

30.7%、従来法 33.1%で二つの方法に差はみられなかった。ワルファリン導入時に遺伝型の情報を有効に用いることを目指した論文が発表された。297名のワルファリン導入時のPT-INRを調べ、PT-INRがはじめて治療域に入るまでの日数を遺伝型に分けて調べたところ、VKORC1多型がこの日数に大きく影響を与え、CYP2C9多型は影響しなかった⁴⁾。治療域に入るまでの平均日数は、Non-A/Non-A型15日、Non-A/A型11日、A/A型7日であり、A/A型の患者は有意に治療域への移行が早かった。日本人にはNon-A/Non-A型は1%しかみられず、日本人の80%はA/A型であるので、日本人は治療域への移行が容易である患者が多いことになる。ワルファリン初回導入時のワルファリン量を推定するアルゴリズムが公開されており (<http://www.warfarindosing.org>)、また投与3日後に投与量を補正するアルゴリズムも発表されている⁵⁾。

今後、ワルファリンの個人の反応性にかかわる遺伝子型を、臨床的に有効に应用する試みが増加してくるものと思われる。われわれも、「ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討：The Study on the Contribution of Genetic Factors or Dietary Vitamin K Intake to Individual Warfarin Dosage (Godward Study)」を開始し、わが国におけるワルファリンの個別化医療実施可能性について、検討をおこなっている。

2 アスピリン抵抗性 (aspirin-resistance)

アスピリンは、心筋梗塞や脳梗塞などのアテローム血栓症の予防薬として、最も多用されている抗血小板薬である。血栓症のハイリスク患者をランダムに割り付けた試験のメタアナリシスでは、アスピリン投与群(29,652名)の2年間の追跡期間中のイベント(心筋梗塞、脳梗塞、致死性血管傷害)発生率は12.9%であり、非投与群(29,743名)では16.0%であったと報告されている⁶⁾。したがって、この差である3.1%がアスピリンの二次イベントの発症抑制効果と考えられる。このように、大規模なメタアナリシスにより、その有効性が示されているものの、この結果から、アスピリンを服薬しても、ハイリスク患者の8人に1人(12.9%)は2年間でイベントを再発していることとなる。発症の原因としていくつか

表② 検査学的アスピリン抵抗性の頻度 (42の研究のメタ解析)
(Hovens MM *et al* 2007⁷⁾より引用)

| | 頻度 | |
|------------|-------------------|--------------------|
| | 補正前 % (95% CI) | 補正後* % (95% CI) |
| 全体 | 23.8 (19.5~28.0) | 27.1 (21.5~32.6) |
| 測定法 | | |
| PFA-100 | 28.1 (22.2~33.9) | 29.0 (23.1~34.8) |
| RPFA | 18.9 (12.1~25.8) | 26.2 (18.6~33.9) |
| LTA | 15.4 (7.8~23.0) | 21.3 (15.1~27.5) |
| Rest | 35.0 (6.0~64.0) | 31.8 (21.6~42.0) |
| 対象疾患 | | |
| CAD | 22.4 (17.5~27.4) | 22.9 (17.0~28.7) |
| Stroke | 26.0 (16.3~35.7) | 32.1 (22.4~41.8) |
| Rest | 27.3 (9.5~45.1) | 26.3 (16.5~36.0) |
| 用量 | | |
| ≤100 mg | 27.1 (18.7~35.6) | 35.6 (28.1~43.2) |
| 101~299 mg | 29.6 (21.8~37.5) | 28.2 (20.9~35.6) |
| ≥300 mg | 21.7 (11.8~31.7) | 18.6 (11.3~26.0) |
| Unknown | 19.8 (10.7~28.9) | 25.8 (16.2~35.4) |

アスピリンレジスタンスの測定に使用された測定法、対象疾患、用量に分けてアスピリンレジスタンスの頻度を求めた。PFA-100とRPFAは、測定に用いた機種(本文参照)。LTA:血小板凝集能の高度法。95% CI:95%信頼区間

*測定法、対象疾患、用量で補正した

の要因が考えられるが、その一因として、アスピリンに代表される抗血小板薬はワルファリンとは異なり、モニタリングをおこなわず、一定量で投与されることが多いため、アスピリンの効果に個人差が認められることが指摘されている。これらアスピリンの効果は血小板凝集能やトロンボキサン代謝産物量などを用いて評価し、アスピリンを服薬しているにもかかわらず、血小板機能抑制効果が弱い患者群をアスピリン抵抗性(aspirin-resistance)と定義し、その頻度や意義について検討した報告が増加している。実際、さまざまな*in vitro*もしくは*ex vivo*測定系を用いて評価しアスピリン抵抗性を定義した、いわゆる検査学的アスピリン抵抗性の頻度に関して、42の試験を集めておこなわれたメタアナリシスの結果が報告されている⁷⁾。表②にその結果を示した。用いられた血小板機能評価法は、ずり応力下での血小板凝集能を測定するPFA-100、フィブリノーゲンが固相化された使い捨てタイプのカートリッジを用いるrapid platelet functional assay (RPFA)、古典的な血小板凝集法(LTA)などである。メタアナリシスの結果では、これらの測定法

表⑥ 検査学的アスピリン抵抗性と心血管系疾患の再発（臨床学的アスピリン抵抗性）との関連，メタアナリシス (Snoep JD *et al* 2007¹⁰⁾より引用)

| 研究 (対象者数) | 検査学的アスピリン抵抗性を示した患者数 (%) | | | オッズ比 (95% CI) | P 値 |
|---|-------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------|--------|
| | 検査学的アスピリン抵抗性を示した患者数 (%) | 検査学的アスピリン抵抗性を示した患者数 (%) | 検査学的アスピリン抵抗性を示さなかった患者数 (%) | | |
| Grotemeyer <i>et al</i> , 1993 (180) | 60 (33) | 24/60 (40) | 5/114 (4) | 14.5 (5.2~40.9) | <0.001 |
| Buchanan <i>et al</i> , 2000 (289) | 158 (55) | 15/158 (10) | 9/131 (7) | 1.4 (0.6~3.4) | 0.42 |
| Andersen <i>et al</i> , 2002 (71) | 25 (35) | 9/25 (36) | 11/46 (24) | 1.8 (0.6~5.2) | 0.28 |
| Eikelboom <i>et al</i> , 2002 (448 cases, 488 controls) | NR | NR | NR | 1.8 (1.2~2.9) | 0.01 |
| Grundmann <i>et al</i> , 2003 (35 cases, 18 controls) | 12 (23) | 12/35 (34) | 0/18 (0) | 6.8 (1.8~26.2) | 0.004 |
| Gum <i>et al</i> , 2003 (326) | 17 (5) | 4/17 (24) | 30/309 (10) | 2.9 (0.9~9.3) | 0.09 |
| Cotter <i>et al</i> , 2004 (73) | 21 (29) | 6/21 (29) | 3/52 (6) | 6.5 (1.5~29.3) | 0.01 |
| Cheng <i>et al</i> , 2005 (422) | 113 (27) | NR | NR | 2.9 (1.5~5.7) | 0.002 |
| Pamukcu <i>et al</i> , 2006 (105) | 20 (19) | 9/20 (45) | 10/85 (12) | 6.1 (2.0~18.5) | <0.001 |
| Stejskal <i>et al</i> , 2006 (103) | 57 (55) | 50/57 (88) | 21/46 (46) | 8.5 (3.2~22.7) | <0.001 |
| Mueller <i>et al</i> , 1997 (100) | 65 (65) | 8/65 (12) | 0/35 (0) | 10.5 (0.6~187.5) | 0.048 |
| Ziegler <i>et al</i> , 2002 (52) | 5 (10) | 0/5 (0) | 13/47 (28) | 0.2 (0.0~4.5) | 0.31 |
| Yilmaz <i>et al</i> , 2005 (14 cases, 14 controls) | 8 (29) | 7/14 (50) | 1/14 (7) | 13.0 (1.3~128.1) | 0.03 |
| Poston <i>et al</i> , 2006 (225) | 22 (10) | 4/22 (18) | 12/203 (6) | 3.5 (1.0~12.1) | 0.06 |
| Chen <i>et al</i> , 2004 (151) | 29 (19) | 15/29 (52) | 30/122 (25) | 3.3 (1.4~7.6) | 0.004 |
| Lev <i>et al</i> , 2006 (150) | 19 (13) | 7/18 (39) | 23/126 (18) | 2.9 (1.0~8.1) | 0.045 |

* 分子：心血管系疾患イベント発症者数，分母：対象患者数

で求めた検査学的アスピリン抵抗性の頻度は 24% (95% 信頼区間：20~28%) であり，測定方法，対象疾患，アスピリンの用量で補正した頻度は 27% (95% 信頼区間：22~33%) であった。また，補正後では，100 mg 以下のアスピリン投与でのアスピリン抵抗性の頻度は 36%，300 mg 以上の投与では 19% であった。測定法でもアスピリン抵抗性の頻度に大きな違いがみられており，アラキドン酸惹起血小板凝集能ではその頻度は 6% であったものの，PFA-100 や RPFA を用いた場合は，それぞれ 28% および 19% であったと報告されている。

これらの検査学的アスピリン抵抗性が，実際どのような臨床的意義をもつかについても検討がなされている。アスピリンを服薬しているにもかかわらず血栓塞栓症を発症した患者群を臨床的アスピリン抵抗性と定義し，上述した検査学的アスピリン抵抗性が，臨床的アスピリン抵抗性のリスク因子であるとの報告⁸⁾⁹⁾がなされている。

表⑥に，2007 年に発表された検査学的アスピリン抵抗性と心血管系疾患の再発（臨床的アスピリン抵抗性）との関連を検討したメタアナリシスの結果を示す¹⁰⁾。この解析では 16 の試験のデータを用いている。これらの結果をまとめると，そのオッズ比は 3.8 (95% 信頼区間：2.3~6.1) であり，アスピリン服薬患者において，血小板の機能が効果的に抑制されていない患者では，効果的に抑制されている患者にくらべ，心血管系疾患の再発率が高いことが示唆される。2008 年にも同様のメタアナリシスの結果が報告¹¹⁾されている。心筋梗塞，急性冠症候群，脳梗塞，経皮的冠動脈形成術 (percutaneous coronary intervention: PCI)，冠動脈バイパス術，血管疾患に対して二次予防としてアスピリンを投与された患者に対するアスピリン抵抗性を検討した 20 試験に対するメタアナリシスであり，アスピリン投与量は 75 mg/日から 325 mg/日であった。用いられた血小板機能検査でアスピリ

表① アスピリン抵抗性のメカニズム

(De Gaetano G *et al*: Aspirin resistance: a revival of platelet aggregation tests? *J Thromb Haemost* 1: 2048-2050, 2003より引用)

1. アスピリンのバイオアベイラビリティ
 - 服薬不全,
 - アスピリン投与量の不足,
 - salicylate の蓄積によるアスピリンの COX-1 結合部位への結合の妨害
 - 非ステロイド性抗炎症薬の同時服用によるアスピリンの効果の妨害
 - プロトンポンプ阻害薬によるアスピリンのバイオアベイラビリティの減少
2. 血小板機能
 - 血小板の代謝によるアスピリンにさらされていない新しい血小板の血中への出現
 - 新しく形成された血小板中の COX-2 の発現量の違い
 - ADP とコラーゲンへの血小板感受性の増強
3. 遺伝子多型
 - 血小板コラーゲン受容体の遺伝子多型
 - COX-1, COX-2, TXA₂合成酵素, アラキドン酸代謝酵素の遺伝子多型
 - 血小板フィブリノーゲン受容体 GPIIb/IIIa 遺伝子多型
 1. 低用量アスピリンによる FXIII 活性化の阻害の差異につながる FXIII Val34Leu 遺伝子多型
4. 他の血球細胞や細胞由来産物と血小板の相互作用
 - 赤血球による血小板活性化の不十分な阻害
 - アスピリン処理された血小板と血管細胞の間におこるアラキドン酸代謝の細胞間の移動
 - 単球-マクロファージ由来 TXA₂
 - 血小板 TXA₂の制御として COX-1/COX-2 で生成する PGI₂ もしくは血管の t-PA の放出
5. 他の因子
 - 過度の運動や心理的ストレスによるノルエピネフリン量の増加
 - 喫煙
 - 酸化ストレスとアラキドン酸非酵素的な過酸化によって生成する活性をもつ 8-iso-PGF_{2α} の生成
 - アスピリンとアセチルコリンによって生じる一酸化窒素 (NO) の抗血小板作用と血管拡張作用の相互作用

ン抵抗性と分類された患者が全体の 28%で、そのなかの 39%で心血管イベントが発生した。一方、アスピリンに対して感受性を示した患者では、心血管イベントの発生率は 16%であったと報告され、アスピリン抵抗性群における心血管イベント発生のおッズ比は、3.85 (95%信頼区間: 3.08~4.80) であった。

アスピリンは、プロスタグランジンの生合成を阻害することにより薬理学的作用を発揮する。プロスタグランジンの生合成は、ホスホリパーゼ A が膜リン脂質からアラキドン酸を生成することではじまる。このアラキドン酸はプロスタグランジン (PG) H 合成酵素により PGG₂ に変換され、さらに同酵素の過酸化酵素作用により PGH₂ となる。この PGH 合成酵素はシクロオキシゲナーゼ (COX) とよばれ、COX-1 と COX-2 が知られる。

アスピリンは、COX-1 の Ser529 をアセチル化し活性中心のコンホメーション変化を起こし、基質であるアラキドン酸への結合が阻害され、その結果 PGH₂ 産生を抑制する。アスピリンの COX-1 の阻害効果は COX-2 の阻害より約 170 倍強い。このように、アスピリンはトロンボキサン依存性の血小板活性化を抑制する。

アスピリン抵抗性の原因として、血小板活性化経路は、トロンボキサン依存経路だけでなく、カテコールアミン、トロンビン、adenosine diphosphate (ADP) といった刺激による血小板活性化経路など、さまざまにその活性化が制御されているため、トロンボキサン依存性の血小板活性化を抑制しても、血小板活性化経路の一部を抑制しているに過ぎないことが考えられる。それ以外にも、現時点で、さまざまなアスピリン抵抗性のメカニズムが指

摘されている(表4)。

それらのなかで、健康人や心血管系疾患患者を対象にして、検査学的アスピリン抵抗性と遺伝子多型、とくにCOX-1 遺伝子多型との関連についても報告されている^{12)~14)}。また、ADP 受容体であるP2Y₁₂の遺伝子多型とアスピリン服用後の残存アラキドン酸惹起血小板凝集能との関連について指摘されている¹⁵⁾。

わが国においても、アスピリン抵抗性に関する優れた研究が発表されている¹⁶⁾。これによると、アスピリン服薬患者のコラーゲン惹起血小板凝集能を四分位(quartile)に分けると、凝集能が最も残存している群は、他の群より有意にイベント発症が高かった(ハザード比=8)と報告されている。われわれも、脳梗塞/一過性脳虚血発作ならびに急性冠症候群に対する二次予防としてアスピリン投与を受けている患者群を対象に、わが国におけるアスピリン抵抗性の頻度、その予後ならびに遺伝子背景を明らかにするために、多施設共同前向き観察研究「アスピリン抵抗性の実態ならびにその遺伝子背景に関する研究(The Study on Profile and Genetic factors of Aspirin Resistance: ProGEAR study)」を実施し、患者登録を完了している。今後、登録後2年間の臨床イベントを追跡し、わが国においてアスピリン抵抗性が臨床的意義をもつのかどうか、もつとしたら、どのような測定系(遺伝子背景を含めて)が臨床的アスピリン抵抗性を最適に反映できるのかどうか、検討をおこなう予定である。

アスピリン抵抗性に対する対応策として、検査学的アスピリン抵抗性を示した患者に対して、他の抗血小板薬に変更することにより予後が改善する可能性がある¹⁷⁾。実際このようなコンセプトにもとづいた介入試験¹⁸⁾が実施されており、検査学的アスピリン抵抗性を示す患者に対して、他の抗血小板薬に変更することで患者予後が改善することがこのような介入試験で証明されれば、抗血小板療法の個別化が現実味を帯びてくると思われる。

3 クロピドグレル抵抗性

チエノピリジン(Thienopyridine)化合物であるクロピドグレルは、ADP 受容体P2Y₁₂を特異的に阻害することで、血小板凝集を抑制する。薬物そのものには抗血小板作用はなく、肝臓で代謝され活性化体となつてはじめて抗血小板作用を発揮するプロドラッグである。

クロピドグレルについても、その血小板機能抑制効果にかなりの個人差があることが指摘されている¹⁹⁾²⁰⁾。その測定には、古典的な血小板凝集計を用いたADP 惹起血小板凝集、ずり応力下での血小板凝集能を測定するPFA-100、フィブリノーゲンが固相化された使い捨てタイプのカートリッジを用いるRPFA、さらに特異的にクロピドグレルによるP2Y₁₂受容体抑制効果を測定可能なvasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)のリン酸化を測定する方法などが用いられている。それら検討の結果が多数報告されており、測定方法によって異なるものの、検査学的クロピドグレル抵抗性、すなわちクロピドグレルを投与されているが、血小板機能が効果的に抑制されていない患者の頻度は5%から44%の幅であった¹⁹⁾²⁰⁾。

これら検査学的クロピドグレル抵抗性と心血管系疾患の再発(臨床的クロピドグレル抵抗性)との関連を検討した研究についても近年、その報告が増加している¹⁹⁾²⁰⁾。待機的PCIをおこなった379症例について、クロピドグレル導入後、70%を超えるADP 惹起血小板凝集が残存している患者群では、70%以下に抑制されている患者群と比較して、PCI実施3ヵ月後までの心血管イベントが有意(オッズ比:4.9, 95%信頼区間:1.66~14.96)に多く、心血管イベントに関係している因子に対して調整をおこなった後も、クロピドグレルに対する低反応性は、独立した危険因子であったと報告²¹⁾されている。急性ST 上昇型心筋梗塞でプライマリPCIを予定している連続60症例について検討(全員アスピリン投与継続され、クロピドグレルは3ヵ月間服薬された)した報告²²⁾がなされている。ADP 凝集の結果で患者群を四分位(quartile)に分けた(1群:103%±8%, 2群:69%±3%, 3群:58%±7%, 4群:33%±12%)。6ヵ月のフォローアップ期間中に7名が心血管イベントを発症し、そのうち6名は1群(クロピドグレル抵抗性群)に属し、残り1名は2群に属した。3群ならびに4群には発症者はいなかった($p=0.007$)。非ST 上昇型急性冠症候群でPCIをおこなった292症例において、クロピドグレル導入後において70%を超えるADP 惹起血小板凝集が残存していることが、1ヵ月後までの心血管イベントに対し、唯一独立したリスク因子であったと報告²³⁾されている。さらに、クロピドグレル抵抗性に対し、治療介入することで患者予後に改善がみられるのかどうかに関する多施設共

同ランダム化比較試験が報告²⁴⁾されている。PCIを実施する406症例のなかで、クロピドグレル600mgのloading doseで投与後、VASP指数を測定し、50%を超える(すなわちクロピドグレルによるP2Y₁₂受容体抑制効果が弱い)患者162症例を無作為に割り付け、VASP-guided群(78症例)は、VASP指数が50%以下に低下するまで、最大3回24時間ごとにクロピドグレル600mgが追加投与され、その後PCIが実施された。コントロール群(84症例)は、クロピドグレルの追加投与なしにPCIが実施された。その結果、PCI後1ヵ月までのフォローアップ期間に、心血管イベントは有意にVASP-guided群で、コントロール群と比較して少なかった(0% vs 10%, $p=0.007$)。これらの報告は、症例数が少ない検討であり、今後更なるデータの蓄積が望まれる。

現時点で指摘されているクロピドグレル抵抗性のメカニズムを表⑥に示す。これらの原因のなかで、クロピドグレル抵抗性に対する遺伝子多型の関与について検討した結果も報告されている。

健康人にクロピドグレルを服用させ、ADP惹起血小板凝集やVASPのリン酸化といった指標を用いてクロピドグレルの効果を評価し、これに関する個人差を説明する遺伝子多型が、候補遺伝子を対象に探索された。ADP凝集が十分に抑制されない遺伝的背景として、ADP受容体であるP2Y₁₂、P2Y₁、血小板膜受容体GP I a、プロドラッグであるクロピドグレルの活性化体への変換に関与するCytochrome P450であるCYP3A4、CYP3A5、CYP2C19の多型が報告された。これらはいずれも小規模な研究であったので、他の集団を用いて確認する必要がある。そこで、クロピドグレルとアスピリンを併用した1,419名の心筋梗塞患者を対象にADP凝集能とアラキドン酸凝集能を測定し、CYP3A4、CYP2C19、P2Y₁₂の多型を調べた研究がイタリアから報告された²⁵⁾。この三つの遺伝子のなかでCYP2C19の多型のみがADP凝集に強く関連を示した。この多型は、スプライス異常を生じる681G>Aであり、CYP2C19*2として知られている。本変異のAアレル保有者はADP凝集能が高く、その凝集能はアレル数に依存していた。また、この効果は弱いながらアラキドン酸凝集能にも関連を示した。以前の報告で関連がみられたCYP3A4とP2Y₁₂の多型は、本研究ではADP凝集能と関連を示さなかった。フランスの報告では、CYP3A4、CYP3A5、CYP2C19の多型を検討し、

表⑥ クロピドグレル抵抗性のメカニズム
(De Miguel A et al 2008²⁶⁾より引用)

1. クロピドグレルのバイオアベイラビリティ
 - 服薬不全、
 - クロピドグレル投与量の不足、
 - 吸収不全
 - Cytochrome P450 3As に対する薬剤相互作用
2. 遺伝子多型
 - P2Y₁₂遺伝子多型
 - Cytochrome P450 3As の遺伝子多型
 - GP I a の遺伝子多型
 - 2. GP II b/III a の遺伝子多型
3. ADP 放出の増加
4. P2Y₁₂受容体の増加
5. 治療前の血小板活性化の病態
 - 急性冠症候群
 - 糖尿病/インスリン抵抗性
 - 高い body mass index
6. P2Y₁₂に依存しない血小板刺激伝達系の亢進
7. P2Yに依存しない血小板刺激伝達系の亢進
 - トロンピン
 - トロンボキサン A₂
 - コラーゲン
 - エピネフリン
8. 血小板 turn-over の亢進

この研究でもCYP2C19の多型だけが関連を示す結果となった²⁶⁾。この研究では、クロピドグレルとアスピリンの併用療法をおこなっている急性冠症候群患者603名を対象にADP凝集、VASPのリン酸化、血小板表面へのPセレクチンの発現を調べた。CYP2C19*2はこれらいずれの測定値に対しても強い関連を示し、CYP2C19*2変異保有者ではADP惹起血小板凝集能が残存する結果となった。これらの報告を総合すると、クロピドグレル服用者の抗血小板作用のモニターとしてADP惹起血小板凝集を用いてクロピドグレル抵抗性を評価すると、CYP2C19多型がクロピドグレルの効果に関連を示す。クロピドグレルはプロドラッグであり、おもにCYP2C19を通して活性化体へ変換され、活性化体がP2Y₁₂のCys97を修飾し、P2Y₁₂が膜脂質ラフトから離れることによりADP凝集が抑制される²⁷⁾。このように、CYP2C19がクロピドグレルの活性化体への変換反応に大きくかかわっている可能性が考えられた。

日本人を対象としたクロピドグレルの効果と遺伝子多型に関する研究はこれまでのところみつからない。CYP2C19の多型頻度に関しては、日本人を対象に詳しく

表⑥ 日本人の CYP2C19 遺伝型のアレル頻度 (国立食品薬品衛生研究所でタイピングした 253 人から得られた頻度)

| クロピドグレルへの反応性 | | よい | | 悪い | |
|---------------------------|---------|--------------------|--------|--------|--------|
| | CYP2C19 | CYP2C19 | *1/*1 | *1/*2 | *2/*2 |
| | | *1*2 | | | |
| クロピドグレルへの反応性 | CYP2C19 | genotype frequency | 0.5376 | 0.3912 | 0.0712 |
| | *1*3 | | | | |
| よい | *1/*1 | 0.7596 | 0.41 | 0.30 | 0.05 |
| | *1/*3 | 0.2239 | 0.12 | 0.09 | 0.02 |
| 悪い | *3/*3 | 0.0165 | 0.01 | 0.01 | 0.00 |
| CYP2C19*2, *3 は酵素ができないアレル | | CYP2C19 | *1/*1 | *1/*2 | *2/*2 |
| 白人での頻度 | | | 0.71 | 0.27 | 0.03 |

日本人はクロピドグレルを活性化体へ変換する CYP2C19 量が少ないヒトが多い。

調べられており、多くの論文が発表されている。なかでも、国立医薬品食品衛生研究所がミレニアムゲノムプロジェクトの一環としておこなった多型頻度に関する研究は、日本人 253 名を対象とし、ハプロタイプの構築までおこなっており、日本人の CYP2C19 の変異研究の集大成である²⁸⁾。これによると CYP2C19*2 のアレル頻度は 0.267、*3 のアレル頻度は 0.128 である。*2 は先ほども紹介したようにスプライス異常変異であり、*3 は停止コドンとなるナンセンス変異である。ともに、蛋白質に重大な影響を与える。両変異の頻度をもとに計算すると、日本人の約 40% しか CYP2C19 の野生型をもたないことが理解されよう (表⑥)。日本人の約 1 割は、CYP2C19 をまったく発現しない*2 のホモ体もしくは*3 のホモ体である。白人では CYP2C19*2 のアレル頻度は 0.16 であり*3 は存在しない。したがって、日本人は CYP2C19 を欠損する遺伝型を高頻度に保有すると理解されている。

おわりに

ここまで、抗血栓薬の抵抗性について、テーラーメイド (個別化) 医療実施の可能性の観点から述べてきたが、これら薬剤抵抗性に関しては、いまだ臨床的に受け入れられているとはいえない²⁰⁾²⁹⁾。その大きな理由として、*in vivo* における血小板機能を鋭敏に反映する *in vitro* もしくは *ex vivo* 血小板機能測定系はいまだ確立されておらず、普遍的に認められた診断上のカットオフ値の設定

もできないため、これら薬剤抵抗性の診断基準が確立できていないことが指摘されている。また、抗血栓薬に限らず、どんな薬剤でもすべての患者に有効であるわけではない。したがって、薬剤抵抗性と定義せずに “treatment failure” (治療不成功) とすべきで、特別な疾患として分類する必要はないとも指摘されている。さらに、薬剤服薬のコンプライアンスを確認する必要があること、また、血栓症は、血小板機能のみに依存するのではなく、さまざまな要因に依存すること、抗血小板薬は血小板凝集にかかわる刺激伝達系のたった一つの経路を抑えるに過ぎないことなどの理由で、抗血小板薬に過大な期待をもつこと自体が誤りであることも指摘されている。したがって、現時点では血小板機能を測定して、その結果をもって抗血小板療法に介入することを臨床現場でおこなうべきではないことを、強調しておきたい。今後、われわれが実施している研究も含めて、更なる検討が進められ、今後、個別化医療により、さらに有効で安全な抗血栓療法が確立されることを期待したい。

【謝辞】

この論文の成果の一部は、厚生労働科学研究費補助金および (独) 医薬基盤研究所保健医療分野における基礎研究推進事業でおこなった。

●文 献●

- 1) Yin T *et al*: Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1—rationale and perspectives. *Thromb*

- Res 120 : 1-10, 2007
- 2) Fukuda T *et al* : Warfarin dose requirement for patients with both VKORC1 3673A/A and CYP2C9*3/*3 genotypes. *Clin Pharmacol Ther* 80 : 553-554, 2006
 - 3) Anderson JL *et al* : Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation* 116 : 2563-2570, 2007
 - 4) Schwarz UI *et al* : Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med* 358 : 999-1008, 2008
 - 5) Millican EA *et al* : Genetic-based dosing in orthopedic patients beginning warfarin therapy. *Blood* 110 : 1511-1515, 2007
 - 6) Antithrombotic Trialists' Collaboration : Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 324 : 71-86, 2002
 - 7) Hovens MM *et al* : Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin : a systematic review. *Am Heart J* 153 : 175-181, 2007
 - 8) 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
 - 9) 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
 - 10) Snoep JD *et al* : Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events : a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 167 : 1593-1599, 2007
 - 11) Krasopoulos G *et al* : Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity : systematic review and meta-analysis. *BMJ* 336 : 195-198, 2008
 - 12) Halushka MK *et al* : Genetic variation in cyclooxygenase 1 : effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther* 73 : 122-130, 2003
 - 13) Maree A *et al* : Glycoprotein IIb/IIIa antagonists in acute coronary syndromes : where are we now? *Semin Vasc Med* 3 : 385-390, 2003
 - 14) Lepantalo A *et al* : Polymorphisms of COX-1 and GPVI associate with the antiplatelet effect of aspirin in coronary artery disease patients. *Thromb Haemost* 95 : 253-259, 2006
 - 15) Li Q *et al* : Frequency of genetic polymorphisms of COX1, GP IIIa and P2Y1 in a Chinese population and association with attenuated response to aspirin. *Pharmacogenomics* 8 : 577-586, 2007
 - 16) Ohmori T *et al* : Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity : involvement of other signaling pathway(s) in cardiovascular events of aspirin-treated patients. *J Thromb Haemost* 4 : 1271-1278, 2006
 - 17) Cheng X *et al* : Aspirin resistance or variable response or both? *Am J Cardiol* 98 : 11N-17N, 2006
 - 18) Pettersen AA *et al* : Unstable angina, stroke, myocardial infarction and death in aspirin non-responders. A prospective, randomized trial. The ASCET (ASpirin non-responsiveness and Clopidogrel Endpoint Trial) design. *Scand Cardiovasc J* 38 : 353-356, 2004
 - 19) Gurbel PA *et al* : Clopidogrel resistance? *Thromb Res* 120 : 311-321, 2007
 - 20) De Miguel A *et al* : Clinical implications of clopidogrel resistance. *Thromb Haemost* 100 : 196-203, 2008
 - 21) Geisler T *et al* : Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation. *Eur Heart J* 27 : 2420-2425, 2006
 - 22) Matetzky S *et al* : Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 109 : 3171-3175, 2004
 - 23) Cuisset T *et al* : Benefit of a 600-mg loading dose of clopidogrel on platelet reactivity and clinical outcomes in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 48 : 1339-1345, 2006
 - 24) Bonello L *et al* : Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance : a multicenter randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol* 51 : 1404-1411, 2008
 - 25) Giusti B *et al* : Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10+12 G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients. *Pharmacogenet Genomics* 17 : 1057-1064, 2007
 - 26) Frere C *et al* : Effect of cytochrome p450 polymorphisms on platelet reactivity after treatment with clopidogrel in acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 101 : 1088-1093, 2008
 - 27) Savi P *et al* : The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y12 receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 : 11069-11074, 2006
 - 28) Fukushima-Uesaka H *et al* : Genetic variations and haplotypes of CYP2C19 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet* 20 : 300-307, 2005
 - 29) Cattaneo M : Aspirin and clopidogrel-efficacy, safety, and

the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*
24: 1980-1987, 2004

みやた・しげき

宮田茂樹 国立循環器病センター輸血管理室医長

1961年、奈良県生まれ。

奈良県立医科大学小児科入局、同助手。1992年から4年間 The Scripps Research Institute (CA, USA) に留学。2000年から現職。研究テーマは、流動状況下（すり応力下）血小板血栓形成メカニズム、アスピリンレジスタンス、人工心肺使用手術周術期の血小板機能低下のメカニズム、ヘパリン起因性血小板減少症（HIT）など。



特集 脳卒中と遺伝子

アスピリンレジスタンス

Aspirin Resistance

宮田 茂樹¹⁾ 宮田 敏行²⁾ 嘉田 晃子³⁾ 長東 一行⁴⁾Shigeki Miyata¹⁾, Toshiyuki Miyata²⁾, Akiko Kada³⁾, Kazuyuki Nagatsuka⁴⁾

Abstract

Aspirin inhibits platelet activation through the permanent inactivation of the cyclooxygenase (COX) activity of prostaglandin H synthase-1 (referred to as COX-1), and consequently inhibits the biosynthesis of thromboxane A₂ (TXA₂), a platelet agonist. Recent meta-analysis has revealed that long-term aspirin administration has clear benefits for the secondary prevention of cardiovascular diseases with an odds reduction of 23% and an absolute risk reduction of 3.1% over 2 years. However, this indicates that not all individuals respond equally to aspirin therapy and cardiovascular events may occur during aspirin therapy, this is often denoted as "clinical aspirin resistance". Several reports have, indeed, suggested that the effect of aspirin administration varies considerably among the patients at high risk for cardiovascular events. Approximately one fourth of the patients showed persistent platelet reactivity *in vitro* despite the use of aspirin (denoted "laboratory aspirin resistance"), this was determined by laboratory tests including the test for arachidonic acid-induced platelet aggregation and the assays using point-of-care devices. Recent clinical studies have proposed that resistance to aspirin (laboratory aspirin resistance) can relate to the cardiovascular outcomes in patients treated with aspirin (clinical aspirin resistance). A systematic review and meta-analysis on aspirin resistance have indicated that patients who are resistant to aspirin are at a greater risk (odds ratio: 3.85) of clinically important cardiovascular morbidity than patients who are sensitive to aspirin. However, many issues are yet to be resolved in order to apply the concept of "aspirin resistance" to actual clinical practice. The relevance of the various *ex vivo* functional indexes of platelet capacity to *in vivo* platelet activation and the precise mechanisms underlying aspirin resistance are still largely unknown. To assess what kind of laboratory assays is the best predictor for cardiovascular events and the risk factors of aspirin resistance, including non-compliance, concurrent intake of other drugs such as nonsteroid anti-inflammatory drugs, and polymorphism of COX-1, we have conducted a multicenter, prospective cohort study (ProGEAR study). We hope that these results will contribute to an individualized antiplatelet therapy through the identification of aspirin nonresponders as a high-risk group for cardiovascular events.

Key words : antiplatelet therapy, aspirin resistance, cyclooxygenase-1, laboratory assay, cardiovascular events

はじめに

生活水準の向上による高齢化や生活習慣病の罹病率の上昇により、不安定粥腫の破綻を契機として形成される

動脈血栓症、すなわち脳梗塞や心筋梗塞などの克服が重要な課題となっている。これら、疾患をアテローム血栓症という包括した概念として捉え、検討することが提唱されている。実際、世界保健機関 (WHO) からは、アテローム血栓症は世界の死因の約 3 割を占める人類最大の

1) 国立循環器病センター輸血管理室 [〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1] Division of Transfusion Medicine, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai Suita-shi, Osaka 565-8565, Japan

2) 同 研究所病因部 Research Institute, National Cardiovascular Center

3) 同 臨床研究センター Department of Clinical Research and Development, National Cardiovascular Center

4) 同 内科脳血管部門 Cerebrovascular Division, Department of Internal Medicine, National Cardiovascular Center

疾患であると報告されている。

動脈血流下では、液相の凝固カスケードは有効に機能せず、流動状況下で血管壁損傷部位に粘着し得る血小板の存在が、血栓形成の初期段階には必須となる。したがって、アテローム血栓症に対する最も基本的な薬物療法は、抗血小板療法となる。その中で、アスピリンは、その使用経験が長く、薬価が非常に安いという大きな利点を有しており、副作用として消化管出血、アスピリン喘息など注意すべき点も多いが、チエノピリジン系薬剤で発生するような血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP)、無顆粒球症、肝障害などの重篤な副作用に関する懸念が比較的少ないために、最も多用されている抗血小板薬である。

代表的抗凝固薬であるワルファリンは、その投与患者において、その効果を PT-INR (Prothrombin Time-International Normalized Ratio: プロトロンビン時間-国際標準化比) 等でモニタリングしながら投与量を調節し、治療を行う。一方、アスピリンに代表される抗血小板薬は、モニタリングを行わず、一定量で投与されることが多い。しかしながら、アスピリンの血小板機能抑制効果には個人差がある、との報告が以前からなされており、アスピリンの効果に関するモニタリングの必要性について指摘する声もあった。

近年、このアスピリンの血小板機能抑制効果に関する個人差が、臨床的な意義を持つのではないかと、すなわち、アスピリン投与を受けているにもかかわらず、血小板機能抑制効果が弱い患者群をアスピリン抵抗性 (aspirin resistance) と定義した場合、アスピリンによって効果的に血小板機能が低下しているアスピリン感受性群の患者と比較して、アスピリン抵抗性群では、心血管イベントの再発が有意に多く認められるとの報告が増加し、「アスピリン抵抗性 (aspirin resistance)」という概念が改めて注目を集めるようになった。この概念は、患者個々に合った薬剤ならびに投与量を、その効果をモニタリングしながら使用することで、最大限に有効で、かつ副作用の少ない治療を模索する個別化医療に向けた検討につながることもあり、さまざまな検討がなされてきている。

本稿では、アスピリン抵抗性 (aspirin resistance) に関する現時点での流れについて概説するとともに、筆者らがを行っているアスピリン抵抗性に関する多施設共同前向き観察研究である「アスピリン抵抗性の実態ならびにその遺伝子背景に関する研究 (The Study on Profile and Genetic factors of Aspirin Resistance: ProGEAR study)」について、紹介したい。

I. アスピリンの抗血小板作用

アスピリンは、プロスタグランジンの生合成を阻害し薬理学的作用を発揮する。プロスタグランジンの生合成は、ホスホリパーゼAが膜リン脂質からアラキドン酸を生成することで始まる。このアラキドン酸はプロスタグランジン (PG) H合成酵素により PGG_2 に変換され、さらに同酵素の過酸化酵素作用により PGH_2 となる。このPGH合成酵素はシクロオキシゲナーゼ (COX) とも呼ばれ、COX-1とCOX-2が知られる。COXにより生成された PGH_2 は、 PGI_2 (プロスタサイクリン) やトロンボキサンA₂ (TXA₂) へとそれぞれの合成酵素により変換され、血小板凝集阻止活性/血管平滑筋拡張作用ならびに血小板活性化作用/血管平滑筋収縮作用を発揮する。したがって、同じアラキドン酸でも、血小板における代謝産物 (TXA₂) は血栓形成促進に、血管内皮細胞 (PGI_2) では血栓形成抑制に働く。

COX-1は胃、腎、血管系、血小板といった、すべての細胞に構成的に発現している。アスピリンは、COX-1のSer529をアセチル化し活性中心の構造変化を起こし、基質であるアラキドン酸への結合を阻害することで、 PGH_2 産生を抑制する。アスピリンのCOX-1阻害効果はCOX-2の阻害より約170倍強い。このように、アスピリンはトロンボキサン依存性の血小板活性化を阻害することで、抗血小板作用を発揮する。COX-1の阻害はプロスタノイド類の恒常的な生成を抑制するので、上部消化管粘膜障害 (潰瘍) といった副作用を起こすことがある。経口投与されたアスピリンは胃と小腸の粘膜から素早く吸収される。アスピリンは投与後20分以内に血漿中に検出され、30~40分以内にピークとなり、1時間以内に血小板機能を阻害する。血小板COX-1はアスピリンが全身に循環する前に門脈でアセチル化され阻害される。アスピリンは弱酸性の薬剤で、脂溶性のため、胃粘膜を速く通過できる。また、胃のpHは酸性なのでアスピリンの加水分解が最小限に抑えられる。一方、腸溶剤は小腸の上部で溶け出すのでpHが高く、アスピリンはプロトン化されにくく膜を通りにくい状態となり吸収されにくい。したがって、腸溶剤はアスピリンの吸収が遅く、その効果発現も遅い。

アスピリンの血中の半減期は約20分であるが、効果を示す半減期はより長い。血小板は核を持たないので新しい酵素を生成できないため、アスピリン投与によるCOXの不可逆的な阻害効果は、血小板の寿命が尽きる約10日間継続する。

II. アスピリンの有効性

アスピリンの心血管イベント二次予防に対する有効性については、ほぼ確立されたといっても過言ではない。血栓塞栓症のハイリスクを持つ患者（脳梗塞や一過性脳虚血発作の既往を持つ患者、心筋梗塞患者、その既往を持つ患者など）をランダムに割付けた試験のメタアナリシス²⁾において、アスピリン投与群（29,652名）では、追跡2年間でのイベント（心筋梗塞、脳梗塞、致死血管障害）の発生割合は12.9%であり、コントロール群（29,743名）では16.0%であったと報告されている。したがって、これら患者群に対する二次予防として、アスピリンは23%のオッズ減少、19%の相対リスク減少、3.1%の絶対リスク減少が認められることとなる。

しかしながら、これらの事実を裏返しに見てみると、アスピリンは、血栓塞栓症のハイリスク患者でのイベント再発を5分の4以上（81%）抑えることができていない。また、血栓塞栓症のハイリスク患者の8人に1人（12.9%）は、2年間にアスピリンを飲んでいるにもかかわらずイベントを発症したことになる。

このような事実関係から、「なぜ、アスピリン治療においてイベントの再発を防ぐことができない患者群が存在するのか」と、疑問を持つことから始まり、「アスピリンの抗血小板効果には個人差が認められる」との報告²⁻⁵⁾をもとに、アスピリン抵抗性（aspirin resistance）という概念が生まれてきた。

III. アスピリン抵抗性（aspirin resistance）の定義

アスピリンの効果を血小板凝集能やトロンボキサン代謝産物量などを用いて評価し、アスピリンを服薬しているにもかかわらず、血小板機能抑制効果が弱い患者群をアスピリン抵抗性（aspirin resistance）と定義し、その頻度や意義について検討した報告が増加している。

実際、さまざまな *in vitro* もしくは *ex vivo* 測定系を用いて評価しアスピリン抵抗性を定義した、いわゆる検査学的アスピリン抵抗性の頻度に関して、42の試験を集めて行われたメタアナリシスの結果が報告されている⁶⁾。Table 1 にその結果を示した。用いられた血小板機能評価法は、①コラーゲン/エピネフリンをコーティングしたカートリッジを用いた、ザリ応力下での血小板凝集能を測定するといわれている platelet functional analyzer-100 (PFA-100)、②フィブリノーゲンが固相化

Table 1 検査学的アスピリン抵抗性の頻度
(42の研究のメタ解析) (文献6より引用)

| | 頻度 | |
|------------|----------------------------|-------------------------|
| | Not adjusted % (95% CI) | Adjusted* % (95% CI) |
| 全体 | 23.8 (19.5-28.0) | 27.1 (21.5-32.6) |
| 測定法 | | |
| PFA-100 | 28.1 (22.2-33.9) | 29.0 (23.1-34.8) |
| RPFA | 18.9 (12.1-25.8) | 26.2 (18.6-33.9) |
| LTA | 15.4 (7.8-23.0) | 21.3 (15.1-27.5) |
| Rest | 35.0 (6.0-64.0) | 31.8 (21.6-42.0) |
| 対象疾患 | | |
| CAD | 22.4 (17.5-27.4) | 22.9 (17.0-28.7) |
| Stroke | 26.0 (16.3-35.7) | 32.1 (22.4-41.8) |
| Rest | 27.3 (9.5-45.1) | 26.3 (16.5-36.0) |
| 用量 | | |
| ≤100 mg | 27.1 (18.7-35.6) | 35.6 (28.1-43.2) |
| 101-299 mg | 29.6 (21.8-37.5) | 28.2 (20.9-35.6) |
| ≥300 mg | 21.7 (11.8-31.7) | 18.6 (11.3-26.0) |
| Unknown | 19.8 (10.7-28.9) | 25.8 (16.2-35.4) |

アスピリンレジスタンスの測定に使用された測定法、対象疾患、用量に分けてアスピリンレジスタンスの頻度を求めた。PFA-100とRPFAは、測定に用いた機種(本文参照)。LTA: 血小板凝集能の濁度法。95% CI: 95%信頼区域
*測定法、対象疾患、用量で補正した

されたビーズが入った使い捨てタイプのカートリッジを用いた rapid platelet functional assay (RPFA)、③アラキドン酸などをアゴニストとして用いた古典的な血小板凝集法 (LTA) などである。メタアナリシスの結果では、これらの測定法で求めた検査学的アスピリン抵抗性の頻度は24% (95%信頼区間20~28%) であり、測定方法、対象疾患、アスピリンの用量で補正した頻度は27% (95%信頼区間22~33%) であった。また、補正後では、100 mg/日以下のアスピリン投与でのアスピリン抵抗性の頻度は36%、300 mg/日以上での投与では19%で、投与量での有意差が認められた。測定法でもアスピリン抵抗性の頻度に大きな違いがみられており、アラキドン酸惹起血小板凝集能 (5試験) ではその頻度は6%であったものの、PFA-100 (22試験) やRPFA (6試験) を用いた場合は、それぞれ28%および19%であったと報告されている。また、アスピリン投与に至った基礎疾患を、冠動脈疾患 (心筋梗塞、狭心症、冠動脈血行再建術など)、脳梗塞 (虚血性脳梗塞、一過性脳虚血発作など)、その他 (末梢動脈疾患など) に分けた場合、アスピリン抵抗性の頻度には有意な差は認められなかった。

このメタアナリシスでは、服薬 (compliance) の問題について解析できていないため、アスピリン抵抗性に

non-compliance が関与^{7,8)}していることは否定できない。

IV. アスピリン抵抗性 (aspirin resistance) の臨床的意義

これらの検査学的アスピリン抵抗性が、実際どのような臨床的意義を持つかについても検討がなされている。アスピリンを服薬しているにもかかわらず、血栓塞栓症を発症した患者群を臨床的アスピリン抵抗性と定義し、上述した検査学的アスピリン抵抗性が、臨床的アスピリン抵抗性のリスク因子となるとの報告がなされている。

アスピリン治療 (325 mg/日を7日以上) を受け、他の抗血小板薬を服用せず症状が安定した循環器患者 325 名を、前向きに検討した研究報告がある。冠動脈造影で 60%以上の狭窄が証明されている患者、心筋梗塞、脳梗塞の既往がある患者、血行再建術を受けている患者を対象に、外来もしくは心臓カテーテル検査目的で来院した患者を連続的に登録し、追跡 (追跡期間は 679±185 日) した報告である。アスピリン抵抗性は、血小板凝集計を用い、10 μM の ADP 凝集で 70%以上ならびに 0.5 mg/mL のアラキドン酸凝集で 20%以上の凝集を認めた患者として定義され、5.2%の患者がアスピリン抵抗性と診断された⁹⁾。この試験の主要評価項目として、死亡、心筋梗塞、24 時間以上続く症候性脳血管障害の複合エンドポイントが設定され、アスピリン抵抗性群は、アスピリン感受性群と比較して、上記複合エンドポイントに達した割合が高かった (24% vs 10%, ハザード比 3.12, 95%信頼区間 1.10~8.90)。また、層別多変量解析により血小板数、年齢、心不全、アスピリン抵抗性が独立した危険因子 (アスピリン抵抗性のハザード比 4.14, 95%信頼区間 1.42~12.06) であったと報告¹⁰⁾されている。

カナダにおける HOPE 研究 (The Heart Outcomes Prevention Evaluation study) のコホート内ケースコントロール研究¹¹⁾として、5 年間のフォローアップ期間中に、アスピリン投与を受けているにもかかわらず、心筋梗塞、脳梗塞、致死血管障害を起こした患者 488 症例の尿中 11-dehydro thromboxane B₂ を測定し、アスピリン抵抗性を定義した報告がある。488 名の年齢と性別をマッチさせたコントロール (アスピリンを服用し、心筋梗塞、脳梗塞、致死血管障害を起こさなかった患者) を抽出した。患者背景の調整後に、尿中 11-dehydro thromboxane B₂ 値を 4 分位 (quartile) に分けた場合、心筋梗塞、脳梗塞、致死血管障害の複合エンドポイントに達した患者は、尿中 11-dehydro thromboxane B₂ 値が高くな

るにつれて、その割合が増加した。また、尿中 11-dehydro thromboxane B₂ 値を 4 分位 (quartile) に分けて一番高い群は、一番低い群と比較して複合エンドポイントに対するオッズ比は 1.8 (95%信頼区間: 1.2~2.7) であり、心筋梗塞のオッズ比 2.0 (95%信頼区間: 1.2~2.7)、致死血管障害のオッズ比 3.5 (95%信頼区間: 1.7~7.4) であったと報告されている。

また、本邦からも、アスピリン服薬患者のコラーゲン惹起血小板凝集能を 4 分位に分けると、凝集能が最も残存している群は、他の群より有意にイベント発症が高かった (ハザード比=8) と報告¹²⁾されている。

これらの報告が契機となり、その後、同様の報告が相次いだ。最近、これら報告のシステマティックレビューを行い、検査学的アスピリン抵抗性と心血管系疾患の再発 (臨床的アスピリン抵抗性) との関連を検討したメタアナリシスの結果が報告された¹³⁾。この報告では、最終的に心筋梗塞、急性冠症候群、脳梗塞、percutaneous coronary intervention (PCI)、冠動脈バイパス術、血管疾患に対して二次予防としてアスピリンを投与された患者に対するアスピリン抵抗性を検討した 20 の試験 (2,930 症例) のデータが解析された (Fig. 1)。アスピリンは 75~325 mg/日の投与量が用いられ、6 つの試験では、アスピリン以外の抗血小板薬も同時に投与されていた。これらの結果をまとめると、810 症例 (28%) がアスピリン抵抗性と定義されている。アスピリン抵抗性は、女性ならびに腎機能障害患者に多かったと報告されている。アスピリン抵抗性を示した患者群では、39%に心血管イベントが認められたのに対し、アスピリン感受性群では 16%に心血管イベントが認められた。そのオッズ比は 3.85 (95%信頼区間: 3.08~4.80) であった。発症イベント別に分けても、死亡では、オッズ比 5.99 (95%信頼区間: 2.28~15.72)、急性冠症候群では 4.06 (95%信頼区間: 2.96~5.56)、グラフト閉塞 (graft failure) は、4.35 (95%信頼区間: 2.26~8.37)、新規脳血管イベントは 3.78 (95%信頼区間: 1.25~11.41) とそれぞれにおいても、アスピリン服薬患者において、血小板の機能が効果的に抑制されていない患者では、効果的に抑制されている患者に比べ、心血管系疾患の再発率が高いことが示唆された (Table 2)。

V. アスピリン抵抗性の原因

アスピリン抵抗性の原因として、血小板活性化経路は、トロンボキサン依存経路のみならず、カテコールアミン、トロンビン、adenosine diphosphate (ADP) といった刺

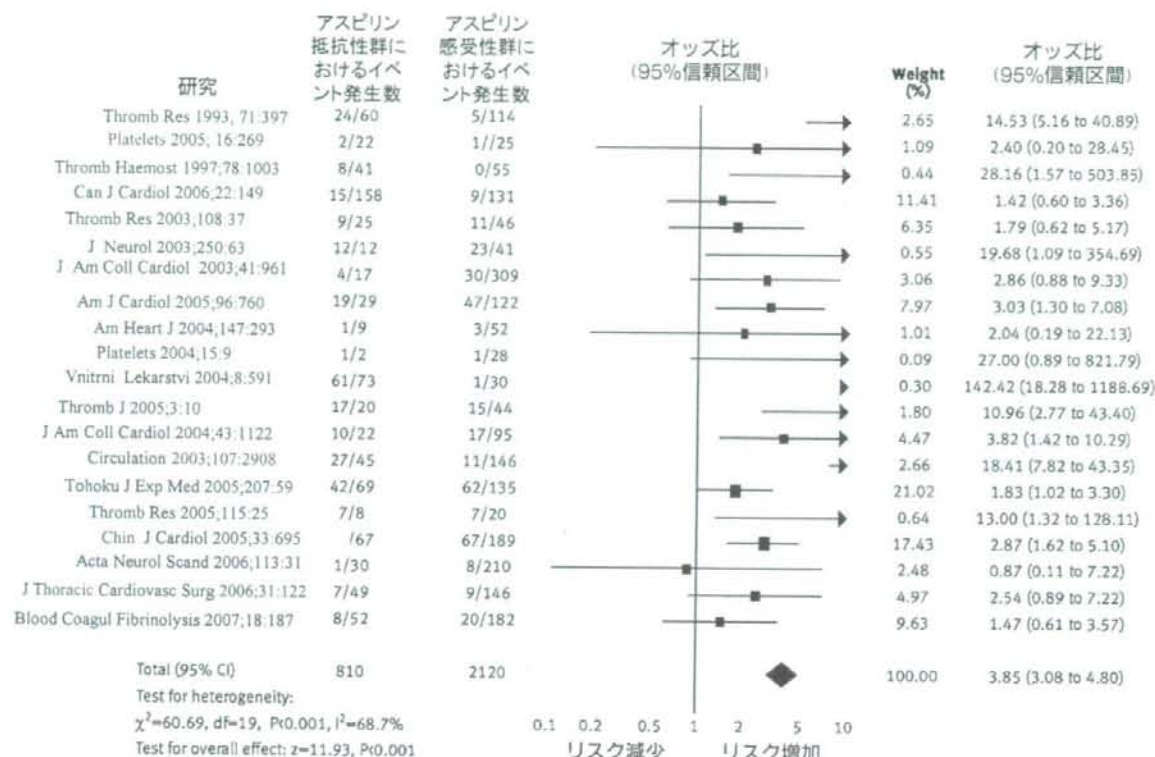


Fig. 1 アスピリン抵抗性を示した患者における心血管イベントのリスク
(文献13より引用)

Table 2 アスピリン抵抗性を示す患者群における心血管イベントのリスク (文献13より引用)

| イベント | 研究数 | 患者数 | オッズ比 (95%信頼区間) | p値 |
|---------------------------|-----|-------|----------------------|--------|
| すべての心血管 イベント | 20 | 2,930 | 3.85 (3.08~4.80) | <0.001 |
| 死亡 | 4 | 728 | 5.99 (2.28~15.72) | <0.003 |
| 急性冠症候群 | 9 | 1,275 | 4.06 (2.96~5.56) | <0.001 |
| グラフト閉塞 (Graft failure) | 3 | 420 | 4.35 (2.26~8.37) | <0.001 |
| 新規脳血管 イベント | 4 | 340 | 3.78 (1.25~11.41) | <0.02 |

されている¹⁵⁾。イブプロフェンなど、他の非ステロイド抗炎症薬などが、アスピリンのCOX-1への結合を拮抗阻害することで、アスピリン抵抗性の原因となり得るとも指摘^{16,17)}されている。また、血小板以外から産生されるTXA₂の関与も指摘されている¹⁸⁾。それ以外にも、現時点で、さまざまなアスピリン抵抗性のメカニズムが指摘されている。現時点で指摘されている主要な要因を Table

激による血小板活性化経路など、さまざまにその活性化が制御されているため、トロンボキサン依存性の血小板活性化を抑制しても、血小板活性化経路の一部を抑制しているにすぎないことが考えられる。また、上述したnon-complianceもアスピリン抵抗性の重要なファクターであることが指摘されている^{7a)}。アスピリンを服薬している連続した700名の心臓カテーテル検査を実施する患者で検討した結果、検討できた692名中、680名で血清トロンボキサンB₂の低下が認められた。2名は、健康人と同様の血清トロンボキサンB₂の値を示し、アラキドン酸惹起血小板凝集率も健康人と変わらず、non-complianceが原因であると考えられた。残り12名では、低下していたものの10 ng/mL以上で、アラキドン酸惹起血小板凝集率が高かった。これら患者検体に、*ex vivo*でアスピリンを添加すると、すべての患者でアラキドン酸惹起血小板凝集が抑制された。したがって、約2%に認められたアスピリンによるCOX-1機能の抑制不良は、服薬上の問題、もしくはアスピリンの投与量不足が関与している可能性が示唆されたと報告¹⁴⁾されている。

腸溶錠がアスピリン抵抗性に関与していることも指摘

Table 3 アスピリン抵抗性のメカニズム (文献 19 より引用)

1. アスピリンのバイオアベイラビリティ
 - ・服薬不全
 - ・アスピリン投与量の不足
 - ・salicylateの蓄積によるアスピリンのCOX-1結合部位への結合の妨害
 - ・非ステロイド性抗炎症薬の同時服用によるアスピリンの効果の妨害
 - ・プロトンポンプ阻害薬によるアスピリンのバイオアベイラビリティの減少
2. 血小板機能
 - ・血小板の代謝によるアスピリンにさらされていない新しい血小板の血中への出現
 - ・新しく形成された血小板中のCOX-2の発現量の違い
 - ・ADPとコラーゲンへの血小板感受性の増強
3. 遺伝子多型
 - ・血小板コラーゲン受容体の遺伝子多型
 - ・COX-1, COX-2, TXA₂合成酵素, アラキドン酸代謝酵素の遺伝子多型
 - ・血小板フィブリン受容体GP IIb/IIIa 遺伝子多型
 - ・低用量アスピリンによるFXIII活性化の阻害の差異につながるFXIII Val34Leu 遺伝子多型
4. 他の血球細胞や細胞由来産物と血小板の相互作用
 - ・赤血球による血小板活性化の不十分な阻害
 - ・アスピリン処理された血小板と血管細胞の間に起こるアラキドン酸代謝の細胞間の移動
 - ・単球-マクロファージ由来TXA₂
 - ・血小板TXA₂の制御としてCOX-1/COX-2で生成するPGI₂もしくは血管のtPAの放出
5. 他の因子
 - ・過度の運動や心理的ストレスによるノルエピネフリン量の増加
 - ・喫煙
 - ・酸化ストレスとアラキドン酸非酵素的な過酸化によって生成する活性をもつ8-iso-PGF_{2α}の生成
 - ・アスピリンとアセチルコリンによって生じる一酸化窒素(NO)の抗血小板作用と血管拡張作用の相互作用

3¹⁹⁾に示す。

それらの中で、健康人や心血管系疾患患者を対象にして、検査学的アスピリン抵抗性と遺伝子多型、特にCOX-1遺伝子多型との関連について検討された報告(否定的な結果も含めて)が出されている²⁰⁻²²⁾。最近、COX-1遺伝子多型(C50T polymorphism)がアスピリン服薬患者の心血管イベント発生(臨床的アスピリン抵抗性)に関与するかどうか検討した報告がインドからなされている²³⁾が、その関与は認められなかった結果であった。また、ADP受容体であるP2Y₁₂の遺伝子多型とアスピリン服用後の残存アラキドン酸惹起血小板凝集能との関連について指摘した、中国人での報告もある²⁴⁾。

VI. アスピリン抵抗性とは?

抵抗性(resistance)という定義は、一般的にその薬剤が、遺伝子変異などによりそのターゲット(酵素など)を抑制できない場合に用いられる。したがってアスピリンの場合は、COX-1の活性を阻害できず、TXA₂の産生、TXA₂による血小板の活性化が抑制されない場合のみを真の「アスピリン抵抗性」と定義すべきであろう。しかしながらアスピリンは、低用量(1日量0.5 mg/kg程度)の持続投与で、十分に血小板のトロンボキサン合成を阻害できることが報告されている^{25,26)}。したがって、現在推奨されている低用量アスピリン治療(75~150 mg/日)は、ほとんどすべての患者でトロンボキサン合成を抑制するのに十分な量である。実際、アスピリンのターゲット酵素であるCOX-1機能を直接反映すると考えられる血清トロンボキサンB₂やアラキドン酸惹起血小板凝集を評価に用いた場合、non-complianceであると推測される患者を除くと、観察したほぼすべての患者で、これら評価系で抑制が認められたとの報告が多い^{7,12,14)}。上述した検査学的アスピリン抵抗性の頻度に関するメタアナリシス⁶⁾においても、アラキドン酸惹起血小板凝集能を用いた評価系ではアスピリン抵抗性の頻度は6%で、ほかのアッセイ系(PFA-100やRPFA)と比較して、非常に低かったと報告されている。このメタアナリシスでは服薬(compliance)の問題について検討されておらず、non-complianceの症例の頻度を考えると、実際の真の「アスピリン抵抗性(aspirin resistance)」である患者の頻度は、たとえ低用量アスピリン治療を行ったとしても、5%以下の非常に低いものと考えられる。

しかしながら、上述した臨床的アスピリン抵抗性に関するメタアナリシス¹⁹⁾でも示されているように、アスピリンを服薬しているにもかかわらず、残存している血小板機能が多い患者群では、効果的に抑制されている患者群と比較して、約3~4倍程度、心血管イベントの発症割合が高いと報告されている。したがってこれらは、真の「アスピリン抵抗性」とは定義されないものの、アスピリン服薬患者において、残存している血小板機能を測定することで、心血管イベントのリスク群を明確にできる可能性がある。Complianceや腸溶錠の問題、また併用薬の関与等も含めて、今後さらに検討されるべき問題であると考えられる。特に、今まで実施されてきた報告では、複数の評価系を用いた試験、その評価系のconsistencyについて時期を変えて検討した試験、complianceを詳細に検討した報告は少ない。

そこで筆者らは、脳梗塞/一過性脳虚血発作ならびに急性冠症候群に対する二次予防として、アスピリン投与を受けている患者群を対象に、本邦におけるアスピリン抵抗性の頻度、その予後ならびに遺伝子背景を明らかにするために、多施設共同前向き観察研究「アスピリン抵抗性の実態ならびにその遺伝子背景に関する研究 (ProGEAR study)」を実施し、患者登録を完了している。検査学的アスピリン抵抗性の評価項目として、アラキドン酸 (2濃度) とコラーゲン (2濃度) による血小板凝集能、ザリ応力下血栓形成能、血清トロンボキサンB₂、尿中11-デヒドロトロンボキサンB₂と、今までアスピリン抵抗性を定義できると報告された評価方法を、5種類同時に検討することで、それぞれ相互の評価を可能としている。また、血小板凝集能は6カ月間隔で2回測定することで、その consistency の評価を行っている。また、アスピリンの服薬 (compliance) を客観的に確かめるため、アスピリンの代謝産物であるサリチル酸の測定を行っている。また腸溶錠や、併用薬の関与も検討している。臨床的エンドポイントは、脳梗塞、一過性脳虚血発作、心筋梗塞、不安定狭心症、血行再建術、そのほかの血栓塞栓症の発症、心血管疾患による死亡とした、2年間の追跡終了時にイベントと血小板機能の各種パラメータとの関連やリスク因子について解析する予定である。また、本研究では、アスピリン抵抗性の遺伝的背景を解析するため、COX-1, COX-2 を含めた遺伝子解析も実施している。本邦においてアスピリン抵抗性が臨床的意義を持つのかどうか、持つとしたら、どのような測定系 (遺伝子背景を含めて) が臨床的アスピリン抵抗性を最適に反映できるのかどうか、検討を行う予定である。

おわりに

アスピリン抵抗性について概略したが、この概念については、いまだ臨床的に受け入れられているとは言い難い^{1,2)}。その大きな理由として、*in vivo*における血小板機能を鋭敏に反映する *in vitro* もしくは *ex vivo* 血小板機能測定系はいまだ確立されておらず、普遍的に認められた診断上のカットオフ値の設定もできないため、これら薬剤抵抗性の診断基準が確立できていないことが指摘されている。また、抗血栓薬に限らず、どんな薬剤でもすべての患者に有効であるわけではない。したがって、薬剤抵抗性と定義せず“treatment failure” (治療不成功) とすべきで、特別な疾患として分類する必要はないとも指摘されている。したがって、現時点で血小板機能を測定して、その結果をもって抗血小板療法に介入する

ことを臨床現場で行うべきではないことを、強調しておきたい。

しかしながら、今後、筆者らが実施している研究も含めて、さらなる検討が進められ、「アスピリン抵抗性 (aspirin resistance)」という用語の妥当性も含め、明確な定義がなされ、アスピリン服薬患者で、心血管イベントに対するハイリスク患者群を抽出できれば、アスピリンと他の抗血小板薬を併用する、もしくはアスピリンから他の抗血小板薬に変更することにより、これら患者群の予後が改善する可能性がある。実際このようなコンセプトに基づいた介入試験²⁰⁾が実施されており、検査学的アスピリン抵抗性を示す患者に対して、治療介入することで、患者予後が改善することがこのような試験で証明されれば、抗血小板療法の個別化が現実味を帯びてくると思われる。今後、個別化医療により、さらに有効で安全な抗血栓療法が確立されることを期待したい。

謝辞

この論文の成果の一部は、厚生労働科学研究費補助金および(独)医薬基盤研究所保健医療分野における基礎研究推進事業で行った。

文献

- 1) Patrono C, Garcia Rodriguez LA, Landolfi R, Baigent C: Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med* 353: 2373-2383, 2005
- 2) Antithrombotic Trialists' Collaboration: Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 324: 71-86, 2002
- 3) Buchanan MR, Brister SJ: Individual variation in the effects of ASA on platelet function: implications for the use of ASA clinically. *Can J Cardiol* 11: 221-227, 1995
- 4) Pappas JM, Westengard JC, Bull BS: Population variability in the effect of aspirin on platelet function. Implications for clinical trials and therapy. *Arch Pathol Lab Med* 118: 801-804, 1994
- 5) Grottemeyer KH, Scharafinski HW, Husstedt IW: 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) Hovens MM, Snoep JD, Eikenboom JC, van der Bom JG, Mertens BJ, et al: Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin: a systematic review. *Am Heart J* 153: 175-181, 2007
- 7) Schwartz KA, Schwartz DE, Ghosheh K, Reeves MJ, Barber K, et al: Compliance as a critical consideration

- in patients who appear to be resistant to aspirin after healing of myocardial infarction. *Am J Cardiol* **95**: 973-975, 2005
- 8) Cotter G, Shemesh E, Zehavi M, Dinur I, Rudnick A, et al: Lack of aspirin effect: aspirin resistance or resistance to taking aspirin? *Am Heart J* **147**: 293-300, 2004
 - 9) Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, et al: Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol* **88**: 230-235, 2001
 - 10) Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ: 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
 - 11) Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, 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
 - 12) Ohmori T, Yatomi Y, Nonaka T, Kobayashi Y, Madoiwa S, et al: Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity: involvement of other signaling pathway (s) in cardiovascular events of aspirin-treated patients. *J Thromb Haemost* **4**: 1271-1278, 2006
 - 13) Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR: Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ* **336**: 195-198, 2008
 - 14) Frelinger AL, 3rd, Furman MI, Linden MD, Li Y, Fox ML, et al: Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1- and cyclooxygenase-2-independent pathway: a 700-patient study of aspirin resistance. *Circulation* **113**: 2888-2896, 2006
 - 15) Cox D, Maree AO, Dooley M, Conroy R, Byrne MF, et al: Effect of enteric coating on antiplatelet activity of low-dose aspirin in healthy volunteers. *Stroke* **37**: 2153-2158, 2006
 - 16) FitzGerald GA: Parsing an enigma: the pharmacodynamics of aspirin resistance. *Lancet* **361**: 542-544, 2003
 - 17) Hohlfield T, Zimmermann N, Weber AA, Jessen G, Weber H, et al: Pyrazolinone analgesics prevent the antiplatelet effect of aspirin and preserve human platelet thromboxane synthesis. *J Thromb Haemost* **6**: 166-173, 2008
 - 18) Cipollone F, Ciabattini G, Patrignani P, Pasquale M, Di Gregorio D, et al: Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina. *Circulation* **102**: 1007-1013, 2000
 - 19) De Gaetano G, Cerletti C: Aspirin resistance: a revival of platelet aggregation tests? *J Thromb Haemost* **1**: 2048-2050, 2003
 - 20) Halushka MK, Walker LP, Halushka PV: Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther* **73**: 122-130, 2003
 - 21) Maree A, Fitzgerald DJ: Glycoprotein IIb/IIIa antagonists in acute coronary syndromes: where are we now? *Semin Vasc Med* **3**: 385-390, 2003
 - 22) Lepantalo A, Mikkelsen J, Resendiz JC, Viiri L, Backman JT, et al: Polymorphisms of COX-1 and GPVI associate with the antiplatelet effect of aspirin in coronary artery disease patients. *Thromb Haemost* **95**: 253-259, 2006
 - 23) Clappers N, van Oijen MG, Sundaresan S, Brouwer MA, Te Morsche RH, et al: The C50T polymorphism of the cyclooxygenase-1 gene and the risk of thrombotic events during low-dose therapy with acetylsalicylic acid. *Thromb Haemost* **100**: 70-75, 2008
 - 24) Li Q, Chen BL, Ozdemir V, Ji W, Mao YM, et al: Frequency of genetic polymorphisms of COX1, GPIIIa and P2Y1 in a Chinese population and association with attenuated response to aspirin. *Pharmacogenomics* **8**: 577-586, 2007
 - 25) Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C: Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest* **69**: 1366-1372, 1982
 - 26) Patrono C, Collier B, FitzGerald GA, Hirsh J, Roth G: Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* **126** (Suppl): 234S-264S, 2004
 - 27) Cattaneo M: Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**: 1980-1987, 2004
 - 28) Pettersen AA, Seljeflot I, Abdelnoor M, Arnesen H: Unstable angina, stroke, myocardial infarction and death in aspirin non-responders. A prospective, randomized trial. The ASCET (Aspirin non-responsiveness and Clopidogrel Endpoint Trial) design. *Scand Cardiovasc J* **38**: 353-356, 2004

Genetic Polymorphisms of L-Type Calcium Channel $\alpha 1c$ and $\alpha 1D$ Subunit Genes are Associated With Sensitivity to the Antihypertensive Effects of L-Type Dihydropyridine Calcium-Channel Blockers

Kei Kamide, MD; Jin Yang, MD*; Tetsutaro Matayoshi, MD; Shin Takiuchi, MD; Takeshi Horio, MD; Masayoshi Yoshii, MD; Yoshikazu Miwa, MD; Hisayo Yasuda, MD; Fumiki Yoshihara, MD; Satoko Nakamura, MD; Hajime Nakahama, MD; Toshiyuki Miyata, PhD*; Yuhei Kawano, MD

Background: The response of blood pressure (BP) to L-type dihydropyridine calcium-channel blockers (dCCBs) differs among individuals.

Methods and Results: A pharmacogenomic analysis was undertaken in 161 patients with essential hypertension who were treated with dCCBs to study whether genetic polymorphisms of the calcium channel $\alpha 1c$ and $\alpha 1D$ subunit genes, *CACNA1C* and *CACNA1D*, are associated with the antihypertensive effects of dCCBs. Responders were defined as those in whom systolic BP (SBP) was lowered by more than 20 mmHg or diastolic BP (DBP) was lowered by more than 10 mmHg after treatment with dCCBs. Eleven sequence-proven polymorphisms of *CACNA1C* and 5 common polymorphisms of *CACNA1D* chosen from a public database were subjected to genotypic analysis. The comparison of polymorphism prevalence between responders and nonresponders showed significant differences in *CACNA1D* rs312481G>A and rs3774426C>T, and in *CACNA1C* 527974G>A. There were significant differences in SBP or DBP between alleles in these single nucleotide polymorphisms (SNPs). A much more significant reduction in BP was observed for the combined presence of these SNPs.

Conclusions: Three SNPs in *CACNA1D* or *CACNA1C* are genetic polymorphisms conferring sensitivity to the antihypertensive effects of L-type dCCBs in patients with hypertension. The BP reduction by L-type dCCBs might be predicted by evaluating these polymorphisms.

Key Words: Essential hypertension; Genetic polymorphism; L-type calcium channel gene; L-type dihydropyridine channel blockers

Calcium-channel blockers (CCBs), especially those of the L-type dihydropyridine (DHP) subclass, are widely used to treat hypertension because they are better able to lower blood pressure (BP) than are other types of antihypertensive agents. The DHP CCBs (dCCBs) complement the BP-lowering ability in both salt-sensitive and salt-resistant forms of hypertension (HT), and elderly patients generally respond well to dCCBs.² Recently, a number of trials, including VALUE,³ ALLHAT,⁴ ASCOT,⁵ Syst-Eur,⁶ and STONE,⁷ and most correctly performed meta-analyses have demonstrated that dCCBs effectively reduce the incidence of stroke events in older patients with HT^{6,7} and could be the preferred agents for treating HT in patients with ischemia heart diseases because of their vasodilatory effects on the coronary arteries.^{3,8,9} Moreover, dCCBs demonstrate additive effects on BP reduction by most other

kinds of antihypertensive agents, especially angiotensin-I-converting enzyme inhibitors, angiotensin-II-receptor blockers, β -blockers, and thiazide diuretics, with few side-effects.^{2,10} Because of these advantages of dCCBs, several groups that establish international guidelines have recently endorsed them as an initial therapy option in patients with essential HT (EHT), and as an important component of most multidrug regimens for BP control according to a Japanese guideline (JSH2004).¹¹ However, the response of BP to dCCBs differs among individuals, so, to lower BP more effectively, determining an individual's sensitivity to a dCCB before prescribing it would be useful.

Recent studies indicate that the heterogeneity of a patient's responses to antihypertensive treatment is, at least in part, genetically determined.¹² This finding underscores the role of pharmacogenetic research to identify either functional genetic variations or variations inherited in linkage disequilibrium (LD) with these variations as markers to enable more individualized evaluation and selection of agents for treating HT in each drug class.¹³

In Japan, more than a dozen dCCBs, particularly DHP derivatives, are available for clinical use. These DHP derivatives bind to receptors on the $\alpha 1$ subunits of DHP-sensitive voltage-gated (L-type) calcium channels to exert their antihypertensive effects and are believed to play a central role in the excitation-contraction coupling for cardiac and

(Received August 11, 2008; revised manuscript received October 27, 2008; accepted November 12, 2008; released online February 17, 2009)

Division of Hypertension and Nephrology, *Research Institute, National Cardiovascular Center, Suita, Japan

Mailing address: Kei Kamide, MD, Division of Hypertension and Nephrology, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita 565-8565, Japan. E-mail: kamide@hsp.ncvc.go.jp

All rights are reserved to the Japanese Circulation Society. For permissions, please e-mail: cj@j-circ.or.jp

Table 1. Comparison of Characteristics of Responders and Nonresponders to L-Type CCBs

| | R=ΔSBP>20mmHg | | | R=ΔDBP>10mmHg | | |
|--------------------------|-----------------|--------------------|---------|-----------------|--------------------|---------|
| | Responder (±SD) | Nonresponder (±SD) | P value | Responder (±SD) | Nonresponder (±SD) | P value |
| n | 48 | 113 | | 56 | 105 | |
| Age (years) | 62.7±10.8 | 66.7±9.0 | 0.016 | 63.9±11.3 | 66.4±8.6 | 0.124 |
| Sex (M/F) | 23/25 | 62/51 | 0.419 | 34/22 | 51/54 | 0.140 |
| BMI (kg/m ²) | 21.1±7.9 | 21.4±8.6 | 0.849 | 22.5±7.0 | 20.7±9.0 | 0.201 |
| Pre-SBP (mmHg) | 169.7±18.8 | 151.2±18.5 | <0.001 | 161.8±23.8 | 154.0±17.8 | 0.020 |
| Pre-DBP (mmHg) | 102.9±11.5 | 93.6±10.0 | <0.001 | 102.4±12.1 | 93.2±9.4 | <0.001 |
| Pre-MBP (mmHg) | 125.2±12.2 | 112.8±9.2 | <0.001 | 122.2±13.0 | 113.4±9.6 | <0.001 |
| Pre-HR (beats/min) | 68.6±9.3 | 69.6±10.9 | 0.585 | 68.6±9.3 | 69.6±10.9 | 0.585 |
| Post-SBP (mmHg) | 137.6±14.2 | 146.3±15.1 | <0.001 | 137.7±14.2 | 146.9±15.0 | <0.001 |
| Post-DBP (mmHg) | 86.4±9.3 | 88.4±9.9 | 0.243 | 84.4±10.4 | 89.6±8.9 | 0.001 |
| Post-MBP (mmHg) | 103.5±9.3 | 107.7±9.7 | 0.012 | 102.2±9.3 | 108.7±9.2 | <0.001 |
| Post-HR (beats/min) | 72.6±9.8 | 71.8±12.8 | 0.708 | 72.6±9.8 | 71.8±12.8 | 0.708 |
| Monotherapy (%) | 37.5 | 21.2 | 0.035 | 30.4 | 23.8 | 0.371 |
| Type of CCB (%) | | | | | | |
| Amlodipine | 39.6 | 44.2 | 0.584 | 42.9 | 42.9 | 1.000 |
| Nifedipine | 22.9 | 18.6 | 0.533 | 23.2 | 18.1 | 0.442 |
| Nicardipine | 10.4 | 11.5 | 0.840 | 5.4 | 14.3 | 0.071 |
| Manidipine | 8.3 | 9.7 | 0.778 | 10.7 | 8.6 | 0.659 |
| Nilvadipine | 6.3 | 8 | 0.700 | 8.9 | 6.7 | 0.607 |
| Benidipine | 2.1 | 2.7 | 0.829 | 1.8 | 2.9 | 0.669 |
| Nitrendipine | 4.2 | 1.8 | 0.392 | 1.8 | 2.9 | 0.669 |
| Bamidipine | 0.0 | 1.8 | 0.232 | 0.0 | 1.9 | 0.189 |
| Cilnidipine | 2.1 | 0.9 | 0.548 | 1.8 | 0.9 | 0.657 |
| Efonidipine | 2.1 | 0.0 | 0.119 | 1.8 | 0.0 | 0.145 |

Responder defined as SBP reduction (ΔSBP)>20 mmHg or DBP reduction (ΔDBP)>10 mmHg, respectively, after taking L-type CCB.

CCBs, calcium-channel blockers; R, response; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; BMI, body mass index; Pre-SBP, SBP before treatment; Pre-DBP, DBP before treatment; Pre-MBP, mean blood pressure before treatment; Pre-HR, heart rate before treatment; Post-SBP, SBP after treatment; Post-DBP, DBP after treatment; Post-MBP, mean blood pressure after treatment; Post-HR, heart rate after treatment; Monotherapy, prevalence of monotherapy.

smooth muscle¹⁴ L-type calcium channels are formed by 1 of 4 principle pore-forming α 1 subunits [α 1s (Cav1.1), α 1c (Cav1.2), α 1d (Cav1.3), and α 1f (Cav1.4)], which are encoded by different individual genes, in association with several auxiliary subunits.¹⁵ Expression of α 1s and α 1f is restricted to skeletal muscle and retina, respectively, but α 1c and α 1d are widely expressed in neuronal and (neuro)endocrine cells and in electrically excitable cells in the cardiovascular system, including cardiac muscle and vascular smooth muscle.¹⁶ In most cases, both channel types are found in the same cells, with α 1c usually being the predominant isoform.¹⁷ Although previous studies have shown that the effects of dCCBs on the contractility of ventricular muscle and aortic smooth muscle are exclusively mediated by α 1c (not by α 1d)¹⁸ and that α 1d might control physiological processes, such as diastolic depolarization in sinoatrial node cells and neurotransmitter release and neuronal excitability,¹⁹ the physiological effects of these subunits are largely unknown. Considering their expression patterns, the central role of α 1c on the contractility of heart muscle and of vascular smooth muscle, and the important role of the neuroendocrine system in the pathophysiology of HT,²⁰ genes encoding α 1c (*CACNA1C*) or α 1d (*CACNA1D*) might be candidates for influencing the antihypertensive effects of L-type dCCBs.

The aim of the present study was to evaluate *CACNA1C* and *CACNA1D*, which encode L-type calcium-channel subunits α 1c and α 1d, respectively, in relation to the responsiveness of patients with EHT to treatment with L-type dCCBs. We focused on evaluating the effects of the α 1c subunit. First, we screened for possible genetic polymorphisms in the promoter region, all exon regions, and a small

part of the intron regions of *CACNA1C* in 48 patients with HT. Next, we performed genotyping of the missense mutations and representative common polymorphisms of *CACNA1C* found with direct sequencing or common single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *CACNA1D* chosen from a public database in 161 patients with EHT who were treated with L-type dCCBs. Finally, we examined the association of these genetic polymorphisms with the responsiveness of patients with EHT to treatment with L-type dCCBs.

Methods

Study Subjects

Peripheral blood samples for genetic analysis were collected after written informed consent was given by Japanese patients with EHT at an outpatient clinic of the Division of Hypertension and Nephrology, National Cardiovascular Center, Suita, Japan. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the National Cardiovascular Center. A total of 161 patients (85 men, 76 women), for whom L-type dCCBs had been newly prescribed as monotherapy or in addition to other antihypertensive agents and for whom BP data could be obtained from records of 3 consecutive outpatient visits before and after the start of treatment with L-type dCCBs, were retrospectively enrolled. BP was measured in the subjects after they had rested while seated for at least 10 min. Systolic BP (SBP) and diastolic BP (DBP) values were the means of 3 physician-obtained measurements. All subjects visited the outpatient clinic every month. The L-type dCCBs prescribed were amlodipine (43.5%), nifedipine (19.9%), nicardipine (11.8%), manidipine (9.3%), nilvadipine (7.5%), benidipine (2.5%),

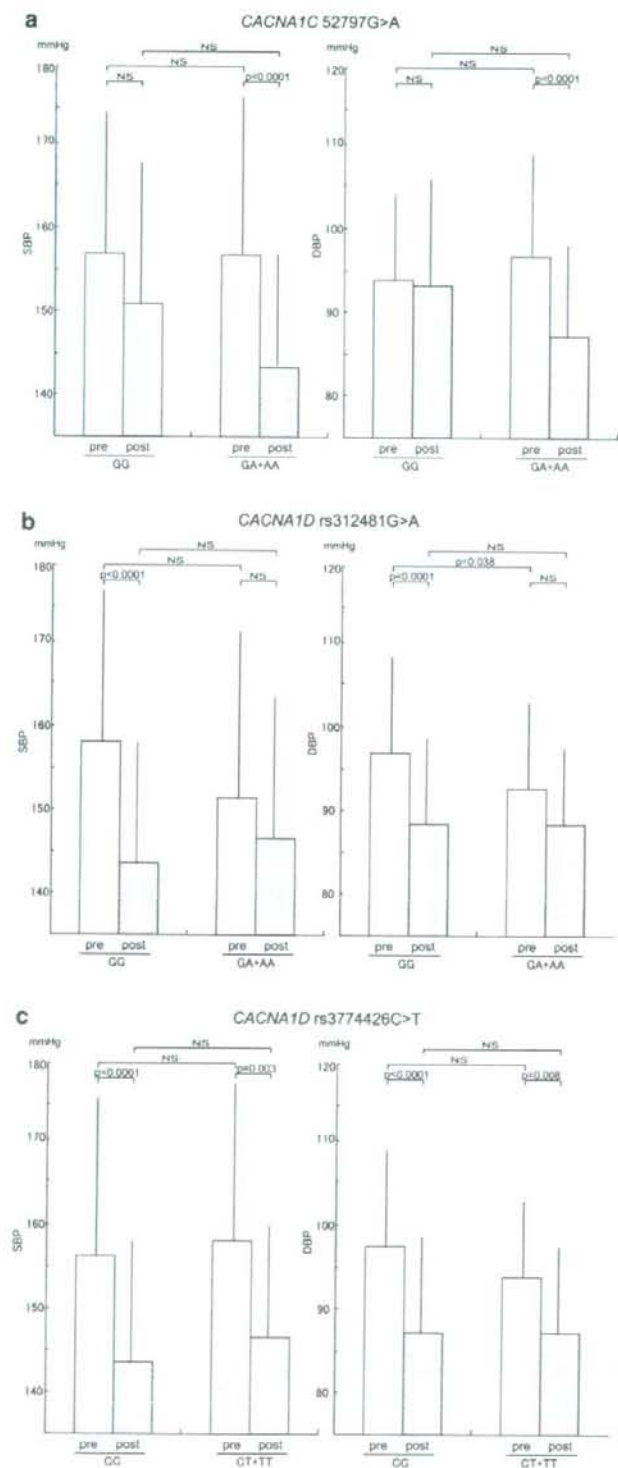


Figure 1. (a) Comparison of blood pressure (BP) between pre- and post-administration of CCBs in each genotype of dominant model in patients with *CACNA1C* 52797G>A. (b) Comparison of BP between pre- and post-administration of CCBs in each genotype of recessive model in patients with *CACNA1D* rs312481G>A. (c) Comparison of BP between pre- and post-administration of CCBs in each genotype of recessive model in patients with *CACNA1D* rs3774426C>T. CCBs, calcium-channel blockers; SBP, systolic BP; DBP, diastolic BP.

Table 2. Characteristics of Genetic Polymorphisms Identified by Direct Sequencing or Genotyping With TaqMan PCR

| Gene, location | SNPs | LD | aa. Info | Region | Allele 1 | Hetero | Allele 2 | Total | Allele 1 freq. | Allele 2 freq. | TaqMan |
|---------------------|-------------------|--------|-----------|-----------|----------|---------|----------|---------------|----------------|----------------|--------|
| CACNA1C* 12p13.3 | 395458G>A | | A174A | Exon 4 | 43 | 5 | 0 | 48 | 0.948 | 0.052 | |
| | 395570G>A | a | | Intron 4 | 29 (102) | 17 (48) | 2 (11) | 48 (161) | 0.781 (0.783) | 0.219 (0.217) | OK |
| | 395572T>C | a | | Intron 4 | 29 | 17 | 2 | 48 | 0.781 | 0.219 | |
| | 439886C>A | | | Intron 7 | 45 | 3 | 0 | 48 | 0.969 | 0.031 | |
| | 459184G>A | b | | Intron 8 | 35 (137) | 13 (22) | 0 (1) | 48 (160) | 0.865 (0.919) | 0.135 (0.081) | OK |
| | 496317delG | c | | Intron 9 | 30 | 14 | 0 | 44 | 0.841 | 0.159 | |
| | 496354G>T | c | | Intron 9 | 30 (101) | 18 (55) | 0 (5) | 48 (161) | 0.813 (0.798) | 0.187 (0.202) | OK |
| | 513074G>A | b, c | | Intron 12 | 32 | 13 | 0 | 45 | 0.856 | 0.144 | |
| | 513955C>T | d | | Intron 12 | 0 | 2 | 46 | 48 | 0.021 | 0.979 | |
| | 527974 G>A | c, e | | Intron 13 | 4 (8) | 20 (62) | 24 (91) | 48 (161) | 0.292 (0.242) | 0.708 (0.758) | OK |
| | 529458T>G | e, f | | Intron 15 | 1 | 22 | 23 | 46 | 0.261 | 0.739 | |
| | 530778G>C | | | Intron 15 | 47 | 1 | 0 | 48 | 0.990 | 0.010 | |
| | 531126A>G | | | Intron 16 | 47 | 1 | 0 | 48 | 0.990 | 0.010 | |
| | 531910C>T | f | D812D | Exon 17 | 18 | 24 | 3 | 45 | 0.667 | 0.333 | |
| | 539757G>A | | A879A | Exon 19 | 47 | 1 | 0 | 48 | 0.990 | 0.010 | |
| | 542532G>T | g | | Intron 20 | 47 | 1 | 0 | 48 | 0.990 | 0.010 | |
| | 551409T>C | h | | Intron 22 | 47 | 1 | 0 | 48 | 0.990 | 0.010 | |
| | 552959A>G | d | | Intron 24 | 46 | 2 | 0 | 48 | 0.979 | 0.021 | |
| | 554886G>A | | | Intron 26 | 47 | 1 | 0 | 48 | 0.990 | 0.010 | |
| | 557206C>T | d | | Intron 28 | 46 | 2 | 0 | 48 | 0.979 | 0.021 | |
| | 557231C>T | | | Intron 28 | 47 | 1 | 0 | 48 | 0.990 | 0.010 | |
| | 558260T>C | f | | Intron 28 | 14 | 27 | 6 | 47 | 0.585 | 0.415 | |
| | 558409 C>T | f | F1262F | Exon 29 | 14 (58) | 27 (79) | 6 (24) | 47 (161) | 0.585 (0.606) | 0.415 (0.394) | OK |
| | 594891C>G | | | Intron 30 | 45 | 3 | 0 | 48 | 0.969 | 0.031 | |
| | 595028 T>C | i | | Intron 31 | 8 (9) | 18 (60) | 22 (92) | 48 (161) | 0.354 (0.242) | 0.646 (0.758) | OK |
| | 595041T>C | i | | Intron 31 | 8 | 18 | 22 | 48 | 0.354 | 0.646 | |
| | 595054C>T | i | | Intron 31 | 8 | 18 | 22 | 48 | 0.354 | 0.646 | |
| | 597980 G>A | j | | Intron 31 | 4 (14) | 17 (39) | 23 (108) | 44 (161) | 0.284 (0.208) | 0.716 (0.792) | OK |
| | 598239delA | j | | Intron 32 | 4 | 17 | 23 | 44 | 0.284 | 0.716 | |
| | 615494delT | g | | Intron 38 | 47 | 1 | 0 | 48 | 0.990 | 0.010 | |
| | 615546-615547insC | k | | Intron 38 | 32 | 15 | 0 | 47 | 0.840 | 0.160 | |
| | 624139G>A | h | | Intron 40 | 43 | 1 | 0 | 44 | 0.989 | 0.011 | |
| | 624330 C>T | k | | Intron 41 | 33 (105) | 15 (46) | 0 (10) | 48 (161) | 0.844 (0.795) | 0.156 (0.205) | OK |
| 626151G>A | | T1787T | Exon 43 | 8 | 17 | 16 | 41 | 0.402 | 0.598 | | |
| 632652 G>A | | R1910Q | Exon 45 | 45 (159) | 3 (2) | 0 (0) | 48 (161) | 0.969 (0.994) | 0.031 (0.006) | OK | |
| 635110 G>A | | G2004S | Exon 46 | 35 (160) | 1 (0) | 0 (0) | 36 (160) | 0.986 (1.000) | 0.014 (0.000) | OK | |
| 637259C>T | j, l | | Intron 46 | 28 | 17 | 3 | 48 | 0.760 | 0.240 | | |
| 638741-638742insT | l | | 3'-UTR | 28 | 17 | 3 | 31 | 0.875 | 0.125 | Failed | |
| CACNA1D** 3p14.3 | rs3774414 C>T | | | Intron 2 | 64 | 78 | 18 | 160 | 0.644 | 0.356 | OK |
| | rs219847 G>A | | | Intron 2 | 40 | 82 | 38 | 160 | 0.506 | 0.494 | OK |
| | rs312481 G>A | | | Intron 3 | 131 | 26 | 3 | 160 | 0.900 | 0.100 | OK |
| | rs3774425 G>A | | | Intron 3 | 73 | 72 | 16 | 161 | 0.677 | 0.323 | OK |
| | rs3774426 C>T | | | Intron 3 | 118 | 35 | 7 | 160 | 0.847 | 0.153 | OK |

*Genetic polymorphisms of *CACNA1C* were firstly screened in 48 randomly chosen hypertensive subjects, and then representative polymorphisms were genotyped in 161 patients with essential hypertension who were treated with L-type CCBs.

Data in parentheses () based on genotyping results for *CACNA1C*.

Based on the sequencing result, the apparent LD, defined by $r^2 > 0.5$, was indicated by a-l.

The A of the ATG of the initiator Met codon is denoted nucleotide +1, as recommended by the Nomenclature Working Group (Hum. Mut., 11, 1-3, 1998).

The nucleotide number was according to the reference sequences GenBank Accession ID: NT_009759.15.

Sequence for promoter region, exon 44, and exon 47 of *CACNA1C* was abortive.

**Common SNPs of *CACNA1D* were chosen from JSNP database and genotyped in 161 patients with essential hypertension who were treated with L-type CCBs. PCR, polymerase chain reaction; LD, linkage disequilibrium; SNPs, single nucleotide polymorphisms. Other abbreviation see in Table 1.

nitrendipine (2.5%), barnidipine (1.2%), cilnidipine (1.2%), and efonidipine (0.6%) (Table 1). Patients who could achieve a SBP reduction greater than 20 mmHg or a DBP reduction greater than 10 mmHg after taking L-type dCCBs were defined as responders, and those who could not were defined as nonresponders. These criteria are often used in the clinical trial of new antihypertensive drugs in Japan.

DNA Studies

Direct Sequencing for Detection of Polymorphisms in *CACNA1C* Genomic DNA was extracted using an NA-3000 nucleic acid isolation system (Kurabo, Osaka, Japan) and stored at -80°C until use. Human *CACNA1C*, located on chromosome 12 at p13.3, consists of 47 exons. We sequenced 48 samples from Japanese patients with HT,

using a direct sequencing method described previously²¹. Briefly, all exons with their flanking sequences and approximately 1,000bp of the upstream region of exon 1, which would include promoter regions of *CACNA1C*, were individually amplified with the polymerase chain reaction (PCR) and sequenced with a ABI PRISM 3700 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). We failed to sequence the promoter region and exons 44 and 47 of *CACNA1C* because of amplification problems by the PCR. Information on the primers and the PCR conditions is available on request. The polymorphisms were identified with Sequencer software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA), followed by visual inspection.

Genotyping of Polymorphisms The TaqMan-PCR method was used for genotyping sequence-proven genetic