連が日本人と白人で違いがみられる(図4). 日本人では, 145番目のアミノ酸がThrの場合VNTRは1回または2回の反復であり, Metの場合には3回または4回の反復である(表2)²³⁾. 一方白人では, 145番目がMetの場合にはほとんどが3回の反復である²⁴⁾. GPIIbαの145番目がMetである, あるいはVNTRの3回または4回反復を有することが心筋梗塞, 脳梗塞などの血栓症発症が関連する²⁵⁾, との報告がある一方で, これらに相関関係は認められない²⁶⁾, とする報告もあり, このGPIIbαの遺伝子多型が血栓症の危険因子であるか否かは, まだ一定の見解は得られていない.

第5因子(FV)とプロトロンビン(PT)

血液凝固因子の一つであるFVはトロンビンまたはXaで切断されると凝固促進活性を有する活性化FV(FVa)を形成し, このFVaはさらに抗凝固因子であるAPCにより切断され不活化される. 一方, FVが最初にAPCにより切断されると, 抗凝固活性をもちAPCの補酵素として働く. APCレジスタンスの原因として知られているFV Leidenは, 506番目のArgがGlnに置換されてAPCにより切断されなくなったFVであり, FV Leidenのキャリアーの血液は血栓傾向を呈している. また, PTの遺伝子多型としては非翻訳領域に変異を有するPT G20210Aが重要であり, この多型を有す

るキャリアーは血漿PT値が高値となり血栓傾向を呈することが知られている. 白人ではFV Leidenの頻度が2~7%, PT G20210Aの頻度が2~3%と比較的高く, いくつかの臨床研究の結果, 両者はともにDVT発症の危険因子であると考えられている²⁷⁾. 最近報告されたいくつかの臨床研究をメタ解析した結果では, 計3,104人の初発のDVT患者中21.4%がFV Leidenキャリアーであり, FV LeidenキャリアーではDVT再発の危険性は1.41倍であった. 計2,903人の初発のDVT患者中9.7%がPT G20210Aキャリアーであり, PT G20210AキャリアーではDVT再発の危険性は1.72倍であった. これらの結果から, この両者はDVT再発の危険因子でもあるが, その程度は再発予防のために必ずしも長期の抗凝固療法が必須とされるほどではない, と結論されている²⁸⁾.

一方, この両者の変異は従来必ずしも心筋梗塞などの動脈血栓症の危険因子とは考えられていなかったが, 最近報告された66,155人の冠動脈疾患(coronary artery disease: CAD)患者と91,307人の対照群という大規模なメタ解析の結果では, FV G1691AのキャリアーでCAD発症の相対危険比が1.17, PT G20210Aでは1.31と上昇しており, この両者の変異はCAD発症に強くはないが関連していることが示された. なお, この研究ではその他5種類の遺伝子多型についても解析されているが, それらとCAD発症の関連は明らかではなかった²⁹⁾. この結果は, FV Leiden, PT G20210AはDVTのみならず弱いながらもCAD発症の危険因子であることを示唆するものといえる(表3). したがって, 血栓症, ことに肺血栓

症などのDVT患者ではこの両者の変異を有するかは重要な情報ではあるが、実際は日本人にはいずれの変異も存在しない。したがって、日本国内で日本人を対象として診療を行っているかぎりこれらの変異を検査する必要はまったくない。しかし外国人、とくに白人患者を診療する場合、あるいは外国で診療を行う場合にはこの両遺伝子多型の検査が必要となることがある。

おわりに

以上述べてきたように、日本人ではおそらくPS K196Eが深部静脈血栓症(DVT)発症と関連すると考えられる。したがって、現時点では保険適応の問題はあるが、日本人でDVTと診断した場合には可能であればPS K196Eのキャリアーであるか否かを検査することが望ましいと思われる。ただし、その結果をいかに診療に役立てて行くべきかは今後の検討課題である。一方現時点では、日本人において心筋梗塞、脳梗塞などの動脈血栓症発症との関連が明らかにされている遺伝子多型はない。最初に述べたように血栓症発症にはさまざまな要因が複雑に絡み合っている。その中で遺伝子多型と血栓症の関連を明らかにするためには、PS K196Eも含め今後多くの遺伝子多型に関して前向きの大規模な試験を行う必要がある。

文 献

- 1) Nomura T, Suehisa E, Kawasaki T, et al. Frequency of protein S deficiency in general Japanese population. *Thromb Res* 2000 ; 100 : 367.
- 2) Sakata T, Okamoto A, Mannami T, et al. Prevalence of protein S deficiency in the Japanese general population : The Suita Study. *J Thromb Haemost* 2004 ; 2 : 1012.
- 3) Dykes AC, Walker ID, McMahon AD, et al. A study of protein S antigen levels in 3788 healthy volunteers : influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. *Br J Haematol* 2001 ; 113 : 636.
- 4) Miyata T, Kimura R, Kokubo Y, et al. Genetic risk factors for deep vein thrombosis among Japanese : Importance of protein S K196E mutation. *Int J Haematol* 2006 ; 83 : 217.
- 5) Shigekiyo T, Uno Y, Kawauchi S, et al. Protein S Tokushima : An abnormal protein S found in Japanese family with thrombosis. *Thromb Haemost* 1993 ; 70 : 244.
- 6) Yamazaki T, Sugiura I, Matsushita T, et al. A phenotypically neutral dimorphism of protein S : the substitution of Lys 155 by Glu in the second EGF domain predicted by an A to G base exchange in the gene. *Thromb Res* 1993 ; 70 : 395.
- 7) Kimura R, Honda S, Kawasaki T, et al. Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood* 2006 ; 107 : 1737.
- 8) Hayashi T, Nishioka J, Shigekiyo T, et al. Protein S Tokushima : Abnormal molecule with a substitution of Glu for Lys-155 in the second epidermal growth factor-like domain of protein S. *Blood* 1994 ; 83 : 683.
- 9) Hayashi T, Nishioka J, Suzuki K. Molecular mechanism of the dysfunction of protein S_{Tokushima} (Lys¹⁵⁵→Glu) for the regulation of the blood coagulation system. *Biochim Biophys Acta* 1995 ; 1272 : 159.
- 10) Miyata T, Iwanaga S, Sakata Y, et al. Plasminogen Tochigi : Inactive plasmin resulting from replacement of alanine-600 by threonine in the active site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982 ; 79 : 6132.
- 11) Ooe A, Kida M, Yamazaki T, et al. Common mutation of plasminogen defected in three Asian populations by an amplification refractory mutation system and rapid automated capillary electrophoresis. *Thromb Haemost* 1999 ; 82 : 1342.
- 12) Okamoto A, Sakata T, Mannami T, et al. Population-based distribution of plasminogen activity and estimated prevalence and relevance to thrombotic disease of plasminogen deficiency in the Japanese: the Suita Study. *J Thromb Haemost* 2003 ; 1 : 2397.
- 13) Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000 ; 342 : 1792.
- 14) Francis CW. Plasminogen activator inhibitor-1 levels and polymorphisms. Association with venous thromboembolism. *Arch Pathol Lab Med* 2002 ;

- 126 : 1401.
- 15) Eriksson P, Kallin B, van't Hooft FM, et al. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 1851.
 - 16) Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, et al. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation* 1997 ; 95 : 59.
 - 17) Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, et al. Prediction of the risk of myocardial infarction from the polymorphisms in candidate gene. *N Engl J Med* 2002 ; 347 : 1916.
 - 18) Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001 ; 413 : 488.
 - 19) Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, et al. Mutations and common polymorphisms in ADAMTS 13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 11902.
 - 20) Ruan C, Dai L, Su J, et al. The frequency of P475S polymorphisms in von Willebrand factor-cleaving protease in the Chinese population and its relevance to arterial thrombotic disorders. *Thromb Haemost* 2004 ; 91 : 1257.
 - 21) Bongers TN, De Maat MPM, Dippel DWJ, et al. Absence of Pro475Ser polymorphism in ADAMTS-13 in Caucasians. *J Thromb Haemost* 2005 ; 3 : 805.
 - 22) Murata M, Uchida T, Suzuki M, et al. Screening of single nucleotide polymorphisms in the ADAMTS 13 (von Willebrand factor-cleaving protease) gene and studies on their association with stroke and coronary artery disease. *Blood* 2003 ; 102 : 801a.
 - 23) Murata M, Matsubara Y, Kawano K, et al. Coronary artery disease and polymorphisms in a receptor mediating shear stress-dependent platelet activation. *Circulation* 1997 ; 96 : 3281.
 - 24) Aramaki KM, Reiner AP. A novel isoform of platelet glycoprotein Iba is prevalent in African Americans. *Am J Haematol* 1999 ; 60 : 77.
 - 25) Sonoda A, Murata M, Ito D, et al. Association between platelet glycoprotein Iba genotype and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 2000 ; 31 : 493.
 - 26) Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, et al. Platelet GP IIIa P1A and GPIb variable number tandem repeat polymorphisms and markers of platelet activation in acute stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 ; 18 : 1124.
 - 27) Reitsma PH. Genetic heterogeneity in hereditary thrombophilia. *Haemostasis* 2000 ; 30 Suppl 2 : 1.
 - 28) Ho WK, Hankey G, Quinlan DJ, et al. Risk of recurrent venous thromboembolism in patients with common thrombophilia. *Arch Intern Med* 2006 ; 166 : 729.
 - 29) Ye Z, Liu EHC, Higgins JPT, et al. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary_disease : meta-analysis of 66155 cases and 91307 controls. *Lancet* 2006 ; 367 : 651.

* * *



Telomere length of normal leukocytes is affected by a functional polymorphism of hTERT

Yumiko Matsubara ^{a,*}, Mitsuru Murata ^b, Tadashi Yoshida ^c, Kiyooki Watanabe ^b, Ikuo Saito ^d, Koichi Miyaki ^e, Kazuyuki Omae ^e, Yasuo Ikeda ^a

^a Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

^b Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

^c Department of Pathophysiology, Faculty of Pharmacology, Hoshi University, Tokyo, Japan

^d Health Center, Keio University, Tokyo, Japan

^e Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

Received 22 December 2005

Available online 6 January 2006

Abstract

Transcriptional regulation of human telomerase reverse transcriptase (hTERT), a catalytic subunit of telomerase, is essential for telomerase activity associated with telomere length. In this study, we investigated the effects of a ⁻¹³²⁷T/C polymorphism within the hTERT promoter region on the hTERT promoter activity and leukocyte telomere length in normal individuals. The promoter activity in the ⁻¹³²⁷T-sequence was significantly higher than that in the ⁻¹³²⁷C-sequence ($p = 0.0004$). For leukocyte telomere length, the ⁻¹³²⁷T-allele carriers had significantly longer than the ⁻¹³²⁷T-allele non-carriers ($p = 0.0007$). Also, there was no age-related shortening in leukocyte telomere length in the ⁻¹³²⁷T/T ($p = 0.6633$) and ⁻¹³²⁷T/C subjects ($p = 0.1691$), whereas there was clear age-related telomere shortening in the ⁻¹³²⁷C/C subjects ($p = 0.0117$). These findings suggest that the functional ⁻¹³²⁷T/C polymorphism of hTERT is associated with leukocyte telomere length in normal individuals.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Human telomerase reverse transcriptase; Polymorphism; Telomere length

Telomerase synthesizes telomeric repeats for addition to the end of linear chromosomes, although replication of the telomeric end is sometimes incomplete [1,2]. Thus, telomere shortening occurs after repeated cell divisions and has a key role in cellular senescence, differentiation, immortalization, and transformation [3]. A recent study showed that telomere shortening is assumed to contribute to mortality in older subjects or age-related diseases [4].

Telomere length is mainly regulated by telomerase activity associated with transcriptional activity of human telomerase reverse transcriptase (hTERT), a subunit of telomerase [5–7]. The hTERT promoter region located with the 1375 bp upstream of the transcrip-

tion-starting site is rich in transcription factor binding sites [8,9]. Although the regulation of hTERT transcription has been widely studied, little is known about the genetic variations in relation to hTERT transcriptional activity.

In this study, the hTERT promoter region was sequenced for screening of genetic polymorphisms in a healthy population. A T to C transition 1327 bp upstream of the transcription-starting site of hTERT (⁻¹³²⁷T/C) was frequently observed (nucleotide numbering according to Horikawa et al.) [9]. Further, we investigated the association between the ⁻¹³²⁷T/C polymorphism and (a) hTERT transcriptional activity in normal human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and (b) telomere length and telomerase activity in peripheral leukocytes in normal individuals.

* Corresponding author. Fax: +81 3 3353 3515.

E-mail address: yumikoma@sc.itc.keio.ac.jp (Y. Matsubara).

Materials and methods

Screening of the sequence variations within the hTERT promoter region. Written informed consent was obtained from all subjects enrolled into the study. Study subjects were genetically unrelated Japanese subjects.

We recruited 46 healthy subjects for screening of polymorphisms within the hTERT promoter region. Among these subjects, the variation(s) in the hTERT sequence (nucleotide number [9] -1665 to $+20$) for 17 subjects and the sequence variation at position -1327 for 29 subjects were analyzed by a direct DNA sequence analysis.

Luciferase assay. A dual-luciferase reporter assay system (Promega, Madison, WI) was used according to the manufacturer's protocol. A 1.6-kb DNA fragment (nucleotide number [9] -1623 to $+20$) with the -1327 T- or -1327 C-sequence was subcloned using the TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Each hTERT insert was subsequently cloned into a firefly luciferase reporter plasmid pGL3-Basic, a promoter- and enhancer-less vector (Promega), designated pGL3- -1327 T and pGL3- -1327 C. Thus, we prepared four types of firefly luciferase reporter plasmids, pGL3- -1327 T, pGL3- -1327 C, pGL3-Basic, and pGL3-Control, with the SV40 enhancer/promoter for the normalization of hTERT promoter activity and one *Renilla* luciferase reporter plasmid for standardization of transfection efficiency.

HUVECs (passage number, 3) were purchased from TAKARA (Tokyo, Japan). Early passage HUVECs (passage number, 5–7) were used to avoid the influence of any transformation by subculture on this assay. Transfection with luciferase plasmid into HUVECs was performed using FuGene 6 Transfection Reagent (Roche, Nutley, NJ). Luminescence was measured in each transfectant 24 h and 48 h after transfection. The value corresponding to the transcriptional activity of hTERT promoter for pGL3- -1327 T or -1327 C was calculated using the formula: relative luciferase activity (%) = [(pGL3- -1327 T or -1327 C) – (pGL3-Basic)] / [(pGL3-Control) – (pGL3-Basic)] \times 100.

Assay for telomere length. To measure telomere length of leukocyte DNA, as assessed by mean length of terminal restriction fragments (TRF), we used Southern hybridization of telomeric DNA [10] and real-time kinetics quantitative polymerase chain reaction (PCR) [11], and correlation of results by these two methods was previously confirmed [11]. After the confirmation of correlation between these two different methods for measuring telomeres of our samples, we calculated telomere length. Study subjects were 133 males over 40 years of age because the rate of telomere shortening decreases after 40 years of age and is higher in males [12,13]. Genotyping of the -1327 T/C polymorphism was performed using Megabase 1000 (General Electric, Fairfield, CT), according to the manufacturer's protocol for the single nucleotide primer extension-based method.

Telomerase activity. Telomerase activity in leukocyte from healthy subjects was measured using the method for real-time quantitative PCR telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay, as described previously [14], and telomerase activity in each genotype of the -1327 T/C polymorphism was analyzed by the values of threshold cycle of telomeric repeat amplification in the real-time quantitative PCR TRAP assay. Nine study subjects were selected to match in age among three genotypes of the -1327 T/C polymorphism.

Statistics. Mean values of the two groups in this study were compared by Student's *t* test. Mean values of the three groups in this study were compared by ANOVA. Single regression analysis was used to detect a correlation coefficient (*r*) in TRF length assay. Statistical analyses were performed using StatView (ver 5.0, for Macintosh, SAS, Cary, NC). A *p* value less than 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

We analyzed the sequence of the hTERT promoter region to screen for genetic variations in 17 subjects, and 2 subjects were showed to be heterozygous for a T to C transition at 1327 bp upstream of the transcription-starting site [9]. This -1327 T/C transition has been reported

(rs 2735940) in the database of single nucleotide polymorphism (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>), although there is no report of epidemiologic or experimental data for this substitution. To examine whether this T/C substitution is polymorphism or not, i.e., this substitution is present more than 1% among population, the genotype distribution of the -1327 T/C substitution was analyzed in an expanded population of 46 subjects. As a result, the genotype distribution was 15.2% for the -1327 T/T genotype, 39.0% for the -1327 T/C genotype, and 45.8% for the -1327 C/C genotype, suggesting that this T/C substitution is a polymorphism.

To investigate the effects of the -1327 T/C polymorphism on hTERT transcriptional activity, we performed an experimental study using a dual-luciferase reporter assay system. The mean value of relative luciferase activity representative of hTERT promoter activity in HUVECs transfected with pGL3- -1327 T was significantly higher than that in HUVECs transfected with pGL3- -1327 C at 24 h or 48 h after the transfection: 4.592 ± 0.285 (%), mean \pm SD) for the pGL3- -1327 T and 3.711 ± 0.686 for the pGL3- -1327 C after 24 h of the transfection ($p = 0.0026$), and 6.368 ± 1.017 for the pGL3- -1327 T and 4.842 ± 0.203 for the pGL3- -1327 C after 48 h of the transfection ($p = 0.0004$) (data were obtained from three independent experiments performed in triplicate). The results are indicative of the relationship between the -1327 T-sequence and higher hTERT transcriptional activity.

Next, we measured leukocyte TRF length to test the hypothesis that the -1327 T/C polymorphism affects telomere length, closely related to the final stages of the telomere system. This speculation was also raised by previous reports that an inter-individual variation in leukocyte telomere length was genetically determined [15,16]. The TRF length in normal leukocytes was significantly different among the three genotypes: 7.80 ± 1.23 (kb, mean \pm SD) for the -1327 C/C genotype ($n = 67$), 8.47 ± 1.04 for the -1327 T/C genotype ($n = 52$), and 8.53 ± 0.96 for the -1327 T/T genotype ($n = 14$) ($p = 0.0031$; Fig. 1). When analyzing the telomere length between the subjects without or with the -1327 T-allele, we obtained the results which showed that the genotypes with -1327 T/T and -1327 T/C were significantly longer than that in the -1327 C/C genotype: 7.80 ± 1.23 (kb, mean \pm SD) for the -1327 C/C genotype ($n = 67$), 8.47 ± 1.04 for the -1327 T/C and -1327 T/T genotypes ($n = 66$) ($p = 0.0007$). Mean age was not significantly different between groups: 53.4 ± 5.0 (years, mean \pm SD) for the -1327 C/C, 52.7 ± 4.4 for the -1327 T/C, and 51.9 ± 4.4 for the -1327 T/T ($p = 0.5200$). Also, there was no age-related shortening in TRF length in the -1327 T/T ($r = 0.128$, $p = 0.6633$) and -1327 T/C subjects ($r = -0.194$, $p = 0.1691$), whereas there was clear age-related telomere shortening in the -1327 C/C subjects ($r = -0.306$, $p = 0.0117$; Fig. 1). These observations suggest that the -1327 T/C polymorphism is strongly associated with telomere length in peripheral leukocytes in normal individuals.

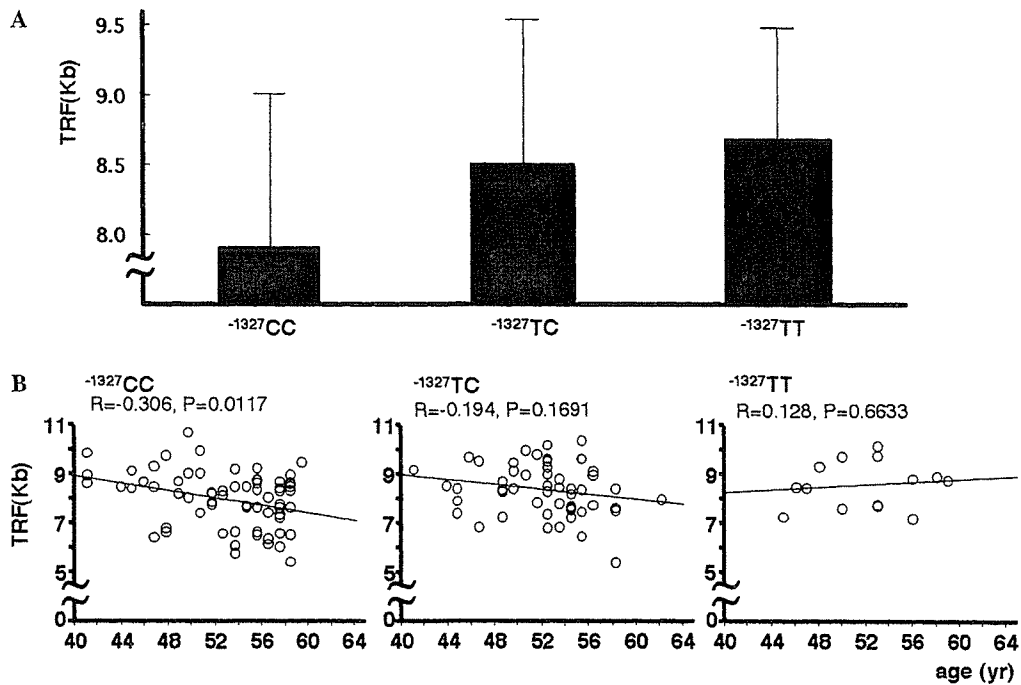


Fig. 1. Relationship between leukocyte telomere length and the $^{-1327}\text{T/C}$ polymorphism. (A) Bars show mean TRF length (i.e., telomere length) (mean \pm SD) in each genotype. (B) Plot of leukocyte TRF length against age and regression line are shown separately for the $^{-1327}\text{CC}$, $^{-1327}\text{TC}$, and $^{-1327}\text{TT}$ genotypes.

Telomere length is mainly regulated by telomerase activity that is generally associated with hTERT transcriptional activity. However, several reports showed that transcriptional activity of hTERT did not always correlate directly with telomerase activity and the presence of post-translational modification [17]. Thus, we analyzed the relationship between the $^{-1327}\text{T/C}$ polymorphism and telomerase activity in leukocyte from healthy subjects, and mean age in each genotype group was 36.0 ± 11.0 (y, mean \pm SD) for the $^{-1327}\text{C/C}$ genotype ($n=4$), 36.0 ± 7.1 for the $^{-1327}\text{T/C}$ genotype ($n=2$), and 36.0 ± 12.2 for the $^{-1327}\text{T/T}$ genotype ($n=3$). Telomerase activity was examined using the threshold cycle values (C_t) of telomeric repeat amplification in the real-time quantitative PCR TRAP assay, thus higher C_t indicating lower telomerase activity. Telomerase activity in the subjects with the $^{-1327}\text{T}$ -allele was higher than that in the subjects without the $^{-1327}\text{T}$ -allele: 29.9 ± 5.6 (C_t , mean \pm SD) for the $^{-1327}\text{C/C}$ genotype, 28.0 ± 4.2 for the $^{-1327}\text{T/C}$ genotype, and 21.8 ± 4.0 for the $^{-1327}\text{T/T}$ genotype, and this difference was marginally significant ($p=0.0713$). Observation suggests that the $^{-1327}\text{T}$ -allele is associated with higher telomerase activity in leukocyte.

Discussion

The present study demonstrates for the first time that the $^{-1327}\text{T/C}$ polymorphism within the hTERT promoter region has functional roles: the $^{-1327}\text{T}$ sequence is associated with higher transcriptional activity, lack of age-dependent telomere shortening, longer telomere length, and telomerase

activity. The relationship of the $^{-1327}\text{T/C}$ polymorphism to telomere shortening, telomere length, and telomerase activity was found in normal peripheral leukocytes. Leukocyte telomere shortening has been highlighted as a critical marker in the research of cell senescence and cancer, thus, our observations show an impact in the fields.

Transcriptional regulation of hTERT has a key role in telomerase activity and telomere shortening; therefore, we focused on the hTERT promoter region in this study. In our promoter assay, we found approximately a 25% higher promoter activity in the $^{-1327}\text{T}$ -sequence compared the $^{-1327}\text{C}$ -sequence. Although the finding with such a modest effect, the data were so strong statistically significant. This significance was caused by the small range of the standard deviations, and possible reasons of the very little inter-assay are as follows; we used a dual-luciferase assay system for standardization of transfection efficiency and early passage HUVECs (passage number, 5–7) to avoid the influence of any transformation by long-term culture on this assay. Particularly, long-term culture of HUVECs showed cell senescence [18]. Although HUVECs have slight activity of telomerase [19], telomerase activity in senescent HUVECs is not fully understood. These suggest that long-term culture of HUVECs is not adapted to evaluate hTERT promoter assay. Thus, we used the present assay system that telomerase promoter with promoter gene works under transient condition using early passage HUVECs although it is important to examine the promoter assay under permanent condition in HUVEC. As a result of careful assay design, we found the relationship of the $^{-1327}\text{T/C}$ polymorphism on hTERT transcription activity in HUVECs.

We measured leukocyte DNA TRF length, but not that of endothelial cells, because telomere length in both leukocytes and endothelial cells is inversely correlated with age (average decline 30–40 bp/year in normal leukocytes) [12,13,20–22], and leukocyte DNA was available for this study. Also, endothelial cells and leukocytes are exposed to the same hemodynamic stress, thus the rate of turnover is considered to correlate between these cells [21]. The $^{-1327}\text{T}$ -sequence was strongly associated with longer telomere length. We postulated that $^{-1327}\text{T}$ -sequence with higher hTERT transcriptional activity is associated with more effective extension of the telomeric end during cell division, and our results reveal a possible causative role of the $^{-1327}\text{T/C}$ polymorphism in inter-individual variations in leukocyte telomere length.

In conclusion, we report a potential role of the $^{-1327}\text{T/C}$ polymorphism within the hTERT promoter region in the hTERT promoter activity and leukocyte telomere shortening among normal individuals.

Acknowledgments

We thank Ms. Satomi Tezuka and Ms. Aya Shimizu for their technical support in genetic analysis.

References

- [1] G.B. Morin, The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats, *Cell* 59 (1989) 521–529.
- [2] A.O. Wilkie, J. Lamb, P.C. Harris, R.D. Finney, D.R. Higgs, A truncated human chromosome 16 associated with alpha thalassaemia is stabilized by addition of telomeric repeat (TTAGGG)_n, *Nature* 346 (1990) 868–871.
- [3] J.M. Wong, K. Collins, Telomere maintenance and disease, *Lancet* 362 (2003) 983–988.
- [4] R.M. Cawthon, K.R. Smith, E. O'Brien, A. Sivatchenko, R.A. Kerber, Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older, *Lancet* 361 (2003) 393–395.
- [5] T.M. Nakamura, G.B. Morin, K.B. Chapman, S.L. Weinrich, W.H. Andrews, J. Lingner, C.B. Harley, T.R. Cech, Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human, *Science* 276 (1997) 955–959.
- [6] A. Kilian, D.D. Bowtell, H.E. Abud, G.R. Hime, D.J. Venter, P.K. Keese, E.L. Duncan, R.R. Reddel, R.A. Jefferson, Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types, *Hum. Mol. Genet.* 6 (1997) 2011–2019.
- [7] A.L. Ducrest, H. Szutorisz, J. Lingner, M. Nabholz, Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene, *Oncogene* 21 (2002) 541–552.
- [8] M. Takakura, S. Kyo, T. Kanaya, H. Hirano, J. Takeda, M. Yutsudo, M. Inoue, Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells, *Cancer Res.* 59 (1999) 551–557.
- [9] I. Horikawa, P.L. Cable, C. Afshari, J.C. Barrett, Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene, *Cancer Res.* 59 (1999) 826–830.
- [10] E. Hiyama, K. Hiyama, T. Yokoyama, T. Ichikawa, Y. Matsuura, Length of telomeric repeats in neuroblastoma: correlation with prognosis and other biological characteristics, *Jpn. J. Cancer Res.* 83 (1992) 159–164.
- [11] R.M. Cawthon, Telomere measurement by quantitative PCR, *Nucleic Acid Res.* 30 (2002) e47.
- [12] H. Iwama, K. Ohyashiki, J.H. Ohyashiki, S. Hayashi, N. Yahata, K. Ando, K. Toyama, A. Hoshika, M. Takasaki, M. Mori, J.W. Shay, Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals, *Hum. Genet.* 102 (1998) 397–402.
- [13] A. Benetos, K. Okuda, M. Lajemi, M. Kimura, F. Thomas, J. Skurmick, C. Labat, K. Bean, A. Aviv, Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity, *Hypertension* 37 (2001) 381–385.
- [14] H. Wege, M.S. Chui, H.T. Le, J.M. Tran, M.A. Zern, SYBR green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity, *Nucleic Acid Res.* 31 (2003) e3.
- [15] P.E. Slagboom, S. Droog, D.I. Boomsma, Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups, *Am. J. Hum. Genet.* 55 (1994) 876–882.
- [16] B.A. Kosciolk, P.T. Rowley, Human lymphocyte telomerase is genetically regulated, *Genes Chromosomes Cancer* 21 (1998) 124–130.
- [17] Y.H. Hsu, J.J. Lin, Telomere and telomerase as targets for anti-cancer and regeneration therapies, *Acta Pharmacol. Sin.* 26 (2005) 513–518.
- [18] R. Hastings, M. Qureshi, R. Verma, P.S. Lacy, B. Williams, Telomere attrition and accumulation of senescent cells in cultured human endothelial cells, *Cell Prolif.* 37 (2004) 317–324.
- [19] S.M. Bode-Boger, J. Martens-Lobenhoffer, M. Tager, H. Schroder, F. Scalera, Aspirin reduces endothelial cell senescence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334 (2005) 1226–1232.
- [20] M. Ogami, Y. Ikura, M. Ohsawa, T. Matsuo, S. Kayo, N. Yoshimi, E. Hai, N. Shirai, S. Ehara, R. Komatsu, T. Naruko, M. Ueda, Telomere shortening in human coronary artery diseases, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2004) 546–550.
- [21] E. Chang, C.B. Harley, Telomere length and replicative aging in human vascular tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 11190–11194.
- [22] H. Vaziri, F. Schachter, I. Uchida, L. Wei, X. Zhu, R. Effros, D. Cohen, C.B. Harley, Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes, *Am. J. Hum. Genet.* 52 (1993) 661–667.

アスピリンレジスタンスの臨床的意義と
その分子基盤

村田 満*

抗血小板薬は世界中で多くの患者が服用しており、とくにわが国ではアスピリンが頻用され約340万人が服用しているとされる。しかし一般人口の約3割の人がアスピリンが効かない、いわゆるアスピリンレジスタンス(アスピリン不応)ともいわれている。これらの人にアスピリンを漫然と投与することは医療経済の面からも大きな損失である。最近アスピリン不応者では心血管イベントの再発が多いと報告された。一般に抗血小板薬不応者では血小板機能が高いといわれるが、投与中の血小板機能モニタリングは煩雑であり、投与前の効果予測が理想的である。一方、アスピリンレジスタンスはその定義がまちまちであり、原因も服薬の不遵守にはじまり投与量の不適切、吸収の問題、他の抗炎症薬との薬物相互作用、喫煙、糖尿病、COX-1やGP IIb/IIIaの遺伝子多型、ADPやコラーゲンに対する血小板の感受性亢進、マクロファージ、血管内皮細胞のCOX-1の再生、COX-2の誘導など多くが提唱されている。明確な定義と原因の解明が急務である。

はじめに

アスピリンやチクロピジンなどの抗血小板薬は虚血性脳血管障害や冠状動脈疾患に代表される動脈血栓症に対して世界中で非常に多くの患者に投与されている。数多くの大規模臨床研究においてそれらの効果が立証され、抗血小板薬は全世界で年間約30億錠が動脈血栓症の再発予防や一部ではハイリスク患者の一次予防に用いられている。わが国ではアスピリンが頻用され、約340万人が服用している。アスピリンは動脈硬化性疾患を有

する患者での血栓症再発率を20~30%低下させること、糖尿病患者、高血圧患者など血栓症発症の危険性が高い患者群での血栓症発症予防に有効であることが証明された。その結果に基づき欧米でのアスピリンによる抗血小板療法に関するガイドラインが作成されている。しかし一方では、その予防効果は不十分であることが知られている。抗血小板薬の効果が不十分な原因として、血小板機能の抑制作用が弱いという考え方があるが、これまでの大規模研究においては薬剤効果の個体差が考慮されていない点が問題である。血小板機能は個体差が大きく、たとえば健常人の血小板凝集能を例にとっても、凝集物質に対し非常によく反応し凝集を起こす個体と、まったく凝集を起こさない個体が存在する。この現象は経時的に観察しても同一個体ではよく保存され再現性が良好である。また血小板機能の個体差には遺伝的な要因が想定されている。

【キーワード】

抗血小板療法
アスピリン不応
COX-1
遺伝的多型
心血管イベント

*MURATA Mitsuru/慶應義塾大学医学部臨床検査医学

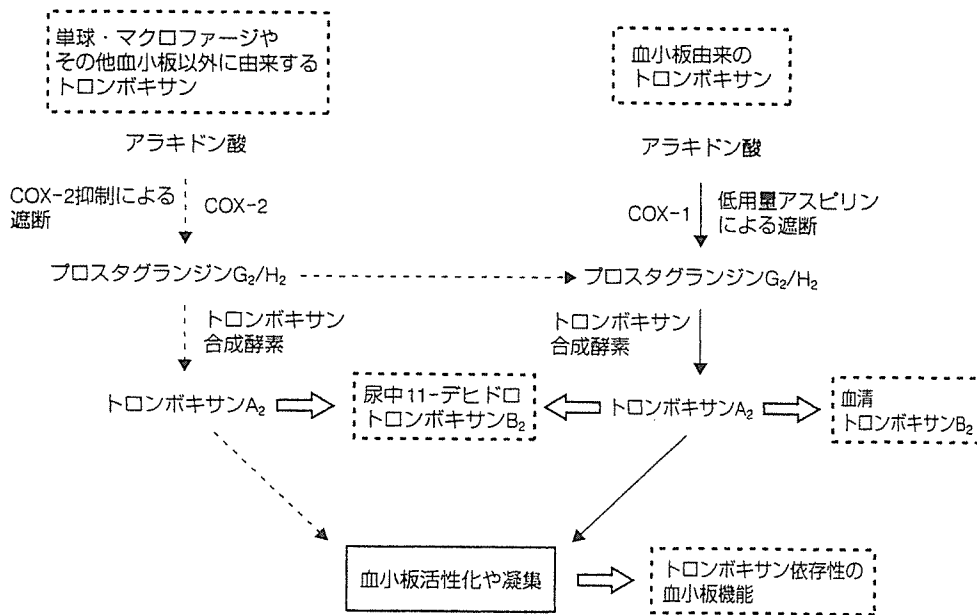


図 1. トロンボキサン合成経路とアスピリンの抗血小板作用 (Hankey GJ *et al*, 2006¹⁾より引用)

アスピリンはシクロオキシゲナーゼ(cyclooxygenase: COX)を阻害してトロンボキサン(thromboxane: TX)合成を抑制することにより、その抗血小板効果を発揮する(図1)¹⁾。最近、いわゆる「アスピリンレジスタンス(アスピリン不応)」の病態が注目されており、大規模研究でも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^{2)~4)}。しかがって、抗血小板薬に対する responder, non-responder の原因解明は重要課題である。これは個々の患者ごとに適切な抗血小板薬を選択する根拠となり、無効な薬剤の使用を減少させる効果が期待される。

「アスピリンレジスタンス」はこれまでさまざまな状態に用いられてきた。すなわち、*in vitro* や *ex vivo* での血小板機能検査におけるアスピリン作用の減弱、*in vivo* でのトロンボキサンA₂(TXA₂)合成抑制作用の減弱、そして臨床的效果の減弱すなわち血栓性疾患の予防効果の減弱などである。同様の現象はアスピリンに限らず、まったく作用機序の異なる抗血小板薬、たとえばクロピドグレルなどでも報告されている。

1. アスピリンレジスタンスの臨床的意義

検査上のアスピリンレジスタンスと、心血管イベントの関連をおそらく最初に示した論文は Grottemeyer ら⁵⁾による、181名のアスピリン服用脳卒中症例の検討であろう。アスピリンレジスタンスと診断された60名は、2年間のフォローアップで40%の症例が重大な心血管イベントを経験したのに対し、アスピリン感受性と診断された残りの患者ではわずか4.4%が心血管イベントを経験した(相対危険率9.1)。

HOPE試験⁶⁾では、尿中11-デヒドロトロンボキサンが976名のハイリスク患者(75~325 mg/日のアスピリン服用)で測定された。11-デヒドロトロンボキサン排泄量が多い上位1/4のグループでは、下位1/4のグループに比較して4.5年の観察期間中、重症心血管イベントの頻度が有意に高かった(図2, オッズ比1.8)。しかもオッズ比の上昇は尿中11-デヒドロトロンボキサンの上昇に伴って連続的に上昇している。

2003年、Gumら⁷⁾は325 mg/日のアスピリンで

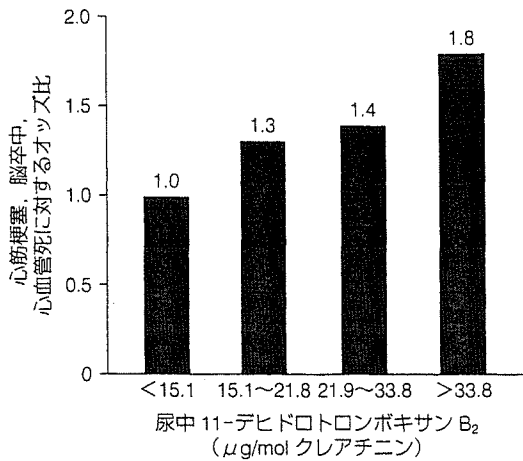


図 2. 尿中 11-デヒドロトロンボキサン B₂ 排泄量とイベントの関連(心筋梗塞, 脳卒中, 心血管死) (Eikelboom JW *et al*, 2002⁶⁾より引用)

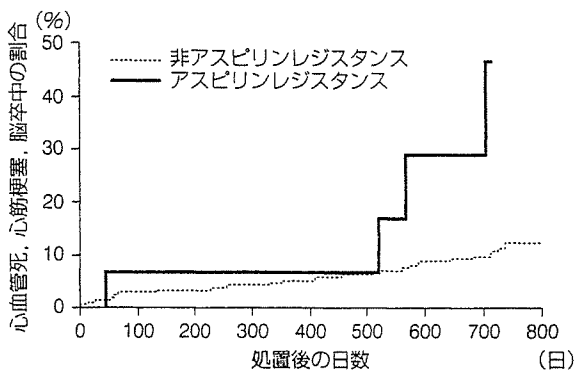


図 3. 血小板凝集抑制の減弱と心血管死との関連 (Gum PA *et al*, 2003⁷⁾より引用)

治療されている 326 名の冠状動脈疾患や脳血管障害患者を解析し、アスピリンレジスタンスと診断された 17 名中 5 名 (29%) が 2 年間のフォローアップで重大な心血管イベントを起こした一方、非アスピリンレジスタンスと診断された 309 名での発症は 30 名 (10%) にとどまったと報告している (図 3)。このほかにも、アスピリンレジスタンスの評価法はさまざまである (インピーダンス凝集計, PFA-100 など) が、アスピリンレジスタンスが心血管イベントと関連するという報告は多い。

2. アスピリンレジスタンスの評価法

いくつかの評価法があるが (表 1)¹⁾, 残念ながら現時点ではアスピリンなどの抗血小板薬の効果を評価する理想的な血小板機能検査は存在しない。言い換えれば服薬中の患者の評価として日常的に推奨される検査は存在しない。上述のようにアスピリンレジスタンスの定義はコンプライアンス、体内動態にはじまり、評価法 (*in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*) がまちまちである。血小板機能のみに着目したアスピリンレジスタンス評価をおこなったとしても、その方法が研究によりさまざまであるため、標準化にはほど遠いのが現状である。

① 血小板凝集計：上述の Gum ら⁷⁾による前向き研究では透過光変化を測定する通常の血小板凝集計が用いられた。PRP での ADP やアラキドン酸凝集に対するアスピリンの効果を評価したもので、約 5.2% の患者がアスピリンレジスタンスであったと報告している。この頻度は他の評価法を用いた研究にくらべかなり低い。しかし、臨床的アウトカムとの相関が非常に良好であったため、信頼性の高いデータと考えられている。

② PFA-100：PFA-100 (Platelet Function Analyzer 100, Dade Behring, Deerfield, IL) は、高ずり応力下 (5,000~6,000/秒) での血小板の血栓形成能を測定する装置である⁸⁾。血管壁への血小板粘着および凝集、そして血栓形成を *in vitro* で再現する。ADP またはエピネフリンとコラーゲンを含有する膜にクエン酸全血を通過させ、血栓形成による閉塞時間を測定する。閉塞時間はフォンウィルブランド病などの出血性疾患で延長し、また一部の抗血小板薬でも延長する。アスピリンについてはエピネフリンとコラーゲンを含有するカートリッジで閉塞時間が延長する。この評価法では、アスピリンレジスタンスは 9.5~40% とされており、喫煙者に多いと報告されている。またアスピリンレジスタンスにアスピリン用量依存性が報告されている。Takahashi ら⁹⁾は 129 名の男

表 1. アスピリンの抗血栓作用の評価方法 (Hankey GJ *et al*, 2006¹⁾より引用)

Advantages		Limitations
Thromboxane production		
Serum thromboxane B ₂	Directly dependent on aspirin's therapeutic target, COX-1	May not be platelet specific Operator expertise required
Urinary 11-dehydro-thromboxane B ₂	Dependent on aspirin's therapeutic target, COX-1 Correlated with clinical events	Not platelet specific Uncertain sensitivity Uncertain reproducibility Not widely evaluated
Thromboxane-dependent platelet function		
Light or optical aggregation	Traditional gold standard Widely available Correlated with clinical events	Not specific Uncertain sensitivity Limited reproducibility Labour intensive Operator and interpreter dependent
Impedance aggregation	Less sample preparation required	Not specific Uncertain sensitivity Operator and interpreter dependent
PFA-100	Simple Rapid Semi-automated Correlated with clinical events	Dependent on von Willebrand factor and haematocrit Not specific
Ultegra RPFA	Simple Rapid Semi-automated Point-of-care test Correlated with clinical events	Uncertain sensitivity Uncertain specificity Uncertain sensitivity

性検診受診者を対象に PFA-100 による評価をおこない、*in vitro* でアスピリンが一定濃度となるよう添加し、閉塞時間を測定した場合、アスピリン 10 μM, 30 分のインキュベーションでは約 3 割が不応と分類される一方、30 μM の場合では不応者はほとんどいなかったと報告している。10 μM での評価では不応者は糖尿病患者でより高頻度であったという。

③尿中 11-デヒドロトロンボキサン B₂排泄量：尿中 11-デヒドロトロンボキサン B₂排泄量が高い人では心筋梗塞や心血管死の頻度が高いとされるが、必ずしもアスピリンレジスタンスと関連するとは考えられていない。これは 11-デヒドロトロンボキサン B₂の一部が血小板以外の組織に由来することに起因するとされており、アスピリンの血小板への作用を確実に反映するものではない。

表 2. 提唱されているアスピリンレジスタンスのメカニズム(アスピリンが抗血栓作用を発揮できない理由) (Hanjic C *et al*, 2006²⁾より改変引用)

1. アスピリン投与量の不適切
2. アスピリンの吸収が悪い製剤(腸溶錠など)
3. 服薬の不遵守
4. 他の抗炎症薬との薬物相互作用(イブプロフェンなど)
5. 喫煙
6. 糖尿病
7. isoprostane 形成
8. ADP やコラーゲンに対する血小板の感受性亢進
9. GP II b/IIIa の遺伝的多型
10. 赤血球や単球/マクロファージによる血小板活性化抑制の障害
11. 時間経過による血小板のアスピリン感受性の低下
12. COX-1 遺伝子多型
13. マクロファージ, 血管内皮細胞の COX-1 の再生, COX-2 の誘導

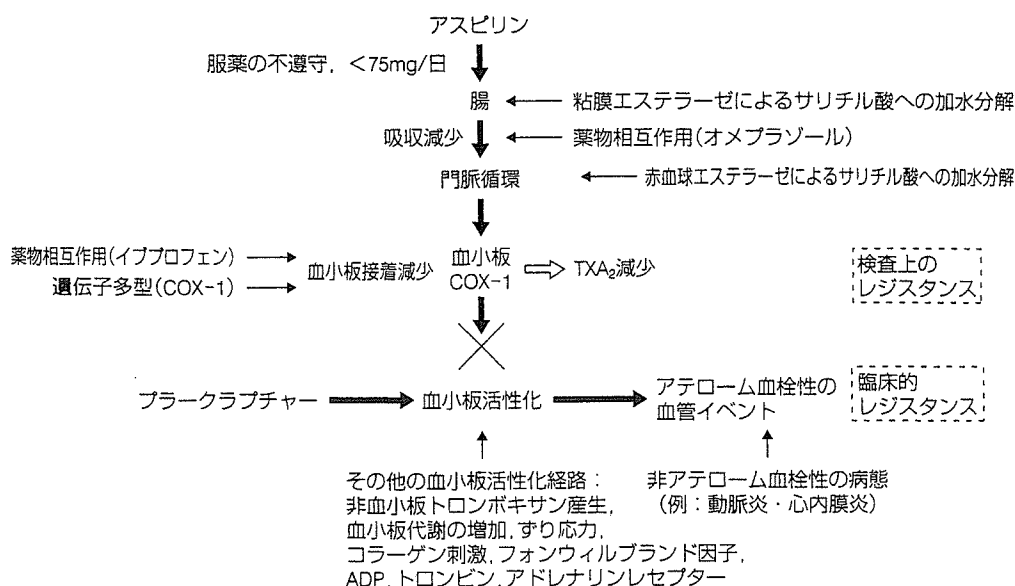


図 4. アスピリンレジスタンスの分子機序 (Hankey GJ *et al*, 2006¹⁾より引用)

このほかにもアスピリンレジスタンスや他の抗血小板薬不応を評価する簡便な装置がいくつか開発されているが、どれもデータが少なく、どれが臨床的なアスピリンレジスタンスを最もよく反映するかは定かでない。

3. アスピリンレジスタンスのメカニズム

表 2 に現在考えられているアスピリンレジスタンスの機序をまとめた²⁾。アスピリンが抗血小板作用を発揮できない理由として、アスピリン投与量の不適切、アスピリンの吸収が悪い製剤(腸溶錠など)、服薬の不遵守などの問題のほか、併存する状態により血小板が活性化されていると思われる場合(喫煙, 糖尿病), イブプロフェンなど他の抗炎症薬の COX への作用が先行するとアスピリンによるアセチル化が阻害される可能性, isoprostane 形成, ADP やコラーゲンに対する血小板の感受性亢進, 赤血球や単球/マクロファージによる血小板活性化抑制の障害, マクロファージ, 血管内皮細胞の COX-1 の再生, COX-2 の誘導, そして血小板自体の遺伝的個体差(GP IIb/IIIa の遺伝的多型¹⁰⁾, COX-1 遺伝子多型)などが提唱され

ている(図 4)¹⁾。他の抗炎症薬による干渉について詳細は省略するが、アスピリンが COX-1 の ¹²⁰Arg に結合する際、イブプロフェンやナプロキセンなどがこれを競合的に阻害するためと考えられている。このような作用は他の非ステロイド性抗炎症薬(non-steroidal anti-inflammatory drugs : NSAIDs)には観察されていないが、抗炎症薬がアスピリン療法、とくに少量アスピリン治療における臨床的効果にどのような影響を与えるかは今後の研究を待たねばならない⁴⁾。

おわりに

アスピリンは 100 年以上の歴史をもつ薬剤であり、これまでに数多くの臨床試験がアスピリンを用いておこなわれてきた。しかし上述のようにアスピリンを投与しても血小板機能が十分に抑制されない、いわゆる「アスピリンレジスタンス」なる状態が少なからず認められることが判明した。抗血小板薬に対する反応性の個体差が虚血性脳血管障害や冠状動脈疾患における血栓症予防効果に影響している可能性が高く、事実、アスピリンレジスタンス患者では実際に冠状動脈疾患での再発

率が高いことは既述した通りである。アテローム血栓症(athrothrombosis)の成因を考えれば、たとえ抗血小板薬を服用していても血栓症の発症が高頻度にみられること、抗血小板薬の臨床的効果が20~30%のイベント減少にとどまることは十分に予想できることである。これらは通常「treatment failure」と考えられるが、抗癌剤と異なり1つの抗血小板薬が無効であったからといってただちに別の抗血小板薬に変更する、という論理は抗血小板療法においては一般的ではない。アスピリンレジスタンスの頻度は定義によりまちまちであり、さらにアスピリンに対する血小板の反応性は、いくつかの血小板機能評価法の間で相関が低いことが問題となる。「不応」という用語に反対する向きもあり、「アスピリン反応性の個体差」などの表現がより適切かもしれない。しかし、アスピリンレジスタンスの病態が十分に解明されれば、少なくとも一部の患者においては抗血小板薬の種類の変更に対する理論的裏づけが可能となる。心血管障害の増加に伴い、国民の健康を預かる医療行政の面からも動脈硬化を基盤にして発症するこれらの心血管イベントを効率的に予防するため、アスピリンレジスタンスの分子機序の早急な解明が望まれる。動脈硬化の終末イベントである閉塞性血栓形成過程に介入して心血管病を予防する抗血小板薬効果の個人差の原因を見つけ出すことは、今後のテーラーメイド医療に欠かすことの出来ないものである。

文 献

- 1) Hankey GJ *et al* : Aspirin resistance. *Lancet* 367 : 606-617, 2006
- 2) Hanjic C *et al* : Aspirin resistance : mechanisms and clinical implications. *Cardiol Rev* 14 : 18-25, 2006
- 3) Macchi L *et al* : Aspirin resistance : definitions, mechanisms, prevalence, and clinical significance. *Curr Pharm Des* 12 : 251-258, 2006
- 4) Patrono C *et al* : Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med* 353 : 2373-2383, 2005
- 5) Grotemeyer KH *et al* : Two-year follow-up of aspirin responder and aspirin non-responder. A pilot study including 180 post-stroke patients. *Thromb Res* 71 : 397-403, 1993
- 6) Eikelboom JW *et al* : Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 105 : 1650-1655, 2002
- 7) Gum PA *et al* : A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 41 : 961-965, 2003
- 8) 高橋信一ほか : PFA-100 による血小板凝集能測定. *Thrombosis and Circulation* 13 : 90-94, 2005
- 9) Takahashi S *et al* : Individual Variation of Platelet Functions after in vitro Incubation with Aspirin : Assessment of Aspirin Resistance in healthy subjects using PFA-100. XXth Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis Aug 2005, Sydney, Australia
- 10) Macchi L *et al* : Resistance in vitro to low-dose aspirin is associated with platelet P1^{A1} (GP IIIa) polymorphism but not with C807T (GP I a/IIa) and C-5T Kozak (GP Ib α) polymorphisms. *J Am Coll Cardiol* 42 : 1115-1119, 2003

アスピリン抵抗性

村田 満 慶應義塾大学医学部臨床検査医学 教授

Mitsuru Murata Professor, Department of Laboratory Medicine, Keio University School of Medicine, Japan

SUMMARY

抗血小板薬は世界中で多くの患者が服用しており、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割の人がアスピリンが効かない、いわゆるアスピリンレジスタンス（アスピリン不応）ともいわれている。これらの人にアスピリンを漫然と投与することは医療経済の面からも大きな損失である。アスピリン不応者では心血管イベントの再発が多いとの報告もある。一般に抗血小板薬不応者では血小板機能が低いといわれるが、投与中の血小板機能モニタリングは煩雑であり、投与前の効果予測が理想的である。一方、アスピリンレジスタンスはその定義がまちまちであり原因も不明確である。メカニズムの解明と診断法の確立が急務と思われる。

アスピリン抵抗性（アスピリンレジスタンス）とは

アスピリンは100年以上の歴史をもつ薬剤であり、これまでに数多くの臨床試験によってその有効性が確立されている。アスピリンはcyclooxygenase (COX) を阻害してthromboxan合成を抑制することにより、その抗血小板効果を発揮する(図)¹⁾。最近、いわゆる「アスピリンレジスタンス」の病態が注目されており、大規模研究でも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²⁾⁴⁾。したがって、抗血小板薬に対する個々の患者ごとの反応性の評価は、適切な抗血小板薬を選択する根拠となる可能性があり、無効な薬剤の使用を減少させる効果が期待される。

血小板が急性冠動脈症候群や虚血性脳血管障害の発症に重要な役割を演じていることは広く認められた事実である。また血小板機能の亢進と心血管死との関係も疫学的に明らかにされている。血小板血栓が原因である心筋梗塞や脳梗塞などの動脈血栓症は我が国の死亡原因の第1位を

占め、その予防は現代に求められる最重要課題の1つである。加齢とともに血栓症の頻度は増加する。高齢化社会を迎え血栓症の予防や治療が今後益々重要になることは間違いない。

血栓症の予防や治療を目的に抗血小板薬は全世界で年間約30億錠が使用されている。日本ではアスピリンが頻用され、340万人が服用している。数々の大規模臨床研究においてその効果が立証され、動脈血栓症の再発予防や一部ではハイリスク患者の一次予防に用いられ、抗血栓薬としての地位は確立されたものと考えられる。アスピリンは動脈硬化性疾患を有する患者での血栓症再発率を20~30%低下させること、糖尿病患者、高血圧患者など血栓症発症の危険性が高い患者群での血栓症発症予防に有効であることが証明された。その結果に基づき欧米でのアスピリンによる抗血小板療法に関するガイドラインが作成されている。しかし一方では、その予防効果は不十分であり、例えばアスピリンの効果を非常によく示した米国でのPhysicians' Health Studyでさえアスピリンによる心血管イベントの減少率は40%