

博士（生命科学） 古 郡 壮 俊

学位論文題名

FXa阻害薬とトロンビン阻害薬の抗血栓効果の差異；
作用機序の解明と経口FXa阻害薬エドキサバンの獲得

学位論文内容の要旨

【背景】血液の凝固は凝固カスケードと呼ばれる複数の凝固因子の段階的活性化により進行する。この進行は、障害を受けた血管内皮細胞下に露出する組織因子（TF）により活性化される外因系、負に帶電した異物と血液の接触が原因で活性化する内因系の2種類から開始され、反応が一段階進むごとに、より多くの因子が產生される増幅反応である。活性化血液凝固第X因子（FXa）は外因系と内因系の合流地点に存在し、プロトロンビンをトロンビンに変換する。さらにトロンビンがフィブリノーゲンをフィブリンに変換し、フィブリンが重合して血栓が形成される。この増幅反応を効率よく抑制して、抗凝固作用に基づく抗血栓薬を新たに創製するには、血液凝固カスケードのより上流の因子であり、かつ外因系と内因系の両方を阻害することが出来るFXaがその標的分子として最適と考えた。一方、血栓の素となるフィブリンの最終產生過程に直接関与するトロンビンも血液凝固カスケードにおいてFXaと同様に重要な因子と考えられており、これを標的分子とする試みもあった。

【目的】本研究の目的は、第一に、FXa阻害薬とトロンビン阻害薬の血栓形成における作用を比較すること、第二に、この作用に両者間で相違点があれば、その機作を明らかにすること、第三に、理想的なFXa阻害薬を獲得することである。

【方法ならびに結果】本研究では、FXa阻害薬としてDX-9065aおよびエドキサバンを、トロンビン阻害薬としては主としてメラガトランを用いた。阻害薬の血栓形成における作用を、ラット静脈血栓モデル、TF誘導凝固亢進モデルで検討した。静脈血栓モデルは白金を下大静脈に留置することにより、凝固亢進モデルはTFの静注により血栓を惹起した。DX-9065aは両モデルにおいて用量依存的に抗血栓効果を示した。メラガトランは静脈血栓モデルでは用量依存的な抗血栓効果を示したが、TF誘導凝固亢進モデルでは低用量（0.5, 2.5 mg/kg, p.o.）において血小板消費量ならびに血栓形成の指標であるトロンビン-アンチトロンビン（AT）複合体（TAT）を増加し、肺にフィブリン血栓が認められるなど病態を逆に悪化させた。より高用量（20 mg/kg, p.o.）では病態の改善が認められた。このことは、抗凝固薬であるはずのトロンビン阻害薬が、ある条件下においては逆に血液凝固を亢進させ、血栓形成を促進させることを示している。FXa阻害薬では血栓形成促進現象は無かった。

そこで、ラットTF誘導凝固亢進モデルを用いて、メラガトランの用量、血漿中濃度推移と病態との関係を検討した。その結果、メラガトランは高用量、高濃度の場合は血小板の消費、TATの產生を抑制し、死亡例は認められなかったが、低用量、低濃度では逆に血小板の消費、TATの產生を亢進し、死亡率が増加した。血漿中メラガトラン濃度が15-234 ng/mLでは各指標が悪化し、1190 ng/mLより高濃度では改善することが明らかになった。以上から、トロンビン阻害薬が血液凝固を亢進し病態を悪化させる現象は、血漿中のメラガトラン濃度に依存し、ある濃度を下回ると起こることを明らかにした。これとは異なり、FXa阻害薬、ヘパリンは本実験条件下において病態を悪化させなかった。

上記現象の機作を明らかにする目的で、種々薬物の血漿におけるトロンビン產生（TG）に与える影響をin vitroで検討した。TGの測定、分析は凝固状態を反映した指標を獲得できる有用な方法であり、TGの亢進は凝固活性の亢進を意味する。TG測定はcalibrated automated thrombography法により行った。FXa阻害薬（エドキサバン、DX-9065a）、AT依存性抗凝固薬（ヘパリン類）は可溶性トロンボモジュリン（sTM）存在の有無に関わらず、濃度依存的にTGを抑制した。一方、トロンビン阻害薬（メラガトラン、lepirudin, active site

blocked thrombin) は sTM 存在下で TG のピークを各々 2.0, 1.6, 2.2 倍に増加させた。メラガトランならびに lepirudin はより高濃度では TG を抑制した。この *in vitro* で示した現象は、*in vivo* で示した現象と類似している。

プロテイン C (PC) は血液凝固カスケードをネガティブに調節している重要な因子であり、トロンビン-TM 複合体が PC を活性化し、活性化した PC が活性化血液凝固第 V 因子 (FVa) ならびに活性化血液凝固第 VIII 因子を加水分解することにより、強力な抗凝固作用を発揮するネガティブフィードバックシステムを備えている。メラガトランは TM に結合したトロンビンを阻害することにより PC の活性化を阻害することが報告されている。そこで PC 欠損血漿を用いて上記と同様の検討を実施した結果、メラガトランは濃度に関わらず TG を亢進しなかった。さらに、PC 中和抗体は、sTM 存在下で TG を亢進した。以上の結果から、トロンビン阻害薬が PC 活性化の阻害を介して TG を亢進すること、このネガティブフィードバックシステムの阻害により、血栓形成を促進する可能性を明らかにした。

これまでの検討により、FXa 阻害薬はトロンビン阻害薬と比較して凝固カスケードを活性化させる可能性が少なく、より使いやすい薬である可能性を示した。DX-9065a は臨床では薬効を発揮するのに十分な血中濃度を得られなかった。DX-9065a は強塩基であるアミジノ基を有しており、この部分構造が経口吸収性に負に働くことが判明した。そこでアミジノ基を有さない化合物の誘導展開を進めた結果、強力な FXa 阻害活性を有し、かつ経口吸収性にも優れている選択的 FXa 阻害薬エドキサバンを獲得した。*In vitro* において、エドキサバンはヒト FXa の酵素活性を K_i 値 0.561 nM で拮抗的、かつ選択的に(他セリンプロテアーゼとは 10,000 倍以上の解離)阻害し、生理的により重要なプロトロンビナーゼ複合体のプロテアーゼ活性も阻害し、ヒト血漿の凝固時間を濃度依存的に延長した。エドキサバンはラットおよびカニクイサルにおいて、経口投与後速やかに FXa 阻害活性を示した。エドキサバン 1 mg/kg をカニクイサルに経口投与した際の C_{max} は 175 ± 74 ng/mL、AUC は 852 ± 284 ng·h/mL であり、同用量の DX-9065a を経口投与した際の C_{max} 36.8 ± 20.5 ng/mL、AUC 191 ± 104 ng·h/mL を大きく上回った。*In vivo* では、エドキサバンは、ラット静脈血栓モデル、ラットおよびウサギの静脈鬱血血栓モデルにおいて、モデル作製前の単回経口投与により用量依存的な FXa 阻害活性、凝固時間延長および抗血栓作用を示した。以上の結果から、エドキサバンは強力でかつ選択性に優れた FXa 阻害薬であり、さらに DX-9065a の欠点であった経口吸収性も改善された資質を備えていることを示した。

【結論】同じ血液凝固因子の阻害薬である FXa 阻害薬とトロンビン阻害薬の効果をラット病態モデルで検討した結果、ある条件下ではトロンビン阻害薬が逆に血液凝固を亢進し、血栓形成を促進させるという相違点を見出した。この作用機序として、トロンビン阻害薬が PC 活性化の阻害を介して TG を亢進すること、このネガティブフィードバックシステムの阻害により、血栓形成を促進させる可能性を明らかにした。対照的に FXa 阻害薬は凝固カスケードを活性化させる可能性は少なく、より使いやすい薬である可能性を示した。さらに、強力でかつ選択性に優れた FXa 阻害薬であり、経口吸収性も改善されたエドキサバンを獲得した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	南 雅文
副査	教授	菅原 満
副査	准教授	武隈 洋
副査	准教授	金田 勝幸

学位論文題名

FXa阻害薬とトロンビン阻害薬の抗血栓効果の差異； 作用機序の解明と経口FXa阻害薬エドキサバンの獲得

博士学位論文審査等の結果について（報告）

これまで抗凝固薬としては、長年にわたり、ワルファリンが唯一の経口薬として使用されてきた。ワルファリンはビタミンK依存性血液凝固因子（FVII, FIX, FX因子, プロトロンビン）の生合成を阻害することにより血液凝固を抑制する薬物であるが、薬効の個人差が大きい、他の薬物や食物との相互作用を有する、治療域が狭い、作用発現が遅い、頻繁な薬効モニタリングによる用量調節が必要等の欠点を有しており、新しい抗凝固薬、特に経口投与可能な抗凝固薬の開発が求められていた。血液の凝固は凝固カスケードと呼ばれる複数の凝固因子の段階的活性化により進行する。この進行は、障害を受けた血管内皮細胞下に露出する組織因子（TF）により活性化される外因系、負に帯電した異物と血液の接触が原因で活性化する内因系の2種類の系から開始され、反応が一段階進むごとに、より多くの因子が產生される增幅反応である。活性化血液凝固第X因子（FXa）は外因系と内因系の合流地点に位置し、プロトロンビンをトロンビンに変換する。さらにトロンビンがフィブリノーゲンをフィブリリンに変換し、フィブリリンが重合して血栓が形成される。著者は、この增幅反応を効率よく抑制して、抗凝固作用に基づく抗血栓薬を新たに創製するには、外因系と内因系の両方を阻害することが出来るFXaが標的分子として最適と考えた。一方、血栓の素となるフィブリリンの最終產生過程に直接関与するトロンビンも血液凝固カスケードにおいてFXaと同様に重要な因子と考えられており、これを標的分子とする試みもあった。そこで、著者は、第一に、FXa阻害薬とトロンビン阻害薬の血栓形成における作用をラット病態モデルにおいて比較検討し、FXa阻害薬は用量依存的に血液凝固を抑制するが、トロンビン阻害薬はある濃度範囲において逆に血液凝固を亢進して血栓形成を促進させることを見出した。第二に、その作用機序として、トロンビン阻害薬がプロテインC活性化の阻害を介してトロンビン産生を亢進すること、このネガティブフィードバックシステムの阻害により、血栓形成を促進させる可能性を明らかにした。一方、FXa阻害薬は凝固カスケードを活性化させる可能性は少なく、より使いやすい薬である可能性を示した。第三に、新たなFXa阻害薬として、強力でかつ選択性に優れ、さらに経口吸収性も改善されたエドキサバンを獲得した。本研究は、抗凝固療法において、これまで50年以上に亘って使用されてきた、唯一の経口薬であるワルファリンならびに注射薬であるヘパリンに代わる新たな選択肢を提供するものである。加えてトロンビン阻害薬に比較してFXa阻害薬の有用性を示したものであり、今後の医療満足度の向上に大いに貢献できるものと考えられる。

これを要するに、著者は、特にFXa阻害薬とトロンビン阻害薬の薬理作用の差異について新知見を得たものであり、抗凝固薬の薬理作用機序とFXa阻害薬の有用性の理解に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。