

博士（薬学） 櫻間照雄

学位論文題名

組織プラスミノーゲンアクチベータおよび
抗血小板薬 SM-20302 に関する薬理学的研究

学位論文内容の要旨

生体は、血管損傷時の出血に対する防御機構として止血血栓を形成するが、一方、動脈硬化プラークの破綻時などで血管を完全に閉塞し重大な臓器障害を招来する病的血栓を形成することがある。動脈硬化プラークの破綻により露出した内皮下組織に血小板が粘着し、続いて血小板より種々の agonists が放出されると血小板が次々に活性化され、血小板膜上にフィブリノーゲン受容体である GP II b/III a が露出し、血漿中のフィブリノーゲンを介した血小板の凝集が生ずる。さらにこの血小板血栓上で血液凝固反応が進行しフィブリノーゲンの形成が起こり血栓として安定化する。このようにして形成された血栓が血流を抑制し、心筋梗塞、脳血栓症、一過性脳虚血発作あるいは心原性脳梗塞症等の虚血性疾患、いわゆる血栓症をもたらしている。

これら血栓症治療の目的で多くの抗血栓薬が使用されているが、血栓溶解薬である組織プラスミノーゲンアクチベータ (t-PA) および血小板凝集阻害薬 (GP II b/III a antagonist) もこれら血栓症治療に重要な位置を占めるものである。

今回、t-PA および新規 GP II b/III a antagonist である SM-20302 についてそれぞれ病態モデルを用いてその特徴を明らかにしたので報告する。

1. 組織プラスミノーゲンアクチベータ (t-PA) の血栓溶解作用の研究

血栓溶解療法は血管内に生じた病的血栓を溶解し、虚血に陥った組織への血流を再び取り戻すことを目的とした治療法である。従来、ヒト尿由来のウロキナーゼが使用されてきたが、プラスミノーゲンをプラスミンに変換しフィブリノーゲン・血栓を溶解するものである。ウロキナーゼは血栓特異性をもたず、血栓溶解と同時に出血傾向をもたらすことが問題となっていたが、t-PA は血栓を構成するフィブリノーゲンに対する親和性が高く、出血傾向を抑えることのできる血栓溶解剤である。

1) イヌ冠動脈血栓モデルにおける一本鎖 t-PA および二本鎖 t-PA の比較

t-PA は 527 個のアミノ酸からなるセリンプロテアーゼであり、一本鎖型として分泌されるが、275 位 Arg と 276 位 Ile の間でプラスミンによる切断を受け二本鎖型となる。

これら二つのタイプの t-PA について、イヌ冠動脈血栓モデルを用いて血栓溶解作用をウロキナーゼとともに比較検討した。

イヌの冠動脈左前下行枝に銅コイルを挿入し、血流が途絶えたことを血管造影にて確認し、一本鎖 t-PA、二本鎖 t-PA をそれぞれ 5000IU/kg/min、ウロキナーゼを 663IU/kg/min の速度で 60 分間持続注入し、血管造影により再開通までの時間を確認した。

二本鎖 t-PA、ウロキナーゼでは 6 例全例に再開通が認められた。一本鎖 t-PA では 6 例中 5 例

に再開通が認められた。再開通までの時間は各薬物群とも同程度であった。一方、血中フィブリノーゲンはウロキナーゼ群に低下が認められたが、一本鎖 t-PA、二本鎖 t-PA とも低下は認められなかった。

2) ラット脳塞栓モデルにおける二本鎖 t-PA の神経症状改善作用 (ウロキナーゼとの比較)

住友製薬において二本鎖 t-PA が新規血栓溶解剤として開発され、この二本鎖 t-PA のラット脳塞栓モデルにおける神経症状悪化抑制効果、梗塞面積増加抑制効果、さらに血中フィブリノーゲン、出血の頻度に及ぼす影響についてウロキナーゼと比較検討した。

塞栓子(微小血栓)をラットの左総頸動脈内に注入し脳塞栓症を惹起した。t-PA (5×10^5 IU/kg) を塞栓子注入 5 分後および 3 時間後に静脈内注入することにより、神経症状の悪化抑制が認められた。塞栓子注入の 6 時間後に t-PA を投与した場合には有意な神経症状の悪化抑制は認められなかったが、脳梗塞面積増加抑制作用が認められた。ウロキナーゼにも神経症状の改善、脳梗塞面積増加抑制が認められたが、t-PA には認められなかった血中フィブリノーゲンの減少と頭蓋内出血増加傾向がうかがわれた。

2. 新規 GP IIb/IIIa アンタゴニスト SM-20302 の抗血栓作用の研究

住友製薬研究所において合成化合物のスクリーニングにより、強力な *in vitro* 血小板凝集阻害作用を有する GP IIb/IIIa アンタゴニスト、SM-20302 が見出された。この SM-20302 の *in vivo* 抗血栓作用および出血副作用について検討した。

1) モルモット大腿動脈血栓モデルにおける血栓形成抑制作用

モルモットに rose bengal を静脈内投与し、大腿動脈に 540nm の光照射すると活性酸素が発生し、血管内皮障害が生じ血栓が形成され閉塞に至る。rose bengal 投与の 2 時間前に SM-20302(0.1-3mg/kg) を経口投与しておくことにより、閉塞までの時間が用量依存的に延長した。

2) モルモット一過性脳虚血発作モデルにおける SM-20302 の予防効果

モルモットの左総頸動脈に ADP/epinephrine 溶液を持続注入することにより一過性脳虚血発作を誘発した。虚血発作誘発 1 時間前に SM-20302 (0.3, 1 mg/kg) を経口投与したところ、神経症状の悪化抑制作用がみられたが、aspirin (100mg/kg、誘発 1 時間前経口投与)、ticlopidine (300 mg/kg、誘発 3 時間前経口投与) には有意な作用は認められなかった。

3) イヌ冠動脈血栓症モデルにおける血栓形成抑制作用

イヌの冠動脈左回旋枝に電極を挿入し、電気的刺激を加え血管内皮細胞を損傷する冠動脈血栓症モデルを用い、血栓形成抑制作用を検討した。SM-20302 を静脈投与した群では、対照群に比べ、冠動脈閉塞頻度の減少、閉塞までの時間の延長および死亡率の低下、血栓重量の減少、心筋梗塞面積の抑制が認められた。

4) マウス消化管易出血モデルによる治療安全域の検討

マウスに 0.1N 塩酸-90% ethanol 溶液を投与することにより、消化管易出血モデルを作製し、*ex vivo* 血小板凝集抑制作用との比較から、出血副作用に対する治療安全域について検討した。塩酸-ethanol 溶液投与 24 時間後に出血の有無を観察し、最小出血用量(MHD)を求めた。また塩酸-ethanol 溶液投与直前の時点に採血し、*ex vivo* 血小板凝集活性を測定し、50% 血小板抑制を示す用量(ED_{50})を求め、MHD/ ED_{50} 比を算出した。

SM-20302 の MHD/ ED_{50} 比は 150 であったのに対し比較対照の cyclo(RGDT)₂、aspirin および ticlopidine ではそれぞれ 6.3、1.4 および 7.5 であった。このことから、SM-20302 は他薬に比較して出血副作用の少ない治療安全域の広い抗血栓薬である可能性が示唆された。

SM-20302 は血小板凝集を抑制するが、粘着は抑制しない可能性が示唆され、このことが出血に対する安全域の広い原因になっているものと思われた。

以上、t-PA および SM-20302 は出血副作用に対し、既存の血栓治療薬に比べより治療安全域の広いものであることを明らかにするとともに、出血副作用に対する治療安全域の広い血栓治療薬の開発のための実験的方法論を提示できた。

学位論文審査の要旨

主査 教授 野村 靖幸
副査 教授 五十嵐 靖之
副査 助教授 大熊 康修
副査 助教授 井ノ口 仁一

学位論文題名

組織プラスミノーゲンアクチベータおよび 抗血小板薬 SM-20302 に関する薬理学的研究

申請者は、血栓溶解薬である組織プラスミノーゲンアクチベータ (t-PA) および抗血小板薬である血小板膜糖蛋白質 (GP IIb/IIIa) アンタゴニスト SM-20302 について、薬理作用を種々検討し、その特徴を明らかにした。

t-PA は、527 個のアミノ酸からなるセリンプロテアーゼであり、一本鎖型として分泌されるが、275 位アルギニンと 276 位イソロイシンの間でプラスミンにより切断を受け二本鎖型となる。血栓溶解薬として臨床使用にあたり、この一本鎖 t-PA と二本鎖 t-PA との薬理学的性質の違いに興味が持たれていたところであり、イヌ冠動脈血栓モデルを用いて、一本鎖 t-PA と二本鎖 t-PA を静脈内投与して血栓溶解作用を比較検討した。冠動脈左前方下行枝に形成された閉塞性血栓は、t-PA の投与により溶解し、血流の再開通がなされたことを血管造影的に確認した。その再開通率および再開通までの時間には一本鎖 t-PA、二本鎖 t-PA 間に差が認められること、および血中フィブリノーゲンの低下は認められず、全身の線溶亢進が伴わずに血栓溶解作用が発揮されたことが明らかとなった。既存の血栓溶解剤であるウロキナーゼは、t-PA と同等の血栓溶解作用を示す用量で、全身線溶の亢進が生じている。これらのことから t-PA は一本鎖型、二本鎖型とも同等の血栓溶解作用を有し、ウロキナーゼよりも出血の危険の少ない急性心筋梗塞治療薬になりうることが示唆された。

また、ラットの脳塞栓症モデルを用いて、脳塞栓症に対する t-PA の臨床応用の可能性について検討した。脳塞栓を発症させたラットに t-PA を静脈内投与することで、死亡の抑制、神経症状の改善および梗塞面積の減少が認められ、t-PA 投与による血流再開によるものであることが示唆された。さらに投

与量との相関および脳塞栓発症後から t-PA 投与までの時間による影響について検討を行い、塞栓症発症後できるだけ早い時期に t-PA を投与することが効果的であることを示している。また、同様の検討がウロキナーゼを用いて実施された。t-PA 同様に、死亡の抑制、神経症状の改善が認められたが、t-PA とは異なり、血中フィブリノーゲンの減少および頭蓋内出血の増加傾向が明らかであった。これらの結果から、脳塞栓症も t-PA による血栓溶解療法の適用となる可能性が強く示唆された。実際に、本邦において脳塞栓症を対象として t-PA の臨床試験が実施され、続いて米国において臨床試験が開始されている。

SM-20302 は、血小板凝集阻害薬であり、光化学的に活性酸素を発生させることにより血管壁を損傷して血栓を形成させるモルモット大腿動脈血栓モデル、血管壁に電気刺激を与えて血栓を形成させるイヌ冠動脈血栓形成モデル、およびアデノシン二リン酸/エピネフリンを投与して生じるモルモット一過性脳虚血発作モデルにおいて血栓形成抑制を示すことを明らかにした。その検討の中で、経時的に血小板凝集抑制率をモニターすることにより、血小板凝集が必ずしも 100 % 抑制されていなくとも血栓形成が抑制されることを明らかにした。また、血管壁の損傷が生じても 6 時間程度、血小板の凝集を抑制しておくことで血栓形成を防ぐことができる事を示した。この現象について、血小板形成亢進状態にある損傷血管壁が不動化、すなわち血小板を刺激しない状態を獲得することによる血栓形成抑制として推察している。

SM-20302 の作用機序は、血小板凝集の最終経路である血小板膜上の GP II b/III a とフィブリノーゲンの結合を阻害するものである。一方、血小板は各々の受容体を介して、血管壁のコラーゲン、von Willebrand 因子等の接着蛋白質に結合する粘着反応を生じる。SM-20302 は他の接着蛋白質に比べ、血小板とフィブリノーゲンとの結合に対し特異性の高い阻害作用を持つ化合物としてスクリーニングされており、血小板粘着に対する影響が少なく、出血副作用のリスクの小さな抗血小板薬となる可能性を提起した。このことを実験的に証明するためにマウスを用いて消化管易出血モデルを新たに作製して検討している。このモデルにおいて、SM-20302 はフィブリノーゲンに特異性を示さない血小板受容体阻害物質、および血小板活性化抑制作用を有する既存の抗血小板薬に比べ、血小板凝集抑制を示す用量と出血を生じる用量に大きな乖離があることを明らかにした。これらの結果は、SM-20302 は血小板の凝集作用を抑制するが粘着作用には影響を与えず、そのことにより出血副作用に対する安全域の広い薬物となる可能性を強く示唆するとともに、治療安全域の広い抗血栓薬開発のための新たな実験的方法論の提示となっている。

以上、本論文審査委員会は、t-PA 及び SM-20302 について抗血栓薬としての薬理学的特徴を明らかにし、臨床応用においてその有用性および実用性を

具体的に明らかにした論文と判定し、本論文は申請者の博士（薬学）の学位を受けるに十分に値するものと認めた。