

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791198

研究課題名(和文)先天性心疾患における血小板活性化の機序、特に内皮機能と遺伝要因の関与について

研究課題名(英文)abc

研究代表者

清水 美妃子(Shimizu, Mikiko)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：40338968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：1.チアノーゼ性心疾患では血小板P-selectin発現が亢進していることがわかった。2.チアノーゼ性心疾患では血小板凝集能が亢進していることがわかった。3.先天性心疾患において血栓塞栓症を合併した患者は血小板P-selectin発現が亢進していることがわかった。4.血小板活性化の因子として、短絡の有無、狭窄の有無、低酸素血症、多血症などと血小板活性化の関係を後方視的に調べた。血小板活性化の因子は、チアノーゼ、フォンタン手術であった。5.内皮機能低下のマーカーとして血漿トロンボモジュリンを測定した。血小板活性化の機序は、内皮機能の低下であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：1. Platelet P-selectin expression was enhanced in patients with cyanotic congenital heart disease (CCHD). 2. Platelet aggregation was enhanced in patients with CCHD. 3. In patients with thromboembolism, platelet P-selectin expression was enhanced. 4. Factors related with platelet activation were cyanosis and Fontan operation. 5. Platelet activation was related with endothelial dysfunction, measured by serum thrombomodulin concentration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：チアノーゼ性先天性心疾患 P-selectin 低酸素血症 フォンタン手術

1. 研究開始当初の背景

(1) 先天性心疾患における血栓塞栓症

先天性心疾患において、(特にチアノーゼ性心疾患において)、脳動脈や肺動脈に血栓塞栓症を合併することがある。また、アスピリンを内服しているにもかかわらず、先天性心疾患において、脳動脈や肺動脈に血栓塞栓症を合併することがある。

(2) 先天性心疾患における血小板の活性化

血栓症の発症に際しては、凝固能の亢進とともに、血小板の活性化が考えられる。先天性心疾患において、血小板が活性化されていることを Kajimoto らは(文献1)は示している。血小板の活性化と血栓症発症の関係についてはいまだはっきりとした証拠はない。

先天性心疾患における血小板活性化の有無について調べ、活性化がある場合には、活性化をきたす因子を明らかにする必要がある。

(3) アラキドン酸カスケードと血管内皮機能

血小板ではアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (COX1) によって PGH2 が産生され、さらにトロンボキサン A2 (TXA2) が産生される。トロンボキサン A2 は血小板凝集をほう起する。一方、血管内皮細胞では、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (COX2) によって PGH2 が産生され、さらにプロスタサイクリン (PGI2) が産生される。プロスタサイクリンは血小板凝集を抑制する。(図1)。血管内皮機能が低下している場合、血小板凝集が促進する。

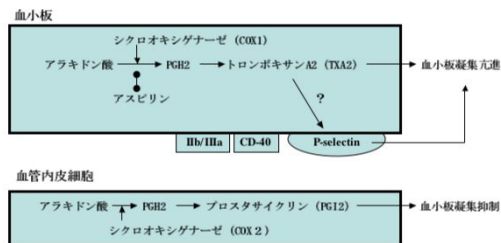


図1. 血小板と血管内皮のアラキドン酸カスケード

(4) 先天性心疾患におけるアラキドン酸カスケード

先天性心疾患では、血小板によるトロンボキサン A2 の産生と、内皮細胞によるプロスタサイクリン産生のバランスが崩れている可能性がある。血小板によるトロンボキサン A2 の産生が増加し、内皮細胞によるプロスタサイクリン産生が低下している可能性があるが、両者のバランスについて調べた研究はない。

(5) 先天性心疾患における血小板活性化とアラキドン酸カスケード

血小板はフィブリノーゲンやトロンピンで活性化される。フィブリノーゲンやトロンピンは膜糖蛋白 IIb/IIIa 受容体に結合し、血

小板を活性化する。また、膜糖蛋白 CD-40 も P-セレクトインの発現をうながし、血小板を活性化させる。トロンボキサン A2 やプロスタサイクリンと、血小板 P-セレクトインの発現の関係は、よくわかっていない。先天性心疾患においてトロンボキサン A2 の産生と、内皮細胞によるプロスタサイクリン産生のアンバランスが、血小板 P-セレクトインの発現をうながし、血小板活性化をもたらす可能性がある。

(6) 先天性心疾患における血管内皮機能と血小板活性化の関係

血管内皮細胞はトロンボモジュリンを産生し、血小板の活性化を抑制している。先天性心疾患では内皮細胞のトロンボモジュリンの発現が低下し、血小板の活性化をもたらしている可能性がある。先天性心疾患において内皮機能と血小板機能の関係を調べた研究はない。

(7) 先天性心疾患におけるアスピリン抵抗性

アスピリンを内服しているにもかかわらず、血小板活性化が抑えられなかったり、血栓塞栓症を合併する現象をアスピリン抵抗性と呼ぶ。先天性心疾患において、アスピリンを内服しているにもかかわらず、脳動脈や肺動脈に血栓塞栓症を合併することがある。先天性心疾患におけるアスピリン抵抗性に関する研究は皆無である。アスピリン抵抗性の機序は不明であるが、シクロオキシゲナーゼ (COX1) や膜糖蛋白 IIb/IIIa 受容体の遺伝子多型が関与するという報告がある。

先天性心疾患におけるアスピリン抵抗性の頻度、アスピリン抵抗性の臨床的意義、遺伝子多型との関係について調べた研究はない

2. 研究の目的

本研究の目的は、チアノーゼ性先天性心疾患における、血小板活性化の機序、特に血管内皮機能との関連、遺伝要因について調べることである。

(1) 本研究では、先天性心疾患において、血小板が活性化されているか否かを、フローサイトメトリーを用いて血小板 P-selectin 発現を測定することで直接的に調べる。

(2) 血小板凝集能と P-selectin 発現の関係を明らかにする。多数の患者において血小板凝集能を従来の比濁法で測定し、同時にフローサイトメトリーを用いて血小板 P-selectin 発現を測定する。さらに先天性心疾患において血小板の活性化と血栓症発症の関係について明らかにする。

(3) 先天性心疾患において血小板活性化がある場合には、活性化をきたす因子を明らかにする。血小板活性化の因子として、短絡の有

無、狭窄の有無、低酸素血症、多血症などと血小板活性化の関係を調べる。

(4) 血小板によるトロンボキサン A₂ の産生と、内皮細胞によるプロスタサイクリン産生のバランスと、血小板活性化の関係や、血栓症発症との関係について明らかにする。血小板活性化を測定するとともに、トロンボキサン A₂ 産生のマーカーとして尿中 11-dehydro thromboxane B₂ を測定し、プロスタサイクリン産生のマーカーとして尿中 6-oxo-prostaglandin F₁ を測定する。

(5) 先天性心疾患において内皮機能と血小板機能の関係を明らかにする。血小板活性化を測定するとともに、内皮機能低下のマーカーとして上腕動脈の疎血後の反応 (Flow-mediated vasodilation) を測定し、また血漿トロンボモジュリンとを測定する。

(6) 先天性心疾患におけるアスピリン抵抗性の頻度、アスピリン抵抗性の臨床的意義、遺伝子多型との関係を明らかにする。アスピリン服用患者と非服用患者において血小板活性化、トロンボキサン A₂ の産生と、プロスタサイクリン産生を測定し、血栓症発症との関係を調べる。また DNA チップを用いてシクロオキシゲナーゼ (COX1) や膜糖蛋白 IIb/IIIa 受容体の遺伝子多型を調べ、遺伝子多型とアスピリン抵抗性の関係について調べる。

(7) 血小板機能検査は煩雑であるので、先天性心疾患における血小板活性化を生化学的検査で推定できれば、患者にとって福音である。血漿 P-selectin, 血漿 CD-40, 尿中 11-dehydro thromboxane B₂ などと血小板 P-selectin 発現の関係を明らかにする。

先天性心疾患患者では血栓塞栓症をしばしば経験する。また、アスピリンを服用している患者は多数存在する。そのなかで、アスピリンを服用していながら不幸にして脳血栓症を合併して重症脳障害を残す患者が存在する。本研究は、先天性心疾患患者における血小板機能異常の本態を解明しようとするものである。同類の研究は無く、独創性は高い。先天性心疾患患者における血栓塞栓症のよりよい予防法の開発につながる可能性があり、その臨床的意義はおおきい。

3. 研究の方法

先天性心疾患患者から採血し、血小板凝集能、血小板機能、P-selectin 発現を測定する。血小板によるトロンボキサン A₂ の産生 (マーカーとして尿中 11-dehydro thromboxane B₂ を測定) と、内皮細胞によるプロスタサイクリン産生 (マーカーとして尿中 6-oxo-prostaglandin F₁ を測

定) のバランスと、血小板凝集能の関係や、血栓症発症との関係について調べる。さらに先天性心疾患におけるアスピリン抵抗性の頻度、アスピリン抵抗性の臨床的意義を調べる。DNA チップを用いてシクロオキシゲナーゼ (COX1) や膜糖蛋白 IIb/IIIa 受容体の遺伝子多型を調べ、遺伝子多型とアスピリン抵抗性の関係について調べる。

4. 研究成果

(1) 血小板活性化

先天性心疾患患者から採血し、P-selectin に対する monoclonal 抗体と、フローサイトメトリー (FACS caliber flow cytometer) を用いて血小板 P-selectin 発現を測定した。非チアノーゼ性先天性心疾患患者 10 名、チアノーゼ性先天性心疾患患者 20 名について調べた。チアノーゼ性心疾患では血小板 P-selectin 発現が亢進していることがわかった。

(2) 血小板凝集能亢進と血小板活性化 (P-selectin 発現) の関係

上記の患者 10 名づつ、血小板凝集能を測定した。また予り応力下での血小板活性化を血小板機能分析計 (PFA100) を用いて測定した。さらにフローサイトメトリーを用いて血小板 P-selectin 発現を測定した。チアノーゼ性心疾患では血小板凝集能が亢進していることがわかった。

(3) 血小板の活性化と血栓症発症の関係

先天性心疾患において血栓塞栓症を合併した患者について、血小板の活性化と血栓症発症の関係について調べた。先天性心疾患において血栓塞栓症を合併した患者は血小板 P-selectin 発現が亢進していることがわかった。

(4) 血小板活性化の因子

血小板活性化の因子として、短絡の有無、狭窄の有無、低酸素血症、多血症などと血小板活性化の関係を後方視的に調べた。血小板活性化の因子は、チアノーゼ、フォンタン手術であった。

(5) 内皮機能と血小板機能の関係

先天性心疾患において内皮機能と血小板機能の関係をしらべた。血小板活性化を測定するとともに、内皮機能低下のマーカーとして血漿トロンボモジュリンを測定した。血小板活性化の機序は、内皮機能の低下であることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕

なし

〔学会発表〕

なし

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水美妃子 (Shimizu, Mikiko)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：40338968