

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590903

研究課題名（和文）冠動脈形成術前後における血小板マーカーの変動と抗血小板療法の有効性に関する検討

研究課題名（英文）Serial changes in platelet activation biomarkers and the effects of anti-platelet therapy in percutaneous coronary intervention

研究代表者

海北 幸一（KAIKITA KOICHI）

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30346978

研究成果の概要（和文）：抗血小板剤クロピドグレルを内服している安定労作狭心症例における待機的冠動脈インターベンション施行前後に血小板機能と血液凝固系および炎症関連マーカー、心筋傷害マーカーの血中濃度の推移を測定し、CYP2C19 機能喪失遺伝子群にて有意に変動するマーカーを同定した。その結果、光吸光度法と VerifyNow システムにより測定した血小板凝集能のみが CYP2C19 機能喪失遺伝子群で変動するマーカーであることが判明し、特に簡易測定法である VerifyNow システムの有用性が確認された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects of CYP2C19 gene variants on platelet function tests and biomarkers of coagulation activation and inflammation in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention (PCI). Only on-clopidogrel residual platelet aggregation was associated with the CYP2C19-reduced function allele in patients treated with clopidogrel. These platelet function tests may be useful for identifying carriers of CYP2C19 reduced-function gene variants and monitoring the efficacy of dual antiplatelet therapy in patients undergoing elective PCI.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：循環器・高血圧、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

近年、虚血性心疾患における経皮的冠動脈インターベンション(PCI)の治療技術の発展は著しく、急性心筋梗塞、不安定狭心症などのいわゆる急性冠症候群においても、血栓性閉塞が生じた責任冠動脈病変に対する再灌

流療法が確立され、虚血心筋の救済、生命予後の改善に有用な治療法となっている。急性冠症候群の発症には、冠動脈プラークの破綻とそれに伴い生じる冠動脈内血栓形成が重要であるが、この血栓形成において血小板は中心的な役割を果たしている。近年、急性冠

症候群における PCI に対して、抗血小板剤を中心とした抗血栓療法を施すことにより治療成績が向上することが明らかとなり、抗血小板剤の重要性が唱えられるようになった。また、安定労作狭心症例における PCI に際しても、十分な抗血小板療法を施した上での PCI 施行により、その安全性が向上している。PCI 後の再狭窄率に対しても、従来の Bare metal stent (BMS) に比較すると、薬剤溶出性ステント (Drug Eluting Stent: DES) の植え込み症例では再狭窄率が格段に減少することが報告されている (Moses JW et al. N Engl J Med. 349:1315-1323, 2003.)。しかし、その一方で、ステント植え込み後の内膜修復の遅れによる遅発性ステント内血栓症も危惧されており、この点でも、上述したようなステント植え込み後の抗血小板療法がさらに重要となることが予想される。さらに、近年において、PCI 後の抗血小板療法として重要な役割を果たしている、チエノピリジン系抗血小板剤 (チクロピジン、クロピドグレル) に対する低反応性例 (プアレスポンドー) が存在することが示唆されており、PCI 後の血栓性イベントとの関連性が危惧されている。チエノピリジン系抗血小板剤であるクロピドグレルは、PCI 後の抗血小板療法としてアスピリンとならび中心的な役割を果たすことが期待されている。クロピドグレルは CYP2C19 を中心とした代謝酵素により活性代謝物になり、ADP 受容体拮抗薬としての役割を果たすが、最近、CYP2C19 の遺伝子多型がクロピドグレルの低反応性に関与していることが指摘されている。実際、健常人での CYP2C19 プアメタボライザーの割合に関する報告では、欧米人で約 3-4% であるのに対し、日本人では約 18~23% と高率であり、このことから、実際の PCI 施行患者における当遺伝子多型の実態を検討することは大変意義のあることと考える。

以前より、当施設は、急性冠症候群や安定労作狭心症例を含む虚血性心疾患例における血小板活性化や凝固線溶系に関与するマーカーの検討を多数報告しており、当分野における基礎、臨床研究において、中心的な役割を果たしている施設の一つであると言える。ごく最近では、血小板粘着の初期の段階で促進的に作用する von Willebrand Factor (VWF) の切断酵素である、VWF 切断酵素 (ADAMTS13) の虚血性心疾患患者における血中濃度推移について報告している。

VWF は、血管が傷害され内皮下組織が露呈した部位で血小板とコラーゲンの橋渡しをする“分子糊”として働くことで血小板の粘着さ

らに凝集を促す作用を担っている。この VWF の作用はマルチマーのサイズが大きいほど強い。分泌されたばかりの VWF は通常のマルチマーより高分子であるが、ADAMTS13 により分解されることでその活性を失う。よって、ADAMTS13 は、ただ単なる診断マーカーとしての役割だけでなく、将来的な治療戦略にも有用な分子と言える。

しかしながら、安定労作狭心症患者の PCI 施行前後における血小板凝集能、粘着能、VWF、および ADAMTS13 等の血小板関連マーカーの動態と、これらのマーカーの変動が、抗血小板薬の低反応性に関与する CYP2C19 遺伝子多型によってどのような影響を受けるか、という点に関しては未だ報告がない。よって、当研究を展開することは、特に CYP2C19 遺伝子多型の頻度が高い日本人にとっては大いに有意義な研究であると考え、今回の研究を発案するに至った。

2. 研究の目的

(1) 今回の研究では、まず、クロピドグレルを内服している安定労作狭心症例における待機的 PCI 施行前後 (施行前、24 時間後、2 週間後、1 ヶ月後) に血小板機能 (凝集能、粘着能)、VWF、ADAMTS13、soluble P-selectin、soluble CD40 ligand、VASP をはじめとする血小板関連マーカーの血中濃度の推移を測定し、PCI 前後に有意に変動するマーカーを同定する。血小板凝集能の測定に関しては、従来の透過光測定法、レーザー散乱光測定法に加え、最近導入された VerifyNow System を用いる。本測定方法は、全血で即座に血小板凝集能を測定することができ、従来の血小板凝集能の測定方法に比べ簡便な方法であり、新たな血小板凝集能測定法確立の一助となるものとする。

(2) 次に、クロピドグレルの低反応性に関与すると考えられる、CYP2C19 遺伝子多型を解析し、クロピドグレル低反応性が、上述した血小板関連マーカーにどのような影響を及ぼすかについて検討する。さらに、これらの患者の PCI 時の血栓性合併症や、PCI 後の心機能や予後に与える影響についても検討を加える。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、待機的 PCI 施行予定の安定労作狭心症患者において、PCI 施行前、施行 24 時間後、14 日後、1 ヶ月後に経時的に採血を行い、血小板凝集能、粘着能と VWF、ADAMTS13、C40 ligand、soluble P-Selectin、IL-6、VASP (Vasodilator-Stimulated

Phosphoprotein Phosphorylation: 血小板凝集関連細胞骨格制御蛋白質)等の血小板関連マーカー、CK-MB、高感度 Troponin T等の心筋傷害マーカーおよび高感度 CRP等の経時変動を測定する。また同時に CYP2C19 遺伝子多型も解析し、抗血小板剤である ADP 受容体拮抗薬 (クロピドグレル) の低反応性との関連性を解析する。また、これらの遺伝子多型を有する患者の将来的な血栓性疾患の発症リスクを比較検討する。

(2)対象: 待機的 PCI を施行予定の安定労作狭心症例。対照群として待機的に心臓カテーテル検査を施行する胸痛症候群の症例。目標症例数: 100 例

(3)除外対象者: 血小板機能や ADAMTS13 の血中濃度に影響があると思われる下記疾患患者とする。

動静脈血栓塞栓症 (DVT、脳梗塞: 1 年以内)、心房細動、膠原病、DIC、敗血症、重症感染症、悪性腫瘍など予後不良と思われる疾患、多枝病変で PCI を後日施行する予定の患者、

・下記薬剤服用者 ワーファリン、ステロイド、血栓溶解剤、アスピリン以外の抗血小板剤 (パナルジン、シロスタゾール、サルボプレラート、ペルサンチン等)

・重篤な肝・腎疾患を有する患者: 肝炎 (ウイルス性、薬剤性、他)、GOT、GPT: 2 倍以上、血清クレアチニン値: 2.0mg/dl 以上

(4)対象患者、あるいは血行動態が不安定などの理由から直接患者本人からの同意取得が困難な場合には家族から文書による同意を得た後、肘静脈あるいは、PCI 施行時のシース挿入部より採血 (合計 27ml) を行う。CYP2C19 遺伝子多型と、血小板凝集能、粘着能、血漿 VWF 抗原濃度、血漿 ADAMTS13 抗原濃度、C40 ligand、soluble P- Selectin、IL-6、VASP 等の血小板関連マーカー、CK-MB、高感度 Troponin T 等の心筋傷害マーカーおよび高感度 CRP 等の経時変動を測定する。

(5)血小板凝集能、血小板粘着能の測定: 血小板凝集能は、従来当施設で施行している光透過法 (ADP 5, 20 μ M 惹起)と、全血で測定可能な簡易型測定システム (VerifyNow system) を用い施行する。両測定法とも、当施設にて安定した血小板凝集能測定値を示すことが確認されており、有用な測定法と考えられる。血小板粘着能の測定は、コラーゲンビーズカラム法を用いて、コラーゲンビーズの通過前

後の全血中の血小板数から算出する。

(6)各種血小板関連マーカーの測定: 血漿 VWF, ADAMTS13 濃度においては、クエン酸入りの採血管に採取後直ちに遠心し血漿成分を取り、検体測定まで -80 度にて保存する。VWF 血中濃度は市販の ELISA キットを用い測定し、ADAMTS13 の血中濃度測定は、ADAMTS13 モノクローナルおよびポリクローナル抗体を使用したサンドイッチ ELISA 法にて行う。ADAMTS13 の assay 系はすでに確立されている。血漿 IL-6、sP-Selectin、CD40L、sICAM-1 濃度は、サンドイッチ ELISA キットを用い測定し、高感度 Troponin T、高感度 CRP 濃度、CK-MB の測定は院内の中央検査部にて施行する。VASP の測定は、外部委託し、測定する。

(7)CYP2C19 遺伝子多型の解析: 患者から同意取得後、PCI 前に 3mL の採血を施行する。遺伝子解析は *in vitro* で行われるので被験者への危険はない。また、個人情報、匿名化され、研究成果を公表する際には、個人が特定される形では公表しないため、遺伝子解析結果の漏洩は起こらず、漏洩に伴う不利益も生じない。遺伝子解析用試料は、個人情報管理者の補助者が被験者の氏名等と関わりのない記号や番号 (以下、匿名化番号と記載する) に置き換え匿名化する。個人情報管理者の補助者は被験者氏名と匿名化番号の対応を示した匿名化番号対応表を作成して適切に保管し、第三者機関に提供することはない。ただし資料は連結可能匿名化の状態と管理するため、遺伝子解析が実施され、被験者本人がその結果の開示を希望された場合、担当医が説明することは可能である。遺伝子解析用試料は匿名化後、三菱化学メディエンス株式会社中央総合ラボラトリーに搬送し、解析される。三菱化学メディエンス株式会社とは、すでに覚書を作成し契約を交わしており、当施設のゲノム倫理委員会にも本研究のプロトコルを提出し、本研究の承認を得ている。血液サンプルは、当研究が終了した時点で三菱化学メディエンス株式会社中央総合ラボラトリーにて廃棄される予定である。

(8)症例登録の継続と統計解析: 症例をエントリーし、目標数を達成するよう積極的なスクリーニングを実施する。また、経時採血により得られたサンプルからの各種血小板関連マーカーや心筋傷害マーカーの推移と CYP2C19 遺伝子多型を含めた患者背景との間の関連性について統計学的手法を用いて解析する。患者背景については、入院時の身体所見、採血データ、服薬状況より冠危険因子

を抽出することによって検討後、各種血小板関連マーカーや心筋傷害マーカーとの関連性を解析する。

(9)虚血性心疾患患者における CYP2C19 遺伝子多型と血栓性合併症を含めた予後との関連：本研究に登録された患者は、可能な限り長期に血栓性合併症を含めた心血管イベントに対する予後調査を実施する予定である。この予後調査により、CYP2C19 遺伝子多型の有無における血小板関連マーカー、心筋傷害マーカーの変動と、血栓性合併症のリスクとを解析することができる。

4. 研究成果

(1)まず、予備検討として当科に入院した心臓カテーテル検査、冠動脈形成術施行予定患者に対し、心臓カテーテル前にADP惹起血小板凝集能を測定した。クロピドグレルの低反応性に関与すると考えられるCYP2C19遺伝子多型を解析し、クロピドグレル低反応性が血小板凝集能や血小板関連マーカーにどのような影響を及ぼすかについて検討した。CYP2C19遺伝子多型を有する、いわゆるCarrier例においてはクロピドグレルのADP凝集能抑制効果が有意に減弱していた。そこで、CYP2C19遺伝子多型とVerifyNow Systemで測定したADP凝集能との関連性を検討し、クロピドグレル反応良好群(Noncarrier)の測定値から、有効治療域のカットオフ値を設定した。その結果、クロピドグレル反応良好群におけるVerifyNowで測定したカットオフ値がPRU256、%inhibitionで26.5%となった。これにより、アスピリンとクロピドグレルの抗血小板剤併用療法における目標値が推定された。

(2)次に、クロピドグレルを内服している安定労作狭心症例において、待機的PCI施行前後に血小板機能と血小板および炎症関連マーカー、心筋傷害マーカーの血中濃度の推移を測定し、CYP2C19機能喪失遺伝子群にて有意に変動するマーカーを同定した。血小板凝集能の測定は、従来の透過光測定法(LTA法)とVerifyNow Systemを用いた。さらにVWF、ADAMTS13、C40 ligand、soluble P-Selectin、IL-6、VASP(血小板凝集関連細胞骨格制御蛋白質)等の血小板および炎症関連マーカーや、高感度Troponin T等の心筋傷害マーカーの血中濃度を測定し、CYP2C19遺伝子多型の有無によって2群に分け、比較検討した。LTA法とVerifyNowにより測定した血小板凝集能はCYP2C19機能喪失遺伝子群でPCIの全経

過を通して高値であった。一方、他の血小板活性化および炎症関連マーカーと心筋傷害マーカーは2群間で有意差を認めなかった。次に、単変量、多変量解析により、当患者群におけるCYP2C19機能喪失遺伝子を予測するマーカーを解析すると、LTA法とVerifyNowにより測定した血小板凝集能のみが有意な寄与因子であることが判明した。今回の結果により、CYP2C19機能喪失遺伝子の存在により抗血小板効果が減弱するクロピドグレルの有効性をモニタリングできる測定マーカーが、血小板凝集能検査のみであることが示され、特に簡易測定法であるVerifyNowシステムが、今後の実臨床の場で有用とな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)

[雑誌論文](計3件)

- ① Ono T, Kaikita K, Hokimoto S, Iwashita S, Yamamoto K, Miyazaki Y, Horio E, Sato K, Tsujita K, Abe T, Deguchi M, Tayama S, Sumida H, Sugiyama S, Yamabe H, Nakamura S, Nakagawa K, Ogawa H. Determination of Cut-off Levels for On-clopidogrel Platelet Aggregation Based on Functional CYP2C19 Gene Variants in Patients Undergoing Elective Percutaneous Coronary Intervention. *Thromb Res.* 128:e130-6, 2011. 査読有
- ② Ogawa H, Hokimoto S, Kaikita K, Yamamoto K, Chitose T, Ono T, Tsujita K. Current status and prospects of antiplatelet therapy in percutaneous coronary intervention in Japan: Focus on adenosine diphosphate receptor inhibitors. *J Cardiol.* 58:6-17, 2011. 査読有
- ③ Yamamoto K, Hokimoto S, Chitose T, Morita K, Ono T, Kaikita K, Tsujita K, Abe T, Deguchi M, Miyagawa H, Saruwatari J, Sumida H, Sugiyama S, Nakagawa K, Ogawa H. Impact of CYP2C19 polymorphism on residual platelet reactivity in patients with coronary heart disease during antiplatelet therapy. *J Cardiol.* 57:194-201, 2010. 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① Chitose T, Hokimoto S, Mizobe M, Yamamoto K, Ono T, Tsujita K, Tayama S, Kaikita K, Nakagawa K, Ogawa H. Impact of Cytochrome P450 3A5 Polymorphism on Platelet Aggregation on Maintenance Treatment with Clopidogrel in Patients Undergoing Elective Coronary Stenting. American College of Cardiology 2012, 2012. 3. 24-27, シカゴ、米国
- ② Hokimoto S, Mizobe M, Chitose T, Kaikita K, Nakagawa K, Ogawa H. Impact of CYP2C19 Polymorphism and Diabetes Mellitus on Platelet Reactivity and Clinical Outcomes in Patients Following Coronary Stent Placement. American Heart Association Scientific Sessions 2011, 2011. 11. 12-16, オランダ、米国
- ③ Hokimoto S, Yamamoto K, Chitose T, Ono T, Kaikita K, Tsujita K, Nakagawa K, Sumida H, Sugiyama S, Ogawa H. Impact of Proton Pump Inhibitor (PPI) and CYP2C19 Polymorphism on Clinical Outcomes in Acute Coronary Syndrome (ACS) Patients. 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会, 2011. 8. 3 - 4, パシフィコ横浜、横浜
- ④ Yamamoto K, Hokimoto S, Chitose T, Ono T, Izumiya Y, Tsujita K, Kaikita K, Sumida H, Sugiyama S, Nakagawa K, Ogawa H. Impact of CYP2C19 Polymorphism on Residual Platelet Reactivity in Patients with Coronary Heart Disease during Antiplatelet Therapy. 第75回日本循環器学会総会・学術集会, 2011. 8. 3 - 4, パシフィコ横浜、横浜
- ⑤ Yamamoto K, Hokimoto S, Chitose T, Ono T, Izumiya Y, Tsujita K, Tayama S, Kaikita K, Sumida H, Sugiyama S, Nakagawa K, Ogawa H. Besides CYP2C19 Polymorphism, Genetic Variation of CYP3A5 is Associated with Higher Ontreatment Platelet Reactivity in Patients Undergoing Coronary Stenting. 第75回日本循環器学会総会・学術集会, 2011. 8. 3 - 4, パシフィコ横浜、横浜
- ⑥ Ono T, Kaikita K, Sato K, Horio E, Chitose T, Yamamoto K, Tsujita K, Tayama S, Hokimoto S, Sumida H, Sugiyama S, Yamabe H, Morita K, Nakagawa K, Ogawa H. Determination of Optimal Cut-Off Value in On-Clopidogrel Platelet Aggregation by VerifyNow P2Y12 System Based on Functional CYP2C19 Gene Variants. 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会, 2011. 8. 3 - 4, パシフィコ横浜、横浜
- ⑦ Hokimoto S, Mizobe M, Chitose T, Kaikita K, Nakagawa K, Ogawa H. Impact of CYP2C19 Polymorphism and Diabetes Mellitus on Platelet Reactivity and Clinical Outcomes in Patients Following Coronary Stent Placement. 第 20 回日本心血管インターベンション治療学会/CVIT2011, 2011. 7. 21-24, 大阪国際会議場、大阪
- ⑧ Kaikita K, Ono T, Hokimoto S, Yamamoto K, Tsujita K, Tayama S, Sumida H, Sugiyama S, Nakazawa K, Nakamura S, Ogawa H. Optimal Cut-off Levels for On-clopidogrel platelet Aggregation Based on Functional CYP2C19 Gene Variants in Patients Undergoing Elective Percutaneous Coronary Intervention. 第20回日本心血管インターベンション治療学会/CVIT2011, 2011. 7. 21-24, 大阪国際会議場、大阪
- ⑨ Ono T, Kaikita K, Hokimoto S, Yamamoto K, Miyazaki Y, Sakamoto K, Tsujita K, Iwashita S, Sumida H, Sugiyama S, Yamabe H, Ogawa H. Determination of Optimal Cut-Off Value in On-Clopidogrel Platelet Aggregation by VerifyNow P2Y12 System Based on Functional CYP2C19 Gene Variants. American College of Cardiology 2011, 2011. 4. 2-5, ニューオーリンズ、米国
- ⑩ Chitose T, Hokimoto S, Yamamoto K, Ono T, Tsujita K, Kaikita K, Sumida H, Sugiyama S, Ogawa H. Impact of CYP2C19 Polymorphism on Development of Acute Coronary Syndrome (ACS) in Patients with Decreased Plasma Low-Density

Lipoprotein Cholesterol (LDL-C).

American College of Cardiology 2011 ,

2011. 4. 2-5, ニューオーリンズ、米国

- ⑪ Kaikita K, Ono T, Hokimoto S, Tsujita K, Miyazaki Y, Sato K, Horio E, Sumida H, Sugiyama S, Ogawa H. Functional CYP2C19 Gene Variants are Associated With Both On-clopidogrel Platelet Adhesiveness and Aggregation in Japanese Patients With Coronary Artery Disease. American Heart Association Scientific Sessions 2010, 2010. 11. 13-17, Chicago, Illinois
- ⑫ Hokimoto S, Yamamoto K, Chitose T, Ono T, Kaikita K, Tsujita K, Nakagawa K, Ogawa H. Do Use of Proton Pump Inhibitor (PPI) and CYP2C19 Polymorphism Have the Same Degree of Impact on Cardiovascular Outcomes in Patients with Acute Coronary Syndrome (ACS)? American Heart Association Scientific Sessions 2010, 2010. 11. 13-17, Chicago, Illinois

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海北 幸一 (KAIKITA KOICHI)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 30346978

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

小野 敬道 (ONO TAKAMICHI)

熊本大学・医学教育部・学生