

令和 6 年 9 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06709

研究課題名（和文）プロテオーム解析に基づく抗血小板薬の薬効指標の確立および薬動力学解析

研究課題名（英文）Establishment of efficacy index and pharmacokinetic analysis of antiplatelet drugs based on proteomic analysis

研究代表者

山本 康次郎（YAMAMOTO, KOUJIROU）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70174787

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、血小板凝集能を変化させた多血小板血漿をADP刺激した後の血小板凝集能を定量的に反映するタンパク質を探索する。健康人から得た新鮮血液を用いて遠心分離によりPRPを調製し、ADP添加により血小板を活性化した後、血小板凝集力スケードの最下流であるTalinがCalpainによりTalin-HeadとTalin-Robに切断される過程に特異的なアミノ酸配列を検出できるLC-TOF-MS条件を確立した。動物を用いて定量的解析を行う目的でラット試料を用いて同様の検討を行ったところLC-TOF-MSで当該シグナルが検出できなかったため、免疫沈降法およびELISAで現象を究明中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血小板凝集能の保持時間が短く、採血後速やかに測定を完了させる必要があるため、抗血小板薬投与時に血小板凝集抑制作用の指標を臨床で継続的に監視することはほとんどない。さらに、抗血小板薬は血小板凝集力スケードの様々な過程に影響を及ぼしており、血中薬物濃度推移と血小板凝集能のプロファイルは一致せず、血中薬物濃度をそのまま血小板凝集能の指標とすることもできない。本研究により、抗血小板作用を物質レベルで評価する手法の確立の手がかりが得られたことにより、血中薬物濃度と同時に測定することで、汎用性の高い生理学的薬動力学モデルを構築できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we will conduct proteome analysis after ADP stimulation of platelet-rich plasma with altered platelet aggregation ability, and search for proteins that quantitatively reflect platelet aggregation ability. PRP is prepared by centrifugation using fresh blood obtained from a healthy person, and immediately after activating platelets by adding ADP, it is subjected to reductive alkylation treatment, and the protein is fragmented with trypsin. We established LC-TOF-MS conditions that allow detection of amino acid sequences specific to the process in which Calpain cleaves. We are continuing similar studies using rat samples for the purpose of quantitative analysis using animals.

研究分野：医療薬学

キーワード：血小板 薬動力学

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

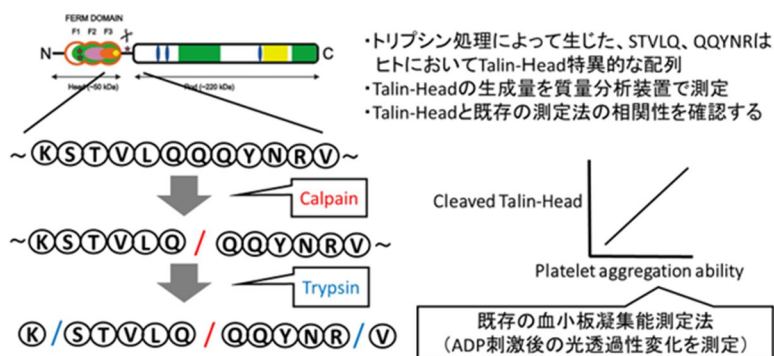
抗凝固療法を実施する際には、血栓形成を阻止しつつ出血性の副作用を防止するための治療管理が必須である。ビタミン K 拮抗薬であるワルファリンは、血液凝固カスケードの様々な過程に作用し、血中薬物濃度と血液凝固能の時間推移が一致しないため、凝固能の指標としてプロトロンビン時間を頻繁に測定する必要がある。直接経口抗凝固薬使用時には血中薬物濃度と活性化部分トロンボプラスチン時間が比較的良く相関することが知られており、凝固因子に直接作用する薬物であることから、血中薬物濃度が薬効の指標として利用できる可能性が示唆されている。一方、抗血小板薬投与時の血小板凝集抑制作用の指標を臨床で監視することはほとんどない。血小板凝集能の測定では抗凝固処理した血液を遠心分離して多血小板血漿 (platelet rich plasma; PRP) と乏血小板血漿 (platelet-poor plasma; PPP) を作成する必要がある。また、血小板凝集能の保持時間が短く、採血後速やかに測定を完了させる必要があるため、多忙な診療業務において日常的に実施するのは現実的でない。さらに、抗血小板薬は血小板凝集カスケードの様々な点で作用しており、血中薬物濃度推移と血小板凝集能の変化は一致せず、血中薬物濃度をそのまま血小板凝集能の指標とすることもできない。

2. 研究の目的

採血時の血小板凝集能を反映している物質を見出し、保存血液においても安定で検出可能なものを用いて、通常診療で得られる血液検体を用いた血小板凝集能評価法を確立することである。さらに、この手法を用いて血中薬物濃度と血小板凝集能の時間推移を解析することにより、最適な薬物治療設計へと発展させることを試みる。

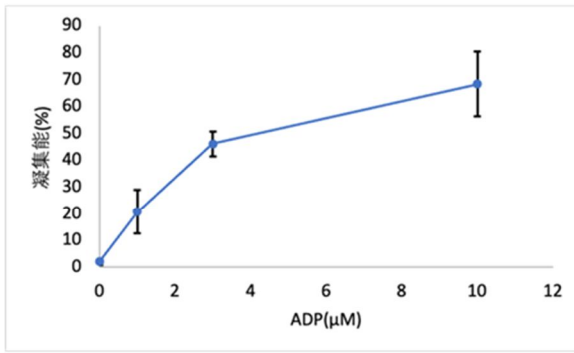
3. 研究の方法

健常人から得た新鮮血液を用いて遠心分離により PRP を調製し、ADP 添加により血小板を活性化した直後に還元アルキル化処理し、トリプシンで蛋白質を断片化し、血小板凝集カスケードの最下流である Talin が Calpain により Talin-Head と Talin-Rod に切断される過程を指標とし、これらに特異的なアミノ酸配列を検出できる LC-TOF MS 条件を検討した。

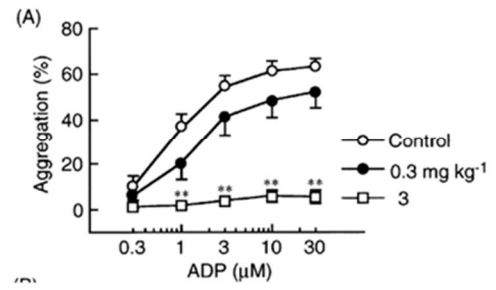


4. 研究成果

特異的なアミノ酸配列として STVLQQQYNR に相当する MS シグナルを選択できた。そこで、合成ペプチドを用いて MS による測定の条件を検討した。未だ若干の夾雑物の影響を受けるものの、必要な濃度範囲で直線性が得られ、測定可能であることがわかった。また、その測定結果はウエスタンブロッティングによる測定と矛盾しなかった。薬物による影響を検討するには動物実験が適当であり、ラットにおける Talin 特異的配列を同定した。ラットにおいてもヒトと同様に光透過度法を用いて血小板凝集能を測定可能であり、ウエスタンブロッティングによる Talin の検出が可能であることを確認した。



n=5



一方、定量的評価を行うためには LC-TOF-MS による測定が必要であるが、ヒト試料と同様の測定条件では該当するシグナルを得ることができなかった。原因究明のため、免疫沈降法および ELISA による検出を行う方向で実験条件を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	荒木 拓也 (ARAKI TAKUYA) (00568248)	群馬大学・大学院医学系研究科・准教授 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関