

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2009

課題番号：18209021

研究課題名（和文） 抗血小板薬の薬効モニタリングの為の新しい指標の探索

研究課題名（英文） Detection of a Novel Biomarker to Monitor Antiplatelet Therapy

研究代表者

村田 満（MURATA MITSURU）

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：50174305

研究成果の概要（和文）：本研究は、抗血小板薬の薬効と関連することが過去の研究で示唆された既知の因子（血漿中物質、血小板や他の血球、造血前駆細胞中の因子）や未知の因子の中から抗血小板薬のモニタリングに有効な因子を探索し実際の臨床検査に応用することを目的とした。その為に抗血小板薬服用患者あるいは幹細胞から血小板への *in vitro* 培養にて得るサンプルを対象にした候補因子アプローチや網羅的解析を行った。いずれの解析においても抗血小板薬アスピリンの薬効に関連する因子として glycofocalin として知られる血小板膜受容体のひとつの GPIb alpha の細胞外ドメイン切断フラグメントとの関連が認められた。しかし血漿中の glycofocalin を多くのサンプル数に対して簡便に定量測定出来る方法が存在していなかった為、glycofocalin を認識するペプチド抗体を作成、それをを用いた新たな glycofocalin 測定系の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：Although there are wide inter-individual variations in platelet sensitivity to antiplatelet drugs, antiplatelet therapy is currently not monitored with laboratory tests. In this study, to identify biomarker(s) of the effects of antiplatelet drugs, we performed comprehensive studies and candidate approaches on blood samples from patients receiving antiplatelet therapy. Both the comprehensive studies and candidate approaches showed that plasma levels of glycofocalin, known as fragments of extracellular domain of a platelet receptor glycoprotein Ib alpha, were associated with platelet response to aspirin. This study also developed a facile protocol for quantitative analysis of glycofocalin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2007年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2008年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2009年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
年度			
総計	37,200,000	11,160,000	48,360,000

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：抗血小板薬、血小板機能、モニタリング、臨床検査、血栓症、遺伝子ターゲティング、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

抗血小板薬の血栓症に対する有用性は多くの大規模臨床試験により示されているが、一方で抗血小板薬の効果に個体差が存在し、その低反応性においては心血管イベントに対する予防効果が低いことが判ってきた。これは心血管イベントを予防する為の抗血小板薬に巨額の医療費が投じられているにもかかわらず、抗血小板薬が無効である症例を選別できていない、という重大な事実である。動脈硬化性疾患は一度発症するとQOLを大きく低下させ、長期に介護が必要であることから巨額の医療費を要する。従って薬効評価の何らかのモニタリングは現代の臨床検査医学に課せられた最重要課題の一つと考えられていた。しかし血小板機能測定の世界的标准法である比濁法は測定開発の背景が血小板機能異常による出血性疾患の検査だった為に機能評価がover-allであることから、薬効モニタリングとしては十分な感度とは言えない点、さらにこの方法は手技が煩雑で標準化に相当な時間が必要である点、から簡単に定量解析可能な新しい抗血小板薬モニタリング法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗血小板薬の薬効と関連することが過去の研究で示唆された既知の因子(血漿中物質、血小板や他の血球、造血前駆細胞中の因子)や未知の因子、の中から抗血小板薬の薬効予測やモニタリングに有効な物質を探索し、実際の臨床検査に応用することである。

3. 研究の方法

抗血小板薬服用中の患者、あるいは抗血小板薬服用前後の健常人の同意を得て本研究に

登録、血液サンプル(約350サンプル)を収集した。その収集当日に血小板機能測定(比濁法、簡易モニタリングとして知られるPFA-100システム、VerifyNowシステム)を行い、血清や血漿、DNAやRNA抽出用サンプルを保存サンプルとした。これら保存サンプルを対象に候補因子解析はvon Willebrand factor、glycocalicinなど血小板機能や血栓形成能に関連する因子の血清あるいは血漿中レベルの測定を行った。遺伝子解析は血小板機能や血栓形成能に関連する因子の遺伝的な多型解析(DNAサンプル)や発現量解析(RNAサンプル)を行った。網羅的解析は患者サンプルに対しては、プロテオーム定量解析を行った。幹細胞より種々の条件のinvitro分化誘導にて得た血小板からのRNAサンプルに対してはマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行った。これら候補因子解析、網羅的解析のいずれにおいても抗血小板薬アスピリンの効果との関連が認められたglycocalicinの測定系の確立の為、glycocalicinを認識するペプチド抗体を作成し、それを用いた新たなglycocalicin測定系を作り、既存法とともに患者サンプルに対して測定を行った。

4. 研究成果

抗血小板薬服用患者登録数を約350とし、血小板機能や既知候補因子の測定値、遺伝子解析結果のデータベース作成を行った。その解析の結果、アスピリン服用群の約20%、P2Y12阻害剤服用群の約40%が薬剤に対する低反応性群であることを示唆する結果を得た。抗血小板薬服用患者の血液サンプル、あるいは抗血小板薬服用前後の血液サンプルを対象に行った候補因子解析、プロテオーム解析に

よる網羅的検討において、アスピリンに対する血小板の反応性と血漿中 glyocalicin(血小板膜受容体のひとつである GPIb alpha の切断フラグメント)のレベルの関連が示唆された。同一個体におけるアスピリン服用前後の血液サンプルに対する検討では、服用前に比し服用後サンプルで血漿中 glyocalicin レベルの増加を認めた。アスピリン服用患者のサンプルに対する検討ではアスピリン反応性群ではその低反応性群に比し、血漿中 glyocalicin レベルの増加を認めた。GPIb alpha は細胞外ドメインが切断されるとリガンドとの結合 domain を失い、血小板機能低下、血栓形成能の抑制が認められる。またアスピリンがその切断を促進することが報告されている。次に本研究では glyocalicin の測定系の確立を行った(これまで、多くのサンプルに対して glyocalicin を簡便に定量解析する方法は存在していなかった)。glyocalicin を特異的に認識するペプチド抗体を作成、その詳細な characterization の後に血小板機能測定を行っているアスピリン服用患者の血液サンプルを対象に従来法と本ペプチド抗体を用いた ELISA 法にて血漿中 glyocalicin レベルを測定した。その結果、従来法での検討同様にアスピリン低反応性群ではその値の低値が認められた。以上、抗血小板薬服用患者の血液サンプルや抗血小板薬服用前後の血液サンプルを主たる解析対象とし、候補因子解析、網羅的解析を行った結果、血小板のアスピリン反応性に glyocalicin として知られる血小板膜受容体 GPIb alpha の細胞外切断フラグメントの血漿中レベルが関連していることを見いだした。その glyocalicin レベルを簡便に多くのサンプルに対し定量測定を行う為の方法を開発した。

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 30 件)

- 1) 山口雄亮、村田 満 . 血流(ずり応力)による血小板の活性化をみる .Vascular Medicine 14 -18 (110 -114) 2010.4; Vol.6 No2 査読無
- 2) 松原由美子、村田満 . 血栓症と検査医学 . 治療学 44 巻 6 号 2010 in press 査読無
- 3) Ito N, Wada H, Matsumoto M, Fujimura Y, Murata M, Izuno T, Sugita M, Ikeda Y: National questionnaire survey of TMA. Int J Hematol . 2009 Oct;90(3):328 -335. Epub 2009 Sep 18. 査読有
- 4) Ishikawa J, Okada H, Kato H, Takeshita S, Honda S, Kawasaki T, Suehisa E, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Ikeda Y, Kokubo Y, Okamura T, Tomoike H and Miyata T: Association of Asn221Ser mutation in tissue factor pathway inhibitor - with plasma total tissue factor pathway inhibitor level. Blood coagulation and Fibrinolysis 2009, Vol20 No1 22 -26 査読有
- 5) Matsubara Y, Saito E, Suzuki H, Watanabe N, Murata M, Ikeda Y. Generation of megakaryocytes and platelets from human subcutaneous adipose tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun. 378: 716 -720, 2009 査読有
- 6) Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K, Isonishi A, Soejima K, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuranishi Y, Imamura Y, Inoue N, Higasa S, Seike M, Kozuka T, Hara M, Wada H, Murata M, Ikeda Y, Miyata T, and George JN. Pregnancy -induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of foetal death, in Upshaw -Schulman syndrome: a series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. British Journal of Haematology, 144(5): 742 -754, 2009 査読有
- 7) 矢作かおり、村田 満 . 偽性血小板減少症 . 最新医学・別冊 新しい診断と治療の A B C 63 血

小板減少症・増加症第6章トピック 215-221

2009年 査読無

8) 松原由美子、村田 満 . 1. 抗血小板薬の臨床薬理 . 日本検査血液学会雑誌 第11巻 第1号

54-62 2009年 査読無

9) 松原由美子、村田 満 . 抗血小板薬のモニタリング 抗血小板薬の薬効評価の基本的考え方と実際 . 医学のあゆみ Vol.228 No10 957-961 2009年 査読無

10) 村田 満 . アスピリンレジスタンス 特集抗血栓療法 最近の動向 . 日本医師会雑誌 第138巻・第3号 492 2009年 査読無

11) 村田 満 . 動脈硬化/炎症と血小板 Mystery of Platelet 第1回: 血小板の発見から血栓形成機序の解明へ . Therapesearch Vol.30 No.6 841-846 2009年 査読無

12) 村田 満 : 動脈硬化/炎症と血小板 Mystery of Platelet 第2回: 生活習慣病と血小板 . Therapesearch Vol.30 No.6 1051-1061 2009年 査読無

13) 猪狩敦子、村田 満 . <抗血栓療法のモニター>抗血小板療法のPOCT(Point of care testing) . 臨床検査 今月の特集血栓症と臨床検査 第53巻 第10号 1175-1179 2009年 査読無

14) 村田 満 . 急性冠症候群治療の発展を支えた抗血小板薬 Mystery of Platelet 第3回: 急性冠症候群と血小板 . Therapesearch Vol.30 No.10 1525-1534 2009年 査読無

15) 村田 満、Catherine P. Hayward . 対談 Standardization of platelet function testing 血小板機能検査の標準化 . International Review of Thrombosis 2009;Vol.4 No4 9-27 査読無

16) 松原由美子、村田満 . 抗血小板薬のモニタリング . 医学のあゆみ . 228: 957-961, 2009 査読無

17) Matsubara Y, Saito E, Suzuki H, Watanabe N, Murata M, Ikeda Y. Generation of Megakaryocyte and Platelet

from Human Subcutaneous Adipose Tissues. Biochemical and Biophysical Research Communications. 378: 16-20, 2009 査読有

18) Matsubara Y, Murata M, Watanabe G, Ikeda Y. Enhancing Effect of the 145Met-allele of GPIb alpha on Platelet Sensitivity to Aspirin under High-shear Conditions. Thrombosis Research. 15: 331-335, 2008 査読有

19) abe M, Matsubara Y, Takahashi S, Ishihara H, Shibano T, Watanabe G, Murata M, Ikeda Y. Alpha 2A Adrenergic Receptor Polymorphism Is Associated with Plasma von Willebrand Factor Levels in a General Population. Blood Coagulation and Fibrinolysis. 19: 395-399, 2008 査読有

20) Matsubara Y, Murata M, Watanabe G, Ikeda Y: Enhancing effect of the ¹⁴⁵Met-allele of GPIb alpha on platelet sensitivity to aspirin under high-shear conditions. Thrombosis Research. 123(2):331-335, 2008 査読有

21) Yabe M, Matsubara Y, Takahashi S, Ishihara H, Shibano T, Watanabe G, Murata M, Ikeda Y. Alpha 2A adrenergic receptor polymorphism is associated with plasma von Willebrand factor levels in a general population. Blood Coagulation and Fibrinolysis. 19(5):395-399, 2008 査読有

22) 松原由美子、村田 満 . 網羅的解析法: マイクロサテライト, SNP 解析, DNA チップ. 遺伝子検査-診断とリスクファクター . 臨床検査 . 51: 1333-1339, 2008 査読無

23) 松原由美子、村田満 . アスピリンレジスタンス. CLINICIAN. 567: 37-41, 2008 査読無

24) 松原由美子、村田 満 . 抗血栓療法の簡易モニター (point-of-care) . 分

- 子脳血管病 . 7: 761 -766, 2008 査読無
- 25) 村田 満 . アスピリン抵抗性 .
International Review of Thrombosis .1(3):
37 -37 , 2006 査読無
- 26) 村田 満 . ワルファリンとファルマコゲ
ノミックス - genotyping は必要か .日本血栓
止血学会誌 . 17 (3): 379 -380 , 2006 査読無
- 27) 村田 満 . 出血時間 血小板機能検査
(血小板停滞率・血小板凝集能) . 日本医師
会雑誌 最新臨床検査の ABC . 135 (特別号
2): 83 -86 , 2006 査読無
- 28) 村田 満 . アスピリンレジスタンスの臨
床的意義とその分子基盤 . 炎症と免疫 . 14
(3): 75 -80 , 2006 査読無
- 29) Yabe M, Matsubara Y, Takahashi S,
Ishihara H, Shibano T, Miyaki K, Omae K,
Watanabe G, Murata M, Ikeda Y.
Identification of ADRA2A polymorphisms
related to shear mediated platelet
function. Biochemical and Biophysical
Research Communications. 347:1001 -1005,
2006 査読有
- 30) Hattori H, Sonoda A, sato H, Ito D,
Tanahashi N, Murata M et al. G501C
polymorphism of oxidized LDL receptor
gene(OLR1)and ischemic stroke. BRAIN
RESEARCH. 1121:246 -249, 2006 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- 1) Matsumoto K, Matsubara Y, Hoshino H,
Yokoyama K, Watanabe G, Shibano T, Suzuki
N, Ikeda Y, Murata M. An Inhibitory Role of
Platelet CD109 in Platelet Function. 第 22 回 国
際血栓止血学会 2009 年 7 月 11 日 ポストン
- 2) Yamaji K, Matsubara Y, Hoshino H, Suzuki
N, Ikeda Y, Murata M. Effect of Aspirin
Administration on GPIIb/IIIa Shedding: Association
of Glycocalicin Level with Platelet

- Sensitivity to Aspirin. 第 22 回 国際血栓止血
学会 2009 年 7 月 11 日ポストン
- 3) 松原由美子、村田 満 . 抗血小板剤の臨床薬理 .
第 10 回日本検査血液学会学術集会 . 平成 21 年 7
月 4 日 山梨
- 4) 猪狩敦子、森木隆典、山口雄亮、中川央充、村
田 満 . 液相静止条件下の VWF に結合する
ADAMTS13 アミノ酸エピトープ配列 . 第 10 回日本
検査血液学会学術集会 . 平成 21 年 7 月 4 日 山梨
- 5) 坂ノ上容子、松原由美子、星野晴彦、芝野俊郎、
鈴木則宏、池田康夫、村田 満 . 血小板機能の簡
易モニタリング開発聞き PEF -100 を用いた日本人
における血小板機能評価の検討 . 第 56 回日本臨床
検査医学会学術集会 . 平成 21 年 8 月 26 日札幌
- 6) 松原由美子, 村田 満, 鈴木英紀,
横山健次, 石原宏朗, 森島義行, 芝野
俊郎, 池田康夫. 巨核球分化・血小板産
生における GSK-3 β の役割: in vitro 分
化誘導法による検討.
第 70 回 日本血液学会 . 2008 年 10 月
11 日 京都
- 7) Matsubara Y, Saito E, Suzuki H, Watanabe
N, Murata M, Ikeda Y. Successful Platelet
Production from Human Subcutaneous
Adipose Tissues. 3rd UK -Japan Platelet
Conference. 2008 年 9 月 17 日
シンガポール
- 8) Saito E, Matsubara Y, Suzuki H, Ikeda Y,
Murata M. Megakaryocytes and Functional
platelets obtained from human subcutaneous
adipocytes in an in vitro differentiation
system. 49th The American Society of Hematology
(第 49 回アメリカ血液学会) 2007 年 12 月 10 日
アトランタ
- 9) Matsubara Y, Murata M, Yabe M, Ikeda Y. Effect
of human TERT transcription on gene expression
in normal human coronary artery endothelial
cells. XXIth Congress of the International

Society on Thrombosis and Haemostasis (第21回国際血栓止血学会) 2007年7月10日ジュネーブ

10) Yabe M, Matsubara Y, Takahashi S, Ishihara H, Shibano T, Watanabe G, Murata M, Ikeda Y. Genetic factors for determination of plasma VWF levels in a general population. XXIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (第21回国際血栓止血学会) 2007年7月11日 ジュネーブ

11) 松原由美子, 村田 満, 池田康夫. 血小板膜受容体 GPIb・遺伝子多型とアスピリンによる血小板機能抑制効果. 第69回日本血液学会 2007年11月11日 横浜

12) 松原由美子, 齋藤絵美, 鈴木英紀, 横山健次, 村田 満, 池田康夫. 巨核球分化と血小板産生: human GPIb・遺伝子ターゲティング細胞の電顕的観察. 第30回国際血栓止血学会 2007年11月18日 三重

〔図書〕(計3件)

1) 村田 満. 血栓傾向. 改訂7版内科学書 vol.6 血液・造血器疾患神経疾患. 189-193 2009年

2) 村田 満. 出血性疾患. 内科学症例図説 11-14 P489-495 2009年

3) Matsubara Y, Murata M, Ikeda Y. Springer. Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008, 643 (277-289), 2008

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:
取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 満 (MURATA MITSURU)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 50174305

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし