

博士論文

血栓溶解薬および抗血小板薬の薬効薬理・作用機序解析のための  
新規モデル動物の作出に関する研究

伊藤 悠介

本博士論文は、下記の発表論文を基に作成され、東北大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. Generation and characterization of tissue-type plasminogen activator transgenic rats.  
Yusuke Ito, Kengo Noguchi, Yoshiyuki Morishima, Kyoji Yamaguchi.  
*J Thromb Thrombolysis*. 45(1), 77-87, (2018).
2. Tissue-type plasminogen activator transgenic rats for evaluating inhibitors of the activated form of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor.  
Yusuke Ito, Kengo Noguchi, Yoshiyuki Morishima, Kyoji Yamaguchi.  
*Blood Coagul Fibrinolysis*. 29(3), 314-321, (2018).
3. A novel porcine model of thrombotic myocardial infarction with cardiac dysfunction sensitive to dual antiplatelet therapy.  
Makoto Mizuno, Yusuke Ito, Atsuhiko Sugidachi.  
*Eur J Pharmacol*. 834, 103-108, (2018).
4. Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is not a major mediator of platelet aggregation, thrombogenesis, haemostasis, and antiplatelet effect of prasugrel in rats.  
Yusuke Ito, Kousaku Ohno, Yuka Morikawa, Atsuyuki Tomizawa, Makoto Mizuno, Atsuhiko Sugidachi.  
*Sci Rep*. 8, 9955 (2018).

## 略語一覽

5HT	5-hydroxytryptamine
5HT2A	5-hydroxytryptamine 2A receptors
95% CI	95% confidence interval
AA	arachidonic acid
AC	adenyl cyclase
ADP	adenosine diphosphate
aPTT	activated partial thromboplastin time
ATIII	antithrombin III
AUC	area under curve
BAC	bacterial artificial chromosome
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CBF	cerebral blood flow
CD61	cluster of differentiation 61
CD62P	cluster of differentiation 62P
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
COX1	cyclooxygenase 1
DAPT	dual anti-platelet therapy
DNA	deoxyribonucleic acid
ECM	extracellular matrix
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EP <sub>3</sub>	prostaglandin E <sub>2</sub> receptor EP <sub>3</sub> subtype
EVG	Elastica van Gieson
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	fluorescein isothiocyanate
FXa	factor Xa
GPIIbIIIa	glycoprotein IIbIIIa
gRNA	guide ribonucleic acid
HE	hematoxylin eosin
HGB	hemoglobin

IC <sub>50</sub>	50% inhibitory concentration
INN	international nonproprietary names
IP	I <sub>2</sub> prostanoid
LCx	left circumflex
LRP-1	lipoprotein receptor related protein-1
LTA	light transmission aggregometry
LVEDV	left ventricular end-diastolic volume
LVEF	left ventricular ejection fraction
LVESV	left ventricular end-systolic volume
MCA	middle cerebral artery
MI	myocardial infarction
mRNA	messenger ribonucleic acid
N/A	not applicable
NO	nitric oxide
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PAR	proteinase-activated receptor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDE	phosphodiesterase
PE	phycoerythrin
PG	prostaglandin
PGE <sub>1</sub>	prostaglandin E <sub>2</sub>
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PIT	photochemically-induced thrombosis
PLC	phospholipase C
PPP	platelet poor plasma
PR	patency rate
PRI	platelet reactivity index
PRP	platelet rich plasma
PSGL1	P-selectin glycoprotein ligand 1
PT	prothrombin time
RBC	red blood cells

RNA	ribonucleic acid
scu-PA	single chain urokinase-type plasminogen activator
SEM	standard error of the mean
SV	stroke volume
TAFI	thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor
TAFIa	activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor
TBS	TRIS buffered saline
TF	tissue factor
Tg	Transgenic
TP	thromboxane prostanoid
t-PA	tissue-type plasminogen activator
TTC	2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride
TTO	time to first occlusion
TXA <sub>2</sub>	thromboxane A <sub>2</sub>
u-PA	urokinase-type plasminogen activator
VASP	vasodilator-stimulated phosphoprotein
VKOR	vitamin K epoxide reductase
vWF	von Willebrand factor
WBC	white blood cells
XL-fibrin	crosslinked-fibrin
α <sub>2</sub> -AP	alpha 2-antiplasmin

## 目次

第一章 緒言 .....	1
第二章 組織型プラスミノゲン活性化因子過剰発現ラットの作製および特性解析 .....	13
第三章 t-PA 過剰発現ラットを用いた TAFIa 阻害化合物の薬効および安全性評価.....	30
第四章 抗血小板薬二剤併用療法に感受性を示す新規なブタ心筋梗塞モデルの確立 .....	40
第五章 ノックアウトラットの作出による血小板凝集・血栓形成・止血およびプラスグレル の抗血小板作用における血管拡張因子刺激リン酸化タンパク質の機能解析 .....	50
第六章 実験材料・方法 .....	66
第七章 総括 .....	82
引用文献 .....	85
発表論文リスト .....	94
謝辞 .....	95

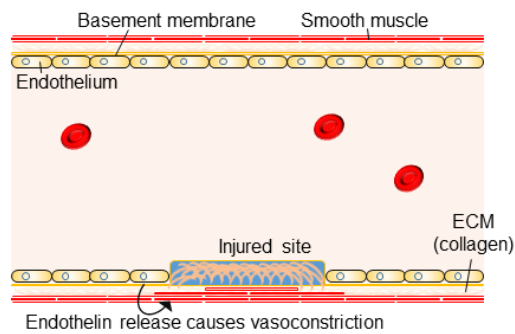
## 第一章 緒言

脳梗塞や急性冠症候群，静脈血栓塞栓症といった血栓に起因する虚血性の疾患を総称して血栓症といい，公衆衛生上の重要課題である．<sup>1-5)</sup> 1990 年から 2013 年にかけて行われた疫学調査によると，上記の血栓症を含む心血管疾患による死亡数は増加している．<sup>4)</sup> 一方で，年齢調整を行うと心血管疾患による死亡率は 1990 年から 2013 年の間に 22% 減少した．<sup>4)</sup> 急性冠症候群を含む虚血性心疾患，更には虚血性および出血性脳梗塞からなる脳血管疾患においても同様の傾向が見られ，これは年齢構成の変化に加え，標準治療の進歩といった要因によるものと考えられる．全死因のうち心血管疾患が占める死亡率こそ減少傾向にあるものの，死亡数そのものは依然として多い．加えて，脳梗塞など一部の疾患については標準治療の恩恵を受けられる患者の割合に限られ，その有効性も不十分であり，心血管疾患の領域には未充足な医療ニーズが多く残されている．

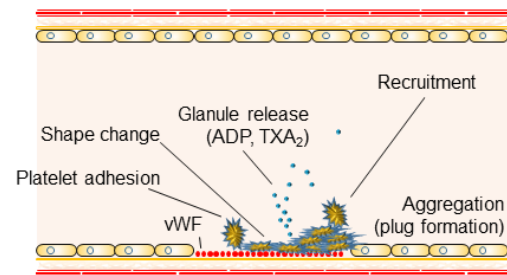
### 止血と血栓

Figure 1 に出血時の止血応答の概略を示す．血液は健常な状態では血管内では凝固せず，血管外に出た際に凝固を開始する．止血においては，血管の傷害に伴って露出したコラーゲンに対して血小板が粘着し，ここに種々のタンパク質や液性因子の刺激が加わることで多数の血小板が活性化し，凝集する．<sup>6)</sup> これを一次止血といい，血小板は止血応答の初期に重要な役割を担っている．一次止血と並行して，血管外組織に発現する組織因子と血液凝固第七因子が相互作用することで血液凝固カスケード (Figure 2) が活性化される．凝固カスケードが活性化した結果，最終産物であるフィブリンが産生され，血液凝固が完了する．<sup>6)</sup> これを二次止血といい，血小板凝集と安定化フィブリンの形成により止血が完了する．止血が完了すると創傷治癒の過程に移行し，同時に止血血栓が虚血を生じることがないように，フィブリンを足場として血栓を溶解する機構が活性化する．<sup>6,7)</sup> これを線維素 (=フィブリン) 溶解系，略して線溶系という (Figure 3)．線溶の主体はセリンプロテアーゼのひとつプラスミンであり，複数段階の酵素反応を経て産生されたプラスミンによってフィブリンが分解されることで線溶反応が完了する．以上，血小板・凝固系・線溶系からなる一連の応答が止血の概略であり，血栓症においてもこれらが重要な役割を果たす．

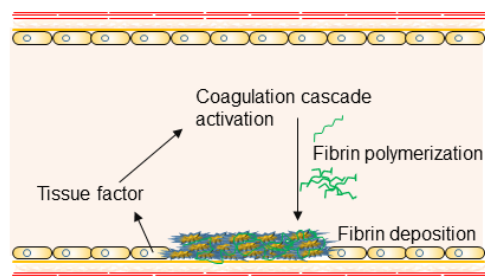
### A. Vasoconstriction



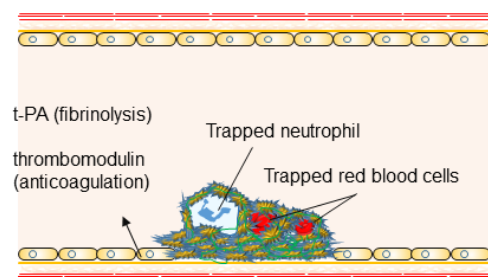
### B. Primary hemostasis



### C. Secondary hemostasis



### D. Thrombus and antithrombotic events



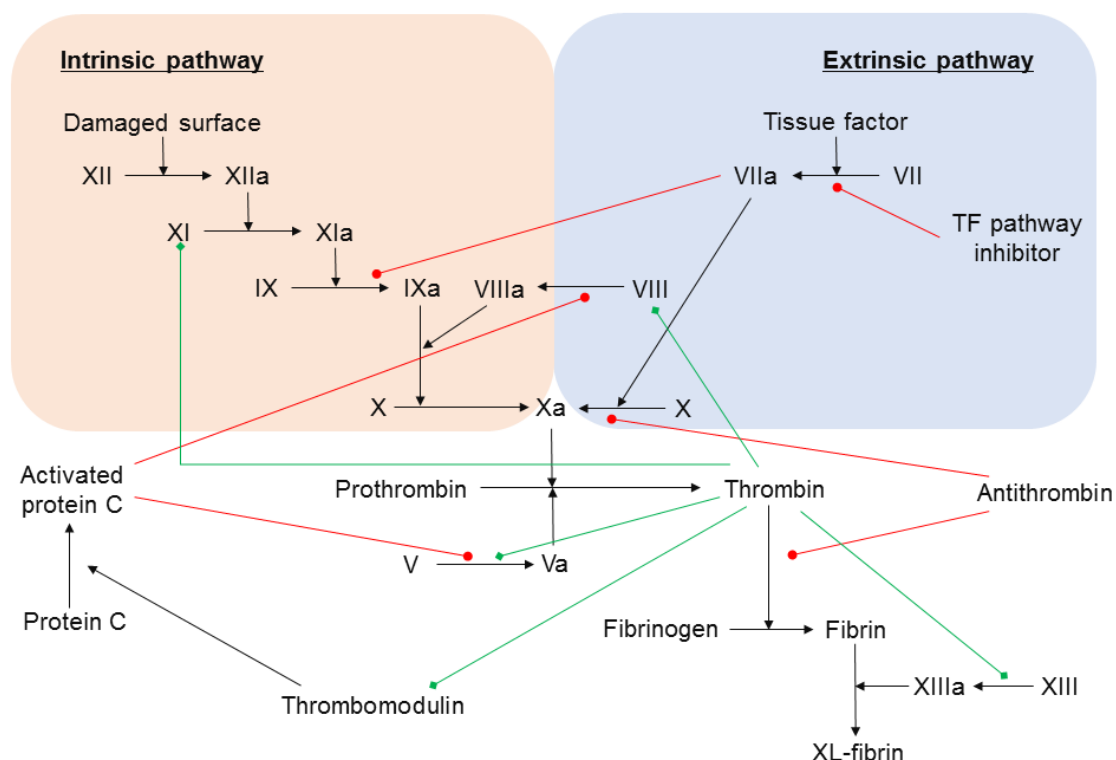
**Figure 1 Illustration of the blood clotting process showing the four main steps of hemostasis**

**(A: vasoconstriction, B. primary hemostasis, C: secondary hemostasis and D: fibrinolysis).**

ADP, adenosine diphosphate; ECM, extracellular matrix; t-PA, tissue-type plasminogen activator; TXA<sub>2</sub>, thromboxane A<sub>2</sub>; vWF, von Willebrand Factor. Illustration was modified from Ref. 6.

血栓形成には 3 つの要因 (血管壁の変化, 血流の変化, 血液成分の変化) が重要とされ, Virchow の三原則として知られる。<sup>8)</sup> 血管壁については, 動脈硬化など血管内腔の病的変化が例として挙げられる。血流については, 生活習慣や姿勢の変化等に起因する局所的かつ慢性的な血流の変化が例として挙げられる。血液成分については, 感染症や肥満などの基礎疾患によって血小板, 凝固, 線溶に参与する成分が変化することが例として挙げられる。Virchow の三原則は, 動脈硬化が心血管疾患のリスク因子であること,<sup>9)</sup> 静脈血栓塞栓症が血流の鬱滞により生じること (エコノミークラス症候群),<sup>10)</sup> 血中脂質レベルが心血管イベントの発症と相関し, 脂質レベルを低下する薬剤がそのリスク低減に繋がること<sup>11)</sup> からも妥当性があると考えられる。

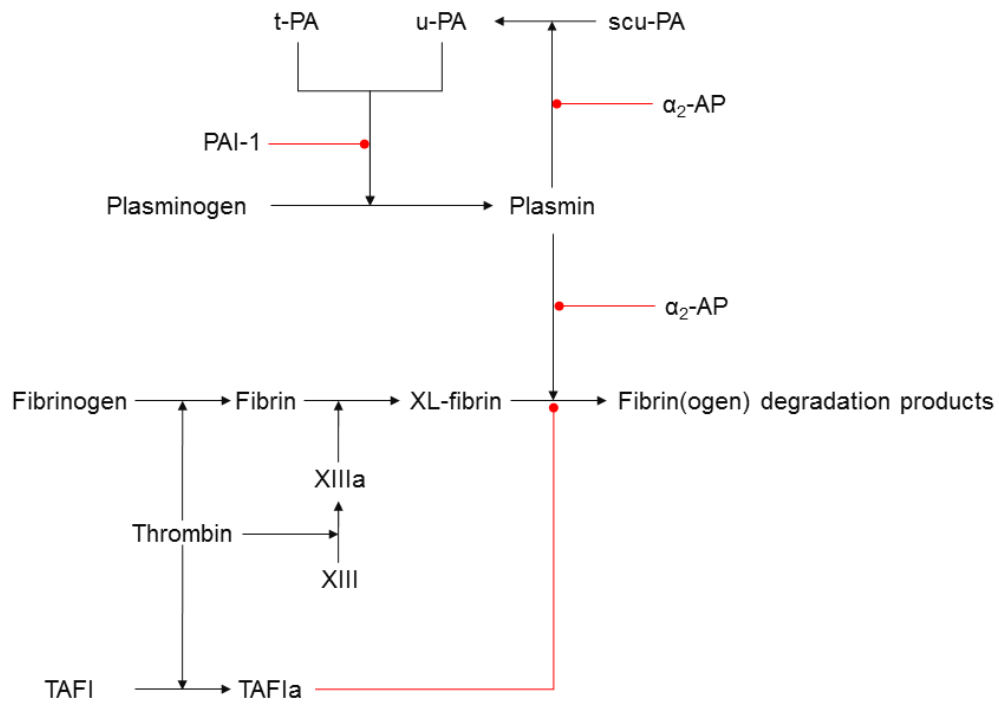




**Figure 2 Schematic representation of the mechanisms of the coagulation cascade.** Red arrows stand for actions that inhibit activations/productions, whereas green arrows have the opposite meaning. Illustration was modified from Ref. 6.

### 血栓症に対する薬物治療

各種血栓症を適応疾患として、血小板・凝固系・線溶系を阻害、あるいは活性化する薬物が創製され、予防および治療に貢献してきた。Table 1 にその実例を示す。それぞれ、血小板の働きを抑える薬剤は抗血小板薬、血液凝固の働きを抑える薬剤は抗凝固薬、線溶系を活性化する薬剤は血栓溶解薬と呼ばれ、これらを総称して抗血栓薬という。抗血小板薬は、血小板の活性化に寄与する酵素あるいは血小板上の受容体を標的とするものが多い (Figure 4)。<sup>12)</sup> 抗凝固薬は、主として血液凝固カスケードを構成するセリンプロテアーゼ (例えば 血液凝固第九因子やトロンビン) を標的とする。血栓溶解薬は、線溶系を活性化するタンパク質そのもの (組織型プラスミノゲン活性化因子, tissue-type plasminogen activator, t-PA) もしくはウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子, urokinase-type plasminogen activator, u-PA) の補充, あるいは線溶を抑制する因子 ( $\alpha_2$ -AP,  $\alpha_2$ -antiplasmin; PAI-1, plasminogen-activator inhibitor-1; TAFIa, activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor) を標的とする。血栓症の未充足な医療ニーズを満たすべく、抗血栓薬の研究開発は現在も進められている。



**Figure 3 Schematic representation of fibrinolysis pathways and endogenous inhibitors. Red arrows stand for actions that inhibit activations/productions.**

$\alpha_2$ -AP,  $\alpha_2$ -antiplasmin; PAI-1, plasminogen-activator inhibitor-1; scu-PA, single chain urokinase-type plasminogen activator; TAFI(a), (activated) thrombin activatable fibrinolysis inhibitor; t-PA, tissue-type plasminogen activator; u-PA, urokinase-type plasminogen activator; XL-fibrin, crosslinked-fibrin.

**Table 1 Example of marketed antithrombotic agents.**

Class of compound	Mechanism of action	INN	Route of administration
Antiplatelets	COX 1 inhibition	Aspirin	per os
		Ozagrel	intravenous
	GPIIb/IIIa inhibition	Abciximab	intravenous
		Eptifibatid	intravenous
		Tirofiban	intravenous
	PDE inhibition	Dipyridamol	per os
		Cilostazol	per os
	P2Y <sub>12</sub> receptor antagonism	Ticlopidine	per os
		Clopidogrel	per os
		Prasugrel	per os
Ticagrelor		per os	

COX 1, cyclooxygenase 1; GPIIb/IIIa, glycoprotein IIb/IIIa; INN, international nonproprietary names; PDE, phosphodiesterase; TXA<sub>2</sub>, thromboxane A<sub>2</sub>.

**Table 1 Example of marketed antithrombotic agents (continued).**

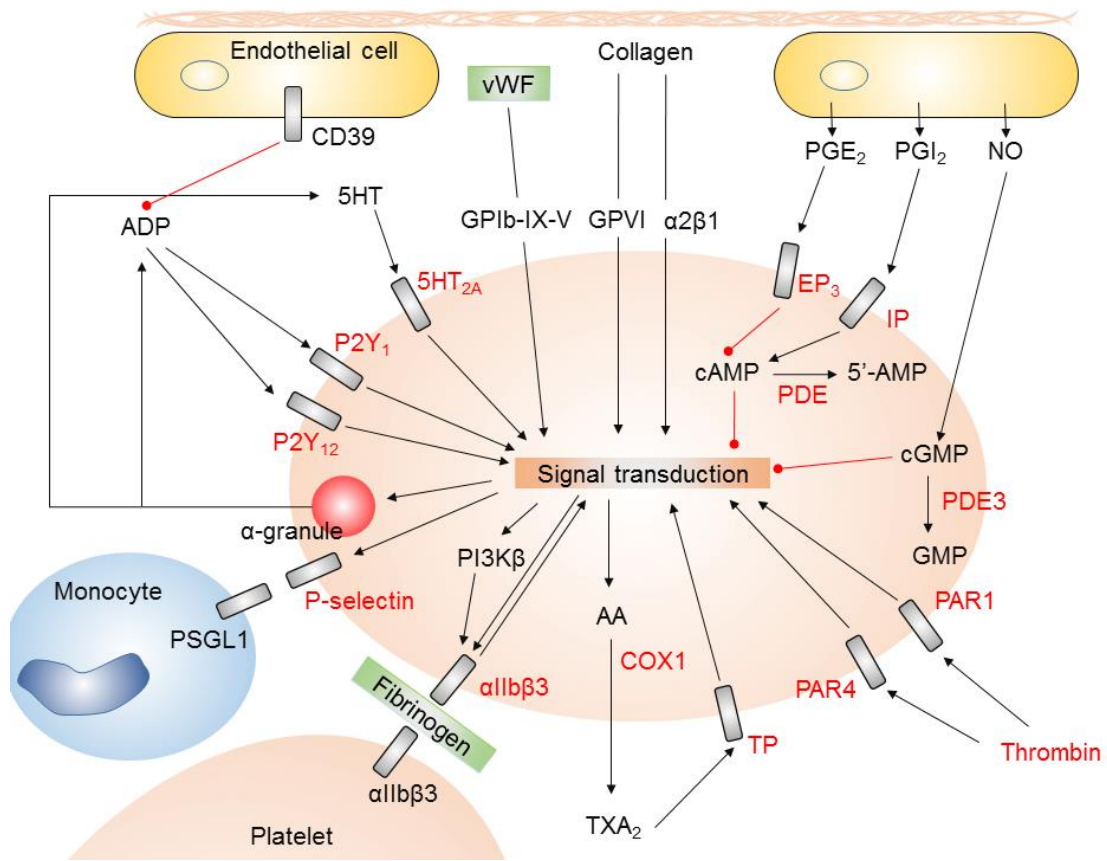
Class of compound	Mechanism of action	INN	Route of administration
Anticoagulants	VKOR inhibition	Warfarin	per os
	ATIII-dependent FXa/thrombin inhibition	Unfractionated heparin	intravenous/subcutaneous
		Dalteparin	subcutaneous
		Enoxaparin	subcutaneous
		Danaparoid	intravenous/subcutaneous
		Fondaparinux	subcutaneous
	Direct thrombin inhibition	Lepirudin	intravenous/subcutaneous
		Bivalirudin	intravenous
		Argatroban	intravenous
		Dabigatran	per os
	Direct FXa inhibition	Rivaroxaban	per os
		Apixaban	per os
		Edoxaban	per os

ATIII, antithrombin III; FXa, coagulation factor Xa; INN, international nonproprietary names; VKOR, vitamin K epoxide reductase.

**Table 1 Example of marketed antithrombotic agents (continued).**

Class of compound	Mechanism of action	INN	Route of administration
Fibrinolytics	u-PA	Urokinase	intravenous
	recombinant t-PA	Alteplase	intravenous
		Monteplase	intravenous
		Pamiteplase	intravenous
		Retepase	intravenous

INN, international nonproprietary names; t-PA, tissue-type plasminogen activator; u-PA, urokinase-type plasminogen activator.



**Figure 4 Platelet function and molecular targets of antiplatelet agents.**

Illustration was modified from Ref. 12.

5HT, 5-hydroxytryptamine; 5HT<sub>2A</sub>, 5-HT 2A receptors; AA, arachidonic acid; ADP, adenosine diphosphate; COX1, cyclooxygenase 1; EP<sub>3</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP<sub>3</sub> subtype; GP, Glycoprotein; IP, I<sub>2</sub> prostanoid; NO, nitric oxide; PAR, proteinase-activated receptor; PDE, phosphodiesterase; PG, prostaglandin; PI3Kβ, phosphoinositide 3-kinase β-isoform; PSGL1, P-selectin glycoprotein ligand 1; TP, thromboxane prostanoid; TXA<sub>2</sub>, thromboxane A<sub>2</sub>; vWF, von Willebrand Factor.

## 抗血栓薬の創薬研究

抗血栓薬の研究開発においては、副作用（出血性合併症）のリスクを低減しながら主作用（抗血栓作用）を発揮する機序および用法用量を見出すことが必須の課題であり、創薬研究においては主として実験動物を用いたモデル系によってその有効性および安全性の評価が行われてきた。<sup>13)</sup> これに加えて、臨床的な未充足医療ニーズを満たしうるかを評価するための疾患モデルの作出、並びに薬剤の特性を正しく理解するための作用機序解析も重要であり、数多くの検討が行われてきた。疾患モデルについては、主としてラットを用いた病態モデルが作出されており、静脈血栓塞栓症、深部静脈血栓症、虚血性脳梗塞などに対する主薬理・安全性評価が薬剤開発に貢献した。<sup>14-16)</sup> さらに、作用機序解析については、近年の分子生物学や遺伝子改変技術の進歩によって旧来不明であった薬剤の標的が明らかにされてきた。<sup>17,18)</sup> しかし、いずれのクラスの抗血栓薬についても、創薬研究によって解決すべき未解決の課題が存在する。

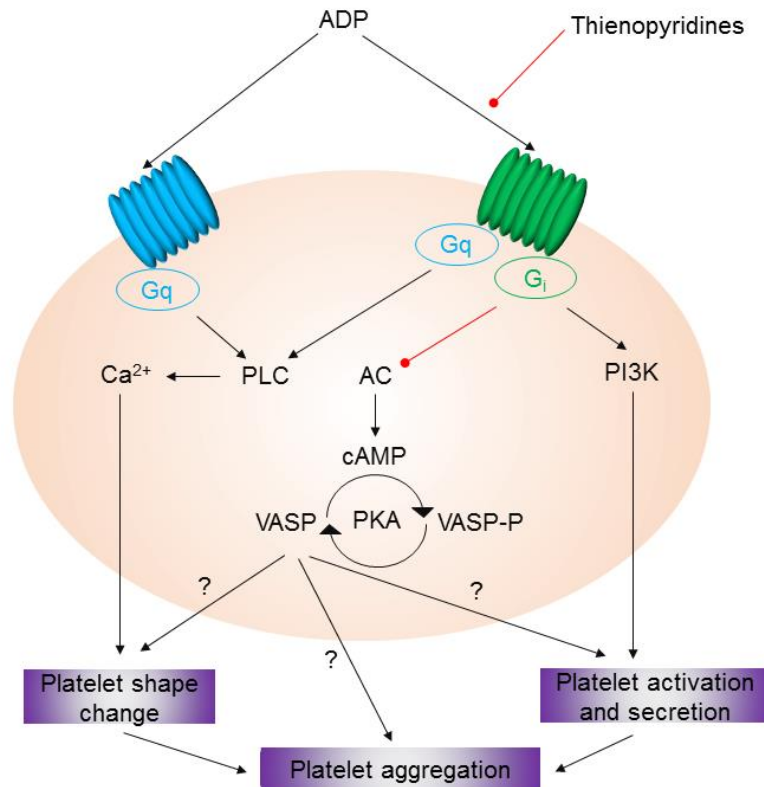
例えば、脳梗塞急性期において、血栓を溶解し脳血流を回復させる目的で血栓溶解薬のひとつヒト組み換え型 t-PA (recombinant t-PA, rt-PA) が医療現場で使用されている<sup>19)</sup> が、この薬剤は発症から 4.5 時間以内かつ特定の基準を満たした患者層にのみ投与が可能であり、恩恵にあずかれない患者が多数存在する。加えて、作用メカニズムの延長線上にある出血リスクが常に付きまとう。そのため、治療可能な患者層を増やすこと、さらに出血リスクを低減することが可能な新規薬剤が望まれている。しかし、これまでのところ rt-PA に続く新規薬剤は上市されていない。その大きな要因のひとつとして、血栓溶解薬を評価するための信頼できる脳梗塞モデル動物がないことが挙げられる。ラット脳梗塞モデルにおける標準治療薬 rt-PA の薬効用量は 10 mg/kg (30 分から 60 分かけて静脈内へ持続投与) であるが、これはヒト臨床用量 (0.6 から 0.9 mg/kg, 60 分かけて静脈内へ持続投与) に比べて非常に高い。<sup>20-22)</sup> このことは、ヒト・ラット間で rt-PA への応答性に種差があることを示している。<sup>23)</sup> rt-PA には線溶促進以外の機序で出血事象に寄与しうる<sup>24-26)</sup> ことが知られており、rt-PA への応答性の種差は安全性や有効性の正確な評価を妨げている可能性がある。ゆえに、脳梗塞病態における rt-PA の応答性をヒトに近づけた動物モデルを製作し、これを活用して rt-PA の出血リスクを低減する薬剤や新規な機序を有する血栓溶解薬を創製することが求められているといえる。

抗血小板薬に関しては、高い安全性と有効性からシクロオキシゲナーゼ 1 阻害薬のひとつ

つアスピリンが長らく使用されてきた。<sup>27,28)</sup> これに加え、新規な機序の抗血小板薬としてチエノピリジン誘導体のひとつチクロピジンが研究開発され、アスピリン抵抗性患者にとって有力な抗血小板薬となった。<sup>29)</sup> のちにその分子標的は Adenosine diphosphate (ADP) 受容体のひとつ P2Y<sub>12</sub> 受容体であることが明らかにされ、<sup>17)</sup> 現在では P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬としてチクロピジンよりも忍容性の高いクロピドグレル、<sup>30,31)</sup> さらに新世代の P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬として薬効発現が早く、薬効発現に個人差が少なく、より強力な抗血小板作用を示すプラスグレル、<sup>32-34)</sup> さらにはチエノピリジン構造を持たないチカグレロル<sup>35,36)</sup> が用いられるようになってきた。これらの薬剤の研究段階での薬理評価においても、主としてマウスあるいはラットを用いた血栓モデルが採用されてきた。しかし、実際の適応疾患である急性冠症候群に対する各種抗血栓薬の作用は、臨床外挿性の高い非臨床の動物モデルで評価されてこなかった。ゆえに、臨床外挿性が高い急性冠症候群を模した動物モデルを確立し、現行治療の作用機序に関する研究や、新規な治療法に関する研究基盤を確立することが課題であるといえる。

P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬については、薬効を反映するバイオマーカーについても薬理的な未解決課題が残っている。抗血小板薬を服用する患者で抗血小板作用をモニターすることは、薬剤の有効性および安全性を把握する上で重要である。抗血小板作用は、薬剤を投与されたヒトの血液から血小板を含む血漿を採取し、ADP などの凝集剤で刺激することで評価可能である<sup>37)</sup> が、この方法では、P2Y<sub>12</sub> 受容体のみならず他の ADP 受容体 (P2Y<sub>1</sub> 受容体など) の寄与が含まれてしまう。<sup>38)</sup> クロピドグレル、プラスグレルおよびチカグレロルといった抗血小板薬は P2Y<sub>12</sub> 受容体に対して選択的に拮抗することが知られている<sup>39-42)</sup> ため、P2Y<sub>12</sub> 受容体シグナルに特異的な拮抗作用を評価する指標として、血管拡張因子刺激リン酸化タンパク質 (Vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP) の定量値を元に算出される血小板反応性指標 (Platelet Reactivity Index, PRI) が用いられている。<sup>43-45)</sup> しかし、P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬の抗血小板作用に対して、VASP が本質的な役割を担っているかについては明らかでない (Figure 5)。VASP のリン酸化を元に算出される PRI は、P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬のサロゲートマーカーとして臨床的に用いられていることから、VASP の生理的・薬理的な意義を解明することは重要な課題といえる。





**Figure 5 ADP-dependent intracellular signaling in platelets.**

Illustration was modified from Ref. 45.

P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> are G-coupled receptors, which utilize ADP as an agonist. P2Y<sub>1</sub> is a Gq-coupled receptor, which initiates ADP-induced platelet aggregation through the stimulation of PLC and phosphatidylinositol-signaling pathway. P2Y<sub>12</sub> is a Gi-coupled 7-transmembrane domain receptor, which mediates platelet activation by inhibiting an AC-mediated signaling pathway and decreasing the cAMP intracellular levels. It also inhibits PI3K and induces Akt kinase activation. The decrease in cAMP intracellular levels reduces the rate of phosphorylation of VASP. Unphosphorylated VASP may induce activation of the GPIIb/IIIa receptor and platelet aggregation. AC, adenylyl cyclase; ADP, adenosine diphosphate; GPIIb/IIIa, glycoprotein IIb/IIIa; PI3K, phosphatidylinositol-3 kinase; PLC, phospholipase C; VASP, vasodilator-stimulated phosphoprotein; VASP-P, vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation.

これらの背景を踏まえ、本研究では、血栓溶解薬および抗血小板薬の薬効薬理・作用機序解析を行う目的で以下の動物モデルを作出した。

- rt-PA に対する用量反応性がヒトに近い急性期脳梗塞モデル
- 急性冠症候群の標準治療薬に感受性を示す心筋梗塞モデル
- P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬の抗血小板作用に対する VASP の寄与を解明する遺伝子改変動物

第二章では、ラット t-PA を内因性のプロモーター下で過剰発現する遺伝子改変ラットを作出し、その特性解析を行った。加えて、脳梗塞モデルにおける rt-PA の用量反応性を遺伝子改変ラットと野生型ラットで比較し、前者での rt-PA 薬効用量がヒトのそれに近いことを明らかにした。

第三章では、第二章で作出した遺伝子改変ラットが、rt-PA とは別の機序によって線溶を促進する TAFIa 阻害化合物の薬理評価において有用であることを明らかにした。

第四章では、実験動物としてブタを用い、急性冠症候群の標準治療である抗血小板薬二剤併用療法に感受性を示す新規な心筋梗塞モデルを作出した。

第五章では、P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬のひとつプラスグレルの抗血小板作用に対して VASP が直接寄与しているかを検証する目的で遺伝子 VASP 欠損ラットを作出し、その役割について検討した。

## 第二章 組織型プラスミノゲン活性化因子過剰発現ラットの作製および特性解析

### 序

組織型プラスミノゲン活性化因子 (t-PA) は血栓を溶解する線溶系に対する内因性の活性化因子である。<sup>7)</sup> ヒト組み換え型 t-PA (rt-PA) は発症から 4.5 時間以内の急性期脳梗塞における標準治療薬であり,<sup>19)</sup> 線溶活性の亢進は血栓性の疾患に対する有効な治療アプローチのひとつである。<sup>46)</sup> 実際, t-PA の変異体,<sup>16,47)</sup> フィブリン分解の主体であるプラスミンの変異体,<sup>48)</sup> 微生物由来の新規化合物群,<sup>49)</sup> および活性型トロンビン活性化線維素溶解阻害因子 (activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, TAFIa) の阻害薬<sup>50-53)</sup> など, 様々な作用機作を持つ血栓溶解薬が研究開発され, そのうち一部は臨床開発の段階にある。しかし, 少なくとも脳梗塞に関しては, これらの新規な血栓溶解薬はヒトにおいて殆ど有効性を示せていない。<sup>54,55)</sup>

その大きな要因のひとつとして, 血栓溶解薬を評価するための信頼できる血栓あるいは脳梗塞モデル動物が少ないことが挙げられる。例えば, ラット脳梗塞モデルにおける標準治療薬 rt-PA の薬効用量は 10 mg/kg (30 分から 60 分かけて静脈内へ持続投与) であるが, これはヒト臨床用量 (0.6 から 0.9 mg/kg, 60 分かけて静脈内へ持続投与) に比べて非常に高い。<sup>20-22)</sup> このことは, ヒト・ラット間で rt-PA への応答性に種差があることを示している。<sup>23)</sup> rt-PA には線溶促進以外にも多様な作用 (血管内皮細胞の低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 1 [lipoprotein receptor related protein-1, LRP-1] を介した細胞内シグナル活性化および血管透過性の亢進<sup>24-26)</sup> など) が知られているため, rt-PA への応答性の種差は, 安全性や有効性の正確な評価を妨げている可能性がある。ゆえに, 脳梗塞病態における rt-PA の応答性をヒトに近づけた動物モデルの作製はこれらの問題解決に寄与しようと考えている。

私は, ヒト・ラット間での rt-PA の応答性の種差を埋めるために, 遺伝子改変を行うことを着想した。線溶関連の遺伝子を改変した報告として, 線溶を抑制する因子 (PAI-1 および  $\alpha_2$ -AP) のノックアウトマウス, 神経細胞特異的な t-PA 過剰発現マウスの報告がある。<sup>56-58)</sup> しかし, これらの動物はいずれも rt-PA のヒトとその他動物間の種差を埋める目的では用いられなかった。加えて, ラットの線溶関連遺伝子を改変したという報告はこれ

までにない。ラットはマウスよりも体が大きく外科手術モデルの作製に適しており，脳梗塞モデルの作出に汎用されることから，私はラット t-PA 遺伝子を過剰発現する遺伝子改変ラットを作出し，脳梗塞モデルにおける rt-PA の用量反応性をヒトに近づけることを試みた。遺伝子改変ラットの作出にあたり，以下のプロファイルを満たすことを目標とした。

- (1) 病態刺激に応答して導入遺伝子が発現する
- (2) t-PA の発現は出血を助長しない水準に留める
- (3) 脳梗塞モデルにおける rt-PA の薬効用量がヒト臨床用量に近い

本章では，上記を満たす t-PA 過剰発現ラットの作出，および野生型ラットとの比較による特性評価（血液学，遺伝子発現，病的刺激に対する応答，凝固線溶マーカー，脳梗塞モデルにおける rt-PA 用量反応性）について述べる。

## 結果

### t-PA Transgenic (Tg) ラットの作出

導入遺伝子の構造およびサザンブロットの典型例を Figure 6 に示す。サザンブロット解析の結果、ゲノム DNA に遺伝子が導入された t-PA Tg ラットが 3 ライン得られた。このうち、最も多くのコピー数で遺伝子が導入されたファウンダーを系統化した。

### 血液学的評価

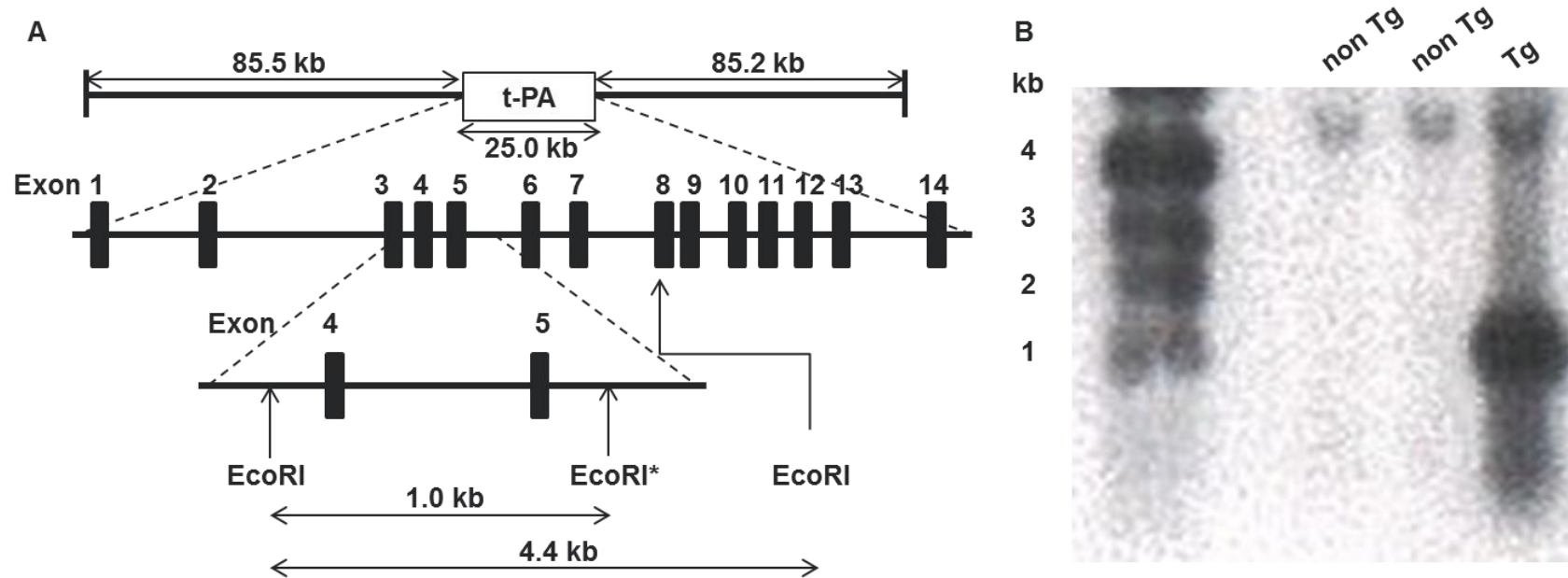
t-PA Tg ラットの血液学的な異常の有無を評価するために血液検査を行った。血液学的評価の結果を Table 2 に示す。t-PA Tg ラットと non Tg ラットの間には有意な差は認めず、t-PA Tg ラットは血液学的には正常であることが判明した。

### 定常状態での t-PA mRNA 発現量

t-PA 遺伝子発現の組織分布は t-PA 遺伝子の導入に依らず保存されているかを評価するために、定常状態での t-PA mRNA 発現量を臓器別に評価した。5 つの主要臓器 (肝臓, 肺, 脳, 腎臓, 心臓) における t-PA mRNA 発現量を Table 3 に示す。t-PA mRNA は t-PA Tg ラットにおいて全ての臓器で有意に増加していた。臓器間での t-PA mRNA 発現量の順序は t-PA 遺伝子導入の有無に関わらず不変 (肝臓 < 肺 < 脳 < 腎臓 < 心臓) であった。

### 永続的な局所脳虚血における脳での t-PA mRNA 発現量

病態刺激下での t-PA mRNA 発現量が、t-PA Tg ラットにおいても non Tg と同様に誘導されるのかを検証するために、脳梗塞モデル作製法のひとつである永続的な局所脳虚血モデルにおける脳での t-PA mRNA 発現量を評価した。ナイロン糸の挿入による虚血処置により、全ての動物の脳血流は処置前の 12.5 から 30.7% の範囲で下降した (data not shown)。脳虚血の翌日における脳 t-PA mRNA 発現量を Figure 7 に示す。t-PA mRNA 発現量は t-PA Tg ラットの虚血側で  $2.00 \pm 0.40$ , 対称側で  $1.19 \pm 0.14$  であり、non Tg ラットでは虚血側で  $0.18 \pm 0.04$ , 対称側で  $0.11 \pm 0.01$  であった。t-PA Tg ラットおよび non Tg ラットのいずれにおいても虚血側で対称側に比べて有意に増加していた。虚血側での発現量を対称側での発現量で除して虚血に伴う t-PA mRNA の誘導率を系統間で比較したところ t-PA Tg ラットでは  $1.81 \pm 0.43$ , non Tg ラットでは  $1.83 \pm 0.66$  であり、両群間に有意な差を認めなかった。



**Figure 6 Analysis of the transgene structure in the genome of the t-PA transgenic rats.**

A: Schematic of transgene constructs and hybridization probe for Southern blot analysis. An EcoRI site (\*) was created in the intron region downstream of Exon 5. B: Southern blot analysis of tail DNA samples of the t-PA Tg rats. Genomic DNA isolated from the tail was digested with EcoRI, electrophoresed through an agarose gel, and transferred to a nylon membrane. The nylon membrane was hybridized to the t-PA probe to detect the 1.0 kb (transgene) and 4.4 kb (endogenous gene) restriction fragments.

**Table 2 Hematological characterization in the t-PA Tg and the non Tg rats.**

Parameter	non Tg		Tg		P value
	Mean	SEM	Mean	SEM	
RBC ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	694.9	$\pm$ 6.3	693.6	$\pm$ 5.0	0.8790
HGB (g/dL)	13.1	$\pm$ 0.1	12.8	$\pm$ 0.1	0.1311
Hematocrit (%)	36.9	$\pm$ 0.4	36.5	$\pm$ 0.4	0.5192
Platelet ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	846.3	$\pm$ 13.0	840.0	$\pm$ 18.0	0.7759
WBC ( $\times 10/\mu\text{L}$ )	410.2	$\pm$ 26.9	374.0	$\pm$ 25.5	0.3474
Neutrophil ( $\times 10/\mu\text{L}$ )	59.7	$\pm$ 6.5	58.1	$\pm$ 3.4	0.8427
Lymphocyte ( $\times 10/\mu\text{L}$ )	333.8	$\pm$ 23.6	300.5	$\pm$ 24.4	0.3437
Monocyte ( $\times 10/\mu\text{L}$ )	11.4	$\pm$ 1.7	9.4	$\pm$ 1.1	0.3262
Eosinophil ( $\times 10/\mu\text{L}$ )	5.3	$\pm$ 0.7	6.0	$\pm$ 0.4	0.4356
Basophil ( $\times 10/\mu\text{L}$ )	0.0	$\pm$ 0.0	0.0	$\pm$ 0.0	N/A

Citrated whole blood was analyzed with an automated hematology analyzer. Data represent means  $\pm$  SEM (n = 8 or 9). Statistical analyses were carried out by a Student *t*-test. A *P* < 0.05 was regarded as statistically significant. RBC, red blood cells; HGB, hemoglobin; WBC, white blood cells; N/A, not applicable.

**Table 3 t-PA mRNA abundance in the t-PA Tg and the non Tg rats.**

Organ	non Tg		Tg		<i>P</i> value
	Mean	SEM	Mean	SEM	
Liver	1.00	± 0.05	11.73	± 0.71	<0.0001
Lung	5.54	± 0.28	28.76	± 3.10	0.0003
Brain	6.02	± 0.53	36.97	± 3.08	<0.0001
Kidney	10.79	± 0.94	77.84	± 7.53	<0.0001
Heart	12.41	± 1.68	89.62	± 4.67	<0.0001

t-PA mRNA abundance of five organs (liver, lung, brain, kidney, and heart) was examined by quantitative PCR. The abundance was normalized with that of  $\beta$ -actin. The mRNA abundance was summarized as relative abundance of non Tg whose liver t-PA mRNA expression was arbitrarily set to 1. Data represent means  $\pm$  SEM (n = 4). Statistical analyses were carried out by a Student *t*-test. A *P* < 0.05 was regarded as statistically significant.





#### 凝固線溶パラメーター

定常状態での血中 t-PA 濃度および凝固線溶パラメーターを測定するため、血漿もしくは血清の分析を行った。凝固線溶パラメーターの測定結果を Table 4 に示す。血漿中 t-PA 濃度は t-PA Tg ラットで  $0.229 \pm 0.031$  ng/mL, non Tg ラットでは  $0.088 \pm 0.009$  ng/mL であり, t-PA Tg ラットで有意に高値を示した ( $P = 0.0004$ )。血清中遊離 PAI-1 濃度は t-PA Tg ラットで  $625.9 \pm 33.9$  pg/mL, non Tg ラットで  $1395.8 \pm 51.8$  pg/mL であり, t-PA Tg ラットで有意に低値を示した ( $P < 0.0001$ )。内因系凝固の活性を反映する activated partial thromboplastin time (aPTT) は t-PA Tg ラットで  $18.1 \pm 0.4$  秒, non Tg ラットで  $19.5 \pm 0.4$  秒であり, t-PA Tg ラットで有意に低値を示した ( $P = 0.0330$ )。一方, その他の評価項目 (prothrombin time [PT], 血漿中  $\alpha_2$ -AP 活性, 血清中プラスミノゲン濃度, 血清中フィブリノーゲン濃度) には両群間に統計学的な有意な差を認めなかった。

#### 出血時間

t-PA 遺伝子の導入が止血機能に影響したかを評価するために, 尾出血モデルを用いて出血時間を測定した。尾出血時間の測定結果を Figure 8 に示す。尾出血時間は t-PA Tg ラットで  $255 \pm 44$  秒, non Tg ラットでは  $244 \pm 32$  秒であり, 両群間で有意な差を認めなかった。

#### 組織因子 (Tissue factor, TF) により誘導した過凝固モデル

t-PA 遺伝子の導入により線溶活性が亢進したかを評価する目的で, TF により誘導した過凝固モデルにおける血漿中の D-Dimer (フィブリン分解産物) 濃度を測定した。TF 負荷したラットにおける血漿中 D-Dimer 濃度の経時変化を Figure 9 に示す。TF 負荷開始から 45 分の時点において, 血漿中 D-Dimer 濃度は non Tg ラットに比べて t-PA Tg ラットで有意に高値を示した。それ以外の時点では, 両群間の血漿中 D-Dimer 濃度に有意な差を認めなかった。

#### 血栓性脳梗塞モデルにおける rt-PA の用量反応性

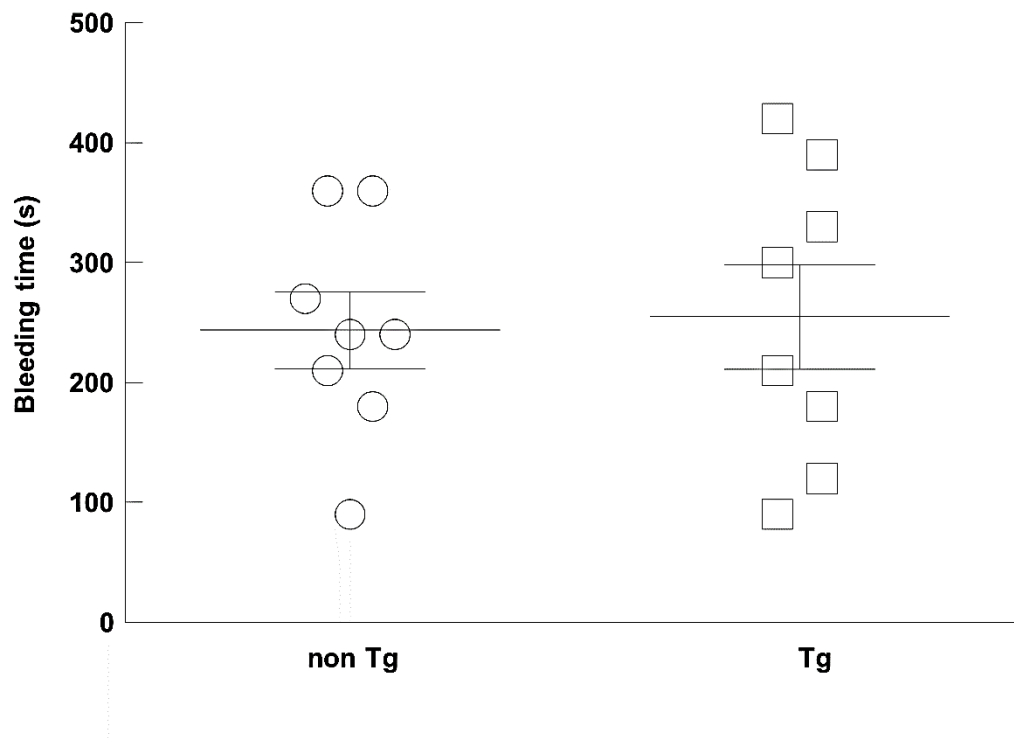
血栓性脳梗塞モデルにおける脳血流の経時変化およびその曲線下面積 (Area Under Curve, AUC, 0 分から 110 分, 単位 %  $\cdot$  min) を Figure 10 に示す。non Tg ラットにおける脳血流の AUC は vehicle 群で  $2491.5 \pm 291.3$ , rt-PA 1 mg/kg 群で  $3062.9 \pm 957.9$ , rt-PA 10 mg/kg 群で  $4430.4 \pm 1707.7$  であり, いずれの rt-PA 用量も, 脳血流の AUC を有意に増

加させなかった。一方，t-PATg ラットにおける脳血流の AUC は vehicle 群で  $2862.6 \pm 461.5$ ，rt-PA 1 mg/kg 群で  $5397.8 \pm 868.2$  ( $P = 0.0402$ )，rt-PA 10 mg/kg 群で  $7614.1 \pm 1060.6$  ( $P = 0.0005$ ) であり，いずれの rt-PA 用量も，脳血流の AUC を有意に増加させた。本実験において，t-PATg ラットで全血塊の注入直後に 1 例瀕死に陥った。本実験の死亡率は t-PATg ラットで 3.22%，non Tg ラットでは 0% であった。

**Table 4 Coagulation and fibrinolytic parameters of the t-PA transgenic rats.**

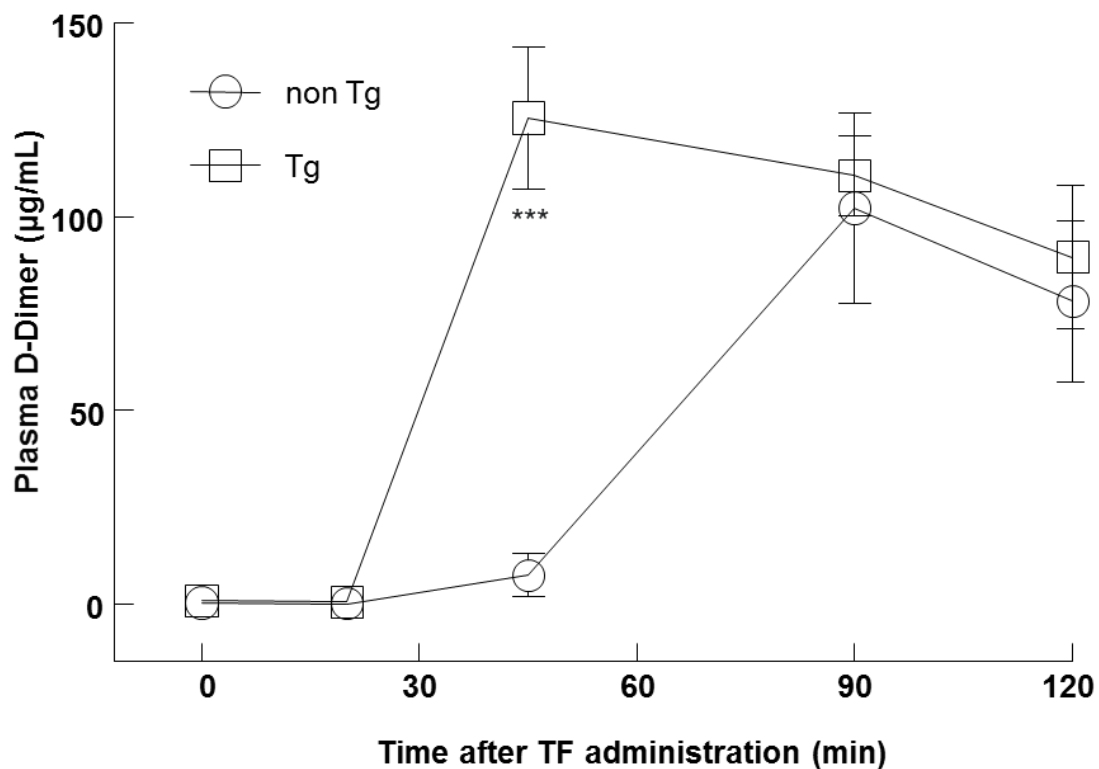
Parameter	non Tg		Tg		P value
	Mean	SEM	Mean	SEM	
PT (s)	23.3	± 0.3	23.8	± 0.5	0.3892
aPTT (s)	19.5	± 0.4	18.1	± 0.4	0.0330
Plasma t-PA (ng/mL)	0.088	± 0.009	0.229	± 0.031	0.0004
Serum free PAI-1 (pg/mL)	1395.8	± 51.8	625.9	± 33.9	<0.0001
Plasma $\alpha_2$ -AP activity (%)	183.7	± 19.7	162.5	± 6.2	0.3440
Serum plasminogen ( $\mu$ g/mL)	475.7	± 22.6	464.9	± 21.0	0.7327
Plasma fibrinogen (mg/dL)	283.2	± 7.0	278.2	± 3.5	0.5519

Serum plasminogen, serum free PAI-1, plasma t-PA concentration, and  $\alpha_2$ -PI activity were determined with commercially available kits. PT, aPTT, and plasma fibrinogen were determined using an automated coagulometric analyzer. Data represent means  $\pm$  SEM (n = 8 or 9). Statistical analyses were carried out by a Student *t*-test. A *P* < 0.05 was regarded as statistically significant. PT, prothrombin time; aPTT, activated partial thromboplastin time; t-PA, tissue-type plasminogen activator; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1;  $\alpha_2$ -AP,  $\alpha_2$ -antiplasmin.



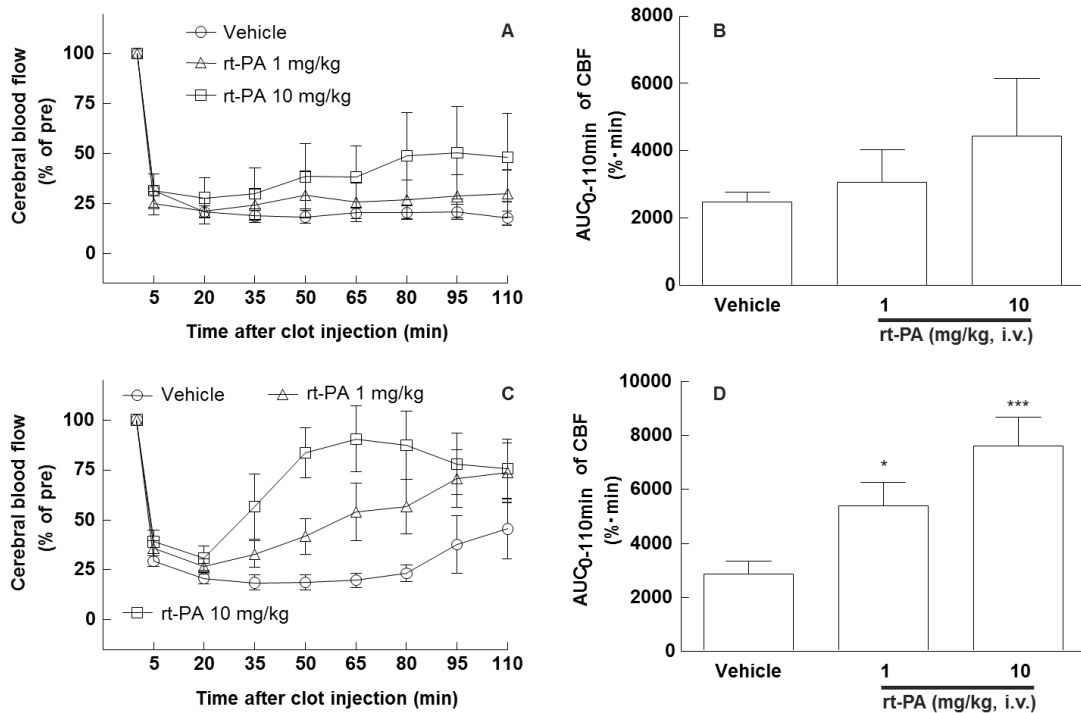
**Figure 8 Bleeding profile of the t-PA Tg rats in a tail bleeding model.**

Rats were anesthetized with thiopental sodium. An incision (1 mm in depth) was made on the artery of the ventral part of the tail at 4 cm from the tip, and the blood was blotted every 30 s with filter papers to measure bleeding time. Data represent means  $\pm$  SEM (n = 8) with individual plots.



**Figure 9 Profibrinolytic response of the t-PA Tg rats in a tissue factor-induced thromboembolic model.**

Recombinant tissue factor (TF) was intravenously administered via the jugular vein using an infusion pump at a rate of 7.5 ml/kg/h for 20 min. Blood was collected from the jugular vein into a syringe containing 10 vol% of 3.13 wt% sodium citrate at 0 (before) and 20, 45, 90, and 120 min after the TF administration. Plasma D-Dimer levels were determined as the biomarker of fibrinolysis. Data represent means  $\pm$  SEM (n = 3 or 4). Statistical analyses were carried out by a Student *t*-test. A  $P < 0.05$  was regarded as statistically significant. \*\*\*:  $P = 0.0009$  compared with the non Tg rats.



**Figure 10 Comparison of dose response against rt-PA between the t-PA Tg rats and the non Tg rats in a thromboembolic stroke model.**

Rat whole blood was coagulated in PE50 tubes using recombinant tissue factor to prepare whole blood clot. A piece of clot (2 cm in length) was injected into the middle cerebral artery (MCA) of an anesthetized rat. rt-PA (1 or 10 mg/kg) or its vehicle (saline) was intravenously administered as a bolus (1/10 vol.) followed by infusion (9/10 vol.) for an hour. Blood flow of the MCA was monitored with a laser Doppler flowmeter for 110 min after the clot injection and expressed as percentage of mean cerebral blood flow (CBF) against CBF before embolization (A for the non Tg rats and C for the t-PA Tg rats). AUC<sub>0-110min</sub> of the CBF was also calculated (B for the non Tg rats and D for the t-PA Tg rats). Data represents means  $\pm$  SEM (n = 5 - 12). \*:  $P = 0.0402$ , \*\*\*:  $P = 0.0005$  compared with vehicle.

## 考察

本章では、脳梗塞急性期の標準治療薬である rt-PA のラットとヒトの応答性に関する種差を埋める目的で、ラット t-PA 遺伝子を導入した遺伝子改変ラットを作出した。遺伝子改変ラットの作出にあたり、以下のプロファイルを満たすことを目標とし、non Tg ラットとの比較解析によって目標とするラットを作出できたか評価した。

- (1) 病態刺激に応答して導入遺伝子が発現する
- (2) t-PA の発現は出血を助長しない水準に留める
- (3) 脳梗塞モデルにおける rt-PA の薬効用量がヒト臨床用量に近い

まず、導入したラット t-PA 遺伝子が病態刺激に応答して発現していたか考察する。私は、bacterial artificial chromosome (BAC) クローンと Red/ET 系<sup>59)</sup> を利用して、ラット t-PA 遺伝子を内因性の転写ユニットごと導入することで、病態生理的な刺激への応答を維持したまま t-PA 遺伝子の発現を増強したラットが作出できるのではと考えた。組換え BAC クローンのマイクロインジェクションにより、ゲノム DNA に t-PA 遺伝子が導入されたファウンダーの作出に成功したことをサザンブロット解析により確認できた。血液学的な所見は野生型と同等であり、遺伝子導入による血液学的な異常は無いと判断した。5つの主要臓器（肝臓<肺<脳<腎臓<心臓）における t-PA mRNA 遺伝子発現量は t-PA Tg ラットで有意に増加していたが、発現強度を臓器順に並べた際の序列は non Tg と同じであり、内因性のプロモーターによって遺伝子発現が制御されていることが示唆された。病態刺激に応答して、t-PA Tg ラットで non Tg ラットと同様の t-PA mRNA 発現が誘導されるかを検証するために、永続的な局所脳虚血モデルを作製し、虚血側での t-PA mRNA 発現量を対称側での t-PA mRNA 発現量で除し、誘導率を算出した。t-PA mRNA 発現量そのものは t-PA Tg ラットで高値であったが、対称側に対する虚血側での t-PA mRNA 発現量の誘導率は両系統間で同等であった。これらの結果から、導入した t-PA 遺伝子が病態刺激によって野生型と同様に誘導されることが示唆された。

今回、BAC を用いた遺伝子組み換えを採用した。これには、構成的な遺伝子発現の誘導が可能とされるプロモーターとエクソンのみを含む短いコンストラクトを利用した従来型の遺伝子導入に比べて、ポジション効果の低減、mRNA サーベイランスの回避など、いくつかの利点があると考えられている。<sup>60)</sup> 実際、BAC 遺伝子導入により、外来遺伝子を



内因性の遺伝子発現プロファイルに近い形で発現可能であるとの報告もある。<sup>61)</sup> これらの報告は今回作出したラットで見られた特性とも合致しており、BAC を用いた遺伝子導入がラットにおいても有用な手法であることを示唆している。

次に、ラット t-PA 遺伝子の導入により、t-PATg ラットが正常な止血機構を維持できたか考察する。凝固線溶パラメーターを測定した結果、血漿中 t-PA 濃度は t-PATg ラットで有意に高い一方、線溶を抑制する因子のひとつ PAI-1 (遊離型) の血清中濃度は t-PATg ラットで有意に低値を示した。このことから、定常状態における t-PA 発現量は増強されていることが示唆された。他方、 $\alpha_2$ -AP 活性、血清中プラスミノゲン濃度、血漿中フィブリノーゲン濃度には両系統間で有意な差を認めなかったことから、t-PATg ラットにおいて定常状態に発現し血中に分泌されている t-PA は遊離型 PAI-1 によって捕捉されており、フィブリン分解の主体であるプラスミン産生には至っていないことが示唆された。実際に尾出血時間を評価してみると、t-PATg ラットと non Tg ラットで出血時間は同等であった。これらの結果を踏まえると、今回作出した t-PATg ラットは定常状態で t-PA を過剰発現しているにもかかわらず線溶系の過剰な亢進はなく、正常な止血機能を維持していることが示唆された。

t-PATg ラットは正常な止血機能を維持していることが判明したが、血栓性の刺激を負荷した際に線溶活性がどのような挙動を示すかは明らかでない。PAI-1 あるいは  $\alpha_2$ -AP 欠損マウスは出血傾向を示さないが、大腸菌の外膜を構成するリポ多糖あるいはフィブリン血栓による負荷を受けると野生型に比べて軽度に線溶活性が亢進することが報告されている。<sup>56,57)</sup> そこで本研究では、TF をラットに持続投与することで過凝固状態を惹起し、血漿中のフィブリン分解産物である D-Dimer 濃度を経時的に測定することで、t-PATg ラットが血栓性の刺激に対して軽度な線溶活性の亢進を示すか検討した。その結果、TF 刺激開始から 45 分という 1 時点のみであるが、non Tg ラットに比べて有意に高い血漿中 D-Dimer 濃度を示した。t-PATg ラットが血栓性の刺激下でマイルドな線溶活性を示すことを明らかにしたのと同時に、ラット脳梗塞モデルにおける rt-PA の用量反応性がヒトのそれに近づくか、t-PATg ラットを用いて検討する価値があると判断した。

最後に、t-PATg ラットを血栓性脳梗塞モデル実験に用いることで、rt-PA の薬効用量がヒト臨床用量 (0.6 から 0.9 mg/kg) に近づいたか考察する。rt-PA 1, 10 mg/kg の静脈内へ

の持続投与により、t-PA Tg ラットの脳血流は用量依存的かつ統計学的に有意に脳血流の AUC を改善した。一方、non Tg ラットではいずれの用量の rt-PA も脳血流を有意に改善しなかった。t-PA Tg ラットにおいて、rt-PA は 1 mg/kg の用量で有意な脳血流の改善を示したことから、t-PA Tg ラットの rt-PA に対する応答性はヒトのそれに近いと考えた。non Tg ラットとの違いは、定常状態での t-PA 発現量および血中濃度の違いや虚血に伴う t-PA 発現の誘導など、複合的な要因に依ると考えた。これらに加え、実験に用いた全血塊の物性・組織学的な違いや、rt-PA の血中での動態が両系統間で異なる可能性を考慮する必要がある。全血塊の物性および組織学的な違いについては不明であるが、薬物動態の影響については既知の情報から考察できる。rt-PA のラットでの血中半減期は  $\alpha$  相が 1.18 分、 $\beta$  相が 5.34 分と短く、肝臓に発現するマンノース受容体および LRP-1 を介して排泄されることが報告されている。<sup>62)</sup> この薬物動態面での知見は  $\mu\text{g/mL}$  オーダーの血中暴露下での知見であるのに対して、今回測定したラット血漿中の t-PA 濃度は  $\text{ng/mL}$  オーダーである。この濃度差を考慮すると、内在性の t-PA 濃度の差が rt-PA の薬物動態に影響を及ぼすとは考えにくく、影響は皆無、もしくはあったとしても軽微と考えている。本章の研究を通して、今回作出した t-PA Tg ラットは rt-PA に対する応答性のヒト・ラット間での種差を埋めうる有用なツールとなることを明らかにした。

実験上のリミテーションについて述べる。まず、今回作出した t-PA Tg ラットについて、コピー数の違いがラットの特性に及ぼす影響は評価しなかった。それゆえ、rt-PA に対する応答性をヒトに近づけたラットを作製するにあたって、今回選択したファウンダーよりも適したコピー数が存在する可能性がある。次に、rt-PA の投与タイミングである。今回は、全血塊を注入した 5 分後から rt-PA を投与開始している。これは、臨床的な治療時間窓（発症から 4.5 時間以内）と比較して短い。今回の実験条件では、虚血前後で脳血流を測定しており、脳血流の低下を確認したあとから rt-PA を投与しており、治療介入を模したモデルと考えている。ゆえに、このモデルを改変した治療時間窓の検討はより有用な情報を与える可能性がある。

## 結論

t-PA 遺伝子を内因性のプロモーター下で過剰発現する遺伝子改変ラットを作出した。このラットは、病的刺激に対して野生型と同様の t-PA 遺伝子発現プロファイルを示し、かつ出血性は呈さなかった。t-PA Tg ラットを用いた血栓性脳梗塞モデルでの rt-PA の薬効用量は 1 mg/kg であり、ヒト臨床用量に近かった。t-PA Tg ラットの報告はこれまでになく、rt-PA の有効性、安全性の評価において有用であることが期待される。これに加え、t-PA やプラスミンの変異体、微生物由来の新規化合物群や TAFIa 阻害化合物など、様々な血栓溶解薬の薬効薬理研究への応用が期待される。

### 第三章 t-PA 過剰発現ラットを用いた TAFIa 阻害化合物の薬効および安全性評価

#### 序

脳梗塞や急性冠症候群，静脈血栓塞栓症といった血栓塞栓性の疾患は世界的な公衆衛生上の課題である。<sup>1-5)</sup> これらの疾患に対して，抗血小板薬，抗凝固薬，血栓溶解薬といった薬物療法が予防あるいは治療的に用いられている．これらを抗血栓薬の研究開発においては，有効性（抗血栓作用が高いこと）と安全性（出血性合併症のリスクが低いこと）を両立させることが重要な解決課題である．

TAFI は肝臓で産生される塩基性カルボキシペプチダーゼのひとつであり，チモーゲンとして分泌される。<sup>63)</sup> TAFI は血中のトロンビン，トロンビン・トロンボモジュリン複合体およびプラスミンといったプロテアーゼによって活性型の TAFIa となり，血栓のフィブリン分子の C 末端に存在するリジン残基を切断する．C 末端のリジン残基はプラスミノゲンと t-PA が相互作用する際の補因子として機能するため，TAFIa はプラスミンの産生並びにフィブリン分解を抑制する線溶阻害因子といえる。<sup>64)</sup> 血中 TAFI 濃度は急性期脳梗塞および深部静脈血栓塞栓症の患者で高値を示すことから，TAFIa が各種血栓症の臨床的な転帰に関与することが示唆されている。<sup>65-67)</sup> 加えて，血栓モデル動物を用いた非臨床研究において，TAFIa 阻害化合物と少量の rt-PA を併用することにより出血リスクを低減しつつ，抗血栓作用を示せることも報告されている。<sup>8, 10)</sup> rt-PA よりも出血リスクが低いという TAFIa 阻害化合物の興味深い特性は，次のような機序で理解されている．フィブリン C 末端のリジン残基を補因子として産生されたプラスミンは，血中に豊富に存在する  $\alpha_2$ -AP による中和を受けない．一方，フィブリン C 末端リジンを介さず液相で産生されたプラスミンは，血中の  $\alpha_2$ -AP により即時に中和される．それゆえ，rt-PA 単独で誘導された線溶反応は非効率的なフィブリン分解に繋がらうる．加えて，rt-PA による液相での過剰なプラスミン産生はフィブリノーゲンの分解を引き起こし，出血事象に繋がらうる．以上を踏まえ，TAFIa 阻害化合物は出血リスクの低い新世代の血栓溶解薬になりうると考えられている。<sup>68-70)</sup>

TAFIa 阻害化合物の薬理評価においては，無作用量の rt-PA の補充なしには血栓モデル動物で有効性を示さない場合があることが報告されており，<sup>8, 10, 11, 68, 71, 72)</sup> 化合物評価の妨

げとなっている。加えて、血栓モデル動物は外科手術で作出する場合が多く、一般にはラットを用いることが多い。第二章にて新規に作出した t-PA Tg ラット<sup>73)</sup> は、内因性のプロモーターの制御下でラット t-PA を過剰発現することから、TAFIa 阻害化合物の in vivo スクリーニング並びに特性理解にも応用できる可能性がある。

被験物質として選択的な TAFIa 化合物のひとつ potato tuber carboxypeptidase inhibitor (PCI)<sup>8, 74, 75)</sup> を使用し、本章では、薬効評価の動物として t-PA Tg ラットを用いることで TAFIa 阻害化合物による線溶促進活性を簡便に評価可能であること、外因性の rt-PA の補充なしに静脈および動脈血栓モデルにおいて TAFIa 阻害化合物が抗血栓作用を示せること、さらに、rt-PA に比べて TAFIa 阻害化合物は出血リスクが低いことを示す。

## 結果

### TFにより誘導した過凝固モデルにおける PCI の作用

t-PA Tg ラットおよび non Tg ラットに PCI を投与した際の線溶促進活性を評価するために、TF により誘導したラット過凝固モデルを用いた。血漿中 D-Dimer 濃度に対する PCI の作用を Figure 11 に示す。non Tg ラットでは、TF 負荷開始から 20 分後の時点では、いずれの用量の PCI を投与した際も血漿中 D-Dimer 濃度の有意な上昇を認めなかった。一方、t-PA Tg ラットでは、PCI 1 もしくは 10 mg/kg 投与群で、vehicle 投与群と比較して血漿中 D-Dimer が用量依存的 ( $P < 0.0001$ ) かつ有意に高値を示した (それぞれ  $P = 0.0040, 0.0069$ )。

### 塩化第二鉄により誘導した深部静脈血栓モデルにおける PCI の作用

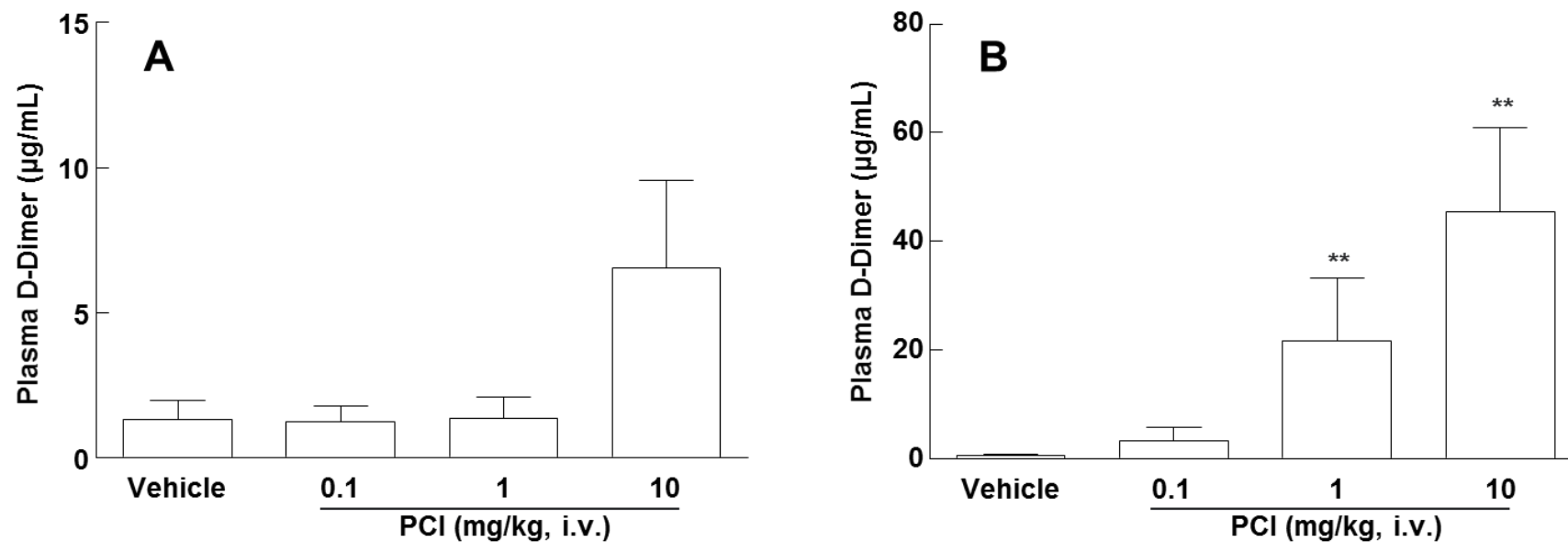
塩化第二鉄により誘導した深部静脈血栓モデルにおける PCI の抗血栓作用を Figure 12 に示す。non Tg ラットでは、TF 負荷開始から 20 分後の時点では、いずれの用量の PCI を投与した際も血栓湿重量の有意な減少を認めなかった。一方、t-PA Tg ラットでは、PCI 1 もしくは 10 mg/kg 投与群で、vehicle 投与群と比較して血栓湿重量の用量依存的 ( $P < 0.0001$ ) かつ有意な減少を認めた (すべて  $P = 0.0247$ )。

### 塩化第二鉄により誘導した動脈血栓モデルにおける PCI の作用

塩化第二鉄により誘導した動脈血栓モデルにおける PCI の抗血栓作用を Figure 13 に示す。non Tg ラットでは、TF 負荷開始から 20 分後の時点では、いずれの用量の PCI を投与した際も血栓湿重量の有意な減少を認めなかった。一方、t-PA Tg ラットでは、PCI 0.1, 1 もしくは 10 mg/kg 投与群で、vehicle 投与群と比較して血栓湿重量の用量依存的 ( $P = 0.0002$ ) かつ有意な減少を認めた (すべて  $P = 0.0247$ )。

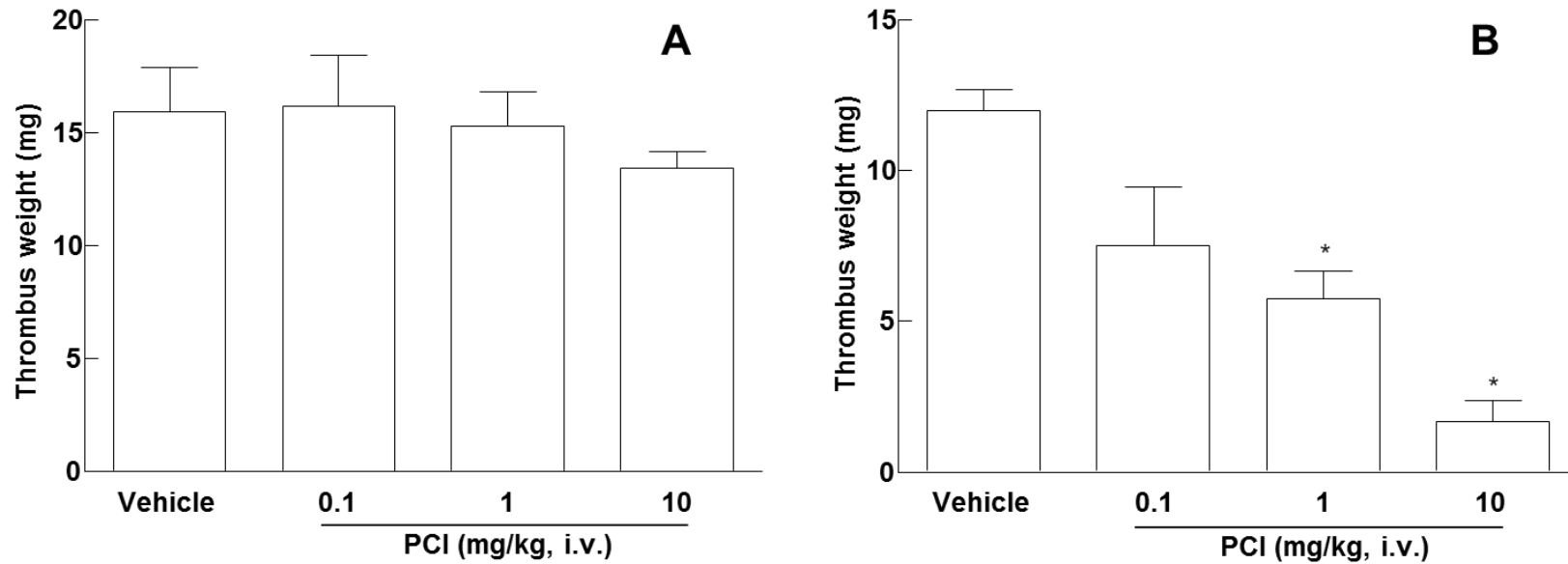
### 尾出血モデルにおける PCI の作用

尾出血モデルにおける出血時間に対する PCI (0.1, 1, 10 mg/kg) および rt-PA (1, 10 mg/kg) の作用を t-PA Tg ラットと non Tg ラットを用いて比較した結果を Figure 14 に示す。いずれの系統においても、vehicle 群と比較して、PCI 0.1, 1, 10 mg/kg および rt-PA 1 mg/kg 投与群では統計学的に有意な出血時間の延長を認めなかった。一方、rt-PA 10 mg/kg 投与群では、vehicle 群と比較して統計学的に有意な出血時間の延長が認められた (non Tg ラットで  $P = 0.0153$ , t-PA Tg ラットで  $P = 0.0168$ )。



**Figure 11 Comparison of the effect of PCI on plasma D-Dimer levels between t-PA Tg and non-Tg rats in a TF-induced venous thromboembolism model.**

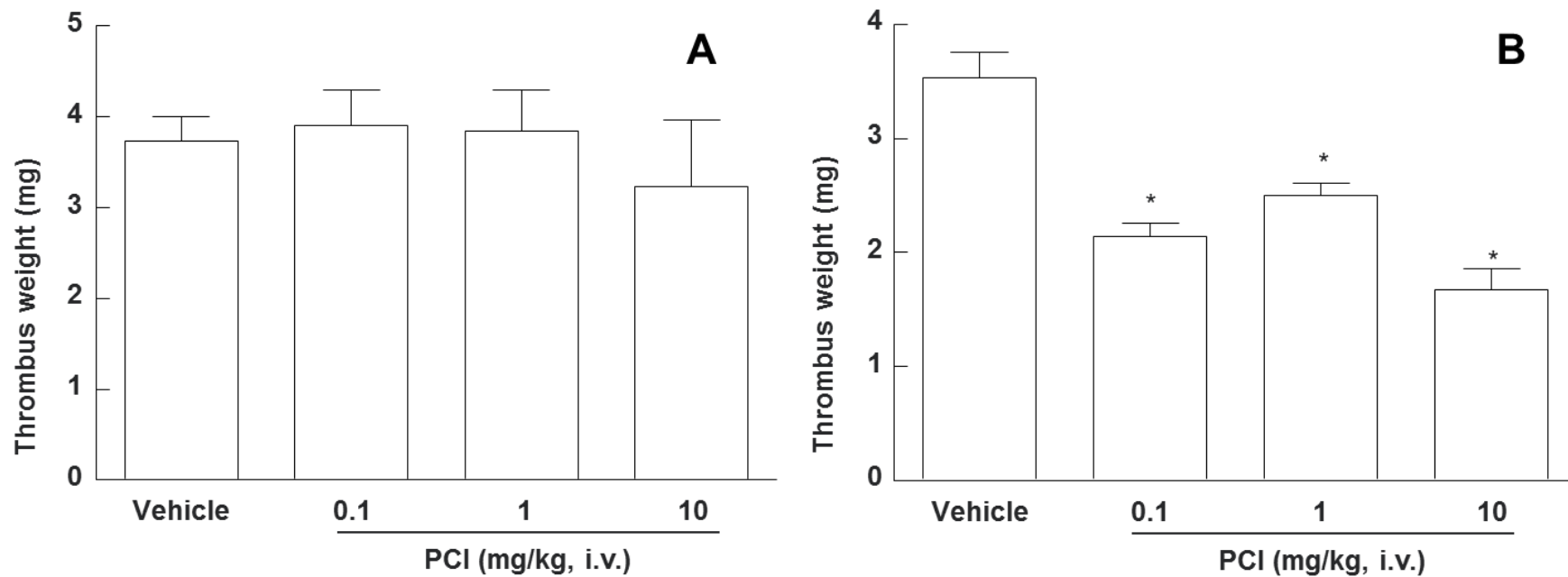
Recombinant TF was intravenously administered to the non-Tg rats (A) and the t-PA Tg rats (B) using an infusion pump at a rate of 7.5 mL/kg/h for 20 min. The PCI solutions or the vehicle were intravenously administered as a bolus 5 min before TF administration. Blood was collected from the jugular vein 20 min after TF administration. Plasma D-Dimer levels were determined as a biomarker of fibrinolysis. Each value represents the mean  $\pm$  SEM (n = 5–10). \*\*:  $P < 0.01$  compared with vehicle (Steel test).



**Figure 12 Comparison of the antithrombotic effect of PCI between the t-PA Tg and the non Tg rats in a ferric chloride-induced deep vein thrombosis model.**

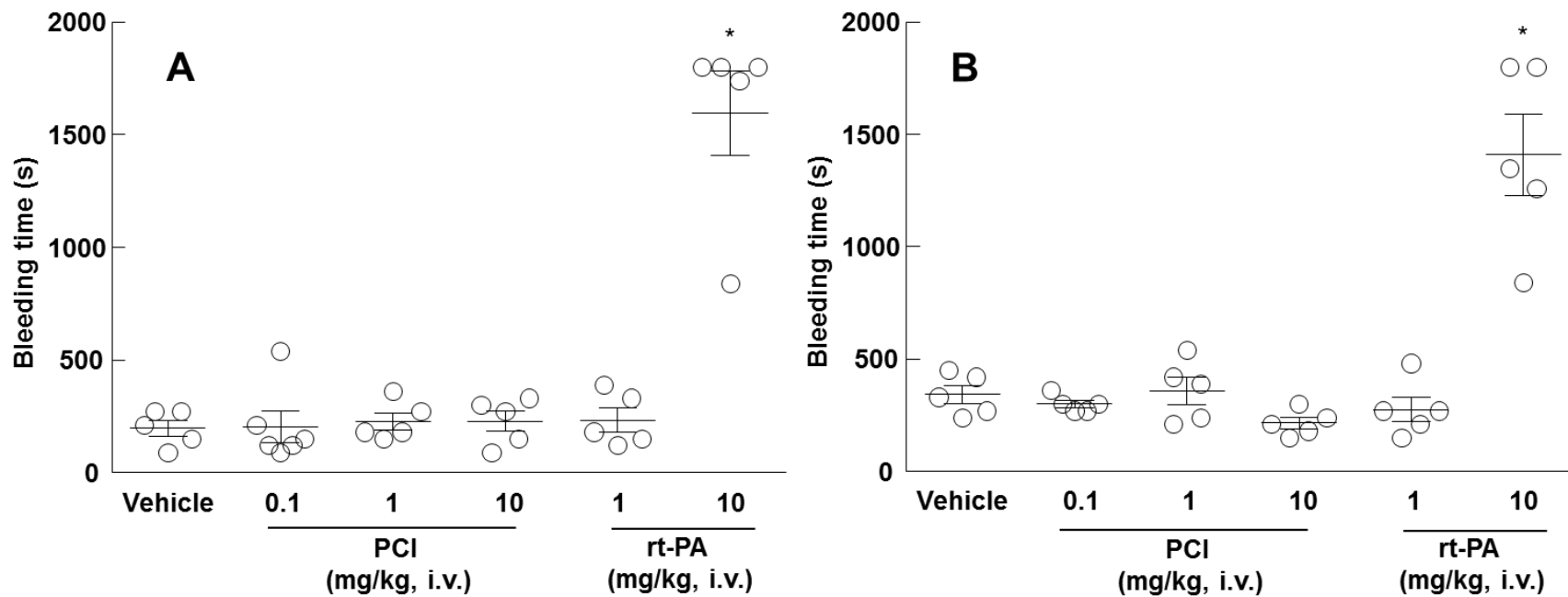
Venous thrombosis was induced in the inferior vena cava of the non Tg rats (A) and the t-PA Tg rats (B) by partial stenosis plus topical application of 10 wt% ferric chloride for 5 min. The PCI solutions or the vehicle were intravenously administered as a bolus via jugular vein 5 min before thrombus induction. Wet thrombus weights were measured 90 min after thrombus induction. Each value represents the mean  $\pm$  SEM (n = 4, 5).  $P < 0.05$  was regarded as statistically significant. \*:  $P < 0.05$  compared with vehicle (Steel test).





**Figure 13 Comparison of the antithrombotic effect of PCI between the t-PA Tg and the non Tg rats in a ferric chloride-induced arterial thrombosis model.**

Arterial thrombosis was induced in the common carotid artery of the non Tg rats (A) and the t-PA Tg rats (B) by sandwiching the common carotid artery between two filter papers soaked with 3.5  $\mu$ L of 10 wt% ferric chloride for 10 min. The PCI solutions or the vehicle were intravenously administered as a bolus via jugular vein 5 min before thrombus induction. Wet thrombus weights were measured 360 min after thrombus induction. Each value represents the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ).  $P < 0.05$  was regarded as statistically significant. \*:  $P < 0.05$  compared with vehicle (Steel test).



**Figure 14 Comparison of the effects of PCI and rt-PA on tail bleeding time between t-PA Tg and non-Tg rats.**

PCI, rt-PA, or their vehicle (saline) was intravenously administered via the jugular vein of the non Tg rats (A) and the t-PA Tg rats (B). The rat tail was cut by a razor 30 min after the beginning of administration and the bleeding time was monitored for 30 min. Each value represents the mean  $\pm$  SEM (n = 5, 6).

\*:  $P < 0.05$  compared with vehicle (Steel test).

## 考察

本章では、rt-PA に対する応答性のヒト・ラット間での種差を埋めるために作出した t-PA Tg ラット<sup>73)</sup>を用い、TAFIa 阻害化合物の薬理評価並びに特性評価を行うことを目的とした。

まず、t-PA Tg ラットを用いることで、TAFIa 阻害化合物の線溶促進活性を簡便に評価可能であったか考察する。薬理評価の簡便なモデルとして TF により誘導する過凝固モデル<sup>8,10)</sup>を採用し、評価項目としてフィブリン分解産物である D-Dimer<sup>8,69)</sup>を採用した。t-PA Tg ラットを用いると、TF 負荷から 20 分の時点で PCI による用量依存的かつ有意な血漿中 D-Dimer 濃度の上昇が認められた。一方、non Tg ラットでは同じ時点で血漿中 D-Dimer 濃度の有意な上昇は認められなかった。両系統における vehicle 投与群での D-Dimer 濃度は同程度であることから、t-PA Tg ラットにおける定常状態での血漿中 t-PA 濃度および TF 刺激による t-PA の発現誘導は本評価条件に対して影響しないと考えた。以上の結果から、t-PA Tg ラットを用いた TF 誘導過凝固モデルにより、短時間で TAFIa 阻害化合物の in vivo 評価が可能となることが示された。

次に、静脈血栓モデルに対する PCI の作用評価の結果を踏まえ、静脈血栓に対する TAFIa 阻害化合物の作用について考察する。深部静脈血栓症は静脈血栓塞栓症の主たる病型のひとつであり、肺血栓塞栓症のリスク因子である。<sup>3)</sup> 非臨床研究では、血栓の誘導刺激として塩化第一鉄、あるいは塩化第二鉄が汎用され、TAFIa 阻害化合物は rt-PA の併用下で深部静脈血栓モデルに対して抗血栓作用を示す。<sup>11)</sup> このことは、TAFIa 阻害薬が抗血栓作用を示すためには薬効用量に満たない程度の t-PA が必要であることを示唆しており、深部静脈血栓症に対する TAFIa 阻害化合物の抗血栓作用を評価するうえで t-PA Tg ラットが有用となる可能性がある。実際、TAFIa 阻害化合物である PCI は t-PA Tg ラットにおいて用量依存的な抗血栓作用を示した。一方、non Tg ラットでは PCI はいずれの用量であっても抗血栓作用を示さなかった。加えて、vehicle 投与群の血栓湿重量は t-PA Tg ラットと non Tg ラットで同等であったことから、t-PA Tg ラットにおいて定常状態および病態刺激で誘導される t-PA 発現量は抗血栓作用を示さない程度であり、深部静脈血栓モデルにおける薬理評価を妨げにはなっていないと考えた。この結果から、TAFIa 阻害化合物は静脈血栓塞栓症に対して有効であることが示唆された。

t-PA Tg ラットを用いた動脈血栓モデルに対する PCI の作用評価の結果を踏まえ、動脈血栓に対する TAFIa 阻害化合物の作用について考察する。一般に、動脈では静脈に比べて血流が速く、凝固系に比べて血小板優位に血栓が生じると考えられている。動脈血栓モデルにおいては抗血小板薬が強力な抗血栓作用を示す<sup>76,77)</sup> が、TAFIa 阻害化合物が有効性を示すかについては議論がある。<sup>8,10,11)</sup> TAFIa 阻害化合物 PCI は t-PA Tg ラットにおいて用量依存的な抗血栓作用を示した。一方、non Tg ラットでは PCI はいずれの用量であっても抗血栓作用を示さなかった。このことから、TAFIa 阻害化合物は、抗血栓作用を示さない程度の t-PA を過剰発現させた条件下で動脈血栓に対しても有効性を示すことが示唆された。深部静脈血栓モデルにおいては、評価時点が血栓刺激から 90 分後であった。そのため、既報で行われている薬効用量に満たない rt-PA の持続的な補充を行うことは実験的にも可能であった。一方、今回私が採用した動脈血栓モデルの評価時点は血栓刺激から 360 分後であり、モデル作製後に一度麻酔から覚醒させている。このような亜急性、あるいは慢性的な病態を観察するモデルにおいて、rt-PA の補充を継続的に行うことは困難である。この点で、TAFIa が関与する急性期・慢性期の病態<sup>78,79)</sup> に対する TAFIa 阻害化合物の薬理評価を行う際に t-PA Tg ラットは有用であろう。加えて、vehicle 投与群の血栓湿重量をみると、t-PA Tg ラットと non Tg ラットで同等であったことから、t-PA Tg ラットにおける定常状態および病態刺激で誘導される t-PA 発現は、動脈血栓モデルにおいても薬理評価に適した水準であると考えた。動脈血栓モデルにおける抗血栓作用の結果から、TAFIa 阻害化合物は急性冠症候群や脳梗塞といった動脈血栓性の疾患に対しても有効かもしれない。

最後に、t-PA Tg ラットを用いた尾出血モデルに対する PCI の作用評価から、TAFIa 阻害化合物の出血リスクに関して考察する。第一章で明らかにしたように、t-PA Tg ラットでは定常状態で血漿中 t-PA 濃度が non Tg ラットに比べて高い。<sup>73)</sup> そのため、t-PA Tg ラットに対して静脈および動脈血栓モデルにおける薬効用量の PCI を投与すると、出血リスクが顕在化する可能性がある。この仮説を検証する目的で、t-PA Tg ラットおよび non Tg ラットに対して薬効用量の PCI および rt-PA を投与した際の出血時間に対する作用を評価した。PCI は、いずれの用量であっても出血時間を有意に延長しなかった。これに対して、10 mg/kg の rt-PA はいずれの系統に投与した際も有意に出血時間を延長させた。この結果は、TAFIa 阻害化合物の出血リスクが低いことを明確に示している。TAFIa 阻害化合物による線溶促進活性は、t-PA 濃度によって規定されることが報告されており、

<sup>80)</sup> 血栓溶解の場に存在する t-PA もしくは rt-PA 濃度は病態や治療背景により異なってくるということが考えられる。それゆえ、TAFIa 阻害化合物の出血性評価においては、化合物が有効性を示す適切な動物種、系統を選択することが重要になる。t-PA Tg ラットは、以下の要因により TAFIa 阻害化合物の出血性を評価するのに適切な動物種と考えている。まず、基底状態の t-PA 発現量が高められている。次に、病態刺激に伴う t-PA の誘導が野生型と同様に起こる。最後に、静脈および動脈血栓モデルで TAFIa 阻害化合物が抗血栓作用を示すことが判明している。ゆえに、脳梗塞など他の病態モデルにおいて、標準治療の存在下における TAFIa 阻害化合物の出血性を t-PA Tg ラットを用いて評価することで、適応疾患を適切に選択することが可能になるかもしれない。

実験上のリミテーションについて述べる。まず、今回評価した動物モデルに PCI を投与した際の血漿中 TAFIa 阻害活性は評価していない。先行研究より、ラットに対して PCI (0.3, 1, 3, 10 mg/kg) を静脈内に急速投与した際に、PCI は用量依存的な TAFIa 阻害活性を示すことが明らかとなっており、10 mg/kg を投与した際の 5, 60 分後の阻害活性はそれぞれ 80%, 60% と報告されている。<sup>11)</sup> 今回の血栓モデルでの評価時点は、TF 誘導過凝固モデルで 20 分、静脈血栓モデルで 90 分、動脈血栓モデルは 360 分であるため、TAFIa 阻害化合物の抗血栓作用を過小評価している可能性がある。PCI は溶解性が悪く、10 mg/kg 以上の濃度では調製できなかった。そのため、種々の血栓モデルにおける薬物動態・薬物動力的な解析を行うには、より高活性で溶解性の高い TAFIa 阻害化合物を用いる必要がある。

## 結論

t-PA Tg ラットを用いることで、TAFIa 阻害化合物の簡便な *in vivo* 活性評価に加え、外因性の rt-PA 補充を必要とせずに静脈・動脈血栓モデルにおける TAFIa 阻害化合物の抗血栓作用を評価できることが判明した。さらに、rt-PA に比べて TAFIa 阻害化合物は出血リスクが低いことを明らかにした。t-PA Tg ラットは、脳梗塞病態における rt-PA の作用を適切に評価できるだけでなく、TAFIa 阻害化合物の有効性・安全性評価においても有用なツールである。

#### 第四章 抗血小板薬二剤併用療法に感受性を示す新規なブタ心筋梗塞モデルの確立

##### 序

心筋梗塞 (myocardial infarction, MI) は世界における主要な死因のひとつであり、<sup>81)</sup> アスピリンと P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬による抗血小板薬二剤併用療法 (Dual Anti-Platelet Therapy, DAPT) は急性冠症候群における標準治療である。<sup>82, 83)</sup> 非臨床研究においては、マウス、ラット、そしてイヌが MI モデル動物として用いられてきた。<sup>84)</sup> これらに加え、ブタの心臓が形態学および生理学的にヒトの心臓に類似していることから、心血管領域の実験動物としてブタに注目が集まりつつある。<sup>85)</sup> 飼育ブタは実験動物として用いられるが、体が大きいために取り扱いが難しい上、被験物質も大量に必要となることが難点であった。これに対して、ミニブタは飼育ブタに比べて体が小さく、心血管領域の実験動物として有用であることが報告されている。<sup>86-88)</sup> 実験的な MI モデルとしては、心血管を外科的に閉塞させることで虚血負荷をかけ、その後再灌流することで再灌流障害を惹起させたものが汎用される。<sup>89)</sup> 他にも、マイクロスフェアや冠動脈の外科的な永久閉塞によって惹起する MI モデルが報告されている。<sup>90, 91)</sup> これらのモデルの難点は、実際の MI において血管を閉塞させる血小板血栓が関与していないことにある。<sup>89)</sup> 血栓が関与する MI モデルとしては、塩化第二鉄により誘導するもの<sup>92)</sup> と、エタノールによる誘導するもの<sup>93)</sup> が知られているが、前者は血管内膜・中膜・外膜の三層全てが傷害され、血管壁の完全性が損なわれてしまう点が問題となっている。<sup>94)</sup> 後者は冠動脈造影などの特殊な装置や技術を要するため、研究のハードルが高い。その上、いずれのモデルにおいても、標準治療薬である DAPT の有効性は報告されていない。それゆえ、ミニブタを用いて DAPT の有効性が評価できる MI モデルを確立できれば、MI の病態理解に加え、現行治療の作用機序に関する研究や、急性冠症候群および MI の新規な治療法に関する研究に応用できる可能性がある。

合成着色料のひとつローズベンガルを実験動物に静脈内投与し、傷害したい血管に緑色光を照射することで活性酸素種を生じさせ、これにより局所的な血管内皮細胞の障害を惹起する血栓モデルの作製法を Photochemically-Induced Thrombosis (PIT) 法という。この方法で障害された血管内皮には血小板が粘着、活性化および凝集し、血栓が形成される。<sup>95)</sup> それゆえ、PIT 法は脳梗塞、心筋梗塞、末梢動脈疾患などの疾患モデル作製に用いられて

きた。<sup>96-98)</sup> 加えて、PIT 法により作製された種々の疾患モデルに対して、抗血小板薬を含む抗血栓薬が有効であることも数多く報告されている。<sup>99-103)</sup> しかし、これまでのところブタを用いた PIT モデルは報告されていない。

本章では、急性冠症候群の標準治療であるアスピリンと第三世代チエノピリジン系 P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬プラスグレルによる DAPT に感受性を示す新規な MI モデルを PIT 法により確立し、その特性を評価した。なお、全ての実験は偽手術 (sham) 群、MI 群、MI にアスピリン (10 mg/kg, 経口投与) とプラスグレル (1 mg/kg, 経口投与) の DAPT 処置を行う群 (MI/DAPT) の三群構成とした。

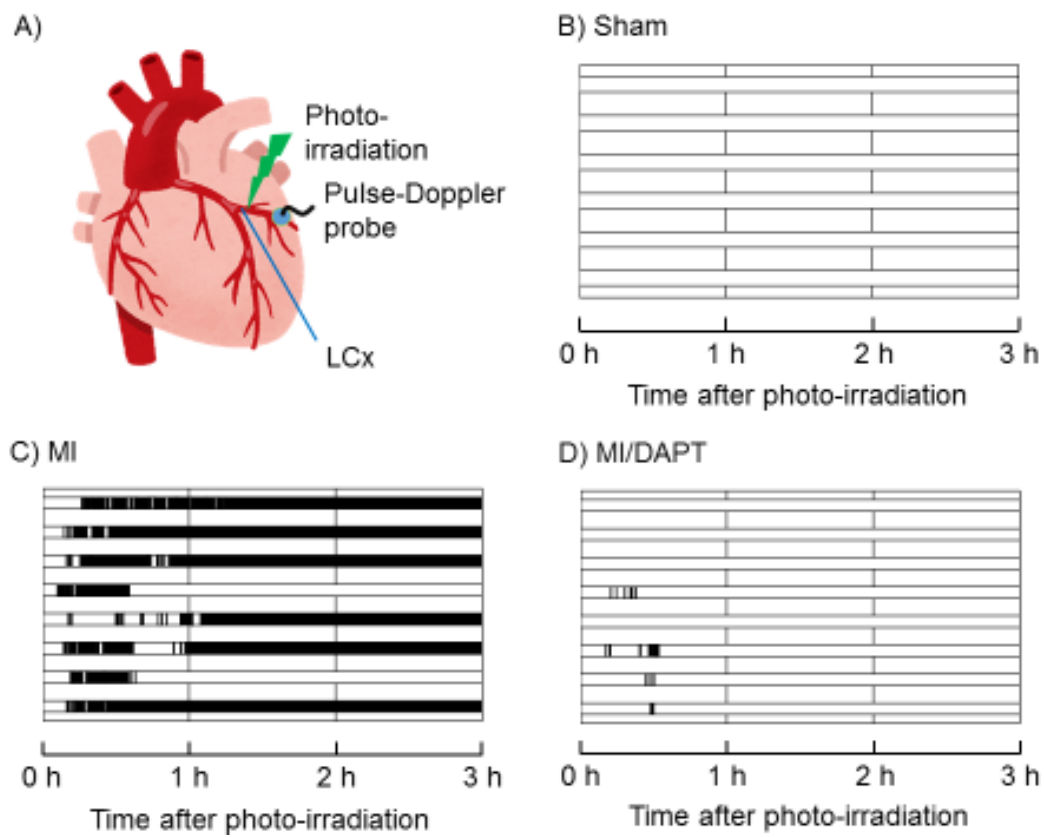
## 結果

### 冠状動脈左回旋枝 (Left Circumflex, LCx) の血流に対する DAPT の作用

LCx における血流の経時変化の個別値を Figure 15 に、初回閉塞時間 (time to first occlusion, TTO) および血管開存率 (patency rate, PR) の値を Table 5 に示す。sham 群では緑色光の照射から 3 時間にかけて閉塞は認めなかった。MI 群では、全ての個体で LCx の閉塞を認め、TTO は  $10 \pm 1$  分であった。MI/DAPT 群では、8 例中 4 例で一過性に LCx の閉塞を認めた。MI/DAPT 群における TTO は  $100 \pm 30$  分であり、MI 群に比べて統計学的に有意な延長を示した ( $P = 0.0107$ )。PR については、sham 群に比べて MI 群で有意に減少し、MI 群に比べて MI/DAPT 群で有意に高値を示した。

### 心電図に対する DAPT の作用

PIT 処置から 1 時間後までに ST 上昇を示した個体数および 24 時間後までに異常 Q 波を示した個体数を Table 6 に示す。sham 群および DAPT/MI 群では ST 上昇を示す個体を認めなかった。一方、MI 群では全ての個体が ST 上昇を示した (sham 群に比べて  $P = 0.0003$ , MI/DAPT 群に比べて  $P = 0.0002$ )。異常 Q 波を示す個体も sham 群および MI/DAPT 群には認められなかったが、MI 群では 8 匹中 7 匹で認められ、心電図 100 拍に占める異常 Q 波の割合は  $48 \pm 15\%$  であり、sham 群および MI/DAPT 群に比べて有意に高値を示した (sham 群に比べて  $P = 0.0047$ , MI/DAPT 群に比べて  $P = 0.0014$ )。



**Figure 15 Effects of aspirin plus prasugrel on left circumflex blood flow.**

Each animal received a single oral dose of aspirin (10 mg/kg) plus prasugrel (1 mg/kg) or vehicle 4 h before photo-irradiation. (A) Illustration of photochemically-induced thrombotic myocardial infarction. Individual patency in the Sham (B), MI (C), and MI/DAPT (D) is shown, and white and black bars indicate patent and closed arteries, respectively. MI, myocardial infarction; MI/DAPT, MI plus dual antiplatelet therapy with aspirin and prasugrel.

#### 梗塞サイズに対する DAPT の作用

PIT 処置から 24 時間後に 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) 染色した心臓切片の典型例を Figure 16 に、梗塞体積および左室に占める梗塞部位の割合を Table 7 に示す。sham 群では梗塞部位を認めなかった。MI 群では梗塞体積が  $1678 \pm 410 \text{ mm}^3$ 、左室に占める梗塞部位の割合が  $12.9 \pm 2.9 \%$  であり、いずれも sham 群に比べて有意に高値を示した (それぞれ  $P = 0.0016$ ,  $P = 0.0016$ )。MI/DAPT 群では梗塞体積が  $6 \pm 4 \text{ mm}^3$ 、左室に占める梗塞部位の割合が  $0.1 \pm 0.0 \%$  であり、いずれも MI 群に比べて有意に低値を示した (それぞれ  $P = 0.0011$ ,  $P = 0.0006$ )。



**Table 5 Effects of aspirin plus prasugrel on left circumflex blood flow.**

Groups	TTO (min)	PR (%)
Sham (n = 6)	180 ± 0	100 ± 0
MI (n = 8)	10 ± 1 <sup>a</sup>	34 ± 12 <sup>a</sup>
MI/DAPT (n = 8)	100 ± 30 <sup>b</sup>	99 ± 0 <sup>c</sup>

Each animal received a single oral dose of aspirin (10 mg/kg) plus prasugrel (1 mg/kg) or vehicle 4 h before photo-irradiation. Left circumflex blood flow was evaluated for 3 h after the initiation of photo-irradiation. Data represents mean ± SEM. <sup>a</sup>  $P < 0.01$  vs. Sham group (Mann–Whitney U-test), <sup>b</sup>  $P < 0.05$ , <sup>c</sup>  $P < 0.001$  vs. MI group (Student *t*-test). MI, myocardial infarction; MI/DAPT, MI plus dual antiplatelet therapy with aspirin and prasugrel, TTO, time to occlusion; PR, patency rate.

**Table 6 Effects of aspirin plus prasugrel on electrocardiogram.**

Groups	ST elevation	Abnormal Q-wave (%)
Sham (n = 6)	0/6	0 ± 0
MI (n = 8)	8/8 <sup>a</sup>	48 ± 15 <sup>c</sup>
MI/DAPT (n = 8)	0/8 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>d</sup>

Each animal received a single oral dose of aspirin (10 mg/kg) plus prasugrel (1 mg/kg) or vehicle 4 h before photo-irradiation. Data represents mean ± SEM. <sup>a</sup>  $P < 0.001$  vs. Sham group, <sup>b</sup>  $P < 0.001$  vs. MI group (Fisher’s exact test); <sup>c</sup>  $P < 0.01$  vs. Sham group, <sup>d</sup>  $P < 0.001$  vs. MI group (Mann–Whitney U test). MI, myocardial infarction; MI/DAPT, MI plus dual antiplatelet therapy with aspirin and prasugrel.



**Figure 16 Representative images showing myocardial infarction volume.**

Each animal received a single oral dose of aspirin (10 mg/kg) plus prasugrel (1 mg/kg) or vehicle 4 h before photo-irradiation. The heart was removed 24 h after photo-irradiation, coronally sectioned, and stained with 1% 2, 3, 5-triphenyl-tetrazolium chloride (TTC)/5% formamide solution. The infarct areas were identified as areas that remained unstained by TTC. MI, myocardial infarction; MI/DAPT, MI plus dual antiplatelet therapy with aspirin and prasugrel.

**Table 7 Effects of aspirin plus prasugrel on myocardial infarction volume.**

Groups	Myocardial infarction volume (mm <sup>3</sup> )	Infarction volume/ LV volume (%)
Sham (n = 6)	0 ± 0	0.0 ± 0.0
MI (n = 8)	1678 ± 410 <sup>a</sup>	12.9 ± 2.9 <sup>a</sup>
MI/DAPT (n = 8)	6 ± 4 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>c</sup>

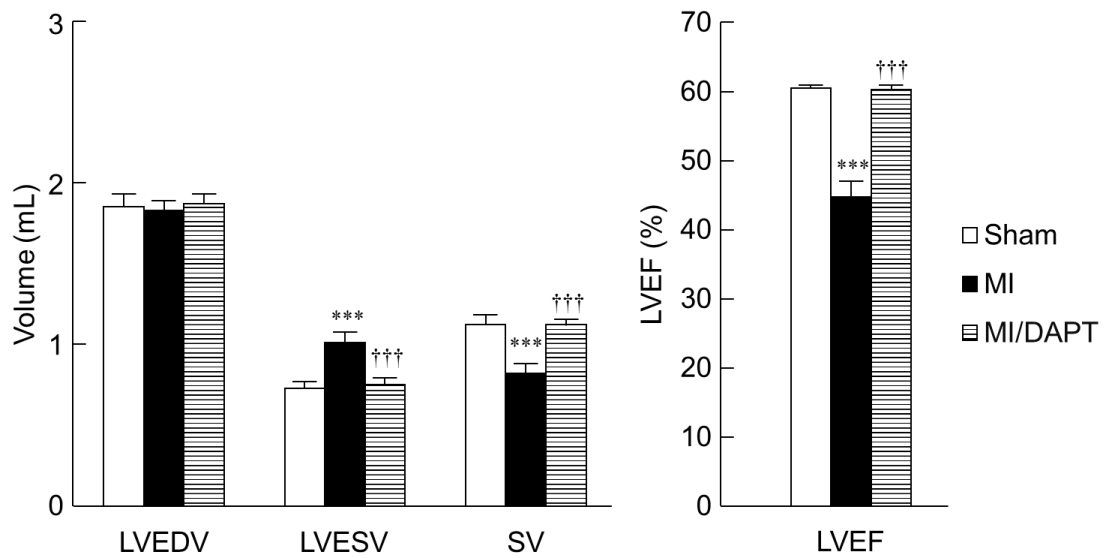
Each animal received a single oral dose of aspirin (10 mg/kg) plus prasugrel (1 mg/kg) or vehicle 4 h before photo-irradiation. Data represents mean ± SEM. <sup>a</sup>  $P < 0.01$  vs. Sham group (Mann–Whitney U test), <sup>b</sup>  $P < 0.01$ , <sup>c</sup>  $P < 0.001$  vs. MI group (Student *t*-test). MI, myocardial infarction; MI/DAPT, MI plus dual antiplatelet therapy with aspirin and prasugrel.

#### 心機能に対する DAPT の作用

PIT 処置から 24 時間後に心エコーによって評価した心機能の指標を Figure 17 に示す。Sham 群における左室拡張末期容積 (left ventricular end-diastolic volume, LVEDV), 左室収縮終末期容積 (left ventricular end-systolic volume, LVESV), 1 回拍出量 (stroke volume, SV), 左室駆出率 (left ventricular ejection fraction, LVEF) は順に  $1.85 \pm 0.06$  mL,  $0.73 \pm 0.02$  mL,  $1.12 \pm 0.04$  mL,  $60.47 \pm 0.27$  % であった。MI 群における LVEDV, LVESV, SV, LVEF は順に  $1.83 \pm 0.04$  mL,  $1.01 \pm 0.05$  mL,  $0.82 \pm 0.04$  mL,  $44.70 \pm 2.10$  % であり, sham 群に比べて LVESV の有意な増加 ( $P=0.0006$ ), SV の有意な減少 ( $P=0.0001$ ) および LVEF の有意な減少 ( $P<0.0001$ ) を認めた。これに対して, MI/DAPT 群における LVEDV, LVESV, SV, LVEF は順に  $1.87 \pm 0.04$  mL,  $0.75 \pm 0.02$  mL,  $1.12 \pm 0.02$  mL,  $60.21 \pm 0.47$  % であり, MI 群に比べて LVESV の有意な減少 ( $P=0.0002$ ), SV の有意な増加 ( $P<0.0001$ ) および LVEF の有意な増加 ( $P<0.0001$ ) を認めた。

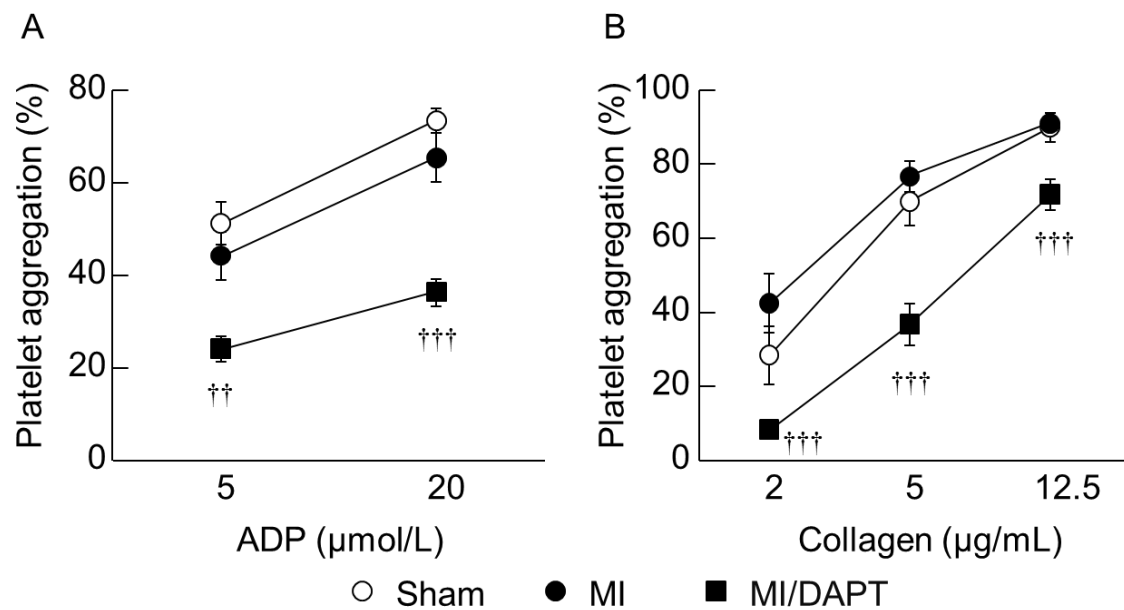
#### Ex vivo 血小板凝集に対する DAPT の作用

PIT 処置から 24 時間後における ADP もしくはコラーゲンにより惹起した血小板凝集の結果を Figure 18 に示す。ADP 20  $\mu$ mol/L で刺激した際の血小板凝集は sham 群, MI 群, MI/DAPT 群でそれぞれ  $73.2 \pm 2.5\%$ ,  $65.2 \pm 5.0\%$ ,  $36.1 \pm 2.7\%$  であり, MI 群に比べて血小板の凝集抑制率は 45% であった。Sham 群と MI 群の間で血小板凝集率には有意な差を認めなかったが, MI/DAPT 群での血小板凝集率は MI 群のそれに比べて有意に低値を示した ( $P=0.0002$ )。ADP 5  $\mu$ mol/L で刺激した際の血小板凝集についても, 同様の結果が得られた。コラーゲン 12.5  $\mu$ g/mL で刺激した際の血小板凝集は sham 群, MI 群, MI/DAPT 群でそれぞれ  $89.7 \pm 3.6\%$ ,  $90.7 \pm 2.5\%$ ,  $71.5 \pm 3.9\%$  であった。Sham 群と MI 群の間で血小板凝集率には有意な差を認めなかったが, MI/DAPT 群での血小板凝集率は MI 群のそれに比べて有意に低値を示した ( $P=0.0009$ )。コラーゲン 2 および 5  $\mu$ g/mL で刺激した際の血小板凝集についても, 同様の結果が得られた。



**Figure 17 Effect of aspirin plus prasugrel on cardiac function.**

Each animal received a single oral dose of aspirin (10 mg/kg) plus prasugrel (1 mg/kg) or vehicle 4 h before photo-irradiation. The cardiac function was determined using echocardiography 24 h after photo-irradiation. Data represents mean  $\pm$  SEM. \*\*\*  $P < 0.001$  vs. Sham group, †††  $P < 0.001$  vs. MI group (Student *t*-test). MI, myocardial infarction; MI/DAPT, MI plus dual antiplatelet therapy with aspirin and prasugrel; LVEDV, left ventricular end-diastolic volume; LVESV, left ventricular end-systolic volume; SV, stroke volume; LVEF, left ventricular ejection fraction.



**Figure 18 Effect of aspirin plus prasugrel on ex vivo platelet aggregation induced by ADP or collagen.**

Each animal received a single oral dose of aspirin (10 mg/kg) plus prasugrel (1 mg/kg) or vehicle 4 h before photo-irradiation. Blood samples were collected 24 h after photo-irradiation, and platelet-rich plasma was prepared. Ex vivo platelet aggregation induced by ADP (5 and 20 μmol/L) or collagen (2, 5, and 12.5 μg/mL) was determined. Data represents mean ± SEM. ††  $P < 0.01$ , †††  $P < 0.001$  vs. MI group (Student  $t$ -test). MI: myocardial infarction, MI/DAPT: MI plus dual antiplatelet therapy with aspirin and prasugrel.

## 考察

本研究では、これまでに報告のない PIT 法によるミニブタを用いた血栓性 MI モデルを確立した。ローズベンガルを投与したミニブタの LCx に緑色光を照射すると血流が速やかに途絶したことから、障害された冠動脈に血栓が形成されたことが示唆された。MI 群では ST 上昇や異常 Q 波といった心電図所見を認めたことに加え、LVESV の上昇、SV および LVWF の低下を認めたことから、左室収縮不全を呈していると考えた。左室収縮不全は MI 患者の予後予測因子として知られているため、<sup>104)</sup> 今回作出したモデルは、冠動脈が血栓性に閉塞している点のみならず、心機能についても急性冠症候群に類似していた。ゆえに、本モデルは急性冠症候群の研究ツールとしても有用であろう。

PIT 法を用いた様々な血栓モデルにより、アスピリン、クロピドグレルおよびプラスグレルといった抗血小板薬単剤の作用が評価されてきた。<sup>96, 98, 100, 102, 105)</sup> しかし、DAPT、すなわちアスピリンと P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬の併用療法は急性冠症候群患者の一次治療であるにも関わらず、<sup>82, 83)</sup> これら PIT モデルを用いた評価事例は殆ど報告されていない。本研究では、新規に構築したミニブタ MI モデルを用いて、アスピリン (10 mg/kg) とプラスグレル (1 mg/kg) の経口投与による DAPT の血小板凝集、梗塞体積及び心機能への作用を評価した。ADP 20 µmol/L により惹起した血小板凝集は、DAPT により 45% 阻害された。臨床における負荷用量で DAPT を施行した患者において、血小板凝集は 45-70% 抑制されていることから、<sup>106-109)</sup> 本実験で採用した DAPT の用量は臨床的な外挿性の点からも妥当であると判断した。この条件下で、DAPT はブタ MI モデルにおける梗塞体積を減少させ、心機能を改善させた。以上から、本 MI モデルは臨床関連性があり、かつ DAPT の有効性を検証できる初の PIT 誘導ブタ MI モデルであると考えた。

TRITON-TIMI 38, PRASFIT-ACS, PRASFIT-*Elective studies* といった臨床試験において、アスピリンとプラスグレルによる DAPT は経皮的冠動脈形成術を受ける急性冠症候群の MI 発症率を減少させ、<sup>32-34)</sup> これらの結果を根拠として急性冠症候群後の MI 予防を適応として薬事承認された。本研究において、DAPT は冠動脈の閉塞、梗塞体積に加えて心機能低下も抑制したことから、本モデルは MI における抗血小板薬の作用を評価あるいは比較する上でも有用であろう。

心機能の評価項目の結果から、既報の MI モデルとの差異について論じる。左室の機能

は MI に伴う心筋の細胞死によって生じる。LVEF は MI 患者における有力な予後予測因子であり、<sup>104)</sup> ACC/AHA および ECS のガイドラインにおいても、MI 患者における LVEF の測定は ST 上昇の有無に関わらず有用と記載されている。<sup>82, 83)</sup> 既報のブタ MI モデル (冠動脈結紮モデル<sup>110)</sup>、虚血再灌流モデル<sup>111)</sup>、マイクロスフェアによる冠動脈閉塞モデル<sup>112)</sup> については心機能が評価されてきたが、PIT 法により誘導された血栓性の MI モデルにおける心機能の報告はない。本研究により確立した PIT 法によるミニブタ MI モデルにおいて、LVEF の低下はモデル作製 24 時間後に認められ、DAPT 処置により LVEF は回復した。このことから、本モデルを用いることで抗血小板薬の有用性をより精度よく評価可能になることが期待される。

実験上のリミテーションについて述べる。まず、今回の研究ではアスピリンとプラスグレルの単独での作用は評価しなかった。これは、急性冠症候群においてそれぞれの単剤が承認を受けていないためである。各々の薬剤の薬効に対する寄与は、単独での作用を評価することで明らかにできると考えている。次に、プラスグレル以外の P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬 (クロピドグレルやチカグレロル) は本モデルにおけるアスピリンとの併用薬として評価しなかった。これらの薬剤を用いた DAPT の作用解析は、今回確立したミニブタ MI モデルの意義を強固なものにするだろう。3 点目として、群構成のなかに DAPT 施行した sham 群を設定しなかった。これは sham 群では梗塞が生じないことがわかっているためである。しかし、DAPT 施行した sham 群を設定することにより、病態と健常な状態の間での DAPT による血小板凝集の抑制率について新奇な知見を得ることができたかもしれない。最後に、今回確立した新規なブタ MI モデルの臨床関連性については、梗塞体積、心機能、組織学的な特徴といった観点から更なる検討が必要と考えている。

## 結論

心機能の低下を伴う血栓性のブタ MI モデルを新たに確立した。アスピリンとプラスグレルによる DAPT はブタ MI モデルにおける心筋梗塞の体積を減少させ、心機能を改善した。本モデルは、急性冠症候群の病態理解、加えて新規な抗血小板薬の薬理評価にとって有用である。

## 第五章 ノックアウトラットの作出による血小板凝集・血栓形成・止血およびプラスグレルの抗血小板作用における血管拡張因子刺激リン酸化タンパク質の機能解析

### 序

冠動脈疾患は先進国における主要な死因のひとつであり、<sup>113)</sup> なかでも急性冠症候群は冠動脈血栓による血流低下を主因とした致死的な疾患である。<sup>114)</sup> アスピリンと ADP 受容体のひとつ P2Y<sub>12</sub> 受容体の拮抗薬による抗血小板薬二剤併用療法 (DAPT) は急性冠症候群および経皮的冠動脈形成術を受ける患者における標準治療であり、血小板凝集を抑制することで心血管疾患の発症リスクを減少させることが判明している。<sup>115)</sup>

抗血小板薬を服用する患者で抗血小板作用をモニターすることは、薬剤の有効性および安全性を把握する上で重要である。光透過血小板凝集測定法 (Light Transmission Aggregometry, LTA) は血小板機能を評価する一般的な方法であるが、<sup>37)</sup> LTA 法で観察される抗血小板作用には、血小板に発現する P2Y<sub>12</sub> 受容体のみならず他の受容体 (もうひとつの ADP 受容体である P2Y<sub>1</sub> 受容体など) の寄与が含まれてしまう。<sup>38)</sup> クロピドグレル、プラスグレルおよびチカグレロルといった抗血小板薬は P2Y<sub>12</sub> 受容体に対して選択的に拮抗することが知られているため、<sup>39-42)</sup> この P2Y<sub>12</sub> 受容体シグナルに特異的な拮抗作用を評価する指標として、血管拡張因子刺激リン酸化タンパク質 (VASP) の定量値を元に算出される血小板反応性指標 (PRI) が用いられている。<sup>43,44)</sup>

VASP はアクチン調節タンパク質ファミリーのひとつとして知られ、動物種間で進化的に保存されており、血小板においては仮足形成や粘着に関与すると考えられている。<sup>116)</sup> <sup>117)</sup> ADP によって血小板が刺激を受けると、受容体に共役する G<sub>i</sub> タンパク質の機能によって血小板中の cyclic AMP (cAMP) が減少し、VASP の 157 番目に位置するセリンのリン酸化も減少する。<sup>118, 119)</sup> VASP を欠損したマウス由来の血小板をコラーゲンやトロンビンで刺激すると、細胞内の情報伝達を担う cyclic guanosine monophosphate (cGMP)/cAMP およびこれらが活性化するキナーゼを介してフィブリノーゲンに対する結合能が増加することから、<sup>120, 121)</sup> VASP は血小板機能に直接関与することが示唆されている。加えて、*ex vivo* での先行研究により、VASP 欠損マウス由来の血小板は、障害あるいは剥離した内皮細胞に対して野生型よりも高度に接着・粘着し、それは一酸化窒素依存的であることも示



されている。<sup>121)</sup>しかし、VASP タンパク質が ADP 刺激に伴う血小板の活性化および凝集に直接関与するかは明らかでない。加えて、*in vivo* での血小板凝集や血栓形成に関与するかについても詳細な評価はされていない。さらに、P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬の抗血小板作用に対して、VASP が本質的な役割を担っているかについても明らかでない。VASP のリン酸化を元に算出される PRI は、P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬のサロゲートマーカーとして臨床的に用いられている<sup>43)</sup>ことから、VASP の生理的・薬理的な意義を解明することは重要であると考えた。

本章では、VASP ノックアウトラットを作出し、血小板の活性化、凝集、血栓形成および止血に VASP が関与しているのかを *in vitro* および *in vivo* で検討した。加えて、チエノピリジン系 P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬のひとつプラスグレルの抗血小板作用における VASP の役割を検討した。

## 結果

### VASP ノックアウトラットの作出

PCR スクリーニングによるジェノタイピングの結果、F0 個体 91 匹のうち、41 匹において VASP 遺伝子の欠損を示唆する増幅産物を確認した (Figure 19)。F0 個体 41 匹中 10 匹についてダイレクトシーケンシングを行い、うち 9 匹において VASP 遺伝子の欠損を確認した。4 ラインの系統化を行い、オフターゲット解析を行ったところ、評価した遺伝子の欠損は認められなかった (data not shown)。雄性 7–8 週齢における体重は VASP<sup>+/+</sup> で 220.3 ± 4.2 g, VASP<sup>+/-</sup> で 214.4 ± 8.0 g, VASP<sup>-/-</sup> で 226.4 ± 8.2 g であった。ウエスタブロット解析の結果、各種臓器における VASP の欠損を確認した (Figure 20)。内部標準タンパク質として測定した β-actin は全ての系統において各種臓器で発現していた (Figure 21)。

### 血液学および血液生化学的な評価項目に VASP の欠損が及ぼす影響

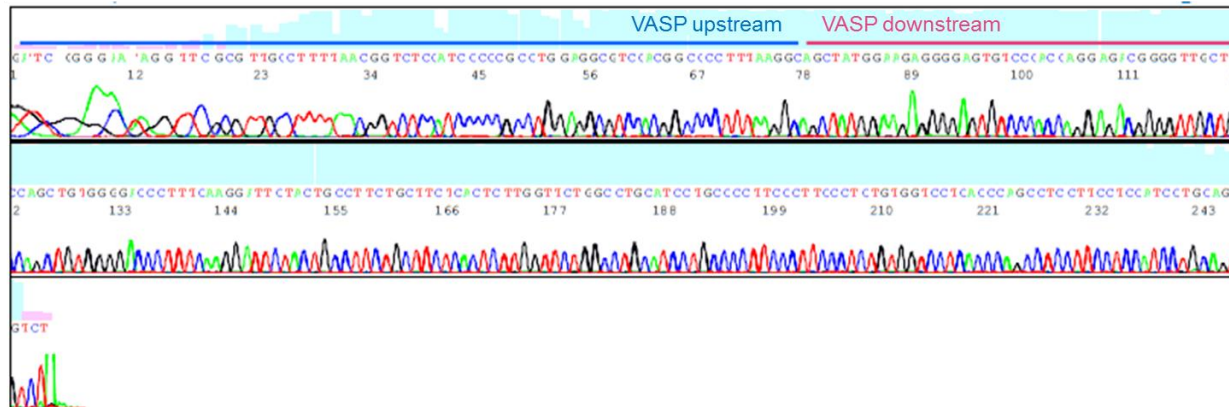
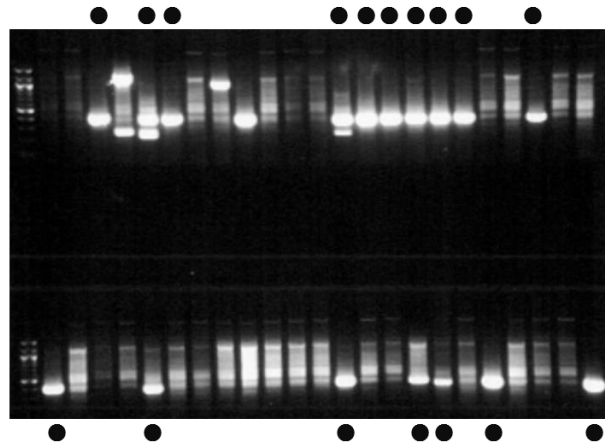
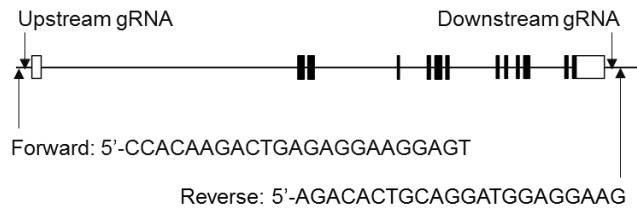
血液学および血液生化学的な評価項目に VASP の欠損が及ぼす影響を Table 7, 8 に示す。殆どの評価項目は VASP 欠損に依らず系統間で同等であった。血小板数 (×10<sup>3</sup>/μL) は VASP<sup>+/+</sup> で 1149 ± 46, VASP<sup>+/-</sup> で 1176 ± 17, VASP<sup>-/-</sup> で 1078 ± 39 であった (*P* < 0.05, VASP<sup>+/+</sup> vs. VASP<sup>-/-</sup>)。好酸球数 (×10<sup>3</sup>/μL) は VASP<sup>+/+</sup> で 0.7 ± 0.0, VASP<sup>+/-</sup> で 1.0 ± 0.1, VASP<sup>-/-</sup> で 0.7 ± 0.1 であった (*P* < 0.05, VASP<sup>+/+</sup> vs. VASP<sup>-/-</sup>)。

血小板の活性化および血小板凝集に VASP の欠損が及ぼす影響

ADP およびコラーゲンによる血小板の活性化および血小板凝集に VASP の欠損が及ぼす影響を Table 9 に示す。血小板凝集については、系統間で有意な差を認めなかった。血小板活性化の指標のひとつ P-セレクチンの陽性細胞数は、PBS 処置群について、VASP<sup>+/+</sup> に比べて VASP<sup>-/-</sup> で有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。ADP 1.25 もしくは 5  $\mu\text{mol/L}$  で刺激した際の P-セレクチン陽性細胞数は VASP<sup>-/-</sup> に比べて VASP<sup>+/+</sup> で有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。

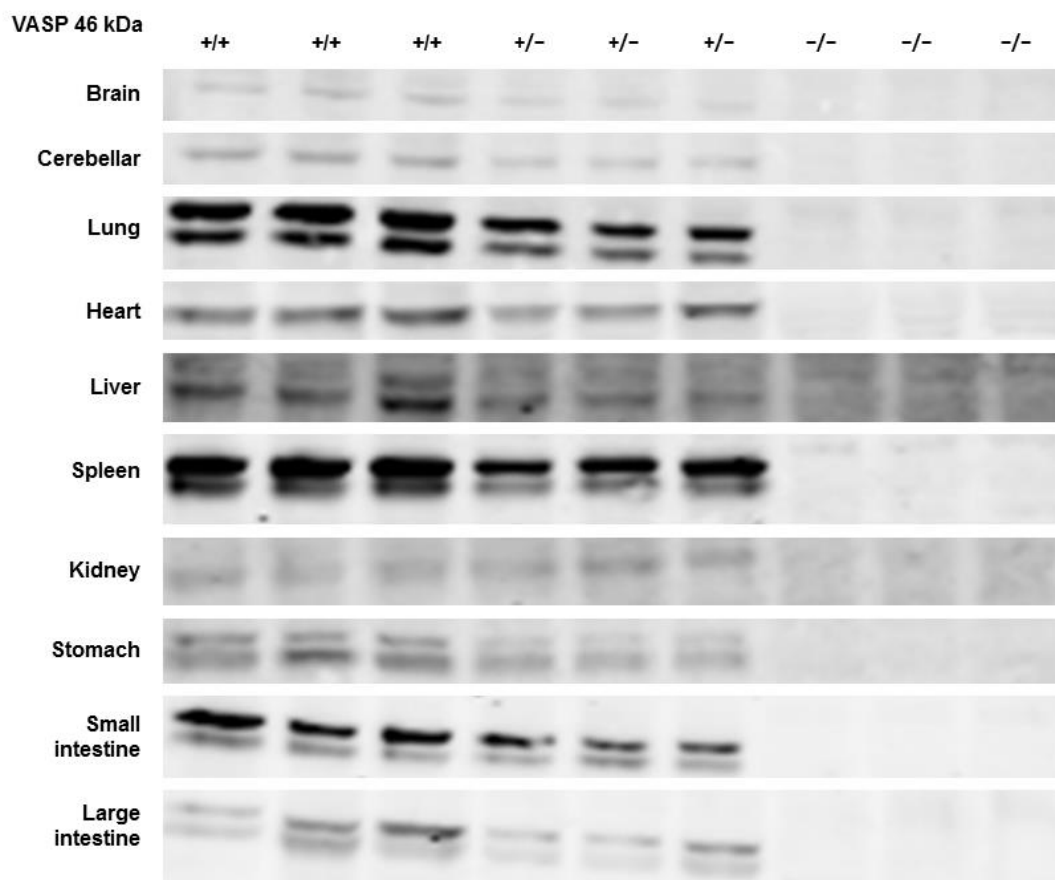
コラーゲン誘導性の血小板減少に VASP の欠損が及ぼす影響

ラットにコラーゲンを投与した際の系統ごとの血小板数の推移およびその AUC (%  $\cdot$  min)を Figure 22 に示す。血小板数の推移は系統間で類似していた。いずれの系統においても、1 mg/kg の用量でコラーゲンを急速投与した際の AUC は vehicle 投与群に比べて有意に低値を示した ( $P < 0.0001$ )。コラーゲン用量ごとに系統間での AUC を比較すると、コラーゲンを 0.1 mg/kg の用量で静脈内に急速投与した際の AUC は VASP<sup>+/+</sup> で  $16434.0 \pm 465.4$ 、VASP<sup>+/+</sup> で  $17036.1 \pm 478.5$ 、VASP<sup>-/-</sup> で  $18046.4 \pm 425.3$  であった ( $P < 0.05$ , VASP<sup>+/+</sup> vs. VASP<sup>-/-</sup>)。他のコラーゲン用量では、系統間で AUC に有意な差を認めなかった。



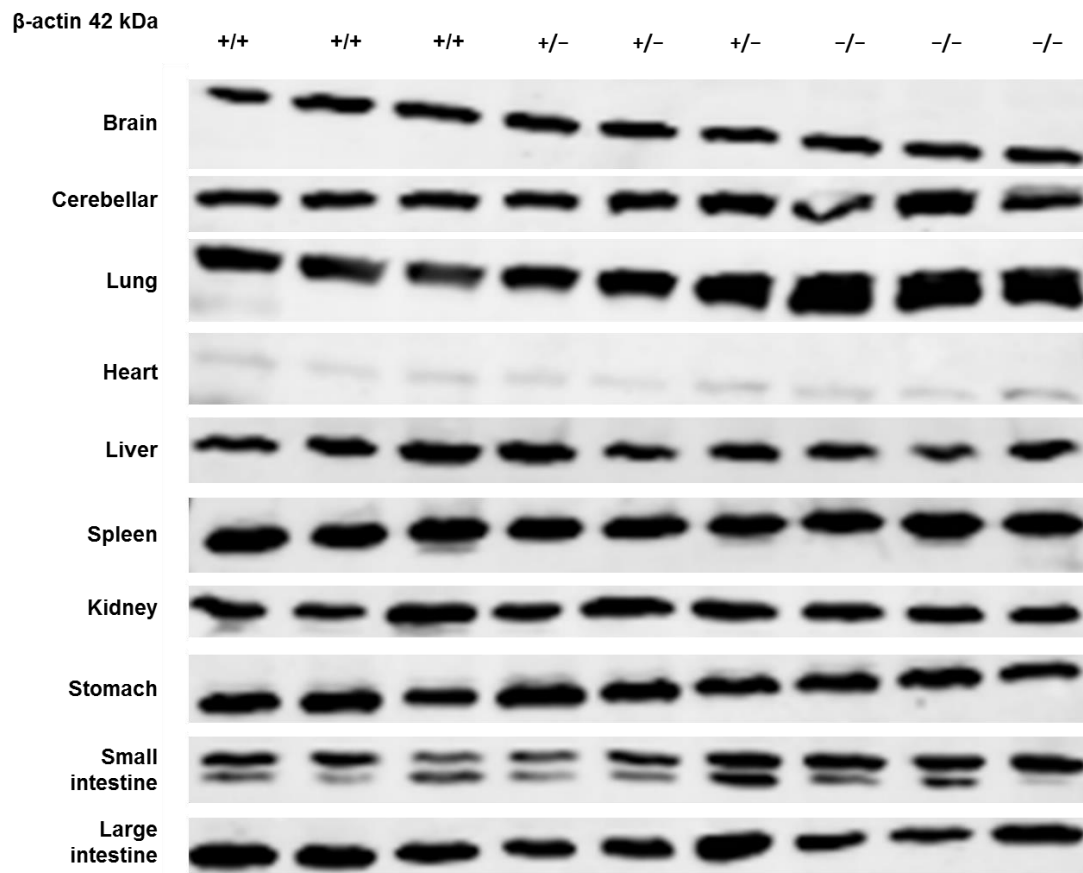
**Figure 19 Analysis of VASP gene deletion in rats.**

Upper left panel shows a schematic illustration of VASP gRNAs and PCR primers. Upper right panel depicts a typical result of agarose gel electrophoresis of PCR products. The left extremity lanes are DNA ladder and VASP deletion mutants (closed circle) brought 4 kb of PCR products. Direct sequencing revealed entire deletion of VASP gene in F1 rats (lower panel).



**Figure 20 Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) expression in VASP<sup>+/+</sup>, VASP<sup>+/-</sup>, and VASP<sup>-/-</sup> rats.**

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analysis were performed with 10  $\mu$ g of protein extracted from each organ. The primary antibody used for VASP was VASP antibody (3112S, Cell Signaling Technology, Inc.) with 1,000-fold dilution. n = 3 per genotype. +/+, wild type; +/-, heterozygous VASP knockout; -/-, homozygous VASP knockout.



**Figure 21  $\beta$ -actin expression in  $VASP^{+/+}$ ,  $VASP^{+/-}$ , and  $VASP^{-/-}$  rats.**

SDS-PAGE and western blot analysis was performed using 1  $\mu$ g of protein extracted from each organ. Primary antibody used for  $\beta$ -actin was monoclonal anti- $\beta$ -actin antibody produced in mouse (A5441, Sigma-Aldrich Co. LLC.) with 10,000-fold dilution. n = 3 per genotype. +/+, wild-type; +/-, heterozygous VASP knockout; -/-, homozygous VASP knockout.

**Table 7 Hematological analysis of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) knockout rats.**

	Genotype		
	VASP <sup>+/+</sup>	VASP <sup>+/-</sup>	VASP <sup>-/-</sup>
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	7.51 $\pm$ 0.12	7.56 $\pm$ 0.16	7.64 $\pm$ 0.15
Hb (g/dL)	13.9 $\pm$ 0.2	14.0 $\pm$ 0.2	14.1 $\pm$ 0.3
Ht (%)	44.3 $\pm$ 0.6	44.6 $\pm$ 0.6	45.0 $\pm$ 0.7
MCV (fL)	59.0 $\pm$ 0.4	59.1 $\pm$ 0.6	58.9 $\pm$ 0.4
MCH (pg)	18.6 $\pm$ 0.1	18.5 $\pm$ 0.2	18.5 $\pm$ 0.1
MCHC (g/dL)	31.4 $\pm$ 0.2	31.3 $\pm$ 0.1	31.4 $\pm$ 0.3
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	5.50 $\pm$ 0.32	5.06 $\pm$ 0.28	4.68 $\pm$ 0.34
Bas (%)	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0
Eos (%)	0.7 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.1 <sup>†</sup>	0.7 $\pm$ 0.1
Neut (%)	13.7 $\pm$ 0.6	13.9 $\pm$ 0.8	14.6 $\pm$ 0.9
Lym (%)	83.6 $\pm$ 0.6	83.2 $\pm$ 0.7	82.7 $\pm$ 1.0
Mon (%)	1.4 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1
Others (%)	0.6 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.1
Platelets ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1149 $\pm$ 46	1176 $\pm$ 17	1078 $\pm$ 39*
Reticulocyte %	5.54 $\pm$ 0.18	5.40 $\pm$ 0.17	5.05 $\pm$ 0.29
$\times 10^3/\text{L}$	415.3 $\pm$ 11.0	407.9 $\pm$ 15.1	383.2 $\pm$ 15.0
PT (s)	10.0 $\pm$ 0.1	10.2 $\pm$ 0.1	10.3 $\pm$ 0.1
aPTT (s)	14.0 $\pm$ 0.3	13.8 $\pm$ 0.3	14.0 $\pm$ 0.6

Data represent means  $\pm$  SEM (n = 6). RBC, red blood cells; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; WBC, white blood cells; Bas, basophils; Eos, eosinophils; Neut, neutrophils; Lym, lymphocytes; Mon, monocytes; PT, prothrombin time; aPTT, activated partial thromboplastin time.

**Table 8 Blood biochemistry in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) knockout rats.**

	Genotype		
	VASP <sup>+/+</sup>	VASP <sup>+/-</sup>	VASP <sup>-/-</sup>
GOT (IU/L)	72 ± 2	74 ± 2	72 ± 3
GPT (IU/L)	45 ± 3	53 ± 4	49 ± 2
ALP (IU/L)	1171 ± 42	1132 ± 82	1023 ± 53
TG (mg/dL)	53 ± 6	47 ± 3	47 ± 5
TC (mg/dL)	79 ± 4	75 ± 2	74 ± 3
BUN (mg/dL)	15.4 ± 0.9	15.3 ± 0.8	18.9 ± 3.2
CRE (mg/dL)	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.01
TB (mg/dL)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TP (g/dL)	5.5 ± 0.0	5.6 ± 0.1	5.5 ± 0.1
Alb (g/dL)	3.2 ± 0.0	3.2 ± 0.0	3.3 ± 0.0
Glu (mg/dL)	123 ± 6	117 ± 5 <sup>†</sup>	136 ± 4
IP (mg/dL)	8.1 ± 0.2	7.8 ± 0.1	8.0 ± 0.2
Ca (mg/dL)	10.2 ± 0.1	10.2 ± 0.1	10.3 ± 0.1
Na (mEq/L)	139.9 ± 0.7	139.8 ± 0.5	140.3 ± 0.4
K (mEq/L)	4.98 ± 0.31	5.09 ± 0.23	4.99 ± 0.22
Cl (mEq/L)	103.3 ± 0.3	103.8 ± 0.3	103.5 ± 0.6

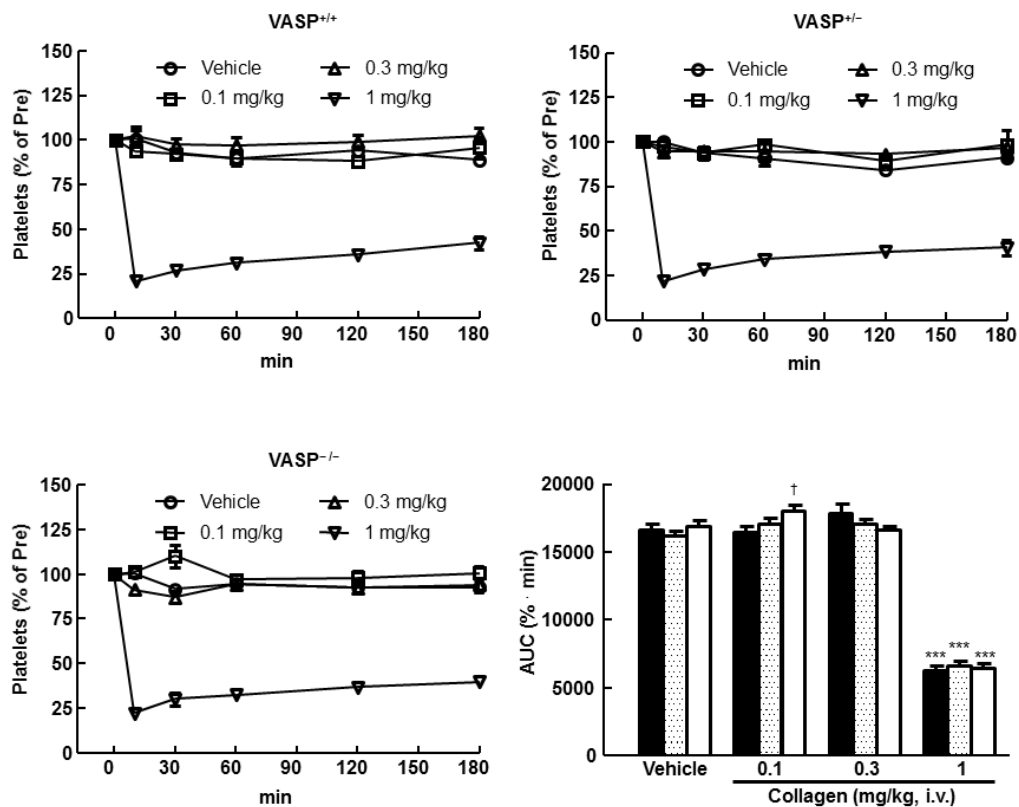
Data represent means ± SEM (n = 6). GOT, glutamate oxaloacetate transaminase; GPT, glutamate pyruvate transaminase; ALP, alkaline phosphatase; TG, triacylglycerol; TC, total cholesterol; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine; TB, total bilirubin; TP, total protein; Alb, albumin; Glu, glucose; IP, inorganic phosphate; Ca, calcium; Na, sodium; K, potassium; Cl, chloride.

**Table 9 Platelet aggregation and platelet P-selectin expression in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) knockout rats.**

		Genotype		
		VASP <sup>+/+</sup>	VASP <sup>+/-</sup>	VASP <sup>-/-</sup>
Platelet aggregation (%)				
ADP ( $\mu$ mol/L)	1.25	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 0	3 $\pm$ 1
	5	30 $\pm$ 2	29 $\pm$ 1	28 $\pm$ 2
	20	46 $\pm$ 2	48 $\pm$ 2	48 $\pm$ 1
Collagen ( $\mu$ g/mL)	2	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 0
	10	65 $\pm$ 3	67 $\pm$ 0	66 $\pm$ 3
P-selectin expression (arbitrary units)				
	PBS	181 $\pm$ 1	180 $\pm$ 3	170 $\pm$ 3 <sup>†</sup>
ADP ( $\mu$ mol/L)	1.25	247 $\pm$ 5**	277 $\pm$ 10**‡	234 $\pm$ 7**
	5	376 $\pm$ 7**	425 $\pm$ 19**‡	371 $\pm$ 14**
	20	496 $\pm$ 11**	556 $\pm$ 26**	490 $\pm$ 17**

Adenosine diphosphate (ADP)- and collagen-induced platelet aggregation of platelet-rich plasma and ADP-induced P-selectin expression in CD61-positive cells were evaluated. Data represent means  $\pm$  SEM (n = 6). Statistical analyses were performed with Dunnett's multiple comparison test (phosphate-buffered saline [PBS] vs. ADP-treated groups) and Student *t*-test (VASP<sup>+/+</sup> vs. VASP<sup>-/-</sup> as a primary analysis and VASP<sup>+/-</sup> vs. VASP<sup>-/-</sup> as a subanalysis). *P* < 0.01 vs. vehicle (Dunnett's multiple comparison test). <sup>†</sup>*P* < 0.05 vs. VASP<sup>+/+</sup> (Student *t*-test). <sup>‡</sup>*P* < 0.05 vs. VASP<sup>-/-</sup> (Student *t*-test).





**Figure 22 Impact of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) deficiency on collagen-induced thrombocytopenia in rats.**

Closed bars: VASP<sup>+/+</sup>; dotted bars: VASP<sup>+/-</sup>; open bars: VASP<sup>-/-</sup>. Data are means ± SEM (n = 4 or 5).

\*\*\**P* < 0.0001 vs. vehicle (Dunnett's multiple comparison test). †*P* < 0.05 vs. VASP<sup>+/+</sup> (Student *t*-

test). AUC, area under the curve.

血栓形成に VASP の欠損が及ぼす影響

塩化第二鉄の刺激によって誘導した頸動脈血栓モデルにおける血栓形成への VASP 欠損が及ぼす影響を Figure 23 に示す。いずれの系統においても、血流は塩化第二鉄の刺激により速やかに途絶した。Hematoxylin Eosin (HE) および Elastica van Gieson (EVG) 染色により、血管内腔の大部分を血栓が占めていることが確認された。TTO, 血管開存率, 血管内腔面積, 血栓面積および狭窄率には系統間で有意な差を認めなかった。

止血に VASP の欠損が及ぼす影響

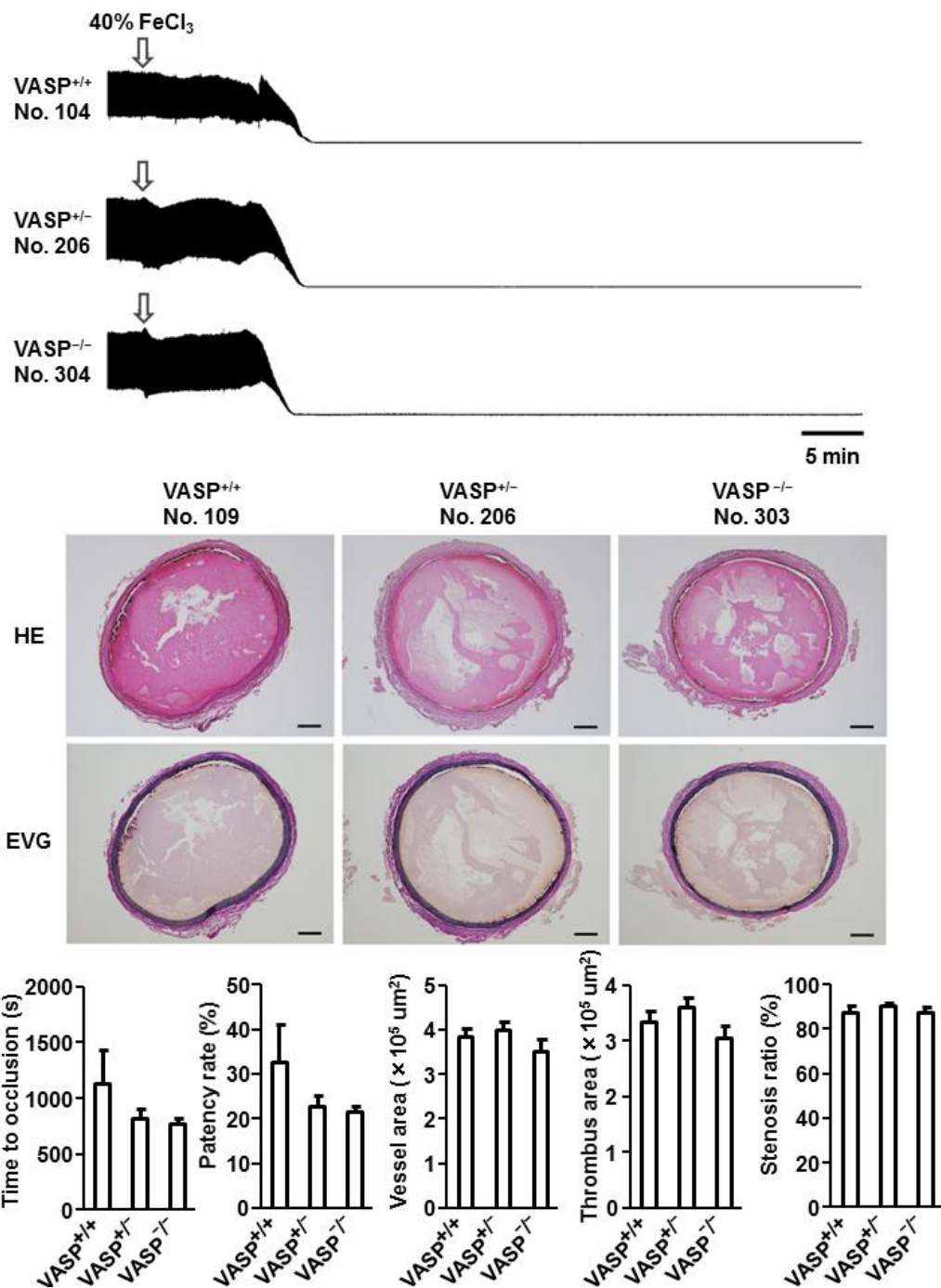
ラット尾出血モデルを用いて VASP 欠損が止血に及ぼす影響を評価した。出血時間(秒)は VASP<sup>+/+</sup> で 269 ± 17, VASP<sup>+/-</sup> で 231 ± 12, VASP<sup>-/-</sup> で 272 ± 16 であり、系統間で有意な差を認めなかった。

PRI に VASP の欠損が及ぼす影響

PRI に VASP 欠損が及ぼす影響を Figure 24 (A, B) に示す。血中のリン酸化 VASP 濃度を反映する吸光度の値は VASP<sup>+/+</sup> で 2.126 ± 0.020, VASP<sup>+/-</sup> で 1.148 ± 0.043, VASP<sup>-/-</sup> で 0.041 ± 0.009 であり、VASP<sup>+/+</sup> に比べて VASP<sup>+/-</sup> および VASP<sup>-/-</sup> で有意に低値を示した ( $P < 0.0001$ )。VASP<sup>-/-</sup> におけるリン酸化 VASP の抗原量が十分に小さかったことから、プラスグレル活性体 R-138727 の PRI に対する影響を評価する際に VASP<sup>-/-</sup> は使用しなかった。そこで、R-138727 の PRI に対する作用を VASP<sup>+/+</sup> と VASP<sup>+/-</sup> で比較したところ、両系統において R-138727 は濃度依存的に PRI を減少させた ( $P < 0.0001$ )。ADP で血液を刺激した際の R-138727 の IC<sub>50</sub> 値 (μmol/L) とその 95% 信頼区間は VASP<sup>+/+</sup> で 10.81 (8.51 to 13.79), VASP<sup>+/-</sup> で 7.75 (6.41 to 9.32) であった。

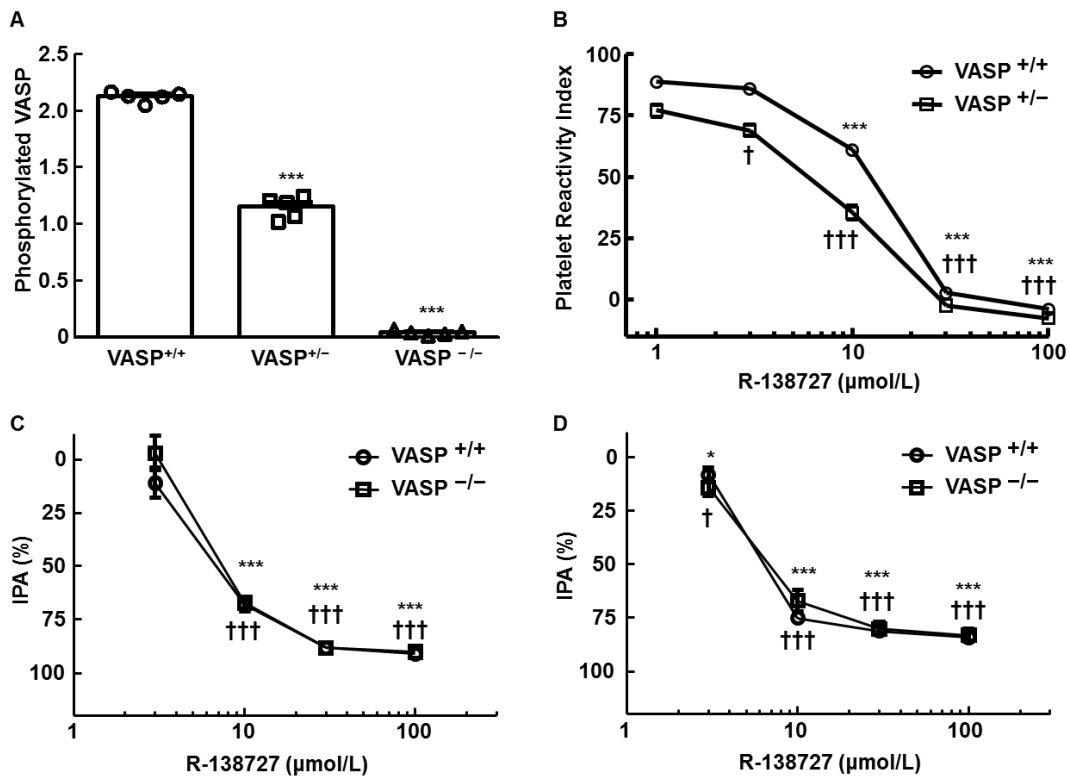
プラスグレル活性体 R-138727 の抗血小板作用に VASP の欠損が及ぼす影響

R-138727 の抗血小板作用に VASP 欠損が及ぼす影響を Figure 24 (C, D) に示す。VASP<sup>+/+</sup> および VASP<sup>-/-</sup> の両系統において R-138727 は濃度依存的に ADP (20 μmol/L) およびコラーゲン (10 μg/mL) 刺激による血小板凝集を阻害した ( $P < 0.0001$ )。ADP 刺激による血小板凝集に対する R-138727 の IC<sub>50</sub> 値 (μmol/L) とその 95% 信頼区間は VASP<sup>+/+</sup> で 6.8 (5.7 to 8.6), VASP<sup>-/-</sup> で 7.5 (6.4 to 9.2) であった。コラーゲン刺激による血小板凝集に対する R-138727 の IC<sub>50</sub> 値 (μmol/L) と 95% CI は VASP<sup>+/+</sup> で 6.4 (5.9 to 6.9), VASP<sup>-/-</sup> で 7.5 (5.7 to 8.3) であった。



**Figure 23 Effect of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) knockout on thrombus formation in FeCl<sub>3</sub>-induced arterial thrombosis in rats.**

Typical tracings of blood flow, haematoxylin and eosin (HE), and Elastica van Gieson (EVG) are presented for each genotype. Summary statistics of time in seconds to first occlusion (TTO), patency rate, vessel area, thrombus area, and stenosis ratio are also presented. Data are means ± SEM (n = 10).



**Figure 24 Influence of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) knockout on phosphorylated VASP antigen, platelet reactivity index (PRI), and inhibition of platelet aggregation (IPA) in rats.**

A: Optical density at 450 nm reflecting quantity of phosphorylated VASP antigen in VASP<sup>+/+</sup>, VASP<sup>+/-</sup>, and VASP<sup>-/-</sup> rats. Data are means ± SEM (*n* = 5). \*\*\**P* < 0.0001 vs. VASP<sup>+/+</sup>. B: Effect of R-138727 on platelet reactivity index in VASP<sup>+/+</sup> and VASP<sup>+/-</sup> rats. Data are means ± SEM (*n* = 5). \*\*\**P* < 0.0001 vs. vehicle in VASP<sup>+/+</sup> rats. †*P* < 0.05, †††*P* < 0.0001 vs. vehicle in VASP<sup>+/-</sup> rats. C, D: Effect of R-138727 on ADP- or collagen-induced platelet aggregation in VASP<sup>+/+</sup> and VASP<sup>-/-</sup> rats. Data are means ± SEM (*n* = 5). \**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.0001 vs. vehicle in VASP<sup>+/+</sup> rats. †*P* < 0.05, †††*P* < 0.0001 vs. vehicle in VASP<sup>-/-</sup> rats.

## 考察

先行研究において、VASP 遺伝子のエクソン 2 から 13 を破壊した VASP 欠損マウスが作出された。これらのマウスは野生型と同等の寿命であり、組織学的な異常や血小板数の変化も認めていなかった。<sup>120)</sup> VASP の血小板機能における役割は、主として *in vitro* で検討されてきた。しかし、*in vivo* での VASP の血小板および血栓形成における役割は詳細に解析されてこなかった。この一因として、マウスは体が小さく、多くの血液を要する血小板研究や、外科手術により作出することが多い血栓モデルの研究に不都合な場合があった可能性を考えている。これに対して、ラットはマウスよりも体が大きく血液を多く確保でき、外科手術モデルの作製にも適している。加えて、CRISPR/Cas9 系を用いた遺伝子編集技術が進歩し、従来は困難であった遺伝子改変ラットの作出が容易になった。<sup>122)</sup> そこで、ラットを用いて VASP 欠損ラットを作製し、血小板凝集・血栓形成・止血およびプラスグレルの抗血小板作用における VASP の役割について検討した。

CRISPR/Cas9 により、オフターゲット遺伝子の欠損なく VASP 欠損ラットを作出することに成功した。このラットでは、血栓形成や止血において重要な指標である凝固時間 (PT, aPTT) は野生型のそれと同等であった。これに加え、その他の血液生化学的な検査項目のうち、中性脂肪や総コレステロールといった、血小板凝集能や血栓形成に関与するとされる指標<sup>123-125)</sup> も VASP の欠損は影響しなかった。一部の評価項目について、系統間で統計学的に有意な差を認めた (血小板数: VASP<sup>+/+</sup> > VASP<sup>-/-</sup>, 好酸球: VASP<sup>+/+</sup> > VASP<sup>-/-</sup>, 血漿中グルコース濃度: VASP<sup>-/-</sup> > VASP<sup>+/+</sup>) が、その差は小さく、正常値の範囲内であり、実験上特段の注意を払う必要はないものと考えた。これらの結果から、今回作出した VASP 欠損ラットは本研究目的に合致すると判断した。

ADP およびコラーゲンで惹起した血小板凝集、および ADP で惹起した P-セレクチン陽性細胞数について、野生型と VASP ホモ欠損型ラットの間で有意な差を認めなかった。コラーゲンにより惹起する血小板凝集に VASP の寄与がないことは、VASP 欠損マウスを用いた先行研究でも報告されており、<sup>120)</sup> 今回の結果と一致する。このことから、VASP は ADP あるいはコラーゲンによる血小板の活性化および凝集において無視できる、あるいはあったとしても僅かな関与に過ぎないものと考えた。これは、ADP およびコラーゲン刺激を介した血小板機能に対する VASP の作用をラットで示した初めての知見であり、VASP は ADP あるいはコラーゲンによる血小板の活性化および凝集において無視でき

る，あるいはあったとしてもわずかな関与に過ぎないものと考えた。

VASP は血小板のみならず，血管内皮細胞，血管平滑筋細胞といった血栓止血において重要な役割を担う細胞にも発現している。<sup>120, 126)</sup> そのため，*in vitro* のみならず，*in vivo* における血小板凝集，血栓形成および止血機能に対する VASP の関与を評価することがその役割を理解する上で重要である。本研究では，コラーゲンにより惹起する血小板減少症モデル，塩化第二鉄による惹起する動脈血栓モデル，尾出血モデルを用いて VASP 欠損の影響を検討した。その結果，血小板減少，血栓形成，止血のいずれについても VASP の欠損の影響を認めなかったことから，VASP はラットにおいて，血栓形成と止血のいずれにおいても重要な役割を担っていないことが示唆された。先行研究において，VASP 欠損マウス由来の血小板は，野生型のそれに比べて P-セレクチンおよび糖タンパク質 IIbIIIa 依存的に血管内皮細胞に強く粘着することが示されている。<sup>121)</sup> この VASP 欠損に伴う強固な粘着は，虚血再灌流や動脈硬化といった血栓性の刺激の存在下でさらに増悪することも示されている。<sup>121)</sup> 先行研究と本研究の結果の差異は，使用した動物種の違い，用いた血栓刺激の違いに起因しているかもしれない。

PRI は血小板上の P2Y<sub>12</sub> 受容体の拮抗に特異的なバイオマーカーであり，非 ST 上昇型の急性冠症候群患者の予後を良好に予測しうることが報告されている。<sup>43, 44, 127)</sup> 本研究において，プラスグレルの活性代謝物である R-138727 は野生型ラット血液において PRI を濃度依存的に減少させたが，VASP ホモ欠損ラットにおいては VASP 抗原が存在しないために PRI 減少を評価できなかった。一方，ADP およびコラーゲン刺激により惹起した血小板凝集に対する R-138727 の抗血小板作用の IC<sub>50</sub> 値は野生型と VASP ホモ欠損ラットと同等であった。このことから，VASP はプラスグレルの抗血小板作用に対して直接関与しないことが明らかとなった。同時に，PRI と IPA を指標とした R-138727 の IC<sub>50</sub> 値はいずれの系統でも同等の値を示したことから，PRI は P2Y<sub>12</sub> を介した抗血小板作用をよく反映するバイオマーカーであることが確認された。

以上の結果から，VASP は血小板凝集，血栓形成，止血およびプラスグレルの抗血小板作用において主要な役割を果たしていないことが示唆された。特にプラスグレルの作用から得られた知見は，その他の P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬であるクロピドグレルやチカグレロルにも当てはまるであろう。

## 結論

本研究により、VASP 欠損ラットを作出し、VASP は ADP およびコラーゲンによる血小板凝集、血栓形成、止血およびプラスグレルの抗血小板作用において主要な役割を果たしていないことを示した。VASP 欠損ラットは、血小板および血管生物学研究において有用であるものと思われた。

## 第六章 実験材料・方法

### 第二章に関して

#### 動物

動物作出は株式会社特殊免疫研究所にて行った。Brown Norway ラット由来の t-PA 遺伝子近傍 (-85.5 から +85.2 kb) の配列を保持する bacterial artificial chromosome (BAC) クローンのひとつ CH230-396J3 を BACPAC リソースセンター (Children's Hospital Oakland research Institute) より入手した。Red/ET 系<sup>57)</sup>により t-PA 遺伝子のエクソン 5 と 6 の間に EcoRI サイトを挿入した組換 BAC クローンを作製し、内在性の t-PA 遺伝子と外来 t-PA 遺伝子を区別できるようにした。組換 BAC クローンを Wistar ラット (日本チャールスリバー株式会社) の受精卵にマイクロインジェクションし、偽妊娠メス Wistar ラットに移植した。産仔の DNA を尾部より抽出し、<sup>32</sup>P でラベルしたエクソン 4 の断片をプローブとしたサザンブロット解析により、t-PA 遺伝子の挿入を確認した。コピー数には段階希釈した BAC コンストラクトを使用した。遺伝子導入陽性の個体を t-PA Tg, 陰性個体を non Tg とした。動物は 6 もしくは 7 週齢で入荷し、1 ケージあたり 3 匹以下で飼育し、水道水および固形飼料 (FR-2, 株式会社フナバシファーム) を自由摂取させた。

#### 被験物質

rt-PA (アクチバシン注) は協和発酵キリン株式会社より入手した。rt-PA は付属の注射用水で溶解した後、生理食塩液 (日本薬局方 大塚生食注, 株式会社大塚製薬工場) にて所定の濃度まで希釈した。生理食塩液は vehicle として使用した。被験物質は、投与総量の 1/10 容を急速に静脈内投与し、残り 9/10 容をシリンジポンプ (TE-361, テルモ株式会社) で 1 時間かけて静脈内より持続投与した。

#### 血液学的評価

ラットに対してチオペンタールナトリウム (ラボナール注射用, 田辺三菱製薬株式会社) を 100 mg/kg の用量で腹腔内投与することで麻酔をかけ、血液は 3.13% (w/v) のクエン酸を 1/10 容含むクエン酸加血として採血した。血液中の赤血球, ヘモグロビン, ヘマトクリット, 血小板, 白血球, 好中球, リンパ球, 単球, 好酸球, 好塩基球は自動血液分析機 (XT-2000iV, シスメックス株式会社) により測定した。



#### 定常状態での t-PA mRNA 発現量

チオペンタールナトリウムで麻酔をかけたラットを開腹し、左心室から 10 mL の生理食塩液を灌流し、肝臓、肺、脳、腎臓、心臓を摘出した。Total RNA の抽出および逆転写による cDNA 合成には RNeasy Mini Kit (キアゲン株式会社) および High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) を使用した。絶対検量線法による定量的 PCR を、PCR 試薬として Taqman Gene Expression Master Mix (ライフテクノロジーズジャパン株式会社)、遺伝子特異的なプローブとして Taqman Gene Expression Assays (ライフテクノロジーズジャパン株式会社、ラット t-PA : Rn01482578\_m1, ラット  $\beta$ -actin : Rn00667869\_m1), サーマルサイクラー兼検出器として 7900HT Fast Real Time PCR System (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) を用いて行った。全ての手順は製造元の手引きに従った。

#### 永続的な局所脳虚血における脳での t-PA mRNA 発現量

ラットに対してブプレノルフィン塩酸塩 (レペタン注, 大塚製薬株式会社) 0.04 mg/kg を皮下投与することで鎮痛処置を行い、その後イソフルラン吸入 (エスカイン吸入麻酔液, ファイザー株式会社) により麻酔をかけた。脳梗塞の好発部位のひとつである中大脳動脈 (Middle cerebral artery, MCA) 近傍の局所的な脳血流は、側頭筋と頭蓋骨の間にレーザードップラー血流計のプローブを固定することで測定した。市販ナイロン糸 (4-0 fine MCAO suture L56PK10, Doccol Corporation) を外頸動脈から内頸動脈へと挿入することで MCA へ向かう血流を遮断した。<sup>128)</sup> 局所的な脳虚血の成立は、レーザードップラーのシグナル減少により確認した。ナイロン糸は犠牲死まで留置し、脳虚血モデルの作製後は術部を閉創し、麻酔から覚醒させた。虚血処置から 24 時間後に脳を摘出し、虚血側と対称側の組織を用いて t-PA mRNA の定量的 PCR を行った。

#### 凝固線溶パラメーターの測定

血漿はクエン酸加血を 2,200 × g, 4°C で 10 分間遠心分離して回収した。血清は、血清分離キット (有限会社フチガミ器械) を用いて回収した。プロトロンビン時間 (prothrombin time, PT) および血漿フィブリノーゲン濃度は HemosIL PT Fibrinogen HS PLUS (株式会社 LSI メディエンス), 活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time, aPTT) は HemosIL SynthASil (株式会社 LSI メディエンス) を用いて血液凝固検査システム (ACLTOP500 CTS, Instrumentation Laboratory) にて測定した。血漿中 t-PA 濃度, 血漿中  $\alpha_2$ -AP 活性は Tissue Plasminogen Activator rat ELISA Kit (Abcam plc.) および テストチーム S APL (積水メディカル株式会社) を用いて測定した。遊離 PAI-1 およびプラスミノゲン濃度は PAI1 (SERPINE1) Rat SimpleStep ELISA Kit (Abcam plc.) および Plasminogen rat ELISA Kit (Abcam plc.) を用いて測定した。

#### 出血時間の測定

チオペンタールナトリウムで麻酔をかけたラットを 37°C の保温マット上で仰臥位にし, 剃刀 (FAS-10, フェザー安全剃刀株式会社) を用いて尾の先端部から 4 cm の箇所に深さ 1 mm の切創を行い, 尾動脈から出血させた。切創から 30 秒毎に出血部にろ紙 (No.2, アドバンテック東洋株式会社) を押し当てる操作を 30 分間繰り返した。ラットの尾部に押し当てた側をろ紙の表面として, ろ紙の裏面まで滲出してきた出血痕の数を計測し, これに 30 を乗じることでその個体の出血時間 (秒) を算出した。

#### 組織因子により誘導した過凝固モデル

リコンビナント TF (Dade Innovin, GTN-200A, 10 mL バイアル, シーメンス株式会社) を 5 mL の生理食塩液で溶解し, チオペンタールで麻酔をかけたラットに対して静脈内から 20 分間, 7.5 mL/kg/h の速度で持続静注した。持続投与にはシリンジポンプ (TE-361) を使用した。採血は, TF の投与開始前, および 20, 45, 90, 120 分後とし, 3.13% (w/v) のクエン酸を 1/10 容含むクエン酸加血として採血した。クエン酸加血を 2,200 × g, 4°C で 10 分間遠心分離して血漿を回収した。血漿中 D-Dimer 濃度は, 血漿を Factor Diluent (株式会社 LSI メディエンス) で 20 倍希釈した後, エルピアエース D-Dimer II (株式会社 LSI メディエンス) を用いて血液凝固検査システム (ACLTOP500 CTS) にて測定した。

## 血栓性脳梗塞モデルにおける rt-PA の用量反応性

ラットの MCA より下流の脳血流を血栓性に閉塞させるために、他家血を用いた全血塊を調製した。チオペンタールで麻酔をかけたラットから 3.13% (w/v) のクエン酸を 1/10 容含むクエン酸加血として全血を採取した。リコンビナント TF (Dade Innovin, 10 mL バイアル) を 5 mL の生理食塩液で溶解し、全血 550  $\mu$ L と TF 25  $\mu$ L を混和して速やかにポリエチレンチューブ (PE50, 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) に引き込んだ。室温で 2 時間インキュベートして全血塊を調製し、4°C の冷蔵庫で一晩保存した。翌日、全血塊を生理食塩液中で洗浄して凝固しなかった赤血球を除去し、1 ピース 2 cm に切って全血塊を調製した。カテーテル (SP31, 株式会社夏目製作所) に全血塊 1 ピースを吸い込み、生理食塩液を満たしたハミルトンシリンジ (ジーエルサイエンス株式会社) と接続した。ラットに対してブプレノルフィン塩酸塩 0.04 mg/kg を皮下投与することで鎮痛処置を行い、その後イソフルラン吸入により麻酔をかけた。MCA 近傍の局所的な脳血流は、側頭筋と頭蓋骨の間にレーザードップラー血流計のプロブを固定することで測定した。全血塊 1 ピースを吸い込んだ SP 31 チューブを外頸動脈から内頸動脈へと挿入し、40  $\mu$ L の生理食塩液で全血塊を MCA に向かって注入することで血流を遮断した。局所的な脳虚血の成立は、レーザードップラーのシグナル減少により確認した。全血塊の注入前後で脳血流が 40% 以上残っていた個体は虚血が不十分と判定し、実験から除外した。全血塊の注入から 5 分後に rt-PA (1 or 10 mg/kg) もしくは vehicle の投与を開始した。被験物質は、投与総量の 1/10 容を急速に静脈内投与し、残り 9/10 容をシリンジポンプ (TE-361, テルモ株式会社) で 1 時間かけて静脈内より持続投与した。脳血流は全血塊の注入から 110 分間測定し、15 分毎の脳血流の平均値を全血塊注入前の平均値に対する割合 (%) で表示した。加えて、脳血流の経時変化の AUC (0 分から 110 分, 単位 %  $\cdot$  min) を算出した。

## 統計解析

要約統計量の算出は全てマイクロソフトエクセル 2010 (日本マイクロソフト株式会社) で行い、データは平均値  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  SEM) で表示した。統計解析には SAS システムリリース 9.2 (SAS Institute Inc.) を使い、スチューデントの *t* 検定もしくはダンネットの多重比較を行った。P 値が 0.05 未満であったときに有意差ありと判定した。

### 第三章に関して

#### 動物

雄性 t-PA Tg ラットは第二章にて作出したものを使用した。

#### 被験物質

PCI はシグマアルドリッチジャパンから購入した。PCI の溶媒 (vehicle) には生理食塩液を使用した。PCI をラットに投与した際の *ex vivo* での TAFIa 阻害活性を踏まえ、<sup>53)</sup> 用法用量は 0.1, 1, 10 mg/kg の静脈内への急速投与とした。rt-PA の入手先、調製法並びに投与法は第二章に関する実験材料・方法の記載に準じた。いずれの被験物質についても、vehicle は生理食塩液とした。

#### TF により誘導した過凝固モデル

モデル作製法、採血法、および血漿中 D-Dimer 測定法は第二章に関する実験材料・方法の記載に準じた。PCI もしくは vehicle は TF 負荷開始 5 分前に投与し、TF 負荷から 20 分後に採血し、血漿中 D-Dimer 濃度を測定した。

#### 塩化第二鉄により誘導した深部静脈血栓モデル

PCI の静脈血栓に対する抗血栓作用を t-PA Tg ラットおよび non Tg ラットで比較するため、塩化第二鉄によってフィブリンを主体とした血栓を誘導する深部静脈血栓モデルを用いた。<sup>129, 130)</sup> ラットに対してチオペンタールナトリウムで麻酔をかけ、腎静脈に分岐する下大静脈に 20G 注射針の太さに相当する狭窄をかけ、2 mm × 5 mm のろ紙 (No.2) 1 片を下大静脈上におき、10% (w/v) 塩化第二鉄を 3.5 μL 浸みこませて 5 分間刺激した。PCI もしくは vehicle は塩化第二鉄による刺激の 5 分前に頸静脈から投与した。血栓の摘出は塩化第二鉄による刺激から 90 分後に行い、血栓湿重量を測定した。

#### 塩化第二鉄により誘導した動脈血栓モデル

PCI の動脈血栓に対する抗血栓作用を t-PA Tg ラットおよび non Tg ラットで比較する目的で、塩化第二鉄によって血栓を誘導する動脈血栓モデルを用いた。一般に、動脈では静脈よりも血流が速いため、血小板を主体とした血栓が形成されと考えられている。<sup>76, 77)</sup> ラットに対してイソフルランによる吸入麻酔をかけ、総頸動脈を露出し、1 mm × 10 mm のろ紙 (No.2) 2 片で総頸動脈を挟み、10% (w/v) 塩化第二鉄を 3.5 μL 浸みこませて

10 分間刺激した。PCI もしくは vehicle は塩化第二鉄による刺激の 5 分前に頸静脈から投与した。モデルの作製後は術部を閉創し、麻酔から覚醒させた。血栓の摘出は塩化第二鉄による刺激から 360 分後にイソフルラン吸入麻酔下で行い、血栓湿重量を測定した。

#### 尾出血モデル

尾出血モデルの作製法は第一章、材料と方法の記載に準じた。rt-PA は 1, 10 mg/kg の用量で投与した。rt-PA と PCI の出血時間に対する作用を同一の実験のなかで比較するために、PCI は、0.1, 1, 10 mg/kg の用量で頸静脈より急速投与したのち、vehicle を rt-PA の投与方法と同じ要領で 1 時間かけて頸静脈より持続投与した。剃刀を用いた尾への切創は、被験物質の投与開始から 30 分後に行い、そこから 30 分間の出血時間を測定した。

#### 統計解析

要約統計量の算出は全てマイクロソフトエクセル 2010 (日本マイクロソフト株式会社) で行い、データは平均値 ± 標準誤差 (mean ± SEM) で表示した。統計解析には SAS システムリリース 9.2 (SAS Institute Inc.) を用い、被験物質の作用は vehicle 群を対照群としたスティーラ検定による多重比較を行った。用量反応性は、スピアーマンの相関係数検定により評価した。P 値が 0.05 未満であったときに有意差ありと判定した。

#### 第四章に関して

##### 動物

雄性の巴马ミニブタは吴江市田宇生物科技有限公司 (中国) から 3 週齢で購入し、定温・定湿度下で飼育した。動物は 6 もしくは 7 週齢で入荷し、1 頭ずつ個別飼育し、固形飼料 (ミニブタ標準飼料, 北京科澳協力饲料有限公司) 50 g を 1 日 2 回摂食させ、水道水を自由摂取させた。

##### 被験物質および試薬

プラスグレル塩酸塩 (以下、プラスグレルと表記, 分子式  $C_{20}H_{20}FNO_3S \cdot HCl$ ) は宇部興産株式会社にて合成されたものを使用した。アスピリンは Cayman Chemical より購入した。プラスグレルとアスピリンは、5% (w/v) のアラビアゴム (辰欣薬業股份有限公司) に懸濁した。ローズベンガルは和光純薬工業株式会社より購入した。ADP はシグマアルドリッチジャパンより購入した。コラーゲンは株式会社エルエムエスより購入した。

## 群構成

全ての実験は sham 群, MI 群, MI にアスピリン (10 mg/kg, 経口投与) とプラスグレル (1 mg/kg, 経口投与) の DAPT 処置を行う群 (MI/DAPT) の三群構成とした. アスピリンとプラスグレルは逐次的な投与とし, DAPT の用量は, 既報<sup>131)</sup> を元に ADP 刺激による血小板凝集の抑制率が臨床と同等 (45-70%) となるように設定した.<sup>106-109)</sup>

## PIT による MI モデル

動物はモデル作製前日の夕方より絶食を行った. モデル作製の当日, ケタミン (福建古田薬業有限公司) 10 mg/kg を筋肉内投与し麻酔をかけたあと気管挿管を行い, 人工呼吸器 (SN23402, Hallowell Engineering and Manufacturing Corporation) を用いて酸素とイソフルラン 0.5-2%の混合ガスによる調節呼吸 (換気量 80 mL, 換気回数 20 回/min 前後) を行って麻酔を維持した. 術前に鎮痛薬として塩酸ブプレノルフィン (大塚製薬株式会社) を筋肉内に 0.01 mg/kg 投与した. 電気メスを用いて開胸し, 心臓を露出させた. 冠状動脈左前下行枝と LCx の分岐部を確認し, LCx を剥離した. パルストッパー血流計 (TS420, Transonic Systems Inc.) のプローブ (MA0.7PSB, Transonic Systems Inc.) を緑色光の照射部位より下流側の LCx に設置した. キセノンランプ (GL532TA-100FC, Shanghai Laser & Optics Century Co., Ltd.) を光源装置とした緑色光プローブ (波長 532 nm) を LCx に設置した. 被験物質あるいは vehicle 投与の 4 時間後に照射 (600 万 ルクス) を開始し, それと同時にローズベンガル 20 mg/kg を 6 分間かけて静脈内投与した. 緑色光の照射時間は 30 分とした. Sham 群には緑色光照射は行わず, 30 分間放置した. 血流測定は照射開始から 3 時間後まで実施し, TTO および PR を算出した. 血流測定の終了とともに胸部を縫合し, ペニシリン (石薬集団中諾薬業有限公司) 10 万 unit/body を筋肉内投与し, 麻酔から覚醒させ飼育ケージに戻した.

## 心電図のモニタリング

血圧・心電図用送信器 (TL11M2-D70-PCT, Data Sciences International) の心電図電極を, 皮下の胸部右外側部と腹部左外側部に留置した. 緑色光の照射開始から 1 時間以内の ST 上昇の有無を確認し, 照射開始から 24 時間後の異常 Q 波の発現率を心電図 100 拍から算出した.

## 心機能の測定

緑色光の照射から 24 時間後に、ケタミン 10 mg/kg の筋肉内投与により導入麻酔を行い、ペントバルビタールナトリウム (北京東方事博精細有限公司) 30 mg/kg の静脈内投与により麻酔をかけた。心機能の指標として、LVEDV, LVESV, SV, LVEF を心エコー本体 (S8 Exp, 深圳開立生物医療科技股份有限公司) およびプローブ (5P2, 深圳開立生物医療科技股份有限公司) を用いて測定した。

## 梗塞サイズの測定

心機能の測定を完了した個体を犠牲死させ、心臓を摘出した。摘出した心臓は、左室部分を短軸方向に心基部から心尖部まで 4 mm 間隔でスライスし、1% (w/v) TTC/5% (w/v) formamide 溶液 (シグマアルドリッチジャパン) で染色した。梗塞領域は TTC による染色をうけなかった白色部分とし、Image J (ImageJ 1.44P, National Institutes of Health) を用いて面積 (mm<sup>2</sup>) を算出した。切片ごとの梗塞体積 (mm<sup>3</sup>) は、各切片の梗塞面積に厚みである 4 mm を乗じて算出し、個体ごとの梗塞体積は切片ごとの梗塞体積の総和として算出した。

## 血小板凝集

心臓摘出の際、腹部大静脈からクエン酸加採血 (3.2% [w/v] のクエン酸を 1/10 含む) を行った。血液は、200 × g で 5 分間遠心し、多血小板血漿 (platelet rich plasma, PRP) を分離した。PRP の一部を 1,700 × g で 5 分間遠心し、乏血小板血漿 (platelet poor plasma, PPP) を分離した。PRP 中の血小板数を総合血液学検査装置 (ADVIA2120, SIEMENS) で測定し、PPP で希釈し 20 万個/μL とした。20 万個/μL の PRP 280 μL を血小板凝集測定装置 (LBY-NJ4, Precil Instrument Co., Ltd.) にセットし、37°C で 2 分間インキュベートした。その後、75 および 300 μmol/L の ADP 溶液あるいは 30, 75 および 187.5 μg/mL のコラーゲン溶液 20 μL を添加して 5 分間反応させ、ADP 終濃度 5 および 20 μmol/L, コラーゲン終濃度 2, 5 および 12.5 μg/mL における血小板凝集を測定した。5 分間の反応による最大血小板凝集率をその個体の血小板凝集率 (%) とした。

## 統計解析

心電図における ST 上昇率を除く全ての要約統計量は平均値 ± 標準誤差 (mean ± SEM) で表示した. 統計解析には SAS システムリリース 9.2 (SAS Institute Inc.) を用い, sham 群と MI 群および MI 群と MI/DAPT 群の比較はスチューデントの *t* 検定を行った. *P* 値が 0.05 未満であったときに有意差ありと判定した. 分散が 0 であった場合はマンホイットニーの *U* 検定を行った. ST 上昇率はフィッシャーの正確性検定により分析した. *P* 値が 0.05 未満であったときに有意差ありと判定した.

## 第五章に関して

### 動物

動物作出は株式会社特殊免疫研究所にて行った. VASP ヘテロ欠損 (VASP<sup>+/-</sup>) ラットは CRISPR/Cas9 系<sup>122)</sup> を用いて作出, 系統化した. ガイド RNA をラット VASP 遺伝子の上流 (5'-GTGCAGCGTCCGAACCTCGC) と下流 (5'-TAAATGCTATGCCCCATCGA) に 2 箇所設計した. ガイド RNA と Cas9 mRNA を Slc:SD ラット (SD, 日本エスエルシー株式会社) の受精卵にマイクロインジェクションし, 偽妊娠メス SD ラットに移植した. 産仔の DNA を尾部より抽出し, PCR とダイレクトシーケンシングによりファウンダー個体における VASP 遺伝子の欠損を確認した. PCR に用いたプライマーの配列は forward: 5'-CCACAAGACTGAGAGGAAGGAGT, reverse: 5'-AGACACTGCAGGATGGAGGAAG であった. ファウンダーを野生型 SD ラットと交配することで系統した F1 世代において, ガイド RNA の配列情報から推定されるオフターゲット候補遺伝子 (5'-side: Rasal1, Mstol1, Eml1, Fbxl1, and Tp53inp2; 3'-side: Gimap8, Tmco4, and RGD1564380, Supplementary Table S1) の欠損を PCR にて評価した (プライマーセットは Supplementary Table S2 に示す). VASP<sup>+/-</sup> ラット同士を交配し, 野生型 (VASP<sup>+/+</sup>), VASP<sup>+/-</sup>, ホモ欠損型 (VASP<sup>-/-</sup>) の産仔を得た. 動物は 1 ケージあたり 3 匹以下で飼育し, 水道水および固形飼料 (FR-2, 株式会社フナバシファーム) を自由摂取させた.

### 被験物質

プラスグレル塩酸塩 (本論文中ではプラスグレルと表記, 分子式 C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>FNO<sub>3</sub>S·HCl) の活性代謝物 R-138727 (分子式 C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>FNO<sub>3</sub>S) は宇部興産株式会社にて合成されたものを使用した. 生理食塩液 (日本薬局方 大塚生食注, saline) は株式会社大塚製薬工場より購入し, vehicle として使用した.



## ウエスタンブロット解析

ラットにチオペンタールナトリウム (田辺三菱製薬株式会社) 100 mg/kg を腹腔内投与することで麻酔をかけたのちに放血死させ、右室から 2 U/mL の未分画ヘパリン (持田製薬株式会社) を含む saline 150 mL で灌流した。大脳、小脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、胃、小腸、大腸を速やかに採取し、RNAlater 溶液 (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) に浸漬した。各々の組織片を 20 mg 程度採取し、Halt Protease & Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktails (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を所定の量添加した T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) 中でホモジナイズした。ホモジナイザーには Tissue Ruptor (株式会社キアゲン) を用いた。4°C, 20,400 × g で 10 分間遠心分離して得た上清中のタンパク質濃度を Pierce BCA Protein Assay Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) にて測定した。組織ホモジネートの上清と、2-メルカプトエタノール (ナカライテスク株式会社) を所定の量添加した 4× Laemli Sample Buffer (バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社) を混和し、95°C に設定したヒートブロック中で 5 分間インキュベートし変性させた。変性させたサンプルを、VASP 検出用に 10 µg/レーン、内部標準として β-actin 検出用に 1 µg/レーン、加えて分子量マーカー (Precision Plus Protein Dual Color Standards, バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社) を 10% ポリアクリルアミドゲル (ディー・アール・シー株式会社) にアプライし、電気泳動を行った。泳動後のゲルの PolyVinylidene DiFluoride (PVDF) 膜への転写には、緩衝液として NuPAGE transfer buffer (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を用い、4°C の低温室内でタンク式転写装置を用いて 250 mA で 120 分間かけて転写を行った。転写後の膜は、0.1% の Tween20 を含む TRIS Buffer Saline (TBS-T) で洗浄し、ブロッキング試薬 (PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal, 東洋紡株式会社) で 1 時間ブロッキングした。PVDF 膜を TBS-T で 3 回洗浄し、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution I (東洋紡株式会社) で希釈した 1 次抗体 (VASP antibody [3112S, CST ジャパン株式会社, 1,000 倍希釈], anti-β-actin antibody produced in mouse [A5441, シグマアルドリッチジャパン] 10,000 倍希釈) を添加して 4°C で一晩インキュベートした。再度 PVDF 膜を TBS-T で 3 回洗浄し、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution II (東洋紡株式会社) で希釈した 2 次抗体 (VASP: Alexa Fluor 680 anti-rabbit IgG, β-actin: Alexa Fluor 680 anti-mouse IgG [いずれもサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社] 10,000 倍希釈) を添加し、室温、遮光下で 1 時間インキュベートした。再度 PVDF 膜を TBS-T で 3 回洗浄し、赤外線イメージャー

(Odyssey, LI-COR Inc.) でタンパク質を検出した。

#### 血液学および血液生化学的な評価

ラットにイソフルラン吸入 (エスカイン吸入麻酔液, ファイザー株式会社) により麻酔をかけ, 大動脈より採血を行った。血液学的な評価項目は血液分析機 (ADAVIA2120, SIEMENS) にて, 血液凝固時間は自動凝固分析機 (CA-1500, シスメックス株式会社) にて, 血液生化学的な評価項目は自動生化学分析機 (7180, 株式会社日立ハイテクノロジー) にて測定した。

#### 血小板凝集

3.8% (w/v) のクエン酸を 1/10 含むクエン酸加血をラット大動脈より採取した。血液は, 150 × g で 10 分間遠心し, PRP を分離した。PRP の一部を 2,000 × g で 10 分間遠心し, PPP を分離した。PRP を PPP で希釈し,  $(500 \pm 50) \times 10^3/\mu\text{L}$  とした。PRP 120  $\mu\text{L}$  を血小板凝集測定装置 (PRP31M3, IMI Corporation) にセットし, 37°C で 1 分間インキュベートした。その後, 5  $\mu\text{L}$  の ADP 溶液あるいはコラーゲン溶液を添加して 15 分間反応させ, ADP 終濃度 1.25, 5 および 20  $\mu\text{mol/L}$ , コラーゲン終濃度 2 および 10  $\mu\text{g/mL}$  における血小板凝集を測定した。5 分間の反応による最大血小板凝集率をその個体の血小板凝集率 (%) とした。プラスグレルの抗血小板作用を評価する際は, R-138727 (終濃度 1, 3, 10, 30, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) もしくは vehicle (saline) を PRP に添加し, 30 分後に ADP を終濃度 20  $\mu\text{mol/L}$  もしくはコラーゲンを終濃度 10  $\mu\text{g/mL}$  で添加した。血小板凝集阻害率 (Inhibition of Platelet Aggregation, IPA) は以下の計算式にて算出した。

$$\text{IPA (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A = vehicle 添加時の血小板凝集率 (%)

B = R-138727 添加時の血小板凝集率 (%)

#### フローサイトメトリーによる活性化血小板の測定

血小板の活性化の指標としてフローサイトメトリーにより血小板上の P-セレクトリンを測定した。クエン酸加血 10  $\mu\text{L}$  を 3  $\mu\text{L}$  の ADP (終濃度 1.25, 5, 20  $\mu\text{mol/L}$ ) もしくは PBS と混和し, さらに fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled hamster anti-mouse CD61 antibody (Clone 2C9.G2, BD Biosciences), 3  $\mu\text{L}$  of phycoerythrin (PE)-labeled mouse anti-human CD62P antibody (Clone Psel.KO.2.7, BD Biosciences), そして 11  $\mu\text{L}$  の PBS をマイクロチューブ内

で混和して室温で 15 分間インキュベートした。500  $\mu$ L の FACS Lysing Solution (BD Biosciences) を加えて 30 分間インキュベートし、赤血球を溶解させた。フロー際とメーターには FACS Canto II (BD Biosciences) を用い、FITC 陽性細胞を血小板、PE 陽性細胞を活性化した血小板と判定した。10,000 個の FITC 陽性細胞あたりの PE の蛍光ヒストグラムの平均値を個体あたりの活性化血小板数の指標とした。

#### コラーゲン誘導性の血小板減少症モデル

ラットにチオペンタールナトリウム 100 mg/kg の腹腔内投与することで麻酔をかけた。コラーゲン溶液 (Collagen I, rat tail, サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を saline で希釈し、0.1, 0.3, 1 mg/mL とした。希釈したコラーゲン溶液もしくは vehicle (saline) を 1 mL/kg の容量で頸静脈内に急速投与した。コラーゲンの投与前、および 20, 45, 90, 120 分後とし、3.8% (w/v) のクエン酸を 1/10 容含むクエン酸加血として採血した。血小板数は自動血液分析機 (セルタック  $\alpha$ , 日本光電工業株式会社) で計測し、各時点での血小板数はコラーゲン投与前の血小板数に対する割合 (%) として示し、曲線下面積 (%  $\cdot$  min) を算出した。

**Supplementary Table S1 Candidate off-target genes in vasodilator-stimulated phosphoprotein gRNAs.**

**VASP upstream gRNA**

Sequence: GTGCAGCGTCCGAACCTCGCCGG

on-target locus: chr1:-81452591

number of offtarget sites: 23 (9 are in genes)

Off-target candidate sequences	Score	Mismatches	UCSC gene	Locus	Gene symbol
GTCCAGCCTCGGAACCTCGGCAG	0.4	4MMs [3:8:11:20]	NM_001108335	chr12:-43306462	Rasa1
CTGCAGCGTGAGCACCTCGCGGG	0.3	4MMs [1:10:11:13]	NM_001106443	chr2:+207615574	Msto1
GTTTCAGCCTCCGAACCACGTCGG	0.3	4MMs [3:8:17:20]	NM_001025741	chr6:-141552861	Eml1
GTGCTGCGTCTCAACCTCTCTGG	0.1	4MMs [5:11:12:19]	NM_001109128	chr19:+48090791	Fbxl8
CTGCAGCCTCCGCACCTGGCCAG	0.1	4MMs [1:8:13:18]	NM_001270947	chr3:-157283350	Tp53inp2

**VASP downstream gRNA**

Sequence: TAAATGCTATGCCCCATCGAAGG

on-target locus: chr1:+81437056

number of offtarget sites: 90 (6 are in genes)

Off-target candidate sequences	Score	Mismatches	UCSC gene	Locus	Gene symbol
CTAATGCTTTGCCCCATCCAAAG	0.3	4MMs [1:2:9:19]	NM_001033923	chr4:+142950824	Gimap8
TACATTCAATGCCCCATGGATGG	0.2	4MMs [3:6:8:18]	NM_001034949	chr5:+161211217	Tmco4
TAAATGCTATGCCAGTTCATGG	0	4MMs [14:15:16:19]	NM_001170329	chr1:-82806734	RGD1564380
TAAATGCTATGCCAGTTCATGG	0	4MMs [14:15:16:19]	NM_001170329	chr1:-82813467	RGD1564380
TAAATGCTATGCCAGTTCATGG	0	4MMs [14:15:16:19]	NM_001170329	chr1:-84155999	RGD1564380

Number of possible off-target sites were 23 (9 are in genes) for upstream and 90 (6 are in genes) for downstream. Top 5 of candidate genes were listed.

**Supplementary Table S2 Primer pairs of off-target candidates.**

Gene symbol		
Rasal1	Forward	5'-AGATCGCAGCGCACAGCTAC
	Reverse	5'-CTGAGAGCCCCCTCCCACAG
Mstl1	Forward	5'-GGCCCTAGAGGAGGAAGAGG
	Reverse	5'-AAGACGTCCGGGCACAGCTC
EM11	Forward	5'-TCTTAGGTCCGGTAGACTGTGTCTG
	Reverse	5'-CAAAGCACACCAACAAAGACTGT
Fbx18	Forward	5'-CCCTTTTACACTTCTGGCACTG
	Reverse	5'-CCAGTACAGAGGGTCTCACCAC
Tp53inp2	Forward	5'-TGTACCCCTCAGTTAGGACATCA
	Reverse	5'-CTGCTACAGAGGAGGCAGAAGG
Gimap8	Forward	5'-CACAAAGGAAACTGAGGACAGTG
	Reverse	5'-GCTCCATAGAACAACAGAGTCCA
Tmco4	Forward	5'-TTTCACACAGAGGGAGTAGACCA
	Reverse	5'-CCAGGCTACCTTGGATTACAAAC
RGD1564380	Forward	5'-CAGCACCAAAGTGCTACTTGACT
	Reverse	5'-ATTCCTCCCTAACACCCAGAGTT

#### ラット血栓モデル

モデルの誘導には 6 週齢のラットを用いた。ラットにイソフルラン吸入により麻酔をかけ、右頸動脈を露出させた。血流測定のためのプローブ (MC0.5PSB, Transonic Systems, Inc.) を右頸動脈に装着し、パルスドップラー血流計 (TS420, Transonic Systems, Inc.) により経時的に血流を測定した。40% (w/v) 塩化第二鉄を浸みこませた 2 mm × 3 mm のろ紙 (No.2) 1 片を頸静脈上におき、3 分間刺激した。刺激から 60 分間血流を測定し、血流の完全な途絶が 1 分間を超えた時点を TTO, 60 分間のうち、血流の途絶が見られなかった時間の割合を血管開存率とした。血流測定を終えた個体は放血死させ、10% 中性ホルマリン緩衝液で 5–10 分間灌流固定した。塩化第二鉄により障害した頸動脈を採材し、10% 中性ホルマリン緩衝液に浸漬した。標本は頸動脈から 3 箇所 (塩化第二鉄で刺激した頸動脈の中央部, 中央部から 100, 200 μm 遠位部) 作製した。パラフィン切片を作製し、HE 染色, EVG 染色を行った。EVG 染色では、血管内腔面積 (A) と血栓面積 (T) を画像解析ソフトウェア (Win ROOF 2013, Mitani Corporation) を用いて計測し、狭窄率 ( $100 \times T/A$ ) を算出した。なお、血管内腔面積、血栓面積および狭窄率は 3 つの標本の平均値を個体ごとの計測値とした。

#### ラット出血モデル

ラットにチオペンタールナトリウム 75 mg/kg の腹腔内投与することで麻酔をかけた。実験者に対して系統をブラインド化した状態で、麻酔をかけたラットを 37°C の保温マット上で仰臥位にし、剃刀 (No.11, フェザー安全剃刀株式会社) を用いて尾の先端部から 4 cm の箇所に深さ 1 mm の切創を行い、尾動脈から出血させた。切創から 15 秒毎に出血部にろ紙 (No.2) を押し当てる操作を 30 分間繰り返した。ラットの尾部に押し当てた側をろ紙の表面とし、ろ紙の裏面まで滲出してきた出血痕の数を計測し、これに 15 を乗じることによってその個体の出血時間 (秒) を算出した。

#### PRI の測定

VASP のリン酸化はヒト血液サンプル用の測定キット (CY-QUANT VASP/P2Y12, BioCytex) を用いて付属のマニュアルに従って測定した。ラット全血サンプルを R-138727 (終濃度で 1, 3, 10, 30, 100 μmol/L) もしくは vehicle (saline) と 1 時間インキュベートした。全血は 1 対のチューブに分け、キット付属の活性化剤 A (prostaglandin E1[PGE<sub>1</sub>]) と B (PGE<sub>1</sub>+ADP) を添加し、室温で 10 分間インキュベートした。付属の赤血球溶解液を

加えてサンプル中の赤血球を破壊し、マウス抗ヒト VASP モノクローナル抗体をコートした 96 well プレートにサンプルを添加した。室温で 30 分間インキュベートした後、300  $\mu\text{L}/\text{well}$  の洗浄用緩衝液で 3 回洗浄した。ペルオキシダーゼで標識されたマウス抗ヒトリン酸化 VASP 抗体を 2 次抗体として添加し、室温で 30 分間インキュベートした後、300  $\mu\text{L}/\text{well}$  の洗浄用緩衝液で 3 回洗浄した。3,3',5,5'-テトラメチルベンゾイミンを添加して発色させ、室温で 30 分間インキュベートした後、反応停止液として硫酸を添加して黄色の生成物を生じさせた。450 nm の波長での吸光度をプレートリーダー (SpectraMax Plus 384, モレキュラーデバイスジャパン株式会社) で測定した。血液中のリン酸化 VASP, および PRI 以下の計算式により算出した。

$$\text{Phosphorylated VASP antigen} = \text{OD(PGE1)} - \text{OD(blank)}$$

$$\text{PRI}(\%) = \frac{\text{OD(PGE1)} - \text{OD(PGE1 + ADP)}}{\text{OD(PGE1)} - \text{OD(blank)}} \times 100$$

OD(PGE<sub>1</sub>) = absorbance at 450 nm (activator A sample)

OD(PGE<sub>1</sub>+ADP) = absorbance at 450 nm (activator B sample)

OD(blank) = absorbance at 450 nm (blank)

#### 統計解析

50% 阻害濃度 (50% inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) 以外の全ての要約統計量の算出はマイクロソフトエクセル 2013 (日本マイクロソフト株式会社) で行い、データは平均値  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  SEM) で表示した。IC<sub>50</sub> および 95% 信頼区間 (95% confidence interval, 95% CI) の算出には SAS システムリリース 9.2 (SAS Institute Inc.) を用いた。血液学、血液生化学、血栓形成、出血時間についてはスチューデントの *t* 検定 (主解析として VASP<sup>+/+</sup> と VASP<sup>-/-</sup> を比較, 副解析として VASP<sup>+/-</sup> と VASP<sup>-/-</sup> を比較) を行い、活性化血小板数 (PBS と ADP を比較), リン酸化 VASP 抗原量 (VASP<sup>+/+</sup> と VASP<sup>+/-</sup>, VASP<sup>-/-</sup> を比較), IPA および PRI (vehicle と R-138727 を比較) についてはダンネットの多重比較を行った。R-138727 の用量反応性はスピアーマンの相関係数検定により評価した。統計解析には SAS システムリリース 9.2 を用い、*P* 値が 0.05 未満であったときに有意差ありと判定した。

## 第七章 総括

脳梗塞や急性冠症候群，静脈血栓塞栓症といった血栓症は，公衆衛生上の重要課題である．これまでに血栓の形成から除去に関与する血小板，凝固系，線溶系を標的として様々な抗血栓薬が創製され，血栓症の予防および治療に貢献してきた．例えば，血栓溶解薬については，rt-PA が発症から 4.5 時間以内の急性期脳梗塞患者の神経症状を改善する薬剤として創製され，急性期治療に変革をもたらした．抗血小板薬に関しては，高い安全性と有効性からシクロオキシゲナーゼ 1 阻害薬のひとつアスピリンが長らく使用されてきた．これに加え，現在では ADP 受容体のひとつ P2Y<sub>12</sub> 受容体の拮抗薬としてクロピドグレル，新世代の P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬として薬効発現が早く，薬効発現に個人差が少なく，より強力な抗血小板作用を示すプラスグレール，さらにはチエノピリジン構造を持たないチカグレロルが創製された．現在ではアスピリンと P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬による抗血小板薬二剤併用療法である DAPT は急性冠症候群の標準治療薬である．

抗血栓薬の研究開発においては，抗血栓薬の研究開発においては，副作用（出血性合併症）のリスクを低減しながら主作用（抗血栓作用）を発揮する機序および用法用量を見出すことが必須の課題であり，創薬研究においては，主として実験動物を用いたモデル系によってその有効性および安全性，さらには作用機序の評価が行われてきた．一連の創薬研究は，抗血栓薬として結実したものもあれば，化合物の創製を端緒として生物学的・薬理学的な知見の創出にも貢献した．一方で，抗血栓薬の創薬研究において未だ解決していない課題が存在する．

例えば，血栓溶解薬については，急性期脳梗塞においては rt-PA の適応とならない患者層を対象としうる薬剤，あるいは出血リスクを低減することが可能な新規薬剤が望まれている．しかし，これまでのところ rt-PA に続く新規薬剤は上市されていない．その大きな要因のひとつとして，血栓溶解薬を評価するための信頼できる脳梗塞モデル動物がないことが挙げられる．先の研究から，ヒト・ラット間で rt-PA への応答性に種差があること，加えて rt-PA は線溶促進以外の機序で出血事象に寄与していることが知られており，rt-PA への応答性の種差は安全性や有効性の正確な評価を妨げている可能性があった．ゆえに，脳梗塞病態における rt-PA の応答性をヒトに近づけた動物モデルを作製し，これを活用して rt-PA の出血リスクを低減する薬剤や新規な機序を有する血栓溶解薬を創製することが



求められていた。

抗血小板薬に関しては、DAPT が急性冠症候群の適応であるにも関わらず、その有効性は臨床外挿性の高い非臨床の動物モデルで評価されてこなかった。ゆえに、臨床外挿性が高い急性冠症候群を模した動物モデルを確立し、現行治療の作用機序に関する研究や新規な治療法に関する研究基盤を確立することが課題であった。さらに、P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬については、P2Y<sub>12</sub> 受容体シグナルの選択的な拮抗作用を評価するバイオマーカーとして血小板内のタンパク質のひとつ VASP のリン酸化を元に算出される PRI が用いられていたが、P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬の抗血小板作用において VASP が本質的な役割を担っているかについては明らかでなかった。PRI は、P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬のサロゲートマーカーとして臨床的に用いられていることから、VASP の生理的・薬理的な意義を解明することは重要な課題であった。

本研究では、血栓溶解薬および抗血小板薬の薬効薬理・作用機序解析を行う目的で以下の動物モデルを作出した。

- rt-PA に対する用量反応性がヒトに近い急性期脳梗塞モデル
- 急性冠症候群の標準治療薬に感受性を示す心筋梗塞モデル
- P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬の抗血小板作用に対する VASP の寄与を解明する遺伝子改変動物

第二章では、t-PA 遺伝子を内因性のプロモーター下で過剰発現する遺伝子改変ラットを作出した。このラットは、脳虚血という病的刺激に対して野生型と同様の t-PA 遺伝子発現プロファイルを示し、かつ出血性は呈さなかった。t-PATg ラットを用いた血栓性脳梗塞モデルでの rt-PA の薬効用量は 1 mg/kg であり、ヒト臨床用量 (0.6–0.9 mg/kg) に近かった。t-PATg ラットの報告はこれまでになく、rt-PA およびその他血栓溶解薬の有効性、安全性の評価において有用であることが期待された。

第三章では、rt-PA とは別の機序で線溶を促進する TAFIa 阻害化合物の評価にも t-PATg ラットが応用可能であることを示した。t-PATg ラットを利用することで、TAFIa 阻害化合物の迅速簡便な *in vivo* 活性評価に加え、従来は必須とされてきた外因性の rt-PA 補充なしに静脈・動脈血栓モデルにおける TAFIa 阻害化合物の抗血栓作用を評価できるこ

とが判明した。さらに，rt-PA に比べて，TAFIa 阻害化合物は出血リスクが低いことを明らかにした。

第四章では，心臓が形態学および生理学的にヒトに類似しているブタを実験動物として用い，急性冠症候群の標準治療である DAPT に感受性を示す新規な MI モデルを作出できるか検討した。アスピリンとプラスグレルによる DAPT はブタ MI モデルにおける心筋梗塞の体積を減少させ，心機能を改善した。本モデルは，急性冠症候群の病態理解，加えて新規な抗血小板薬の薬理評価にとって有用であろう。

第五章では，P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬のひとつプラスグレルの抗血小板作用に対して VASP が直接寄与しているかを検証する目的で VASP 欠損ラットを作出し，その役割について検討した。CRISPR/Cas9 を用いて VASP 欠損ラットを作出し，VASP は ADP およびコラーゲンによる血小板凝集，血栓形成，止血およびプラスグレルの抗血小板作用において主要な役割を果たしていないことを示した。プラスグレルの作用から得られた知見は，その他の P2Y<sub>12</sub> 受容体拮抗薬であるクロピドグレルやチカグレロールにも当てはまるであろう。

以上，本研究において，遺伝子改変あるいは外科手術により，血栓溶解薬および抗血小板薬の薬効薬理・作用機序解析の基盤となる新規な動物モデルを構築した。t-PA Tg ラットは脳梗塞急性期の新規な血栓溶解薬の創製，ブタ MI モデルは MI の病態メカニズム研究および新規な抗血小板薬あるいは異なる機序をもち，心機能の改善に寄与しうる薬剤の高次評価，VASP 欠損ラットは血小板および血管生物学における VASP の役割解明への貢献がそれぞれ期待される。

## 引用文献

1. Fernandez M.M., Hogue S., Preblich R., Kwong W.J., *Clinicoecon Outcomes Res.*, **7**, 451-462 (2015).
2. Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L., Benjamin E.J., Berry J.D., Borden W.B., Bravata D.M., Dai S., Ford E.S., Fox C.S., Franco S., Fullerton H.J., Gillespie C., Hailpern S.M., Heit J.A., Howard V.J., Huffman M.D., Kissela B.M., Kittner S.J., Lackland D.T., Lichtman J.H., Lisabeth L.D., Magid D., Marcus G.M., Marelli A., Matchar D.B., McGuire D.K., Mohler E.R., Moy C.S., Mussolino M.E., Nichol G., Paynter N.P., Schreiner P.J., Sorlie P.D., Stein J., Turan T.N., Virani S.S., Wong N.D., Woo D., Turner M.B.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee., *Circulation*, **127**, e6-e245 (2013).
3. Guyatt G.H., Akl E.A., Crowther M., Schünemann H.J., Gutterman D.D., Lewis S.Z., *Chest*, **141**, 48S-52S (2012).
4. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators., *Lancet*, **385**, 117-171 (2015).
5. Mozaffarian D., Benjamin E.J., Go A.S., Arnett D.K., Blaha M.J., Cushman M., de Ferranti S., Després J.P., Fullerton H.J., Howard V.J., Huffman M.D., Judd S.E., Kissela B.M., Lackland D.T., Lichtman J.H., Lisabeth L.D., Liu S., Mackey R.H., Matchar D.B., McGuire D.K., Mohler E.R. 3rd, Moy C.S., Muntner P., Mussolino M.E., Nasir K., Neumar R.W., Nichol G., Palaniappan L., Pandey D.K., Reeves M.J., Rodriguez C.J., Sorlie P.D., Stein J., Towfighi A., Turan T.N., Virani S.S., Willey J.Z., Woo D., Yeh R.W., Turner M.B.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee., *Circulation*, **131**, e29-322 (2015).
6. Cito S., Mazzeo M.D., Badimon L., *Thromb Res.*, **131**, 116-124 (2013).
7. Cesarman-Maus G., Hajjar K.A., *Br J Haematol.*, **129**, 307-321 (2005).
8. Virchow R.L.K., "Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin." Frankfurt, Meidinger Sohn & Co., 1856.
9. Bhatt D.L., Eagle K.A., Ohman E.M., Hirsch A.T., Goto S., Mahoney E.M., Wilson P.W., Alberts M.J., D'Agostino R., Liao C.S., Mas J.L., Röther J., Smith S.C. Jr, Salette G., Contant C.F., Massaro J.M., Steg P.G.; REACH Registry Investigators., *JAMA.*, **304**, 1350-1357 (2010).
10. O'Keefe D.J., Baglin T.P., *Clin Lab Haematol.*, **25**, 277-281 (2003).
11. Ridker P.M., *Lancet*, **384**, 607-617 (2014).
12. Michelson A.D., *Nat Rev Drug Discov.*, **9**, 154-169 (2010).

13. Bodary P.F., Eitzman D.T., *Curr Opin Hematol.*, **16**, 342-346 (2009).
14. Morishima Y., Honda Y., Kamisato C., Shibano T., *Thromb Res.*, **132**, 234-239 (2013).
15. Sugidachi A., Ohno K., Ogawa T., Jakubowski J., Hashimoto M., Tomizawa A., *Br J Pharmacol.*, **169**, 82-89 (2013).
16. Kuiper J., van de Bilt H., Martin U., van Berkel T.J., *Thromb Haemost.*, **74**, 1501-1510 (1995).
17. Hollopeter G., Jantzen H.M., Vincent D., Li G., England L., Ramakrishnan V., Yang R.B., Nurden P., Nurden A., Julius D., Conley P.B., *Nature*, **409**, 202-207 (2001).
18. Hashimoto M., Sugidachi A., Isobe T., Niitsu Y., Ogawa T., Jakubowski J.A., Asai F., *Biochem Pharmacol.*, **74**, 1003-1009 (2007).
19. Jauch E.C., Saver J.L., Adams H.P. Jr, Bruno A., Connors J.J., Demaerschalk B.M., Khatri P., McMullan P.W. Jr, Qureshi A.I., Rosenfield K., Scott P.A., Summers D.R., Wang D.Z., Wintermark M., Yonas H.; American Heart Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Nursing; Council on Peripheral Vascular Disease; Council on Clinical Cardiology., *Stroke*, **44**, 870-947 (2013).
20. Overgaard K., Sereghy T., Pedersen H., Boysen G., *Neuroreport*, **3**, 925-928 (1992).
21. Haelewyn B., Risso J.J., Abraini J.H., *J Cereb Blood Flow Metab.*, **30**, 900-903 (2010).
22. Tomkins A.J., Hood R.J., Levi C.R., Spratt N.J., *Sci Rep.*, **5**, 16026 (2015).
23. Korninger C., Collen D., *Thromb Haemost.* **46**, 561-565 (1981).
24. An J., Zhang C., Polavarapu R., Zhang X., Zhang X., Yepes M., *Blood*, **112**, 2787-2794 (2008).
25. Wang X., Lee S.R., Arai K., Lee S.R., Tsuji K., Rebeck G.W., Lo E.H., *Nat Med.*, **9**, 1313-1317 (2003).
26. Hu K., Yang J., Tanaka S., Gonias S.L., Mars W.M., Liu Y., *J Biol Chem.*, **281**, 2120-2127 (2006).
27. Antithrombotic Trialists' Collaboration., *BMJ.*, **324**, 71-86 (2002).
28. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group., *Lancet*, **2**, 349-360 (1988).
29. Ito M.K., Smith A.R., Lee M.L., *Clin Pharm.*, **11**, 603-617 (1992).
30. CAPRIE Steering Committee., *Lancet*, **348**, 1329-1339 (1996).
31. Bertrand M.E., Rupprecht H.J., Urban P., Gershlick A.H.; CLASSICS Investigators., *Circulation*, **102**, 624-629 (2000).
32. Wiviott S.D., Braunwald E., McCabe C.H., Montalescot G., Ruzyllo W., Gottlieb S., Neumann F.J., Ardissino D., De Servi S., Murphy S.A., Riesmeyer J., Weerakkody G., Gibson C.M., Antman E.M.; TRITON-TIMI 38 Investigators., *N Engl J Med.*, **357**, 2001-2015 (2007).
33. Saito S., Isshiki T., Kimura T., Ogawa H., Yokoi H., Nanto S., Takayama M., Kitagawa K.,

- Nishikawa M., Miyazaki S., Nakamura M., *Circ J.*, **78**, 1684-1692 (2014).
34. Isshiki T., Kimura T., Ogawa H., Yokoi H., Nanto S., Takayama M., Kitagawa K., Nishikawa M., Miyazaki S., Ikeda Y., Nakamura M., Saito S.; PRASFIT-Elective Investigators., *Circ J.*, **78**, 2926-2934 (2014).
  35. van Giezen J.J., Berntsson P., Zachrisson H., Björkman J.A., *Thromb Res.*, **124**, 565-571 (2009).
  36. Wallentin L., Becker R.C., Budaj A., Cannon C.P., Emanuelsson H., Held C., Horrow J., Husted S., James S., Katus H., Mahaffey K.W., Scirica B.M., Skene A., Steg P.G., Storey R.F., Harrington R.A.; PLATO Investigators, Freij A., Thorsén M., *N Engl J Med.*, **361**, 1045-1057 (2009).
  37. Jakubowski J.A., Payne C.D., Li Y.G., Farid N.A., Brandt J.T., Small D.S., Salazar D.E., Winters K.J., *Thromb Haemost.*, **99**, 215-222 (2008).
  38. Gremmel T., Yanachkov I.B., Yanachkova M.I., Wright G.E., Wider J., Undyala V.V., Michelson A.D., Frelinger A.L. 3rd, Przyklenk K., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **36**, 501-509 (2016).
  39. Hollopeter G., Jantzen H.M., Vincent D., Li G., England L., Ramakrishnan V., Yang R.B., Nurden P., Nurden A., Julius D., Conley P.B., *Nature*, **409**, 202-207 (2001).
  40. Hasegawa M., Sugidachi A., Ogawa T., Isobe T., Jakubowski J.A., Asai F., *Thromb Haemost.* **94**, 593-598 (2005).
  41. Hashimoto M., Sugidachi A., Isobe T., Niitsu Y., Ogawa T., Jakubowski J.A., Asai F., *Biochem Pharmacol.*, **74**, 1003-1009 (2007).
  42. VAN Giezen J.J., Nilsson L., Berntsson P., Wissing B.M., Giordanetto F., Tomlinson W., Greasley P.J., *J Thromb Haemost.*, **7**, 1556-1565 (2009).
  43. Barragan P., Bouvier J.L., Roquebert P.O., Macaluso G., Commeau P., Comet B., Lafont A., Camoin L., Walter U., Eigenthaler M., *Catheter Cardiovasc Interv.*, **59**, 295-302 (2003).
  44. Tomizawa A., Ohno K., Jakubowski J.A., Mizuno M., Sugidachi A., *Thromb Haemost.*, **110**, 769-776 (2013).
  45. Kalantzi K.I., Tsoumani M.E., Goudevenos I.A., Tselepis A.D., *Expert Rev Clin Pharmacol.*, **5**, 319-336 (2012).
  46. Wyseure T., Declerck P.J., *Drug Discov Today*, **19**, 1476-1482 (2014).
  47. Gardell S.J., Ramjit D.R., Stabilito I.I., Fujita T., Lynch J.J., Cuca G.C., Jain D., Wang S.P., Tung J.S., Mark G.E., *Circulation*, **84**, 244-253 (1991).

48. Wu H.L., Shi G.Y., Bender M.L., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 8292-8295 (1987).
49. Hu W., Kitano Y., Hasumi K., *J Antibiot (Tokyo)*, **56**, 832-837 (2003).
50. Suzuki K., Muto Y., Fushihara K., Kanemoto K., Iida H., Sato E., Kikuchi C., Matsushima T., Kato E., Nomoto M., Yoshioka S., Ishii H., *J Pharmacol Exp Ther.*, **309**, 607-615 (2004).
51. Wang Y.X., Zhao L., Nagashima M., Vincelette J., Sukovich D., Li W., Subramanyam B., Yuan S., Emayan K., Islam I., Hrvatin P., Bryant J., Light D.R., Vergona R., Morser J., Buckman B.O., *Thromb Haemost.*, **97**, 45-53 (2007).
52. Wang Y.X., da Cunha V., Vincelette J., Zhao L., Nagashima M., Kawai K., Yuan S., Emayan K., Islam I., Hosoya J., Sullivan M.E., Dole W.P., Morser J., Buckman B.O., Vergona R., *Thromb Haemost.*, **97**, 54-61 (2007).
53. Bird E., Tamura J., Bostwick J.S., Steinbacher T.E., Stewart A., Liu Y., Baumann J., Feyen J., Tamasi J., Schumacher W.A., *Thromb Res.*, **120**, 549-558 (2007).
54. Albers G.W., von Kummer R., Truelsen T., Jensen J.K., Ravn G.M., Grønning B.A., Chabriat H., Chang K.C., Davalos A.E., Ford G.A., Grotta J., Kaste M., Schwamm L.H., Shuaib A.; DIAS-3 Investigators., *Lancet Neurol.*, **14**, 575-584 (2015).
55. Thijs V.N., Peeters A., Vosko M., Aichner F., Schellinger P.D., Schneider D., Neumann-Haefelin T., Röther J., Davalos A., Wahlgren N., Verhamme P., *Stroke*, **40**, 3789-3795 (2009).
56. Carmeliet P., Stassen J.M., Schoonjans L., Ream B., van den Oord J.J., De Mol M., Mulligan R.C., Collen D., *J Clin Invest.*, **92**, 2756-2760 (1993).
57. Lijnen H.R., Okada K., Matsuo O., Collen D., Dewerchin M., *Blood*, **93**, 2274-2281 (1999).
58. Madani R., Hulo S., Toni N., Madani H., Steimer T., Muller D., Vassalli J.D., *EMBO J.*, **18**, 3007-3012 (1999).
59. Testa G., Zhang Y., Vintersten K., Benes V., Pijnappel W.W., Chambers I., Smith A.J., Smith A.G., Stewart A.F., *Nat Biotechnol.*, **21**, 443-447 (2003).
60. Yang X.W., Gong S., *Curr Protoc Neurosci.*, Chapter 5, Unit 5.20 (2005).
61. Gong S., Zheng C., Doughty M.L., Losos K., Didkovsky N., Schambra U.B., Nowak N.J., Joyner A., Leblanc G., Hatten M.E., Heintz N., *Nature*, **425**, 917-925 (2003).
62. Oikawa K., Watanabe T., Higuchi S. *Drug Metab Dispos.*, **28**, 1087-1093 (2000).
63. Declerck P.J., *Hamostaseologie*, **31**, 165-166, 168-173 (2011).
64. Foley J.H., Kim P.Y., Mutch N.J., Gils A., *J Thromb Haemost.*, **11**, 306-315 (2013).
65. Leebeek F.W., Goor M.P., Guimaraes A.H., Brouwers G.J., Maat M.P., Dippel D.W., Rijken D.C., *J Thromb Haemost.*, **3**, 2211-2218 (2005).

66. Montaner J., Ribó M., Monasterio J., Molina C.A., Alvarez-Sabín J. *Stroke*, **34**, 1038-1040 (2003).
67. Eichinger S., Schönauer V., Weltermann A., Minar E., Bialonczyk C., Hirschl M., Schneider B., Quehenberger P., Kyrle P.A., *Blood*, **103**, 3773–3776 (2004).
68. Islam I., Bryant J., May K., Mohan R., Yuan S., Kent L., Morser J., Zhao L., Vergona R., White K., Adler M., Whitlow M., Buckman B.O., *Bioorg Med Chem Lett.*, **17**, 1349–1354 (2007).
69. Sasaki T., Yoshimoto N., Sugimoto K., Takada K., Murayama N., Yamazaki H., Yamamoto K., Ishii H., *Thromb Res.*, **130**, e222–e228 (2012).
70. Zhou J., Kochan J., Yin O., Warren V., Zamora C., Atiee G., Pav J., Orihashi Y., Vashi V., Dishy V., *J Thromb Haemost.*, **15**, 961–971 (2017).
71. Nagashima M., Werner M., Wang M., Zhao L., Light D.R., Pagila R., Morser J., Verhallen P., *Thromb Res.*, **98**, 333-342 (2000).
72. Björkman J.A., Abrahamsson T.I., Nerme V.K., Mattsson C.J., *Thromb Res.*, **116**, 519-524 (2005).
73. Ito Y., Noguchi K., Morishima Y., Yamaguchi K., *J Thromb Thrombolysis*, **45**, 77-87 (2018).
74. Ryan C.A., Hass G.M., Kuhn R.W., *J Biol Chem.*, **249**, 5495-5499 (1974).
75. Bouma B.N., Meijers J.C., *J Thromb Haemost.*, **1**, 1566-1574 (2003).
76. Furie B., Furie B.C., *J Clin Invest.*, **115**, 3355-3362 (2005).
77. Mizuno M., Tomizawa A., Ohno K., Jakubowski J.A., Sugidachi A., *PLoS One*, **11**, e0154661 (2016).
78. Fujimoto H., Gabazza E.C., Taguchi O., Nishii Y., Nakahara H., Bruno N.E., D'Alessandro-Gabazza C.N., Kasper M., Yano Y., Nagashima M., Morser J., Broze G.J., Suzuki K., Adachi Y., *Am J Pathol.*, **168**, 1086–1096 (2006).
79. Qin L., D'Alessandro-Gabazza C.N., Aoki S., Gil-Bernabe P., Yano Y., Takagi T., Boveda-Ruiz D., Ramirez Marmol A.Y., San Martin Montenegro V.T., Toda M., Miyake Y., Taguchi O., Takei Y., Morser J., Gabazza E.C., *J Thromb Haemost.*, **8**, 808–816 (2010).
80. Leurs J., Nerme V., Sim Y., Hendriks D., *J Thromb Haemost.*, **2**, 416-423 (2004).
81. GBD 2016 Causes of Death Collaborators., *Lancet*, **390**, 1151-1210 (2017).
82. O'Gara P.T., Kushner F.G., Ascheim D.D., Casey D.E. Jr, Chung M.K., de Lemos J.A., Ettinger S.M., Fang J.C., Fesmire F.M., Franklin B.A., Granger C.B., Krumholz H.M., Linderbaum J.A., Morrow D.A., Newby L.K., Ornato J.P., Ou N., Radford M.J., Tamis-Holland J.E., Tommaso C.L., Tracy C.M., Woo Y.J., Zhao D.X., Anderson J.L., Jacobs A.K., Halperin J.L., Albert N.M., Brindis R.G., Creager M.A., DeMets D., Guyton R.A., Hochman J.S., Kovacs R.J., Kushner F.G., Ohman E.M., Stevenson W.G., Yancy C.W.; American College of Cardiology Foundation/American Heart

- Association Task Force on Practice Guidelines., *Circulation*, **127**, e362-425 (2013).
83. Ibanez B., James S., Agewall S., Antunes M.J., Bucciarelli-Ducci C., Bueno H., Caforio A.L.P., Crea F., Goudevenos J.A., Halvorsen S., Hindricks G., Kastrati A., Lenzen M.J., Prescott E., Roffi M., Valgimigli M., Varenhorst C., Vranckx P., Widimský P.; ESC Scientific Document Group., *Eur Heart J.*, **39**, 119-177 (2018).
  84. Kumar M., Kasala E.R., Bodduluru L.N., Dahiya V., Sharma D., Kumar V., Lahkar M., *Regul Toxicol Pharmacol.*, **76**, 221-230 (2016).
  85. Suzuki Y., Yeung A.C., Ikeno F., *J Biomed Biotechnol.*, 195483 (2011).
  86. Skyschally A., Amanakis G., Neuhäuser M., Kleinbongard P., Heusch G., *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, **313**, H871-H878 (2017).
  87. Suzuki G., Young R.F., Leiker M.M., Suzuki T., *Stem Cells Int.*, 6940195 (2016).
  88. Salameh A., Dhein S., Blanke K., Rastan A., Hiyasat B., Dietze A., Sobiraj A., Dähnert I., Janousek J., *Circulation*, **125**, 2578-87 (2012).
  89. Yang Y.J., Zhao J.L., You S.J., Wu Y.J., Jing Z.C., Yang W.X., Meng L., Wang Y.W., Gao R.L., *Heart*, **92**, 1131-1137 (2006).
  90. Ajijola O.A., Lux R.L., Khahera A., Kwon O., Aliotta E., Ennis D.B., Fishbein M.C., Ardell J.L., Shivkumar K., *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, **312**, H608-H621 (2017).
  91. Matthaïos I., Kaladaridou A., Skaltsiotes E., Agrios J., Antoniou A., Georgiopoulos G., Papadopoulou E., Pamboucas C., Toumanidis S., *Heart Lung Circ.*, **26**, 383-394 (2017).
  92. Dogné J.M., Rolin S., Péteïn M., Tchana-Sato V., Ghuysen A., Lambermont B., Hanson J., Magis D., Segers P., Pirotte B., Masereel B., Drion P., D'Orïo V., Kolh P., *Thromb Res.*, **116**, 431-442 (2005).
  93. Kim W., Jeong M.H., Sim D.S., Hong Y.J., Song H.C., Park J.T., Ahn Y.K., *Heart Vessels*, **26**, 342-348 (2011).
  94. Day S.M., Reeve J.L., Myers D.D., Fay W.P., *Thromb Haemost.*, **92**, 486-494 (2004).
  95. Matsuno H., Uematsu T., Umemura K., Takiguchi Y., Asai Y., Muranaka Y., Nakashima M., *J Pharmacol Toxicol Methods*, **29**, 165-173 (1993).
  96. Tomizawa A., Ohno K., Jakubowski J.A., Mizuno M., Sugidachi A., *Thromb Res.*, **136**, 1224-1230 (2015).
  97. Hirata Y., Umemura K., Uematsu T., Nakashima M., *Jpn J Pharmacol.*, **67**, 51-57 (1995).
  98. Ohno K., Tomizawa A., Mizuno M., Jakubowski J.A., Sugidachi A., *J Am Heart Assoc.*, **5**, e002889 (2016).



99. Matsuzawa S., Hoshina K., Sueyoshi S., Miyata Y., Manita S., Ooie T., Yasue T., Sasahara T., *Arzneimittelforschung.*, **62**, 545-553 (2012).
100. Momi S., Pitchford S.C., Alberti P.F., Minuz P., Del Soldato P., Gresele P., *Thromb Haemost.*, **93**, 535-543 (2005).
101. Kihara H., Koganei H., Hirose K., Yamamoto H., Yoshimoto R., *Eur J Pharmacol.*, **433**, 157-162 (2001).
102. Kawano K.I., Fujishima K., Ikeda Y., Kondo K., Umemura K., *J Cereb Blood Flow Metab.*, **20**, 988-997 (2000).
103. Umemura K., Ishihara H., Nakashima M., *Thromb Res.*, **80**, 209-216 (1995).
104. Rouleau J.L., Talajic M., Sussex B., Potvin L., Warnica W., Davies R.F., Gardner M., Stewart D., Plante S., Dupuis R., Lauzon C., Ferguson J., Mikes E., Balnozan V., Savard P., *J Am Coll Cardiol.*, **27**, 1119-1127 (1996).
105. Takiguchi Y., Hirata Y., Wada K., Nakashima M., *Thromb Res.*, **67**, 435-445 (1992).
106. Yokoi H., Kimura T., Isshiki T., Ogawa H., Ikeda Y., *Thromb Res.*, **129**, 623-628 (2012).
107. Jernberg T., Payne C.D., Winters K.J., Darstein C., Brandt J.T., Jakubowski J.A., Naganuma H., Siegbahn A., Wallentin L., *Eur Heart J.*, **27**, 1166-1173 (2006).
108. Storey R.F., Husted S., Harrington R.A., Heptinstall S., Wilcox R.G., Peters G., Wickens M., Emanuelsson H., Gurbel P., Grande P., Cannon C.P., *J Am Coll Cardiol.*, **50**, 1852-1856 (2007).
109. Gurbel P.A., Bliden K.P., Butler K., Tantry U.S., Gesheff T., Wei C., Teng R., Antonino M.J., Patil S.B., Karunakaran A., Kereiakes D.J., Parris C., Purdy D., Wilson V., Ledley G.S., Storey R.F., *Circulation*, **120**, 2577-2585 (2009).
110. Zeng L., Hu Q., Wang X., Mansoor A., Lee J., Feygin J., Zhang G., Suntharalingam P., Boozer S., Mhashilkar A., Panetta C.J., Swingen C., Deans R., From A.H., Bache R.J., Verfaillie C.M., Zhang J., *Circulation*, **115**, 1866-1875 (2007).
111. Koudstaal S., Oerlemans M.I., Van der Spoel T.I., Janssen A.W., Hofer I.E., Doevendans P.A., Sluiter J.P., Chamuleau S.A., *Eur J Clin Invest.*, **45**, 150-159 (2015).
112. Su Q., Li L., Zhao J., Sun Y., Yang H., *Cell Physiol Biochem.*, **42**, 753-760 (2017).
113. Writing Group Members, Mozaffarian D., Benjamin E.J., Go A.S., Arnett D.K., Blaha M.J., Cushman M., Das S.R., de Ferranti S., Després J.P., Fullerton H.J., Howard V.J., Huffman M.D., Isasi C.R., Jiménez M.C., Judd S.E., Kissela B.M., Lichtman J.H., Lisabeth L.D., Liu S., Mackey R.H., Magid D.J., McGuire D.K., Mohler E.R. 3rd, Moy C.S., Muntner P., Mussolino M.E., Nasir

- K., Neumar R.W., Nichol G., Palaniappan L., Pandey D.K., Reeves M.J., Rodriguez C.J., Rosamond W., Sorlie P.D., Stein J., Towfighi A., Turan T.N., Virani S.S., Woo D., Yeh R.W., Turner M.B.; American Heart Association Statistics Committee; Stroke Statistics Subcommittee., *Circulation*, **133**, e38-360 (2016).
114. Cimmino G., Conte S., Morello A., D'Elia S., Marchese V., Golino P., *Expert Rev Cardiovasc Ther.*, **10**, 1533-1543 (2012).
115. Levine G.N., Bates E.R., Bittl J.A., Brindis R.G., Fihn S.D., Fleisher L.A., Granger C.B., Lange R.A., Mack M.J., Mauri L., Mehran R., Mukherjee D., Newby L.K., O'Gara P.T., Sabatine M.S., Smith P.K., Smith S.C. Jr., *Circulation*, **134**, e123-155 (2016).
116. Pula G., Schuh K., Nakayama K., Nakayama K.I., Walter U., Poole A.W., *Blood*, **108**, 4035-4044 (2006).
117. Horstrup K., Jablonka B., Hönig-Liedl P., Just M., Kochsiek K., Walter U., *Eur J Biochem.*, **225**, 21-27 (1994).
118. Halbrügge M., Walter U., *Eur J Biochem.*, **185**, 41-50 (1989).
119. Butt E., Abel K., Krieger M., Palm D., Hoppe V., Hoppe J., Walter U., *J Biol Chem.*, **269**, 14509-14517 (1994).
120. Aszódi A., Pfeifer A., Ahmad M., Glauner M., Zhou X.H., Ny L., Andersson K.E., Kehrel B., Offermanns S., Fässler R., *EMBO J.*, **18**, 37-48 (1999).
121. Massberg S., Grüner S., Konrad I., Garcia Arguinzonis M.I., Eigenthaler M., Hemler K., Kersting J., Schulz C., Muller I., Besta F., Nieswandt B., Heinzmann U., Walter U., Gawaz M., *Blood*, **103**, 136-142 (2004).
122. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F., *Science*, **339**, 819-823 (2013).
123. de Man F.H., Nieuwland R., van der Laarse A., Romijn F., Smelt A.H., Gevers Leuven J.A., Sturk A., *Atherosclerosis*, **152**, 407-414 (2000).
124. Aye M.M., Kilpatrick E.S., Aburima A., Wraith K.S., Magwenzi S., Spurgeon B., Rigby A.S., Sandeman D., Naseem K.M., Atkin S.L., *J Am Heart Assoc.*, **3**, e000706 (2014).
125. Carvalho A.C., Colman R.W., Lees R.S., *N Engl J Med.*, **290**, 434-438 (1974).
126. Markert T., Krenn V., Leebmann J., Walter U., *Basic Res Cardiol.*, **91**, 337-343 (1996).
127. Frere C., Cuisset T., Quilici J., Camoin L., Carvajal J., Morange P.E., Lambert M., Juhan-Vague I., Bonnet J.L., Alessi M.C., *Thromb Haemost.*, **98**, 838-843 (2007).

128. Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R., *Stroke*, **20**, 84-91 (1989).
129. Hara T., Bhayana B., Thompson B., Kessinger C.W., Khatri A., McCarthy J.R., Weissleder R., Lin C.P., Tearney G.J., Jaffer F.A., *JACC Cardiovasc Imaging*, **5**, 607–615 (2012).
130. Carlsson S., Elg M., *Blood Coagul Fibrinolysis*, **16**, 245-249 (2005).
131. Ohno K., Tomizawa A., Jakubowski J.A., Mizuno M., Sugidachi A., *Thromb Res.*, **135**, 933-938 (2015).

## 発表論文リスト

本博士論文は、下記の発表論文を元に構成した。

1. Generation and characterization of tissue-type plasminogen activator transgenic rats.  
Yusuke Ito, Kengo Noguchi, Yoshiyuki Morishima, Kyoji Yamaguchi.  
*J Thromb Thrombolysis*. 45(1), 77-87, (2018).
2. Tissue-type plasminogen activator transgenic rats for evaluating inhibitors of the activated form of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor.  
Yusuke Ito, Kengo Noguchi, Yoshiyuki Morishima, Kyoji Yamaguchi.  
*Blood Coagul Fibrinolysis*. 29(3), 314-321, (2018).
3. A novel porcine model of thrombotic myocardial infarction with cardiac dysfunction sensitive to dual antiplatelet therapy.  
Makoto Mizuno, Yusuke Ito, Atsuhiko Sugidachi.  
*Eur J Pharmacol*. 834, 103-108, (2018).
4. Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is not a major mediator of platelet aggregation, thrombogenesis, haemostasis, and antiplatelet effect of prasugrel in rats.  
Yusuke Ito, Kousaku Ohno, Yuka Morikawa, Atsuyuki Tomizawa, Makoto Mizuno, Atsuhiko Sugidachi.  
*Sci Rep*. 8, 9955 (2018).

## 謝辞

本論文の執筆および発表にあたり、懇切丁寧な御指導を賜りました東北大学大学院薬学研究科 がん化学療法薬学分野 富岡 佳久教授に謹んで感謝の意を表します。また、本論文の審査にあたり有益な御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科 分子細胞生化学分野 青木 淳賢教授ならびに東北大学大学院薬学研究科 生活習慣病治療薬学分野 平澤 典保教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えてくださり、多大なる御鞭撻を賜りました第一三共株式会社 杉立 収寛博士、森島 義行博士、山口 京二博士に深く感謝いたします。本研究の遂行ならびに本論文執筆に御協力いただきました第一三共株式会社 野口 研吾氏、森川 由香氏、大野 耕作博士、富澤 宏之博士、水野 誠博士に心より感謝いたします。

最後に、本研究の遂行、原著論文ならびに本論文の執筆に際して終始励まし支えてくれた家族に深く感謝いたします。