

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590562

研究課題名(和文) 血小板におけるアスピリン抵抗性の新規検査法の開発および
糖尿病患者での解析研究課題名(英文) Evaluation of Aspirin Resistance in Aspirin-Free Patients with
Severe Type-2 Diabetes Mellitus

研究代表者

高野 勝弘 (TAKANO KATSUHIRO)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60382925

研究成果の概要(和文)：糖尿病はアスピリン抵抗性であるかを検討した。糖尿病患者と健常人で血小板アスピリン感受性は全く同等であり、高血糖はアスピリン抵抗性の原因にならないことが示唆された。一方、高濃度アスピリン処理にも関わらず血小板凝集の強い群が糖尿病のみに見られ、この強い凝集が P2Y12 受容体阻害剤で是正されたことから、糖尿病患者の一部にアスピリン+P2Y12 受容体阻害剤の併用療法が有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Platelet aspirin sensitivity assessed by COX-1 activity in severe DM patients was the same as in healthy individuals, which denies the hypothesis that high blood glucose levels interfere with aspirin acetylation of the COX-1 active site. On the other hand, some individuals who showed strong platelet aggregation at high aspirin dose despite their almost complete inhibition of TxA2 production were observed only in the DM group. Such “high residual platelet responsiveness” was corrected by adding P2Y12 receptor blocker, suggesting that P2Y12 blocker in addition to aspirin might be beneficial for selected DM patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：血液学，止血血栓学，血小板

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床血液学，血小板，アスピリン抵抗性，糖尿病

1. 研究開始当初の背景

アスピリンの血栓性疾患予防作用に関し様々な大規模臨床研究が行われ、特に coronary risk factor を有する患者や cardiovascular event の再発に対する有用性、安全性が確認されており、アスピリンは世界で最も多くの患者に使用される抗血小板剤となっ

ている。一方、アスピリン投与にも関わらず血小板機能抑制が起きない、または血栓性疾患の予防効果が認められない患者群、すなわちアスピリン抵抗性を示すグループがあることが認識されてきた。この原因として、COX-1 の遺伝子多型、アスピリンの効果が少ない誘導型 COX-2 の存在、COX-1 非依存性の血小

板活性化機構の関与, アスピリンの投与量不足などが推定されていたが, まだほぼ未解明であった. また出血時間, 血小板凝集能, アラキドン酸代謝産物, または臨床経過のどれがアスピリン抵抗性の定義として適切かについても結論は出ていなかった.

糖尿病は心筋梗塞などの重篤な血栓性疾患の重要な **risk factor** であることが広く知られているが, 多くの大規模臨床研究で, 他の疾患と比較し特に糖尿病患者においてアスピリンの血栓症予防効果が悪いことが報告され, 糖尿病はアスピリン抵抗性の候補疾患と考えられるようになった.

2. 研究の目的

上記した糖尿病でのアスピリン抵抗性について, 我々は, 糖尿病患者ではアスピリン作用基である血小板 COX-1 のセリン 529 またはその近傍のリジン等アミノ基含有アミノ酸が糖化されアスピリンが作用しにくくなるのではないかと考えた. そこで, 「糖尿病患者はアスピリン抵抗性であり, その機序は血小板 COX-1 の糖化によるアスピリン感受性の低下である」ことを示すため, 本研究を行った.

3. 研究の方法

ex vivo でのアスピリン処理による血小板凝集抑制・COX-1 活性抑制を評価することで, 薬剤吸収の個人差や服薬コンプライアンス等によらない正確なアスピリン抵抗性の評価が可能と考えられる. そこでまず健常人血液検体を用い, アスピリン抵抗性検査法の条件設定を行い, 多血小板血漿 (PRP) をアスピリン 0, 0.3–30 μ M で処理後 2 μ g/mL コラーゲンで刺激し, 透過光法凝集計での最大凝

集率 (LT_{Amax}) 及び産生 Tx_{B2} 量を測定する検査法を開発した. 次に上記「研究の目的」欄で記述した「高血糖による血小板 COX-1 の糖化によるアスピリン感受性の低下」を示しやすいと考えられる, 高血糖の著明な重症 2 型糖尿病患者の血液検体での上記アスピリン抵抗性の検査を行い, 健常人と比較した.

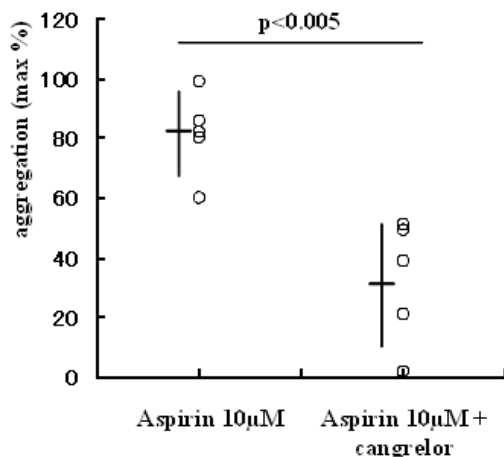
4. 研究成果

(1) アスピリン抵抗性の検査法の開発

アスピリン非投与者の血小板を用い, *ex vivo* での種々の濃度のアスピリンを incubation した後, アゴニストで刺激する方法で, 薬剤吸収の個人差や服薬コンプライアンス等によらない正確なアスピリン抵抗性の評価が可能と考えられる. アスピリンによる凝集の抑制及び COX-1 活性の抑制は, 50% 抑制のアスピリン濃度 (IC₅₀) を算出することで数値化できる. COX-1 の活性は, 血小板刺激後上清中のアラキドン酸の安定代謝産物 Tx_{B2} の産生量で表される. 血小板刺激アゴニストとしては, 直接 COX-1 が作用して Tx_{A2} (Tx_{B2}) が産生されるアラキドン酸を用いるのが良いが, アラキドン酸に対する血小板凝集には個人差が大きいためトロンビンまたはコラーゲンを共に使用した. まず基礎検討として, 洗浄血小板をアラキドン酸及びトロンビンで刺激して Tx_{B2} 産生を見た. Tx_{B2} 量は, EIA 法による測定キットを使用した. アラキドン酸 40, 80 μ M, トロンビン 1 U/mL での Tx_{B2} IC₅₀ はほぼ同等で, アスピリン 2.5 μ M 程度であった. 次に臨床検体での応用のため, より確実かつ少量の検体でも測定可能な多血小板血漿 (Platelet rich plasma, PRP) での測定系を検討した. アラキドン酸 (600 μ M) およびコラーゲン (2 μ g/mL) でも行い, 凝集計での透過光の IC₅₀ 及び産生 Tx_{B2} 量の IC₅₀ を同時に測定した. 上記洗浄血小板での結果と

この糖尿病患者群での TxA2 産生に依存しない「強い血小板反応性の残存」への血小板 ADP 受容体 P2Y12 の関与を調べるため、特異的 P2Y12 受容体阻害剤 cangrelor の影響を 5 人の T2DM 患者（うち 3 人が「強い血小板反応性の残存」を示した患者）で検討した。1 μ M cangrelor は LTAm_{max} をこの 5 人すべてで著明に抑制し（アスピリン 10 μ M での LTAm_{max} = cangrelor 無し：81.4 \pm 14.1%，cangrelor 有り：32.4 \pm 20.7%， $p < 0.005$ ），「強い血小板反応性の残存」に血小板 ADP 受容体 P2Y12 が関与していることが示唆された。

図 4



(3) 結語

① アスピリン非投与重症 2 型糖尿病患者での血小板アスピリン感受性は健常人と全く同等であり、高血糖はアスピリン抵抗性の原因にならないことが示唆された。

② TxA2 産生がほぼ完全に抑制される高濃度アスピリン処理にも関わらず強い血小板凝集が見られる人が、糖尿病患者群にのみ認められた。

③ この「強い血小板反応性の残存」は P2Y12 受容体阻害剤で是正され、糖尿病患者群の一部にアスピリン+P2Y12 受容体抑制剤の併用

療法が有効である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔学会発表〕（計 4 件）

① 高野 勝弘，木村 行男，佐藤 金夫，尾崎 由基男
アスピリン非投与重症 2 型糖尿病患者での血小板アスピリン抵抗性の解析
日本臨床検査自動化学会 第 41 回大会
平成 21 年 10 月 10 日
パンフィコ横浜・会議センター

② K Takano，Y Kimura，K Sato，K Aida，T Kobayashi，Y Ozaki
Evaluation of Aspirin Resistance in Aspirin-free Patients with Severe Type-2 Diabetes Mellitus
XXII Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis
平成 21 年 7 月 15 日
Boston Convention and Exhibition Center, Boston, USA

③ 木村 行男，高野 勝弘，佐藤 金夫，尾崎 由基男
重症 2 型糖尿病患者を用いたアスピリン抵抗性の評価-最大凝集率および COX-1 活性の IC50
日本検査血液学会 第 10 回学術集会
平成 21 年 7 月 4 日
山梨大学 甲府キャンパス

④ 高野 勝弘，木村 行男，佐藤 金夫，尾崎 由基男
血小板におけるアスピリン抵抗性の新規検査法の開発および糖尿病患者での解析
第 31 回日本血栓止血学会学術集会
平成 20 年 11 月 22 日
大阪市 大阪国際交流センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 勝弘 (TAKANO KATSUHIRO)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60382925

(2)研究分担者

尾崎 由基男 (OZAKI YUKIO)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部
・教授
研究者番号：30134539

佐藤 金夫 (SATO KANEKO)
山梨大学・医学部・助手
研究者番号：20242662

(3)連携研究者

なし