

(5) case-control study: CVD患者40名とその患者群と年齢や性別を一致させるように選ばれたコントロール90名におけるDNA解析を約11,000種類の遺伝子多型が検出できるmicroarrayを用いて網羅的検討を行った。各群の間で有意に頻度の異なる遺伝子多型の解析を行った結果、 p value <0.001 の因子を16種類認めた。それらの中で遺伝子名の記載されているものは4位のcoactivator associated arginine methyltransferase 1-like、12位のATPase, Class I、13位のEPH A4、16位のglutamate receptor metabotropic 8であった。

(6) 血小板ミトコンドリア遺伝子多型検索の基礎検討: 白血球除去フィルター処理をしたPRPからミトコンドリア遺伝子を抽出した。ミトコンドリアのreference sequenceにおける制限酵素BamH 1の認識配列は1カ所であるため、その抽出したミトコンドリア遺伝子が16kbを有するかどうかを検討するためにその遺伝子に対してBamH 1制限酵素処理を行った。その結果、電気泳動にて16kbのband size を認めた。さらにミトコンドリア遺伝子の全長を増幅するためのPCRを行った結果、電気泳動にて16kbのband size とdeletionの存

在が示唆される約10-11kbのband sizeを認めた。

(7) 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: hTERT遺伝子導入されていない正常冠状動脈内皮細胞に比し、その遺伝子導入細胞において発現が減少の上位20位から血栓に関連する因子を検索した結果、intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2)、von Willebrand factor (VWF)を認めた。また、ICAM2とVWFそれぞれのプロモーター活性調節因子のなかでhTERT遺伝子導入とともに発現変化を示したものを検索した結果、ICAM2はcaspase 1、VWFはGATA6を認めた。さらにICAM2とVWFの遺伝子発現減少はreal-time定量PCRにより確認された。

(8) 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: OP9培養システムにおいてES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。これらES由来成熟巨核球と血小板にアスピリン30uM添加30分後に血小板活性化物質であるADP20uMとトロンビン5U/mlをそれぞれ加え

たサンプルを用いてフィブリノーゲンとの結合をフローサイトメトリーを用いて検討した結果、アスピリン添加サンプルでは非添加のものに比し巨核球と血小板ともにフィブリノーゲンとの結合が抑制された。

microarray解析をより少量のサンプルで行うための改良法と従来法を比べると発現上位10ではどちらの方法でも9つが含まれていた。

巨核球や血小板産生におけるアポトーシスの関与の有無については、最初に各分化誘導過程（未成熟巨核球、成熟巨核球、血小板）での TUNEL 法による検討を行った。その結果、分化誘導の進行とともに TUNEL 陽性細胞は増加を示した。この結果は巨核球、血小板分化誘導過程にアポトーシスが関与していることを示唆している。次にアポトーシスに深く関与している caspase の巨核球、血小板分化誘導過程における役割を検討した。caspase 活性化経路の中心である caspase 3 の阻害剤を用いた検討では培養 5 日目、8 日目、12 日目の添加で培養 5 日目のものは血小板産生に影響を認めず、培養 8 日目、12 日目のものは阻害剤非添加のものに比し血小板産生の減少を認めた。さらに caspase 活性化のどの経路が巨核球、血小板分化誘導過程に影響を与えるかを検討するため、その各

過程からタンパク抽出したサンプルに対して種々の caspase 抗体を用いて行ったウエスタンブロット解析の結果、caspase12、10、9、そして 7 は培養 8 日目に、caspase3 は培養 12 日目にそのレベルのピークを示した。caspase6 はそれぞれの過程でのレベルの変化を示さなかった。

(9) 抗血小板服用者に対するgood responder、poor responderにおけるmicroarray解析結果に基づいた遺伝子多型解析：抗血小板薬の反応性に関与する遺伝子多型を検出するために、抗血小板薬服用者からの血液（クエン酸採血）に血小板機能評価機器PFA-100®（Date社）collagen/epinephrinカードリッジおよびcollagen/ADPカードリッジの閉塞時間を測定し、collagen/epinephrinカードリッジでの閉塞時間が250秒以上の群と250秒未満の群に分け、それぞれをgood responder群、poor responder群とした。抗血小板薬服用者80名を対象に検討を行った結果、22名がpoor responderであった。抗血小板薬服用者のほとんどはアスピリン服用の為に詳細な解析はアスピリン服用者に着目して行った。それぞれの群において、約11,000種類の遺伝子多型が検出できるmicroarrayを用いて網羅的検討を行い、両群の間で有意に頻度の異なる遺伝子多型

の検出を行った。平成17年度の健常人サンプルに*in vitro* アスピリン添加時のcollagen/ epinephrinカードリッジでの閉塞時間によりgood responder群、poor responder群とした場合に行った解析と同様の解析を行った。平成17年度、18年度いずれの解析においても有意差を認めた因子は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。これらのなかでTumor protein D52はチクロピジンに対する感受性にも関連を示した。(10) 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(表 1 A、表 1B) : GPIb alpha の 2 つの遺伝子多型-5T/C と 145Thr/Met それぞれとアスピリン good responder、poor responder の関係を検討した結果、-5T/C とアスピリン反応性の関係は認められなかった (p=0.1831)。一方、145Thr/Met の 145Met を有する血液サンプルは 145ThrThr のものに比し有意に poor responder の頻度が低かった (p=0.0072)。この結果は 145Met とアスピリン good responder の関連が強い、すなわち

145Met ではアスピリンの反応性が良いことを示唆している。

表1A. -5T/C遺伝子多型とアスピリン反応性

	-5TT n (%)	-5TC+CC n (%)	p value
Good responder	72 (53.3)	63 (46.7)	0.1831
Poor responder	17 (41.5)	24 (58.5)	

表1B. 145Thr/Met遺伝子多型とアスピリン反応性

	145TT n (%)	145TM+MM n (%)	p value
Good responder	98 (72.6)	37 (27.4)	0.0072
Poor responder	38 (92.7)	3 (7.3)	

T: Thr、M: Met

今回用いた血小板機能評価法PFA-100の値は血小板数、ヘマトクリット、VWF抗原量に影響を受けることが知られているため、これら値と145Thr/Met遺伝子多型を独立変数、good responder vs poor responder を従属変数とした多変量解析を行った。その結果、145Thr/Met多型とVWF抗原量はアスピリン反応性に対する独立した因子であることが示された。アスピリンを添加しない場合、VWF抗原量で補正したcollagen/ epinephrinカードリッジおよび

collagen/ADPカードリッジの閉塞時間は-5T/Cと145Thr/Metいずれとも関連は認めなかった。

D. 考察

(1) 抗血小板薬不応の評価法の最適化

：PFA-100を用いた検討から、in vitroでASAを添加し血中濃度を担保した条件下でも、感受性にはバラつきがあることがわかった。低感受性の原因として元々の血小板機能が亢進している可能性が示唆された。

GTTによって、VWF:Ag、VWF:RC₀、ヘマトクリット、HbA_{1c}高値による血小板血栓形成能の促進が検出された。今回の研究により閉塞時間が血漿VWF値と逆相関することが初めて明らかにされ、主にずり応力依存性の血小板機能を反映することが裏付けられた。しかし病的状態における診断意義については今後の研究を待たねばならない。

(2) 血小板のtranscriptome解析

：Microarray解析を行う際、そのサンプル調整が結果に与える影響は大きい。サンプルRNAの量と質についての規定はMicroarray購入先のプロトコルに定められているが細胞の分離法やRNAの抽出法はそれぞれの実験により異なるため独自のプロトコルを確立する必要がある。我々は高純度血小板分離による血小板サン

プルから microarray 解析に用いる RNA 抽出法のプロトコルをすでに有しているが今後本研究課題を行うためにはそのサンプルの白血球や赤血球の混在の定量データを得ることが必要であると考え、今回報告の検討を行った。白血球の除去法と混在率の定量解析法による結果は同一個体での再現性と異なる個体での再現性を示した。白血球は多量の RNA を含むためこれら方法の確立ができた意義は大きい。赤血球については、その RNA 計測に用いる波長測定の際、含有たんぱく量に相当する 280nm の数値が高く、本課題研究に用いる microarray 解析サンプルの条件として決められている RNA 中のたんぱく混入の規定に達しなかった。これは、磁気ビーズ・negative selection 法により赤血球は減少を示したがリアルタイム定量 PCR による値が一定せず、その定量値が得られなかったことの原因のひとつと考えられる。今後、赤血球からの RNA 抽出方法の再検討が必要と考えられる。

(3) 血小板 VWF 受容体 GPIIb 多型と

血小板機能の関連：冠状動脈疾患・脳血管障害の大きな原因となる動脈血栓の形成において GP Iba と VWF の反応は血小板活性化を引き起こすという点で重要である。GP Iba はこれまでに血栓症の危険因子となる遺

伝子多型を有するが疫学研究で報告されていた。したがって今回はその関連の分子学的機序を解明するために遺伝子組換えたんぱくを作成して実験研究を行った。疫学研究により冠動脈疾患・脳血管障害の危険因子と報告されている遺伝子型 (¹⁴⁵Met と 4R) が流動状態下で高い VWF との反応を示したことから、血流内では ¹⁴⁵Met と 4R を有する血小板は VWF との反応性が高いため血小板を活性化方向へと導き、動脈血栓形成を招来しやすいと考察している。

(4) 抗血小板薬に対する responder, non-responder における microarray 解析：前年度の検討結果は 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を示していた。今回はそのアスピリンに対する感受性の高い群と低い群に分け microarray を用いた網羅的解析を施行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。約 11,000 種類の遺伝子多型の中から receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1、mannosidase alpha、potassium voltage-gated channel の遺伝子多型がアスピリンに対する responder と non-responder に非常に強く関与していることが統計解析により示唆

された。今後これら因子に着目し、候補遺伝子アプローチを行う必要がある。また今回は健常人からのサンプルを用いて検討をおこなったが血栓症患者からのサンプルを用いた網羅的解析や候補遺伝子アプローチを行う必要がある。

(5) case-control study: 抗血小板薬に対する不応状態の原因のひとつとして個体の元々の血栓形成能の亢進が提唱されている。その血栓形成能の遺伝的要因を網羅的に検出するために今回の検討、すなわち microarray を用いての case-control study (CVD vs コントロール) を行った。これまでに「stroke に関与する遺伝子の網羅的解析」は genome-wide linkage analysis によるものが報告されている。その報告では染色体 5p13、染色体 4 (4cM)、染色体 17 (95cM)、染色体 2p31-36、染色体 6p12-22、染色体 13q31-33 に疾患に関与する遺伝子が存在することが示されている。今回、各群で有意に頻度の異なる遺伝子多型の上位では 23 位に染色体 13q31 に位置する遺伝子多型(遺伝子名は不明)と 47 位に染色体 6p22 に位置する遺伝子多型(遺伝子名は不明)があった。6p22 はハプロタイプ解析においても疾患との関与を示した。genome-wide scan によるアプローチに比べ

microarray を用いる本解析はサンプル量が約 1/40 と少量であること、遺伝子多型の位置が特定できることが利点である。これら利点を活かして今後、今回の解析で検出した遺伝子多型を候補遺伝子として、疫学研究や実験研究による更なる検討を行う必要がある。また今回の検討で遺伝子名の不明なものについてはその近傍遺伝子の探索による候補遺伝子の決定を行う必要がある。

(6) 血小板ミトコンドリア遺伝子多型検索の基礎検討：候補遺伝子アプローチとして血小板のミトコンドリア遺伝子に着目した。これまでにアスピリンが NADPH の低下の機序に関与することが血管内皮細胞において報告されている。血小板内での NADPH の低下は血小板機能に影響を与える。ミトコンドリア遺伝子には NADPH に関与する塩基配列の欠失による遺伝子多型の報告がある。血小板はミトコンドリア遺伝子を有するがこの欠失による遺伝子多型の有無やその欠失の正確な配列についての詳細な報告はないため本研究では血小板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の同定とその多型と血小板機能や血栓性疾患との関連を検討する。今回はその予備検討を行った。前年度に行った血小板サンプル処理法の検討の結果か

ら従来行われてい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。

(7) 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。

(8) 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かった理由のひとつとして提唱できる可能性がある。

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

microarray 解析：前年度までの検討結果は *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いため今後、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。

(10) 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作成して

流動状態下、リガンドである von Willebrand factor との反応性を検討し、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に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

抗血小板薬不応症の評価の為の血小板機能検査法について検討した。PFA-100 で評価した際、アスピリン低感受性個体の特徴が明らかになった。血小板の transcriptome 解析におけるサンプル（白血球除去フィルター処理による血小板 RNA サンプル）に混在する白血球の定量解析法と microarray 解析法のプロトコルの確立が示された。

また GPIb alpha の ¹⁴⁵Thr/Met と繰り返し配列の遺伝子多型の ¹⁴⁵Met と 4R(疫学研究により冠状動脈疾患・脳血管障害の危険因子と報告されている遺伝子型)が流動状態下で高い VWF との反応を示した。

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®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。脳血管障害の疾患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。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。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 , Tomohiro Hayashi, Keiichiro Suzuki , Yosuke Okamura, Makoto Handa, Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano , Yasuo Ikeda. Platelet glycoprotein Ib alpha polymorphisms affect the interaction with von Willebrand factor under flow conditions. Br J Haematol 128(4):533-9, 2005

Yumiko Matsubara, Mitsuru Murata , Tadashi Yoshida , Kiyooki Watanabe, Ikuo Saito, Koichi Miyaki, Kazuyuki Omae, Yasuo Ikeda. Telomere length of normal leukocytes is affected by a functional polymorphism of hTERT. Biochem Biophys Res Commun. 341 (2006) 128-131.

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、林 朋博、鈴木 啓二郎、岡村 陽介、半田 誠、石原 宏明、芝野 俊郎、池田 康夫 von Willebrand 因子との反応性に関与する GPIIb/IIIa の遺伝子多型 日

本血栓止血学会誌 第 15 巻 第 15 号 437 頁 2004

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 28th 日本血栓止血学会

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、渡辺巖太郎、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、渡辺巖太郎、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、渡辺巖太郎、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」

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)

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.

「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

脳梗塞患者の臨床像の解析

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
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講師

研究要旨 抗血小板薬反応性に関連する遺伝子の同定を目的とする本研究の分担研究として、脳梗塞患者の臨床像の解析、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、慢性期脳梗塞における抗血小板薬の検討、についての研究を遂行した。脳梗塞患者の臨床像の解析においては、抗血小板薬の脳梗塞再発予防効果につき遺伝因子の関与を検討する上で臨床症状と梗塞巣の関係を解析した。上肢に限局した運動障害のみを呈する症例の頭部 MRI で大脳皮質運動野の中心前回にある precentral knob の他に、皮質下白質にも梗塞巣を認める症例が観察された。類似の臨床症状を呈しても病巣が異なる可能性を示し、研究を推進する上で頭部 MRI による病巣の確認の必要性を証明した。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では、詳細な文献調査を行った。そして、慢性期脳梗塞における抗血小板薬の検討では実際に観察患者の登録を行い、臨床背景データと抗血小板薬の投薬状況、血小板機能についての詳細な解析を行った。

A. 研究目的

脳梗塞再発予防に用いる抗血小板薬の効果に対する遺伝因子の関与を検討していく上で他因子の関与を最小限に留めるため同一の臨床症状を呈した症例の梗塞巣を頭部 MRI で確認し病巣の均一性の有無を解析する。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ことを目的とした。

B. 研究方法

当院神経内科に入院した脳卒中患者のデータベースより神経学的に一側上肢遠位部の運動麻痺のみを呈した症例を抽出した。

一肢に限局した感覚障害を伴わない運動麻痺は pure motor monoparesis (PMM) と呼ばれており、症状が特徴的のため診断に偏りが無い。また手の運動に関与する部位として大脳皮質中心前回の precentral knob と呼ば

れる領域に限局すると考えられており、この症状を呈した患者の、頭部MRIについて病巣の比較検討を行った。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。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。

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)

本研究は合同指針の則り施設の倫理委員会で承認を受けた。すべての検体提供者から十分な説明の後インフォームドコンセントをえた。検体はすべて匿名化した後解析された。

C. 研究結果

一側上肢遠位部に限局した運動麻痺のみを呈する症例の頭部MRIでは大脳皮質運動野の中心前回にあるprecentral knobと称される領域の他、皮質下白質にも梗塞巣を認める症例が観察された。以下に症例を1例提

示する。

症 例

患者：68歳，女性

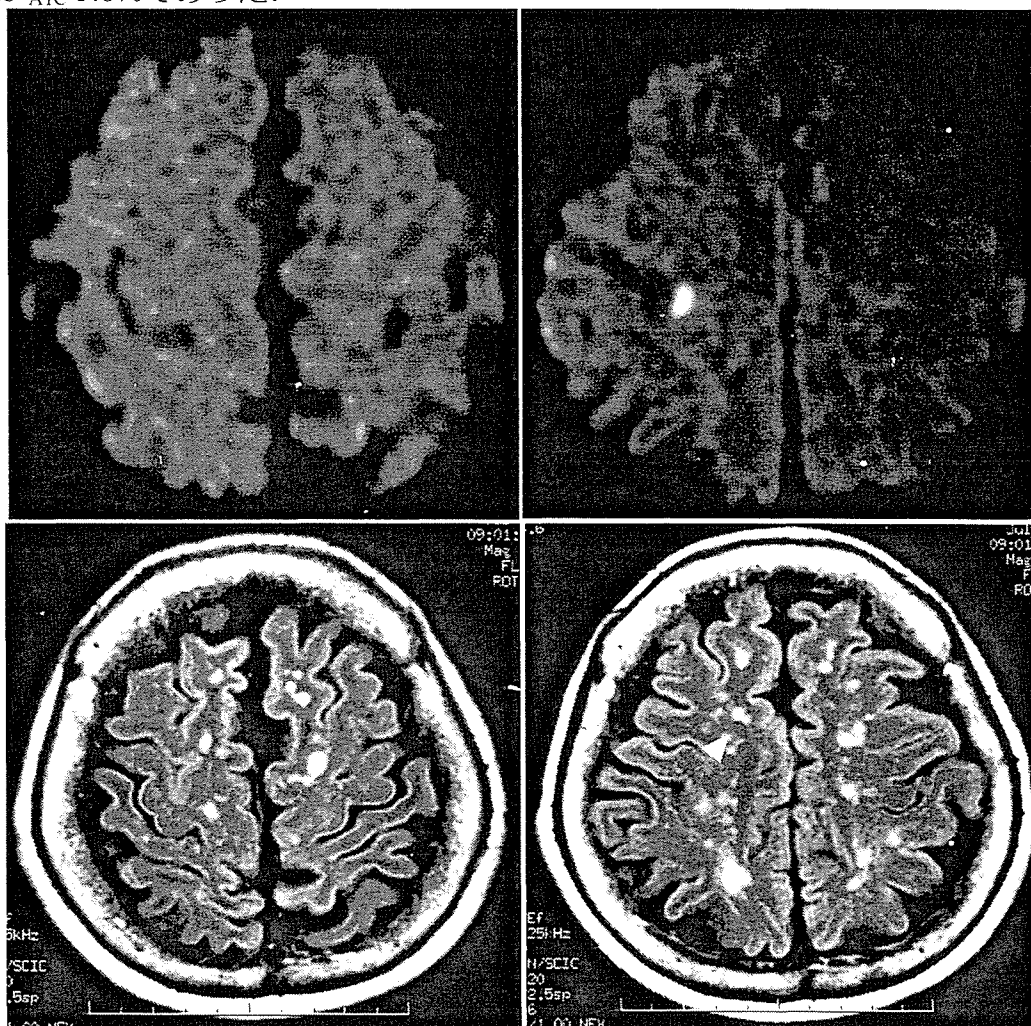
既往歴：50歳高血圧（losartan 50mg/日内服）。54歳高脂血症・糖尿病（食事療法）。

家族歴：兄，糖尿病。

現病歴：2003年7月夕食の準備中に皿を落とし、左上肢の筋力低下を自覚し、翌日当科外来を受診した。手首の伸展が困難で橈骨神経麻痺様症状を呈していたが、明らかな圧迫のエピソードもなく、神経学的診察で手首の屈曲力も減弱し、橈骨神経麻痺としては非特異的と考え頭部CTを施行したが陳旧性脳梗塞を認めるのみであった。発症4日後施行された筋電図は正常で、頭部MRI（T₁ T₂およびFLAIR）は陳旧性と思われる多発性脳梗塞が見られただけであったが症状の改善がないことから同日入院した。

入院時検査所見：一般身体所見にて血圧135/90mmHg、神経学的所見では徒手筋力テストで左三角筋・上腕三頭筋・上腕二頭筋は5だったが、手根屈筋群4、手根伸筋群3、対立筋4、また握力も右24kg、左4kgと左上

肢の筋力低下を認めた。右上肢および両下肢筋力を含めその他の異常を認めず、血液検査で、総コレステロール264mg/dl、中性脂肪266mg/dl、Hb-A_{1c} 5.8%であった。



入院後経過、検査所見：入院翌日施行した MRI 拡散強調画像で主に右前頭葉運動野の皮質下白質に径 8mm の高信号を認め（下図），脳梗塞と診断し点滴による補液，

図：本症例の MRI 拡散強調画像（上段）および FLAIR 画像（下段）。FLAIR 画像で主に皮質下白質に相当する部位に（矢印），拡散強調画像で高信号を呈す梗塞巣を認める。

aspirin100mg の内服およびリハビリテ

ーション開始した。

MRA では軽度の径不整を認める以外主幹動脈の途絶・狭窄を認めず、頸動脈超音波検査でも両側の中内膜複合体を認めたが有意な狭窄はなかった。心臓超音波検査では異常無く、ホルター心電図上発作性心房細動を認めなかった。その後左握力も 4kg から 10kg と改善し症状の悪化もなく独歩退院した。

文献の詳細な調査では、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。

慢性期脳梗塞における抗血小板薬の服用状況と血小板機能の検討において、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。

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。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%、2 剤内服が 8.6%、3 剤併用が 0.8%であった。PFA-100 による血小板機能の測定では CEPI 閉塞時間が正常値の上限以下である症例は 22 例 (27.5%)、CADP 閉塞時間が正常値の上限以下である症例は 21 例 (26.3%)であった。

D. 考察

Pure motor strokeによりPMMを呈した症例では病変が不明な場合も多いとされていたが、近年拡散強調画像により病巣が明らかにされる症例が報告されてきている。拡散強調画像は本来FLAIR画像で描出困難な超急

性期の梗塞巣の検出に有用であり、上肢のPMMを超急性期に診断した症例が報告されている。一方、すでにFLAIR画像で多発性脳梗塞を認めどの病巣が今回発症の病巣であるかを特定困難な時にも拡散強調画像が有用であり例示した症例もそれに該当している。

手の運動に関与する部位として中心前回のprecentral knobと呼ばれる部位が考えられており、上肢遠位部に限局したPMMを呈し拡散強調画像でprecentral knobに梗塞巣を認め多症例も数例報告されている。しかし上肢遠位部に限局したPMMで皮質下白質のみを責任病巣とする報告は少なく、例示した症例でもprecentral knobに病変はなく、皮質下白質を主な病巣としていることはきわめて興味深い。症例の均一性や遺伝因子の検討を推進する際には他因子の関与を最小限に留めるためには問題となると考えられる。

いずれにしても病巣の診断には拡散強調画像が有用であり、上肢のPMMにおいては従来報告されているような中心前回のprecentral knobを責任病巣とするだけでなく、皮質下白質でも同様の症状を呈する可能性がある。

従って類似の臨床症状を呈していても梗塞巣がいくつかの部位に認め

られることから、脳梗塞の原因となる責任血管は1つとは限らない可能性があると考えられる。

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。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、抗血小板機能が增强されるが、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。

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バンク約 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%、冠状動脈疾患例（アスピリン 325mg 内服）の 9.5%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、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。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

臨床症状に対し病巣の多様性が認められたことから、脳梗塞の再発予防に関する遺伝因子の検討を推進する際には他因子の関与を最小限に留めるため頭部 MRI による病巣確認が必要である。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. 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