

令和元年9月19日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10717

研究課題名(和文) 抗血小板剤不応症に対する治療ターゲットの探求

研究課題名(英文) Treatment target of hyper residual platelet reactivity in patients receiving anti platelet therapy

研究代表者

榎本 由貴子 (Enomoto, Yukiko)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20377659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：抗血小板薬を投与しているにもかかわらず十分な効果が発現されない「不応症」は、従来言われている薬物代謝酵素の遺伝子多型の影響よりも、急性期脳梗塞そのものが大きく関与していることが明らかとなった。その機序について血小板細胞内情報伝達経路を検討したところ、血小板からリリースされるリン酸化HSP27産生量の亢進が関与しており、それは低分子量G蛋白の一種であるRacにより調節されていた。血小板とトロンピン、HSP27は脳梗塞急性期という一時的な不応症に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、不応症の主な原因は薬剤相互作用や薬物代謝酵素の遺伝子多型とされ、抗血小板薬の変更や追加投与により対処せざるを得ないと考えられていたが、急性期脳梗塞における一時的な不応症においては、血小板におけるトロンピン刺激感受性の亢進、および血小板から放出されるHeat Shock Protein 27の関与が示された。急性期においては、トロンピン受容体拮抗薬などの併用が臨床的效果をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our study showed that "acute stroke" is more strongly related with high residual on-treatment platelet reactivity (HRPR) on antiplatelet therapy than genetic polymorphism which is most known.

In acute stroke patients, the release of phosphorylated-heat shock protein 27 (HSP27) from thrombin-stimulated platelets is accelerated via Rac.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：抗血小板薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

アテローム血栓性脳梗塞急性期には再発予防のための早急な抗血小板療法の導入が必須である。効果発現を早めるために、維持投与量の数倍量を投与するローディングドーズ投与方法がおこなわれている。しかし、抗血小板薬を投与しているにもかかわらず十分な効果が発現されない「不応症」が存在するため、ローディングドーズを投与しても十分な抗血小板効果が発現されているかどうかについては不明である。

不応症の主な原因は薬剤相互作用や薬物代謝酵素の遺伝子多型とされており、代表的なものはクロピドグレルの代謝酵素である **CYP2C19** の遺伝子多型である。しかし、我々の先行研究ではクロピドグレルの不応症は薬物代謝酵素の影響よりも、血小板細胞内情報伝達などその他の因子による影響が大きいことが示唆された。

2. 研究の目的

そこで、脳梗塞再発予防を目的として抗血小板薬をあらたに投与する患者を対象に、急性期脳梗塞患者と慢性期脳梗塞患者の2群にわけ、①抗血小板薬投与後の経時的な血小板凝集能変化と、②血小板細胞内シグナル伝達に関与する因子を解析し、「不応症」の機序を解明し、あらたな治療ターゲットを探求する研究を着想した。

3. 研究の方法

1) 急性期脳梗塞患者と慢性期脳梗塞患者における抗血小板薬投与開始後の経時的血小板凝集能抑制効果を比較検討

脳梗塞再発予防を目的として抗血小板薬をあらたに投与する患者を対象に、ADP(Adenosine diphosphate)、コラーゲン、TX(thromboxane)A2 誘導体、TRAP(Thrombin Receptor Activating Peptide)の血小板凝集惹起物質（アゴニスト）を各低濃度と高濃度の二濃度を用いた血小板凝集能検査を以下のタイミングで行った；抗血小板剤使用前、6時間後、24時間後、48時間後、7日後、30日後。これらの経時的変化を急性期脳梗塞患者と慢性期脳梗塞患者において比較検討し、2群間でもっとも差がみられる項目は何か、またその差の原因は何か、各アゴニスト血小板凝集能の経時的変化をヒントに導き出す。

2) 「不応症」に関与する血小板細胞内情報伝達経路の解明

上記にて最も差がみられ、急性期脳梗塞患者における血小板活性化の原因を導き出し、その細胞内情報伝達経路を探るため以下の実験をおこなった。患者血液から得られた血液上清を用い、可溶性CD40リガンド、インターロイキン6、血小板由来成長因子AB、セロトニン、トロンボキサン、heat shock protein (HSP) 27など血小板から産生・分泌される血小板由来活性化物質の定量測定をELISA法を用いておこなった。また、洗浄血小板の細胞成分はWestern Blotting法を用いて血小板上の受容体から効果発現に至るまで、どの経路での血小板細胞内情報伝達経路を探索する。

4. 研究成果

1) 急性期脳梗塞患者と慢性期脳梗塞患者における抗血小板薬投与開始後の経時的血小板凝集能抑制効果の比較検討

新たに抗血小板薬を投与する発症 24 時間以内の急性期脳梗塞患者 19 名、および 14 日以上経過した慢性期の脳梗塞患者 25 名において、経時的な血小板凝集能値を両群で比較した。いずれのアゴニストを用いた血小板凝集能も、ベースライン値は両群で有意な差はなかったが、急性期脳梗塞患者群は内服 6・24・48 時間後においても凝集能の有意な抑制効果はみられず、慢性期の脳梗塞患者と比べて有意に亢進していた。この差は、7 日後、30 日後の血小板凝集能では消失していた。内服 24 時間後の VerifyNow PRU 値が 230 以上を不応症と仮定し、それに関連する因子を解析したところ、一般的にクロピドグレル不応症の主要原因として考えられている **CYP2C19** 遺伝子多型については両群で **poor metabolizer** の比率は同等(全体の 14.2%)であったにもかかわらず、有意性が認められなかった。ロジスティック回帰分析では、不応症に関連する有意な差がみとめられたのは急性期脳梗塞のみであり、代謝酵素の遺伝子多型という不応症の定説を凌駕する不応症関連因子であることが明らかとなった。

我々は血小板凝集能の変化をさらに細かく評価するため、**Laser-scattering system** を用い、その血小板凝集塊の大きさの比率を検討した。大凝集塊、中凝集塊、小凝集塊の比率は内服後から変化がみられ、急性期脳梗塞患者においても大凝集塊の比率は内服 6 時間後から低下しており、一般的な評価方法としてもちいられてる最大凝集率については有意な経時的抑制は認めなかったものの、血小板凝集塊の比率の変化という面で抗血小板効果は発現されていた。

2) 不応症に関与する血小板細胞内情報伝達経路の解明

慢性期脳梗塞患者と比較し、急性期脳梗塞患者においてはリン酸化 heat shock protein (HSP)27 が有意に亢進していた。そのため、HSP27 の産生にかかわる血小板細胞内情報伝

達に着眼した。コラーゲン、およびトロンビンをアゴニストとした血小板凝集により血小板凝集の亢進とともに HSP27 の産生が亢進していたが、これらは低分子量 G 蛋白の一種である Rac が関与していた (Uematsu K, Enomoto Y, et al. Cell Physiol Biochem, 2018;49:1523-1538)。Rac inhibitor の投与により、HSP27 の産生量は抑制され、その血小板細胞成分を用いた Western blotting では、HSP27、p38mitogen-activated protein kinase および c-Jun N-terminal kinase のリン酸化が抑制されていたことから、Rac が HSP27 の産生における調節因子として寄与している可能性が示された。

HSP27 は脳梗塞急性期という一時的な不応症に関与していることが示唆された。HSP はストレス応答タンパクとして知られており、ストレス下において血小板から産生され、さまざまな作用を導く。急性期脳梗塞においては HSP の産生が亢進し、その原因として生体内におけるコラーゲンやトロンビン濃度の上昇、あるいはそれらに対する血小板の感受性の上昇などが不応症の一因である可能性がある。今後もさらにその機序を解明すべき研究を継続していく。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- 1) Uematsu K, Enomoto Y, Onuma T, Tsujimoto M, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Tokuda H, Ogura S, Iida H, Kozawa O, Iwama T. Rac Regulates the TRAP-Induced Release of Phosphorylated-HSP27 from Human Platelets via p38 MAP Kinase but Not JNK. Cell Physiol Biochem 2018;49:1523-1538. 査読有り
- 2) Tokuda H, Kuroyanagi G, Onuma T, Enomoto Y, Doi T, Iida H, Otsuka T, Ogura S, Iwama T, Kojima K, Kozawa O. Ristocetin induces phosphorylated-HSP27 (HSPB1) release from the platelets of type 2 DM patients: Anti-platelet agent-effect on the release. Biomed Rep 2018;4:365-372. 査読有り
- 3) Tsujimoto M, Enomoto Y, Miyai M, Egashira Y, Iwama T. Optimal platelet function test for in-stent tissue protrusion following carotid artery stenting. J Int Med Res. 2018 May;46(5):1866-1875. 査読有り
- 4) Onuma T, Tanabe K, Kito Y, Tsujimoto M, Uematsu K, Enomoto Y, Matsushima-Nishiwaki R, Doi T, Nagase K, Akamatsu S, Tokuda H, Ogura S, Iwama T, Kozawa O, Iida H. Sphingosine 1-phosphate (S1P) suppresses the collagen-induced activation of human platelets via S1P4 receptor. Thomb Res 2017;156:91-100. 査読有り

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

岐阜大学医学部脳神経外科

<https://www.med.gifu-u.ac.jp/neurosurgery/>

6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。