

平成 23 年 5 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590573

研究課題名 (和文)

11-デヒドロトロンボキサン B2 の生理的意義：血小板機能とアスピリン不応答性

研究課題名 (英文) Physiological role of 11-dehydrothromboxane B2: parameter of platelet activity and aspirin resistance

研究代表者

松浦 栄次 (MATSUURA EIJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20181688

研究成果の概要 (和文)：

冠動脈疾患や脳梗塞の二次予防にアスピリンが処方されるが、作用に個人差があるため個々人のアスピリンに対する反応性の迅速かつ正確な測定法の確立が急務である。本研究ではトロンボキサン A2 の安定な代謝物である 11-デヒドロトロンボキサン B2 (11-dhTXB2) に対する特異抗体を用いた ELISA 法により、高脂血症モデルマウスの尿中 11-dhTXB2 濃度を測定し、ELISA の有用性を評価した。アスピリン投与群では尿中 11-dhTXB2 の減少傾向を認め、動脈硬化病巣面積の減少が観察された。

研究成果の概要 (英文)：

Aspirin prevents platelet aggregation by irreversible acetylation of cyclooxygenase. We evaluated the usefulness of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine levels of 11-dehydrothromboxane B2 in urine, which aids in the detection of aspirin effect post ingestion. In low-density lipoprotein receptor-deficient mice fed with a high fat diet and received aspirin, urinary 11-dehydrothromboxane B2 (11-dhTXB2) tended to decrease and atherosclerotic plaque area significantly decreased.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：トロンボキサン B2、血小板機能、疾患モデルマウス、アスピリン抵抗性、動脈硬化、酸化 LDL

1. 研究開始当初の背景

冠動脈疾患や脳梗塞の二次予防として、効果対費用の面から、アスピリンは世界で最も汎用されている抗血小板薬であるが、アスピリンを服用しているにもかかわらず、心血管イベントを発症する患者があり、アスピリン不応答性と呼ばれている。アスピリン不応答判定のための標準化された検査法はまだ整備されていないが、個々の患者のアスピリンに対する反応性を迅速かつ正確に評価できれば、適切な抗血小板薬を選択する上で大いに有用である。アスピリンは、シクロオキシゲナーゼ-1 (COX-1) を不可逆的にアセチル化することで、COX-1の酵素活性を阻害し、強力な血小板活性化アゴニストであるトロンボキサンA₂ (TXA₂) の産生を抑制する。11-デヒドロトロンボキサンB₂ (11-dhTXB₂) はTXA₂の安定な代謝物であり、尿中の11-dhTXB₂の上昇は血小板活性化の亢進を反映するという報告がある。

抗リン脂質抗体症候群 (APS) 患者の動脈血栓発症予防にも低用量アスピリンが用いられるが、ここでもアスピリン無効例が散見される。我々はこれまでに、酸化LDL/ β 2-GPI複合体がAPS、2型糖尿病等において血中に高濃度に検出されることを明らかにし、さらに、この酸化LDL/ β 2-GPI複合体がAPSで出現する自己抗体「抗カルジオリピン抗体」の標的抗原であることを示してきた。酸化LDL/ β 2-GPI複合体は酸化ストレスの一つの指標となる。

2. 研究の目的

(1) アスピリン不応答を判定するための検査法として、11-dhTXB₂に対する特異抗体を用いたELISAで11-dhTXB₂の尿中濃度を測定し、その有用性を評価する。また尿中11-dhTXB₂濃度

と血小板機能の関係を解析する。

(2) マウスにおける血中酸化LDL/ β 2-GPI複合体測定ELISAを構築し、高脂肪飼料摂取に伴う疾患モデルマウスの血中酸化LDL/ β 2-GPI複合体の推移、およびアスピリン投与が及ぼす本複合体濃度への影響を調査する。

3. 研究の方法

(1) 動物実験スケジュール

① アポリポタンパクE欠損 (ApoE^{-/-}) マウス (1群8匹、以下同じ) に8週齢から24週齢まで高脂肪飼料S (HF-S: コレステロール0.2%、無塩バター21%含有) を与え、4週おきに採尿および部分採血を行い尿中11-dhTXB₂、血中コレステロールおよび中性脂肪を測定した。これを対照群とし、アスピリン (5 mg/kg) 群、フルバスタチン (1 mg/kg) 群、バルサルタン (0.1 mg/kg) 群、フルバスタチン (1 mg/kg) ・バルサルタン (0.1 mg/kg) 併用群に対し、毎日経口投与を行い、同様のパラメータを測定した。実験終了時には心臓から全採血し、血小板凝集能を測定した。また、大動脈を展開して動脈硬化病巣 (プラーク) 面積をSudan IV染色により測定した。

② LDL受容体欠損 (Ldlr^{-/-}) マウスに12週齢から24週齢まで高脂肪飼料A (HF-A: コレステロール1.1%、無塩バター15%、ユール酸1%含有) を与えた群、HF-Aを与えながらアスピリン (30mg/L) を飲料水に溶解して12週間自由摂取させた (90-120 μ g/mouse/day相当) 群、HF-Sを同期間摂取させた群、HF-Sとともにアスピリンを摂取させた群の4群について、①の測定項目に加え、肝機能の指標であるAST (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)、ALT (アラニンアミノトランスフェラーゼ)、血中MCP-1 (Monocyte Chemoattractant

Protein-1) をキットにより測定した。また血中酸化LDL/ β 2GPIをELISAにより測定した。

③Ldlr^{-/-} マウスに12週齢から32週齢まで高脂肪飼料Sを与えた群を対照として、20週齢からアスピリン (90-120 μ g/mouse/day相当) あるいはインドメタシン (18-24 μ g/mouse/day相当) を飲料水に溶解して12週間自由摂取させた群を比較した。20週齢、28週齢、32週齢時に採尿、採血し②と同様の項目を測定した。

(2) 尿中 11-dhTXB2 測定法

尿中11-dhTXB2はELISAによる競合阻害法で測定した。ポリクローナル抗マウスイムノグロブリン抗体を固相化したELISAプレートに希釈した尿検体を加え、アルカリフォスファターゼ (AP) 標識した11-dhTXB2、およびモノクローナル抗11-dhTXB2とともにインキュベートした。検体に含まれる11-dhTXB2と、AP標識11-dhTXB2が競合して、抗11-dhTXB2抗体と結合し、さらに抗11-dhTXB2抗体は固相の抗マウスIg抗体に結合するため、11-dhTXB2含量が多い検体ほど発色が低くなる。洗浄後、発色基質としてパラニトロフェニルリン酸を加えて発色させ、EDTAを加えて反応を停止させた。405 nmの吸光度を測定した。検量線から濃度を算出し、尿クレアチニン1 mg当たりの11dhTXB2量 (pg) で表示した。

(3) 血小板凝集能測定

マウスの血小板凝集能は全血血小板凝集能測定装置 (WBA-Neo、アイエスケ株式会社、東京) を用いて測定した。マウスの全血にクエン酸 (血沈用チトラート) を10%加え、血小板凝集惹起物質としてアデノシン二リン酸 (ADP) を加えた。結果は最低凝集惹起濃度PATI (platelet aggregatory threshold index) で示した。

(4) マウス血中酸化LDL/ β 2GPI測定ELISA

ELISA用96穴プレートに抗 β 2GPIモノクローナル抗体WB-CAL-1を固相化し、ブロッキング

後、希釈した血清を加えてインキュベートした。洗浄後、HRP標識ウサギ抗マウスLDLポリクローナル抗体で固相に結合した酸化LDL/ β 2GPI複合体を検出した。

4. 研究成果

(1) 高脂肪飼料摂取 Apoe^{-/-}マウスにおけるアスピリンおよびスタチン等の効果

尿中 11-dhTXB2 濃度はELISAにより再現性良く測定できた。HF-S 摂取 Apoe^{-/-}マウスでは週齢とともに尿中 11-dhTXB2 濃度が有意に上昇した。11-dhTXB2 濃度および動脈硬化プラーク面積は個体差が大きく、どの薬剤投与群においても対照群と有意な差は見られなかった。血小板凝集能については、フルバスタチンとバルサルタンの併用群で PATI が対照群よりも高く、血小板の活性化が抑制されていることが示唆された。

(2) 高脂肪飼料摂取 Ldlr^{-/-}マウスにおけるアスピリンの効果

- ① HF-A 摂取により LDLR^{-/-} マウスの尿中 11-dhTXB2 は激しく増加した。HF-A 摂取開始と同時にアスピリン摂取を開始した群では、尿中 11-dhTXB2 の濃度は抑制傾向が見られたが有意な差ではなかった (24 週齢時、p=0.064)。
- ② HF-A 摂取により血漿コレステロールおよび中性脂肪濃度は上昇したが、アスピリン摂取による血漿脂質の有意な変化は認められなかった。
- ③ HF-A摂取により血漿AST値は上昇したが、アスピリンにより有意にその上昇が抑制された (p<0.05)。
- ④ HF-A 摂取マウスでアスピリン投与により大動脈の動脈硬化プラーク面積の減少傾向を認めた (p=0.06)。
- ⑤ 高脂肪飼料摂取により血中酸化LDL/ β 2GPI 複合体は有意に増加したが、

アスピリン摂取による複合体濃度の有意な変化は認められなかった。

(3) HF-S 飼料摂取 Ldlr^{-/-}マウスにおけるアスピリンおよびインドメタシンの効果

- ① HF-S 摂取により LDLR^{-/-} マウスの尿中 11-dhTXB2 はゆるやかに増加した。32 週齢時、アスピリン投与群では尿中 11-TXB2 の濃度は抑制傾向が見られたが有意な差ではなかった。インドメタシン群では 28 週齢時および 32 週齢時に有意に尿中 11-TXB2 濃度の上昇が抑制された。
- ② 対照群で血漿 AST 濃度は有意に増加し、アスピリン群では AST の増加がやや抑制されたが有意ではなかった。インドメタシン群では有意に AST の増加が抑制された。(P<0.01)
- ③ HF-S 摂取により血漿 ALT は有意に上昇した。アスピリンは ALT 値に影響を与えなかったが、インドメタシンは ALT の上昇を有意に抑制した(p<0.05)。
- ④ 普通飼料、HF-S 群、薬剤投与群の間で血中 MCP-1 濃度に有意差は無かった。
- ⑤ アスピリン摂取およびインドメタシン摂取により大動脈の動脈硬化プラーク面積の有意な抑制を認めた(アスピリン群 p<0.01、インドメタシン群 p<0.05)。

以上の結果をまとめると、11-dhTXB2特異的抗体を用いたELISAにより尿中の11-dhTXB2が再現性良く測定でき、アスピリンの抗血小板作用の判定に簡便に用いることができることが示唆された。また、マウスの血中酸化 LDL/β2GPI複合体をELISAにより測定することができたが、アスピリンの投与による影響は観察されなかった。

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6件)

- ① Quan N, Kobayashi K, (他7名、9番目) Persimmon (*Diospyros Kaki* Thunb ‘Saijo’) peel improved dyslipidemia and its related production of atherogenic autoantigen complexes in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *The Open Nutrition J*, 査読有、in press
- ② Shen L, Matsunami Y, (他4名、5番目) In vivo oxidation, platelet activation and simultaneous occurrence of natural immunity in atherosclerosis-prone mice. *Israel Med Association J*, 査読有、in press
- ③ Matsuura E, Shen L, Kobayashi K, (他7名) Pathophysiology of beta2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome. *Lupus* 査読有、19巻、2010、379-384
- ④ Ayada K, Yokota K, Hirai K, (他9名、11番目) Regulation of cellular immunity prevents Helicobacter pylori-induced atherosclerosis. *Lupus* 査読有、18巻、2009、1154-1168
- ⑤ Matsuura E, Kobayashi K, Matsunami Y, (他7名) Autoimmunity, infectious immunity, and atherosclerosis. *J Clin Immunol* 29巻、2009、714-721
- ⑥ Nakagawa H, Yasuda S, Matsuura E, (他6名) Nicked {beta}2-glycoprotein I binds angiostatin 4.5 (plasminogen kringle 1-5) and attenuates its antiangiogenic property. *Blood* 114巻、2009、2553-2559

[学会発表] (計3件)

- ① Kobayashi K (他9名、10番目) Persimmon (*Diospyros Kaki* Thunb ‘Saijo’) peel improved dyslipidemia and its related production of atherogenic autoantigen complexes in low-density lipoprotein

receptor-deficient mice. Bioactive
Okayama 2010 International Conference on
Biologically Active Substances, 2010年8
月11日、岡山

② Matsuura E. Atherosclerosis and
angiogenesis in autoimmunity. 4th Asian
Congress on Autoimmunity 2009年9月12日、
シンガポール

③ 中川久子、保田晋介、松浦栄次 (他6名)
Angiostatin 4.5 (plasminogen Kringle
1-4.5)を介した nicked β 2GPI の血管新生に
与える影響. 第53回日本リウマチ学会総
会・学術集会 第18回国際リウマチシンポ
ジウム、2009年4月23日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 和子 (KOBAYASHI KAZUKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・非
常勤研究員
研究者番号：20304298
(H20)

松浦 栄次 (MATSUURA EIJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教
授
研究者番号：20181688
(H21～)

(2) 研究分担者

松浦 栄次 (MATSUURA EIJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准
教授
研究者番号：20181688
(H20→H21: 研究代表者)

西井 伸洋 (NISHII NOBUHIRO)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：50537214
(H21～)