

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に關与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	網脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚搔痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗 血栓薬の開発

国立循環器病センター研究所病因部

加藤久雄

分担研究者

吉元良太 味の素株式会社医薬研究所

塚原徹也 国立京都病院脳神経外科

中村 伸 京都大学霊長類研究所 分子生理・遺伝情報

青崎正彦 国立横浜病院 臨床研究部

佐々木久雄 国立金沢病院 臨床研究部

要旨

ヒトに有効な抗血栓薬（抗血小板薬、抗凝固薬）を如何に効率良く開発するかを目的として、血小板に
ずり応力を負荷した場合のトロンビンの生成およびそのメカニズムに関する研究、内皮細胞表面での血
液凝固反応の再構成系における抗 Xa 薬と抗トロンピン薬の比較、サルの血栓症モデルの開発と抗血栓薬
の効果の解析、ウサギ総頸動脈ステント留置モデルにおける抗血栓薬の評価、恒久的ペースメーカー埋
め込み患者における血栓塞栓症血栓症および末梢循環機能障害疾患の凝固亢進状態の解析を行った。

1. 研究目的

本研究はヒトに有効な抗血栓薬（抗血小板薬、抗凝固薬）を如何に効率良く開発するかを目的として、
その基礎となる血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明を行うとともに、種々の測定系を新たに開
発し、新規抗血栓薬をスクリーニングするための新しい技術を開発しようとするものである。本研究の
動機は今までの抗血栓薬の開発においては、*in vitro* での反応系や動物モデルを用いた *in vivo* での反応系
に有効であっても、最終的にヒトにおいて、その有効性が必ずしも相関しないという経験にもとづいた
ものである。本研究においては、味の素株式会社において開発中の抗血小板薬および抗凝固薬と既に市
販されている抗血栓薬の効果を用いた評価系において比較することを目的とした。

- (1) 内皮細胞表面における血液凝固反応系の解析
- (2) ずり応力負荷による血小板膜及び血小板由来 microparticle 膜上の procoagulant 活性発現
機構に関する検討
- (3) 動物モデル（ウサギおよびサル）での抗血栓薬の効果の評価法の確立

(3) 臨床的効果

2. 研究方法

抗血栓薬

抗 Xa 薬：AXC1826 (味の素株式会社)

抗トロンビン薬：アルガトロバン (市販名 ノバスタン)、ヘパリン (市販名 フラグミン)

抗血小板薬：AjvW-2 (味の素株式会社)

酵素活性測定

合成発色基質法を用いて、FXa、Thrombin、t-PA、Plasmin、Plasma kallikrein、Trypsin、a-Chymotrypsin の測定を行った。

プロトロンビン時間 (PT) の測定

PT 試薬 (DADE BEHRING 社)を用い、常法に従いプロトロンビン時間 (PT) を測定した。コントロールの PT を 2 倍に延長する時の薬物濃度を PT2 として算出した。

ヒト内皮細胞膜上での抗凝固作用の検討

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) をコラーゲンコートした 48 well プレートに 5×10^4 個ずつ播植した。細胞がコンフルートに達した後に TNF- α 10 ng/ml を添加し、一晚培養した。細胞をトリス buffer で 2 回洗浄した。ここに Ca^{2+} を再添加したヒト第 1 因子欠乏血漿および薬剤を添加し、37°C でインキュベートした。30 分、60 分後に上清を分取し、トロンビン活性を、トロンビン基質 S-2238 を用いて定量した。グラフは H_2O を添加した血漿の吸光度を 100% としたときの吸光度を%として示した。

ラット A-V シャントモデル

長さ 10 cm のポリエチレンチューブ (外径 : 1.5 mm、Hibiki No.5) 内に長さ 9 cm の銅線を入れ、その両端に 2 本の 12 cm ポリエチレンチューブ (外径 : 1.0 mm、Hibiki No.3) を接続することで体外循環用のカニューレを作成した。SD ラット (♂、250~450 g) をウレタン (Sigma 社、2 g/kg、i.p) により麻酔した。生理食塩水で満たしたカニューレを左外頸静脈、クランプした右総頸動脈の順に挿入した。尾静脈より評価薬物を注入し、1 分後に血管クランプを取り外し、シャント内に血液を循環させた。5 分後にカニューレ内の銅線を摘出し、付着血栓を生理食塩水で洗い、0.5 N NaOH に溶解させた。BioRad DC プロテインアッセイキットを用いて付着血栓を定量した。

ラット静脈血栓モデル

SD ラット (♂、300~500 g) をペントバルビタール (60 mg/kg、i.p) により麻酔した。右大腿静脈に薬物投与用のカニューレを挿入した。正中線で開腹し、腎静脈より末梢側の下大静脈を露出し、静脈分枝を結紮した。評価薬物を静注した 30 秒後にトロンボプラスチン・C プラス

(DADE BEHRING 社) を 10 mU/kg 静注し、更にその 30 秒後に腎静脈との合流点の末梢側を結紮し閉腹した。10 分後に開腹し結紮した部位の末梢側 1 cm のところを更に結紮し、内部に生成した血栓の湿重量を測定した。

洗浄血小板の作製

健常成人の前腕静脈から 15% ACD (acid citrate dextrose) を用いて採血した後遠心し、多血小板血漿を調製した。この多血小板血漿を HEPES buffer にて 2 回洗浄、遠心を繰り返す、最終的に 0.1% fatty acid free human serum albumin を含む HEPES buffer で血小板を懸濁し、血小板数を 2×10^8 /ml に調整した洗浄血小板を作製した。

ずり応力負荷

ずり応力惹起血小板凝集測定装置 (東レ) を用いて行った。先に調整した洗浄血小板 375 μ l に inhibitor 溶液 45 μ l を加え室温で 10 分 preincubate した後、von Willebrand factor (vWF) 10 μ g/ml, CaCl_2 2 mM を加え、更に thrombin や collagen 等の刺激物質を添加した後、直ちに 400 μ l をセルに添加しローターを回転させずり応力をかけた。ローターの回転数を変化させることにより種々のずり応力を 3 分間負荷させた。

血小板及び血小板膜由来 microparticle 画分の分離

5mM EGTA を含む HEPES buffer 200 μ l を入れたチューブにずり応力をかけた血小板試料 30 μ l を加え、800g, 10 分間遠心し上清を microparticle 画分、沈さを血小板画分として分離した。

血小板膜及び microparticle 膜上 thrombin 生成速度の測定

血小板及び microparticle 画分または分離前の全画分に、115 mM CaCl_2 を 2 mM、Factor Xa 4 nM を加え 37 $^{\circ}$ C で 1 分間 incubate した。さらに prothrombin 0.82 μ M, CaCl_2 3 mM を加え反応を開始、37 $^{\circ}$ C で 1 分間 incubate した。最後に thrombin の発色基質である S2238 (150 μ M) 875 μ l に上記の反応液 25 μ l を加え 37 $^{\circ}$ C で 1 分間 incubate 後、6% citric acid 0.5 ml を添加して反応をとめ、405 nm の吸光度を測定した。standard としての thrombin を用いて検量線を作成し、thrombin 生成速度を算出した。

抗 Xa 薬の出血時間への影響の評価

麻酔下にラビット耳静脈を 21G 針で穿刺し止血までの時間を計測した。最初に抗 X 薬投与前の出血時間を計測し、抗 Xa 薬投与後に再度測定した。

ラビット総頸動脈ステント留置モデルの作成

ラビットの総頸動脈、内頸動脈および外頸動脈を剥離し、外頸動脈より、総頸動脈に向かって 1cm のステントを乗せた径 2.5mm の balloon を挿入し、balloon とともにステントを拡張し、径 3.0mm で留置した。術後、抗 X 薬投与群 (n=6) と非投与群 (n=3) を作成した。投与群は抗 Xa 薬 20mg を生食 3ml に希釈し、3 日間、1 日 1 回投与した。非投与群では生食 3ml を 3 日間、1 日 1 回投与した。ステント留置血管の開存性に関しては、8 週間後に評価した。

サル血栓モデル

マカクサル（ニホンザル、アカゲザル、カニクザル）に LPS（50 µg/head）を投与し、血球および凝固系関連因子の血中動態、主要組織・臓器の血管障害や血栓形成などを解析しながら、凝血病態・血栓症サルモデルの作出およびそのモニタリングを確立した。次いで、このサル凝血病態・血栓症モデルを用い、抗血栓症薬剤として抗炎症性の抗 PAF 剤あるいは凝固因子インヒビターを投与し、TAT などの凝固系関連因子の血中動態および好中球・単球での TF 発現を精査しながら、これらの抗血栓作用や作用機序を検討した。

ペースメーカー埋め込み患者の解析

対象は、房室ブロックのため恒久的ペースメーカー植え込み術を行った 28 例（男性 14 例、女性 14 例。年齢：59～96 歳（平均 72.8±8.7 歳））。ペースング様式は、心房・心室同期の生理的ペースング：18 例、V V I ペースング：10 例。方法は、全例早朝空腹時に採血を行い、 β -thromboglobulin (β -TG) を Asserachrom β -TG(Stago 社)により、Thrombin-antithrombin III complex(TAT)を Enzygnost TAT(Behring 社)により、D-dimer を Dimer test EIA(AGEN 社)によりそれぞれ E I A 法で測定した。さらに血小板活性化の指標として血小板膜上の P-selectin の発現を FITC 標識モノクローナル抗体 (CD62P (PharMingen Internatinal 社製)) を用い、Becton Dickinson 社製 Immunocytometry systems;FAC scan により flow cytometry で測定し、FC 蛍光強度の mean channel で表した。

急性血栓症および慢性動脈閉塞症患者の解析

対象症例は 59 歳から 87 歳、男 16 名、女 4 名の 20 症例を対象とした。疾患別には趾チアノーゼ症候群 2 名、レイノー病 2 名、慢性閉塞性動脈硬化症 12 名を含む慢性動脈閉塞疾患 14 症例、急性動脈閉塞症 2 名、急性静脈血栓症 4 名を含む急性血栓症 6 症例であった。

介入治療薬はすでに市販中のプロスタグランジン E1（市販名：プロスタジン (PGE1 と略す)、アルガトロバン（市販名：ノバスタン）、低分子ヘパリン（市販名：フラグミン）の 3 剤を投与した。投与方法はプロスタジン E160 γ 、アルガトロバン 10mg、フラグミン 5000 単位を各々別々に、電解質輸液剤（市販名：ソリタ T1）200ml に溶解して所要時間 90 分間で 1 日朝夕 2 回点滴にて 5 日間継続して治療した。慢性動脈閉塞疾患の 14 症例には PGE1 かアルガトロバンのいずれかを、急性血栓症の 6 例に対しては低分子ヘパリンを投与した。なお、慢性動脈閉塞症の 3 症例には 1 週間以上の休薬期間を置いて PGE1 とアルガトロバンを互いに入れ替えて投与した。血液凝固・線溶能評価の指標として D ダイマー値、近赤外線分光法を用いて組織酸素代謝を測定した。近赤外線分光測定機器は Shimadzu 社製 OM200 を用いた。

3. 研究成果

(1) 内皮細胞表面における血液凝固反応とラット血栓モデルにおける抗 Xa 薬と抗トロンビ

ン薬の比較

酵素活性測定、プロトロンビン時間延長作用の検討

AXC1826 の各種プロテアーゼに対する阻害活性を検討したところ、FXa 阻害活性が 13 nM と最も強く、トロンビン阻害活性は 40 μ M でありその比は約 3100 倍であった。また、それ以外のプロテアーゼでは plasma kallikrein に対して最も強く 0.69 μ M で阻害活性を示したが、FXa 阻害活性との乖離は 53 倍であり、AXC1826 が選択的 FXa 阻害剤であることが示された。

次に抗凝固活性の一般的な指標である PT に対する作用を検討した。ラット血漿を用いた検討では、AXC1826 よりも argatroban の方が低濃度で PT 延長活性を示したが、ヒト健常人血漿を用いた検討では、AXC1826 の方が argatroban よりも低濃度で PT 延長活性を示した。

ヒト内皮細胞膜上での抗凝固作用の検討

AXC1826 はインキュベート 30 分、60 分のいずれにおいても用量依存的な抗凝固作用を示した。argatroban はインキュベート 30 分では抗凝固作用を示したが、60 分では示さなかった。AXC1826 の IC₅₀ は 0.16 μ M (30、60 分後)、argatroban の IC₅₀ は 6.6 μ M (30 分後)、10 μ M 以上 (60 分後) であり、in vitro PT2 の結果と大きく乖離した。

(2) ずり応力負荷による血小板膜及び血小板由来 microparticle 膜上の procoagulant 活性発現機構に関する検討

種々のずり応力負荷による血小板及び microparticle からの thrombin 生成に関する検討

これまでの研究から、12dyne/cm² という低ずり応力下では、静止状態と比較して血小板からの thrombin 生成は殆ど増大しないが、108 dyne/cm² という高ずり応力下では 5 倍以上に増大することが明らかになっている。そこでこの thrombin 生成の増大がどの程度のずり応力で観察されるかを確認するために、種々のずり応力下での thrombin 生成に関して検討した。thrombin 生成の増大は 50 dyne/cm² から観察され、それ以降はずり応力を増加させても、thrombin 生成は増大しないことが明らかになった。

血小板膜上及び microparticle 膜上における thrombin 生成に関する検討

我々は、平成 10 年度及び 11 年度の研究により、高ずり応力の負荷により血小板膜上及び血小板由来の microparticle 膜上で flip-flop 現象が起き、膜の内側の構成成分である酸性リン脂質が、外側に expose されることを明らかにした。これらの酸性リン脂質は、膜上で FVa, FXa, Ca²⁺ と prothrombinase complex を構成し、prothrombin から thrombin への生成を飛躍的に増大させると考えられる。そこで今回は、thrombin 生成が血小板膜上で起きているものと、microparticle 膜上で起きているものとどちらの寄与が大きいかに関して検討を行った。その結果、高ずり応力負荷による血小板からの thrombin 生成はその約 7 割が microparticle 上で生成され、残り 3 割が血小板膜上で生成されていることが判明した。一方、血小板膜 GPIb と vWF の結合を阻害する抗 vWF モノクローナル抗体 AJvW-2 の添加により thrombin 生成は阻害されるが、この時の

microparticle 膜上及び血小板膜上での thrombin 生成はそれぞれ 25%, 75%であり、AJvW-2 はいずれの膜上での thrombin 生成も抑制するが主として microparticle 膜上での thrombin 生成していることが明らかになった。また、AJvW-2 添加時の高ずり応力下の thrombin 生成に対する microparticle 膜, 血小板膜の寄与率は静止状態（未刺激状態）に近いものであることもわかった。

血小板刺激アゴニスト存在下における thrombin 生成の検討

実際の血栓形成部位においては、血管壁の傷害により血管内皮下組織が露出し、そこに存在する collagen や血小板から放出される ADP, serotonin, 血小板膜上で生成する thrombin などの刺激物質により血小板が活性化され、血栓形成を促進する。従って、これらの血小板刺激アゴニストは高ずり応力という刺激以外にも血小板の procoagulant 活性を誘引して thrombin 生成を増大させる可能性が考えられる。そこで、これらの中でも強い刺激物質と考えられている thrombin、collagen の存在下での高ずり応力による thrombin 生成速度の測定及びそのメカニズムの検討を行ったが、高ずり応力下においても、静止状態においても collagen の存在による増大は観察されなかった。AJvW-2 は collagen の存在下にも thrombin 生成を阻害したが、血小板糖蛋白 GPIIb/IIIa に対する抗体である c7E3 Fab は、collagen 存在下の thrombin 生成も阻害しなかった。速い血流下（高ずり応力下）においては、collagen の存在下にも GPIIb-vWF 相互作用が thrombin 生成の引き金になっていることが示唆された。

(3) 動物モデルにおける抗血栓薬の評価

ラット A-V シヤントモデル

シヤント内に銅線を入れ、そこに付着した血栓を定量することにより AXC1826、argatroban の抗血栓作用を評価した。AXC1826 および Argatroban はいずれも用量依存的な抗血栓作用を示し、その効果は AXC1826 が 3 μ g/kg から、argatroban は 30 μ g/kg から有意であった。コントロールの血栓重量を 50%抑制する時の投与量 ID₅₀ はそれぞれ、7.1 μ g/kg、29 μ g/kg であった。In vitro PT2 (ラット) では AXC1826 よりも argatroban の方が約 3 倍強力であったが、本モデルの評価では AXC1826 の方が約 4 倍強力であった

ラット静脈血栓モデル

血流のうっ滞および TF により誘発した静脈血栓に対し、AXC1826、argatroban はいずれも用量依存的な抗血栓作用を示し、その効果は AXC1826 が 10 μ g/kg から argatroban は 30 μ g/kg で有意であった。コントロールの血栓重量を 50%抑制する時の投与量 ID₅₀ はそれぞれ、13 μ g/kg、21 μ g/kg であった。A-V シヤントモデルと同様に In vitro PT2 では AXC1826 よりも argatroban の方が約 3 倍強力であったが、本モデルでは AXC1826 の方が約 2 倍強力であった。

ラビット総頸動脈ステント留置モデル

抗 Xa 薬投与群 (n=6) のうち、投与前の出血時間は、208 \pm 79 秒、投与後の出血時間は、845 \pm

237 秒であった。抗 Xa 薬非投与群 (n=3) では、生食投与前の出血時間は、 247 ± 103 秒、生食投与後の出血時間は、 235 ± 48 秒であった。

8 週間後の開存性の評価においては、抗 Xa 薬非投与群では、2 羽 (2/3) で閉塞、抗 Xa 薬投与群では、1 羽 (1/6) で閉塞していた。開存性に 2 群間で有意差が認められた ($p=0.035$)。

サルの血栓モデル

サルはラット・マウスなどげっ歯類と異なり、ヒト同様に LPS 応答性が高く、 $50 \mu\text{g}/\text{head}$ の投与量で、血中炎症性サイトカイン、CRP、血小板・白血球減少、凝固亢進が認められた。特に、このモデル実験で、LPS 投与 1~3 時間後に肝微小血管での接着因子発現、好中球の集積・活性化と TF 発現が免疫組織染色および in situ hybridization で観察された。更に、この好中球 TF 発現に伴い、TAT 増加やフィブリン形成など凝固系亢進・凝血病態が認められた。従って、今回のサルモデルは、これまで明らかでなかった凝固亢進・血栓症の発症機序を知る上でも貴重なモデル系であることが示された。また、この血管内好中球 TF 発現はヒトの、虫垂炎、腹膜炎あるいは脳梗塞においても見られ、今回作出したサルモデルがヒトの凝固系亢進・凝血病態モデルとして好適であることが示された。

このサルモデルに抗 PAF 剤や凝固因子インヒビターを事前投与すると、LPS で惹起される TAT 増加、血管内での好中球集積、TF 発現、フィブリン形成などは著減し、これら薬剤の抗血栓効果が認められた。また、これらの抗血栓薬剤の作用機序として、内皮細胞表面での接着因子・ICAM の発現低下、炎症因子・PAF の産生阻害、好中球・単球での TF 発現の抑制、TF 関与の凝固亢進制御などが示唆された。

(4) 血栓症患者における抗血栓薬の評価

恒久的ペースメーカー植え込み患者における血栓形成傾向の凝血的検討

全例、心房細動は認められなかった。心エコー図上、心腔内血栓は認められなかったが、左房径は生理的ペースング例で $36.0 \pm 6.5\text{mm}$ 、V V I 例で $40.5 \pm 6.5\text{mm}$ と V V I 例では有意に左房の拡大が認められた。凝血的検討では、 β -TG, TAT, D-dimer では二群間に有意な差異は認められなかったが、P-selectin の発現量では生理的ペースング例： 9.42 ± 1.24 に比べ、V V I ペースング例： 11.5 ± 2.51 と V V I 例では有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

慢性動脈閉塞疾患および急性血栓症患者における血栓形成傾向の凝血的検討

D ダイマー値：慢性動脈閉塞症と急性血栓症の治療前 D ダイマー値を比較すると各々 $2.255 \pm 1.85 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10.80 \pm 6.67 \mu\text{g}/\text{ml}$ と急性血栓症において有意 ($P=0.0217$) に高値であった。介入薬剤を投与した前後の D ダイマー値は初回投与時において投与前 $4.533 \pm 6.676 \mu\text{g}/\text{ml}$ に対し $4.220 \pm 6.520 \mu\text{g}/\text{ml}$ と有意 ($P=0.0222$) に低下した。しかしながら、5 日目投与時では介入薬剤の効果は見られなかった。

介入薬剤点滴中の近赤外線分光法測定は初回投与時において PGE1 群 8 例、アルガトロバン群 9 例、低分子ヘパリン群 5 例で測定された。薬剤点滴中の oxyHg 濃度指数は PGE1 で 26.357 から 29.226、アルガトロバンでは 35.220 から 35.672、低分子ヘパリン群では 16.876 から 20.489 とすべての群においても増加し、介入薬剤による有意($P=0.0264$) の効果を認めた。各薬剤の効果ではアルガトロバン群と低分子ヘパリン群の間に有意($P=0.0275$)の差を認めた。他の近赤外線分光法パラメータには薬剤の投与による変化が認められなかった。5 日目投与時ではどのパラメータも有意の変化をしめさなかった。5 日間介入薬剤による治療前後の歩行負荷近赤外線分光法測定は PGE1 群 4 例、アルガトロバン群 4 例、低分子ヘパリン群 4 例に試行した。SdO₂ は 1km 歩行時においても、2km 歩行時においても有意の変化を認めなかった。回復時間では有意の変化ではなかったものの PGE1 群は増加し、アルガトロバン群と低分子ヘパリン群は治療によりむしろ低下する傾向を認めた。

4. 考察

ずり応力負荷による血小板膜及び血小板由来 microparticle 膜上の procoagulant 活性発現機構に関する検討

平成 10 年度及び 11 年度の本研究により、血管内に生じる物理的な力であるずり応力によって、血小板膜上の thrombin 生成が促進され、この反応が血小板膜糖蛋白である GPIb と血漿蛋白である vWF の結合が引き金となって、引き起こされることが明らかになった。一方で、凝固促進活性を有し、一過性脳虚血発作、ラクナ梗塞、冠動脈インターベンション患者、高脂血症、糖尿病などの疾患で上昇することが知られている血小板膜由来の microparticle の生成も高ずり応力によって増大することがわかった。本年度の研究においては、まず負荷するずり応力の大きさと thrombin 生成との関係について検討した。thrombin 生成の増大は 50 dyne/cm^2 以上のずり応力下で観察された。このような高いずり応力は、細小動脈や動脈硬化による狭窄部位でみられ、通常の比較的血管径の大きな動脈では観察されないことが知られている。thrombin 生成を引き起こすずり応力は acute coronary syndromes のような病態時に動脈硬化のために部分的に狭窄されたような状況下で発生するものと考えられた。

次にこの thrombin 生成が血小板膜上で起きているか microparticle 膜上で起きているかに関して検討した。これまでの検討より、血小板膜、microparticle 膜のいずれにおいても flip-flop 現象が起き、thrombin を産生する prothrombinase complex を構成するための酸性リン脂質が膜の外側に分布することがわかっている。この thrombin 生成が主として血小板膜上で起きるか或いは microparticle 膜上で起きるかの検討を行った結果、その約 7 割が microparticle 膜上において生成し、残り 3 割が血小板膜上で生成することが判明した。血小板由来の microparticle は系が $1\mu\text{m}$ 未満（血小板は直径 $2\sim 4\mu\text{m}$ ）と微小な粒子であり、我々の研究結果から high shear 下では血小

板 1 万個当たり 4 千～5 千個放出される。このことから考えて、microparticle は血小板に比較して強力な procoagulant 活性を有し、血栓形成に重要な役割を果たすことが示唆された。また血小板膜 GPIb と vWF の結合を阻害するモノクローナル抗体である AJvW-2 は主として microparticle 上での thrombin 生成を抑制していることが明らかになった。

最後に実際の血栓部位に存在し、血小板を活性化して血栓形成を促進する因子である collagen や thrombin の存在下での血小板からの thrombin 生成に関して検討を行った。これらの血小板刺激アゴニストは、通常の薬剤評価に用いている静止状態での血小板凝集を引き起こすためには、非生理的な高濃度を添加しなければならないが、高ずり応力下ではその 1/10 程度のより生理的な濃度で血小板凝集率を増大させた。一方、高ずり応力負荷による血小板由来 thrombin 生成に関してはいずれのアゴニスト存在下にも増大が観察されなかった。血小板由来の thrombin 生成を引き起こす刺激として、高ずり応力という物理的な刺激は、collagen や thrombin のようなアゴニストによる刺激に比較しても強い刺激であることが示唆された。また、いずれの刺激アゴニストの存在下においても AJvW-2 は血小板由来の thrombin 生成を阻害したのに対し、GPIIb/IIIa に対するモノクローナル抗体 c7E3 Fab は阻害作用を示さなかったことから、これらのアゴニスト存在下にも GPIb-vWF 相互作用が thrombin 生成の引き金になっていると考えられた。

内皮細胞表面における凝固反応と動物モデルにおける血栓症との比較

PT 測定法は血漿にトロンボプラスチンを大量に添加し、短時間で血液凝固反応を起こさせる方法である。一方、生体内で起こる凝固反応では、極少量の TF を起源とし凝固カスケードにより反応を増幅させながら、種々の抗血栓機能の存在下に血栓が形成される過程とされる。そのため、PT 測定法を用いた抗凝固能の測定では、抗血栓薬のポテンシャルを正確に見積もることができない可能性が考えられる。そこで、本研究では PT 測定法よりも生体内での凝固反応に近い条件下で抗凝固活性を測定することを目的として、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を TNF- α で刺激し、細胞膜表面上に TF を発現させ、細胞膜状での凝固反応に対する薬剤の阻害活性を検討した。PT 測定法による検討では、ヒト血漿を用いた場合、FXa 阻害剤 AXC1826 の PT2 はトロンピン阻害剤 argatroban の約 1/3 であった。しかしながら、HUVEC 上での抗凝固活性はインキュベーション時間が 30 分のときは、AXC1826 は argatroban の約 40 倍の活性を示した。インキュベーション時間を 60 分にしたところ、AXC1826 では 30 分の時と同様の抗凝固活性を示したが、argatroban は全く抗血栓作用を示さなかった。PT 測定法よりも生体内での凝固反応に近いと考えられる HUVEC 上での凝固反応においてこのような知見が得られたことから、FXa 阻害剤 AXC1826 がトロンピン阻害剤 argatroban よりも優れた抗血栓薬となる可能性が本実験から示唆された。

そこで、AXC1826 と argatroban の抗血栓活性を in vivo で比較するために、ラット A-V シヤントモデルおよびラット静脈血栓モデルを用いて両薬剤の抗血栓作用を評価した。A-V シヤントモデルは血液が銅線に接触することで内因系凝固カスケードが活性化され血栓が形成されるモデルである。本モデルは血栓形成メカニズムにおいて TF を介さないが、生体内での凝固血栓形成に対する抑制効果の比較という観点から、AXC1826 と argatroban の抗血栓作用を評価した。ラットの PT2 では AXC1826 よりも argatroban の方が約 3 倍強力であったが、A-V シヤントモデルにおける抗血栓作用は AXC1826 の方が 4 倍強力であり、PT 測定法による抗凝固能の測定と in vivo 血栓モデルにおける抗血栓作用との間に乖離が見られた。また、血流のうっ滞と TF から血栓が形成される静脈血栓モデルにおいても AXC1826 の方が argatroban よりも強力な抗血栓作用を示した。以上のことから、PT 測定法における抗凝固活性は in vivo 血栓モデルにおける抗血栓作用を反映していないことが示唆された。

従って、今回我々が検討したヒト内皮細胞上の微量 TF を介した凝固反応系を用いた抗凝固活性の測定は PT 測定法とは異なり in vivo 血栓モデルでの抗血栓作用を反映した評価系であることが示唆された。また、ヒト内皮細胞上での抗凝固活性の検討、in vivo 血栓モデルでの検討から、トロンビン阻害剤よりも FXa 阻害剤の方が優れた抗血栓薬になる可能性が示唆された。

ラビット総頸動脈ステント留置モデルにおいては、抗 X 薬投与により、留置後の閉塞が少なく、ステント留置血管の開存性を高める効果があると考えられた。理由としては、抗 X 薬投与により急性期の血栓性狭窄および閉塞を防ぐことができ、これが慢性期の血管の開存につながったと推測された。しかし、今回の投与量は出血時間を大幅に延長しており、実際の投与においては、出血の危険性を高める投与量と考えられた。今後は、出血時間を延長しない程度の投与量での検討が必要と考えられる。また、さらに長期の投与により、閉塞予防効果が高められる可能性があると考えられた。

サルモデルでの前臨床実験・研究を進める上で有利な点は、ヒトの遺伝子・DNA 情報、種々の測定キット、抗体類などが利用可能で、他の汎用実験動物に比べ遙かに精緻で高度な成果が期待できる。加えて、生体反応もヒトに類似しているため、本研究で示した様に、好中球での TF 発現による凝血病態・血栓症など、これまで知られていなかった血栓症成因为明らかにされ、それに対する新たな抗血栓薬剤のドラッグデザインの可能性も生まれる。

恒久的ペースメーカー植え込み患者における血栓形成傾向の凝血的検討

心房ブロックによるペースメーカー植え込み例では、生理的ペースング例に比べ、VVI ペースング例で P-selectin の発現が有意に多く血栓形成傾向が推測された。また、VVI ペースング例では左房径の拡大がみられ心房・心室同期欠如による左房の mechanical remodeling の関与が示唆された。

慢性動脈閉塞疾患および急性血栓症患者における血栓形成傾向

本研究において、D ダイマー値は急性血栓症では慢性動脈閉塞症と比較して高値であったが、低分子ヘパリンの投与により低下した。しかし、初回投与時のみであり 5 日目投与時にはほとんど変化をしめさなかった。この傾向は慢性動脈閉塞症において使用したアルガトロバンでも同様であり、PGE1 でも同様であった。この事は血液凝固系に關与する低分子ヘパリンとアルガトロバンばかりでなく薬理作用の異なる PGE1 にも D ダイマー値に影響を及ぼす作用を有していると考えられる。また、初回投与時のみに D ダイマー値が低下したことから、薬剤の連続投与により、D ダイマー値に影響を及ぼす物質が少なくなった結果とも考えられる。

初回投与時の薬物注入中の近赤外線分光法測定では oxyHg のみが増加し、D ダイマー値とほぼ同様な所見をしめた。近赤外線分光法では歩行負荷回復時間が薬剤評価に有効であるとされているが予想に反して薬剤投与による変化をみとめなかった。D ダイマー値においても近赤外線分光法においても薬剤投与初期に効果判定を行うことが重要である。

5. 結論

(1) ヒト内皮細胞膜上での凝固反応は PT 測定法よりも生体内での凝固反応に近い反応であり、in vivo 抗血栓作用を評価するのに適した評価系であることが示唆された。

ヒト内皮細胞膜上での抗凝固活性の検討および in vivo 血栓モデルでの検討から、トロンビン阻害剤 argatroban よりも FXa 阻害剤 AXC1826 の方が強力な抗凝固薬になることが示唆された。

(2) 動脈内のような速い血流によって生じる高ずり応力 (high shear stress) は、50 dyne/cm² 以上で血小板膜 procoagulant 活性 (血小板由来 thrombin 生成) を増大させ、フィブリン血栓形成に重要な役割を果たす。高ずり応力負荷による血小板由来の thrombin は、その約 7 割が血小板から放出された microparticle 膜上で産生され、残り約 3 割が活性化した血小板膜上で産生される。

血小板 procoagulant 活性発現に対して、高ずり応力負荷という物理的な刺激は、collagen や thrombin というアゴニストによる刺激に比較して強い刺激である。

血小板 GPIb と vWF の結合は、collagen や thrombin の存在下にも高ずり応力下の thrombin 生成の引き金となっており、この結合を阻害する AJvW-2 のような薬剤は、血栓形成の初期反応を阻害することによって、血液凝固反応も抑制する強力な抗血栓薬になる可能性が示唆された。

(3) ラビット総頸動脈ステント留置モデルにおいては、抗 Xa 薬投与により、留置後の閉塞が少なく、ステント留置血管の開存性を高める効果があると考えられた。しかし、今回の投与量は出血時間を大幅に延長しており、実際の投与においては、出血の危険性を高める投与量と考えられた。

サルでの血栓症モデルを開発して、抗血栓薬の抗血栓作用とその作用機序に関する病態生化学的研究を進めた。具体的には、マカクサルに LPS を投与して実験的凝血病態・血栓症モデ

ルを作出し、このサルモデルに抗血栓薬剤を投与し、単球・好中球での組織因子 (Tissue Factor, TF) 発現や凝固系への影響を、主に分子細胞学的に解析した。得られた結果を基に、抗血栓薬剤の作用機序を解析すると共に、サルモデル系を用いた抗血栓薬剤の評価・試験法の開発を図った。

(4) 患者における血栓形成傾向の凝血的検討

房室ブロックによる恒久的ペースメーカー植え込み例で P-selectin の発現が有意に多く血栓形成傾向が推測された。

動脈閉塞症および急性血栓症患者については、臨床的な治療薬で末梢血管拡張とされているプロスタグランジン E1、血液凝固線溶系に効果があるとされているアルガトロバンと低分子ヘパリンの薬剤評価を D ダイマー値と近赤外線分光法にて行った。その結果、D ダイマー値、近赤外線分光法の酸化ヘモグロビン濃度指数に薬剤効果を認めた。しかし、いずれの評価法においても各薬剤の効果を量的に評価することは出来なかった

6. 研究発表：

- (1) Todoroki, A. Higure, K. Okamoto, K. Okazaki, K. Hirata, Y. Nagafuchi, S. Takeda, H. Itoh, K. Osato, S. Nakamura : Possible Role of Platelet Activating Factor in the in vivo Expression of Tissue Factor in Neutrophils, J. Surg. Res., 80: 149-155(1998).
- (2) Soejima, H. Ogawa, H. Yasue, K. Kaikita, K. Nishiyama, K. Misumi, k. Takazoe, Y. Miyao, M. yoshimura, K. Kugiyama, S. Nakamura, I. Tsuji, K. Kumeda : Heightened Tissue Factor Associated with Tissue Factor Pathway Inhibitor and Thrombin Generation in Patients with Unstable Angina, Circulation, 99: 2908-2913 (1999).
- (3) Hine, K. Enjoji, K. Kokame, S. Nakamura, A. Takai, Y. Kamikubo, K. Sueishi, H. Kato: Monkey Hapatocytes Efficiently Express Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), in Contrast with Human and Rat Hepatocytes, J. Biochem., 125: 1039-1047 (1999).
- (4) Soejima, H. Ogawa, H. Yasue, K. Kaikita, K. Nishiyama, k. Takazoe, K. Nishiyama, K. Misumi, Y. Miyao, M. yoshimura, K. Kugiyama, S. Nakamura: Angiotensin- Converting Enzyme Inhibition Reduces Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Tissue Factor Levels in Patients with Myocardial Infarction, J. Am. Coll. Cardiol., 34: 983-988 (1999) .
- (5) Todoroki, S. Nakamura, A. Higure, K. Okamoto, S. Takeda, N. Nagata, H. Itoh, K. Ohsato: Tissue Factor Expression in Monkey and Human Neutrophils, Surgery, 127:

- 209-216 (2000).
- (6) Ogiichi, Y. Hirashima, S. Nakamura, S. Endo, M. Kurimoto, A. Takaku : Tissue Factor and Cancer Procoagulant Expressed by Glioma Cells Participate in Their Thrombin-Mediated Proliferation, J. Neuro-Oncol., J. Neuro-Oncol., 46: 1-9 (2000).
- (7) Ueno, M. Toi, M. Koike, S. Nakamura, T. Tominaga: Tissue Factor Expression in Breast Cancer Tissues: Its Correlation with Prognosis and Plasma Concentration, Br. J. Cancer , Br. J. Cancer , 83: 164-170 (2000).
- (8) 轟木秀一、中村 伸：組織因子 (CD142)、血液・腫瘍科、39：180-183 (1999) .
- (9) 中村 伸：膜結合性組織因子、検査と技術、28：91-93(2000).
- (10) 佐々木久雄、遠藤將光、岸槌進治郎、松本康、阿部吉伸、川島五月、平能康充、上山 武史. 空間分解法に基づく OxyHg と動脈血酸素分圧との関連性. Therapeutic Research, 21: 27-31, 2000.
- (11) 佐々木久雄、吉村光弘、松本 康、遠藤將光、阿部吉伸、川島五月、平能康充、上山武史. 人工透析患者における下肢腓腹筋の組織循環機能. 脈管学, 41 (3) 2001. (印刷中)

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社