

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590930

研究課題名(和文)低用量アスピリンによる消化管粘膜障害関連因子の検討

研究課題名(英文)Associated factors for low dose aspirin induced gastrointestinal mucosal injury

研究代表者

塩谷 昭子 (Shiotani, Akiko)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80275354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：貧血あるいは消化管出血を伴いカプセル内視鏡検査により小腸粘膜傷害を確認した低用量アスピリン(LDA)内服例(小腸出血群)17例とLDA内服対照群18例の血液よりDNAを抽出した。薬物代謝・トランスポーター遺伝子解析用マイクロアレイ(DMET plus)を使用し、網羅的SNP解析を行った。27 SNPsについて小腸出血群37例と対照群400例でさらに検討し、新規4 SNPsを同定した。多変量解析の結果、CYP2D6 GG (OR 4.11, 95% CI. 1.62 -10.4)は小腸出血と有意に関連した。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) was performed using the Affymetrix DMET Plus Premier Pack. In the validation study in overall 37 patients with small bowel bleeding and 400 controls, 4 of 27 identified SNPs: CYP4F11 (rs1060463) GG (p=0.003), CYP2D6 (rs28360521) GG (p=0.02), CYP24A1 (rs4809957) T allele (p=0.04), and GSTP1 (rs1695) G allele (p=0.04) were significantly more frequent in the small bowel bleeding group compared to the controls. After adjustment for significant factors, CYP2D6 (rs28360521) GG (OR 4.11, 95% CI. 1.62 -10.4) was associated with small bowel bleeding. CYP4F11 and CYP2D6 SNPs may identify patients at increased risk for aspirin-induced small bowel bleeding.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化管内科学

キーワード：低用量アスピリン 小腸粘膜傷害 網羅的SNP解析 CYP2D6 CYP4F11

1. 研究開始当初の背景

(1)非ステロイド系抗炎症剤 (NSAID) による上部消化管出血の危険因子としては、潰瘍および潰瘍合併症の既往歴、高年齢、ワルファリンなどの抗凝固剤やステロイドなどの併用、高用量あるいは複数の NSAIDs の内服等が確認されている。アスピリンについても、同様の因子が危険因子となることが予想されているが、日本人を対象としたエビデンスは極めて少ない。アスピリンによる小腸粘膜障害の発生機序についても十分解明されておらず、治療法や予防法についても確立されていない。

(2)我々のこれまでの低用量アスピリン内服患者を対象とした症例対照研究では、潰瘍の既往歴、慢性腎不全が有意に独立したアスピリン起因性消化性潰瘍の危険因子であり、*H. pylori* 感染との関連性は認めなかった。また併用薬剤の検討では、潰瘍群でチエノピリジン併用率が有意に高く、酸分泌抑制薬や AT1 受容体拮抗薬 (ARB) および HMG-Co A 還元酵素阻害薬 (スタチン) の併用率が有意に低率であった。アスピリン消化管傷害と遺伝子多型との関連性については、*IL-1* -511T アレルが潰瘍発生に抑制的に関与すること、*AGT-20CC* と潰瘍出血との関連性の可能性を確認した。さらに原因不明の消化管出血 (OGIB) 患者においてアスピリンとチエノピリジン併用群では、アスピリン単独群と比較して有意に小腸粘膜障害の頻度が高いことをカプセル内視鏡所見により確認している。

2. 研究の目的

(1)虚血性心疾患や脳血管障害の一次あるいは二次予防の目的で、低用量アスピリンを内服している症例における上部および下部消化管粘膜障害の実態を調査し、他の抗血小板薬をはじめ降圧剤、高脂血症薬等の併用薬剤の消化管粘膜傷害への影響を評価し、これらの薬剤の代謝酵素遺伝子や薬物動態に関連

する薬剤取り込みトランスポーターおよび胆汁排泄トランスポーター遺伝子の多型・薬物相互作用について検討する。

(2)さらに網羅的 SNP 解析を追加することにより、低用量アスピリンによる消化管粘膜傷害、主に出血の危険因子あるいは抑制因子となる一塩基多型 (SNPs) を同定する。

3. 研究の方法

上部消化管内視鏡を予定している低用量アスピリン内服患者および内服中に消化管出血を来した患者を対象とした。消化管出血が疑われる患者に対して、さらに大腸内視鏡検査を行い、出血源が明らかでない場合は、OGIB として小腸カプセル内視鏡検査を行い、小腸粘膜傷害が確認された患者を小腸出血例としてエントリーした。まず、小腸出血 17 例と、性別・年齢およびこれまでの検討から確認された小腸粘膜傷害リスク因子を完全にマッチさせたアスピリン内服対照群 18 例の全血より DNA を抽出し、網羅的遺伝子多型の検索を、DMET™ Plus GeneChip array を用いて行った。アレイ解析の結果、有意な差異が得られた SNPs について、症例を追加し、主に TaqMan SNP Genotyping Assay kits およびダイレクトシーケンス法により SNP 解析を行い、検証した。

3. 研究成果

(1) 患者の臨床背景

検証対象は、小腸出血 37 例 (網羅的遺伝子多型解析 17 例を含む) と対照群 400 例 (網羅的遺伝子多型解析 18 例を含む) の 437 例 (男性 287 例、女性 150 例; 42-91 歳; 平均 71 歳)。臨床背景の比較では、喫煙者が小腸出血群で有意に多かった (35.1% vs. 11%, $p < 0.001$)。併用薬剤の検討では、小腸出血群でワルファリン内服 (43.2% vs. 26%, $p = 0.03$) および NSAIDs 内服 (16.2% vs. 3.0%, $p < 0.001$) 例が有意に多かったが、PPI 内服率は両群間で差

を認めなかった (表 1).

表 1. 患者の臨床背景および低用量アスピリンとの併用薬

	対照群 n=400 (%)	小腸出血群 n=37 (%)
平均年齢 (SD)	70.9(8.4)	72.1(10.3)
80 歳以上	67(15.7)	8(23.5)
性別 男性	263(65.8)	24(73)
飲酒	118(29.5)	9(24.3)
喫煙**	44(11)	13(35.1)
BMI (SD)	23.5(3.1)	23.0 (4.0)
虚血性心疾患*	294(73.5)	21(56.8)
その他の心疾患	88(22)	6(16.2)
脳梗塞**	27(6.8)	9(24.3)
動脈硬化性疾患**	14(3.5)	6(16.2)
糖尿病	115(28.8)	11(29.7)
慢性腎不全	6 (1.5)	2(5.4)
ワルファリン*	104(26)	16(43.2)
チエノピリジン	111(27.8)	13(35.1)
PPI	145(36.3)	13(35.1)
H2 受容体拮抗薬	133(33.3)	9(24.3)
Ca 拮抗薬	158(39.5)	11(29.7)
ACEI、A 拮抗薬	231(57.8)	20(54.1)
スタチン	209(52.3)	15(40.5)
亜硝酸製剤	113(28.3)	13(35.1)
NSAID**	12(3.0)	6(16.2)

p 値: 年齢、body mass index (BMI) のみ unpaired t test, 他は Mantel-Haenszel Chi square 解析による。* <0.05 ; ** <0.001

(2) 網羅的遺伝子多型解析

DMET 解析により、小腸出血と関連性が認められた23 遺伝子27 SNPsが特定された。

(3) 検証研究

437 例に対する特定された遺伝子多型解析の結果、4 遺伝子 5SNPs が小腸出血と有意に関連した。The CYP4F11 20043G>A (D446N) と 4927T>C(I106I) は完全連鎖していた。CYP4F11 20043GG (70.3% vs. 43.5%, $p=0.003$), CYP2D6 -2178GG (45.9% vs. 25.2%, $p=0.02$),

CYP24A1 18948 T 塩基 (86.5% vs. 68%, $p=0.04$), and GSTP1*Bc.313 G 塩基 (37.9% vs. 23.3%, $p=0.04$)は、小腸出血群で対照群と比較して有意に高頻度であった(表 2)。

表 2. アスピリン小腸粘膜傷害と関連性が認められた遺伝子と一塩基変異多型

遺伝子型	オッズ比 (95%CI)
CYP4F11 20043 GG vs GA & AA rs1060463	3.08 (1.48-6.39)
CYP2D6 -2178 GG vs GA & AA rs28360521	2.35 (1.15 - 4.80)
CYP24A1 18948 CT & TT vs CC rs4809957	2.82 (1.07-7.42)
GSTP1*Bc.313 AG & GG vs AA rs1695	2.08 (1.03-4.23)

(4) 小腸出血関連因子

喫煙 (調整オッズ比 (OR) 8.46, 95% 信頼区間 (CI) 3.09-23.2), 心臓以外の動脈硬化性疾患 (調整 OR 6.59, 95%CI 2.48-17.5), ワルファリン併用 (調整 OR 3.59, 95%CI 1.41-9.14), CYP2D6 -2178 rs28360521 GG ホモ (調整 OR 4.11, 95%CI 1.62-10.4) は多変量解析にて有意に小腸出血と関連した(表 3)。

表 3. アスピリン小腸出血と関連する因子

	調整 OR (95%CI)
喫煙***	8.46 (3.09 - 23.2)
心以外の動脈硬化性疾患**	6.59 (2.48- 17.5)
ワルファリン**	3.59 (1.41 -9.14)
NSAID	1.66 (0.28 - 10.0)
CYP4F11 20043 GG	2.09(0.80 - 5.44)
CYP2D6 -2178 GG **	4.11 (1.62 - 10.4)
CYP24A1 18948	3.40(0.90 - 13.0)
GSTP1*Bc.313	1.46(0.56 - 3.80)

p 値, ** <0.05 ; *** <0.01 .

(5) 考察

Cytochrome P450 4F (CYP4F) は染色体 19p13.1-2に存在し、主に肝臓で発現している。

CYP4F11は、脂肪酸・アラキドン酸・ロイコトリンB4などの代謝に関与する遺伝子であるが、血小板凝集にも関与している可能性があり、理論的には、アスピリンによる小腸出血に関わっている可能性がある。今回同定されたSNPが機能的に直接関与しているかどうかについては疑問であり、これまでに、このSNPsに関する報告はされていない。

CYP4F11 (rs1060463) は単変量解析では、遺伝子多型解析の中で最も関連性を認めたと、多変量にてNSAIDsと同様に有意な関連性が証明されなかったことより、CYP4F11 SNP と NSAIDsが相互にアスピリンによる小腸出血に関連する可能性が考えられる。

CYP2D6 は、向精神薬、抗ヒスタミン薬、-遮断薬など処方薬剤の約20%の代謝および脂質合成に関与しているが、その発現は小胞体に局在している。約80種類の変異が知られているが、中でもCYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5はpoor metabolizers (PM)として、CYP2D6*10はintermediate metabolizer (IM) 表現型として知られている。今回特定されたCYP2D6 rs28360521は -2182 5' -UTR に認められ、他の遺伝子との連鎖が報告されているが、この遺伝子についても、どのように小腸出血に関わっているかは不明である。

NSAIDs による小腸粘膜傷害の機序については、まだ不明な点が多いが、直接的粘膜毒性、ミトコンドリア障害、細胞統合性の破壊などの局所作用に加え、胆汁を介した腸肝再循環や腸内細菌の関与が考えられている。今回同定したSNPsがこれらの機序に関わっているかは不明であり、さらに検討が必要である。Wallace JLらは、PPIs が腸内細菌叢を変化しNSAIDs小腸粘膜傷害を増悪させる可能性を動物実験モデルで報告しているが、今回の検討では、低用量アスピリンとPPI の併用は、小腸出血と有意な関連性を認めなかった。さらなる大規模な前向き調査が必要であると考え、今回新たに同定された CYP4F11

と CYP2D6 SNPs は、低用量アスピリン内服患者の小腸粘膜傷害あるいは小腸出血の遺伝子マーカーとなりうる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Shiotani A, Murao T, Fujita Y, Sakakibara T, Nishio K, Haruma K. Novel single nucleotide polymorphism markers for low dose aspirin-associated small bowel bleeding. PLoS One. 査読有 2013 18;8(12):e84244

Shiotani A, Murao T, Sakakibara T, et al. (他 5 名 1 番目) Association of SLC01B1 1b with peptic ulcer amongst Japanese patients taking low-dose aspirin. Dig Liver Dis 査読有 2012; 44:201-205.

Shiotani A, Manabe N, Kamada T, et al. (他 3 名 1 番目) Risk and preventive factors of low-dose aspirin-induced gastroduodenal injuries: a comprehensive review. J Gastroenterol Hepatol. 査読有 ;27 Suppl 3:8-12, 2012.

Shiotani A, Nishi R, Yamanaka Y, et al. (他 7 名 1 番目) Renin-angiotensin system associated with risk of upper GI mucosal injury induced by low dose aspirin: renin angiotensin system genes' polymorphism. Dig Dis Sci 査読有 2011;56: 465-471.

Shiotani A, Honda K, Murao T, et al. (他 7 名 1 番目) Combination of low-dose aspirin and thienopyridine exacerbates small bowel injury. Scand J Gastroenterol 査読有 2011; 46:281-286.

〔学会発表〕(計 10 件)

Shiotani A, Murao T, Fujita Y, Fujimura Y, Sakakibara T, Nishio K, Haruma K. Novel Single nucleotide polymorphism markers for low dose aspirin-associated small bowel bleeding: a DMET microarray profiling study. Digestive Disease Week 2014. Chicago 2014.5.3-6

塩谷昭子、木村智成、春間 賢：低用量腸溶剤アスピリン(LDA)による消化性潰瘍出血の実態とその対策。第 100 回日本消化器病学会総会。2014.4.23-26.東京

塩谷昭子、村尾高久、木村智成、藤村宜憲、春間賢：低用量アスピリン内服小腸出血患者における遺伝子多型の検討網羅的 SNPs 解析による検討。第 10 回日本消化管学会総会学術集会。福島，2014.2.14-15

塩谷昭子、本多啓介、春間賢：NSAIDs、LDA による小腸粘膜傷害 カプセル内視鏡を用いた低用量腸溶剤アスピリンおよび NSAIDs による小腸粘膜病変に関する臨床的検討。第 83 回日本消化器内視鏡学会総会。東京，2012.5.12-14

Shiotani A, Murao T, Tsutsui H, Imamura H, Tarumi K, Manabe N, Kamada T, Kusunoki H, Sakakibara T, Haruma K: Slco1b1*1b haplotype is associated with risk of aspirin induced peptic ulcer and bleeding. Digestive Disease Week 2011. Chicago, 2011.5.7-10

塩谷昭子、榊原敬、春間賢：抗血小板療法による消化管傷害 低用量アスピリン上部消化管潰瘍病変と遺伝子多型からみた関連因子の検討。第 97 回日本消化器病学会総会。2011.5.13-15 東京。

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：低用量腸溶剤アスピリンによる消化管出血関連遺伝子多型の特定

発明者：塩谷昭子

権利者：同上

種類：特許願

番号：特願 2013-30473

出願年月日：平成 25 年 2 月 19 日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

本研究のマイクロアレイの結果は、以下のデータベースに登録

Gene Expression Omnibus (GEO) database:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

塩谷 昭子 (SHIOTANI Akiko)
川崎医科大学 医学部 消化管内科学 准教授

研究者番号：80275354

(2)研究分担者

西尾 和人 (NISHIO Kazuto)
近畿大学 医学部 ゲノム生物学 教授

研究者番号：10208134