

氏名	ごとう まさき 後藤 昌希		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1725 号		
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 15 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	Rivaroxaban, a factor Xa inhibitor, induces the secondary prevention of cardiovascular events after myocardial ischemia reperfusion injury in mice （活性型血液凝固第 Xa 因子阻害薬であるリバーロキサバンのマウスにおける心筋虚血再灌流障害に対する 2 次予防効果）		
論文審査委員	（主査）	福岡大学	教授 朔 啓二郎
	（副査）	福岡大学	教授 石倉 宏恭
		福岡大学	教授 井上 隆司
		福岡大学	准教授 白井 和之

内容の要旨

【目的】

活性型血液凝固第 Xa 因子 (FXa) 阻害薬であるリバーロキサバンは、急性冠症候群 (ACS) 後の心血管イベントに対する 2 次予防効果があるといわれているが、明確な機序は明らかではない。最近の研究では、様々な凝固因子が血栓形成や炎症反応に関与し、FXa はプロテアーゼ活性化受容体 (PAR) -1, 2, 3, 4 を活性化し、炎症促進性に働くと考えられている。今回、我々は FXa 阻害薬であるリバーロキサバンの心筋虚血再灌流障害後血栓形成モデルマウスに対する生存率と心保護作用について検討した。

【対象と方法】

9-12 週齢の雄性 C57BL6/J マウスに心筋虚血再灌流障害を作成し、高用量群 (1.2g/kg deed/day) と低用量群 (0.6g/kg deed/day)、コントロール群の 3 群に無作為に振り分けリバーロキサバンを 2 週間混餌投与した。1 週間混餌投与した後、2 次イベントとして組織因子を静脈注射し、その 1 週間後の各群の生存率、Tail-cuff 血圧計による血圧測定、ミラーカテーテルによる心機能評価、梗塞サイズを評価した。その他、左室における各種因子の mRNA レベルも計測した。薬の効果判定については、血栓形成能解析装置 (Total Thrombus-formation Analysis System : T-TAS) を用いた。

【結果】

実験開始時の Background には 3 群間で有意差は認めなかった。生存率は、実験開始後 14 日で群間に有意差を認めなかったが、組織因子の静脈投与後では高用量群で有意な生存率の改善を認めた (vs. コントロール群, $p < 0.05$)。また、ミラーカテーテルによる心機能評価では、リバーロキサバン群でコントロール群と比較し左室駆出率が高い傾向が認められた。しかし、2 週間後の血圧や梗塞サイズについて有意差は認められなかった。左室における各種因子の mRNA レベルは、リバーロキサバンにより IL-6、Collagen 1 α 2 と Collagen 3 α 1、PAR-2 と PAR-4 が有意に低下していた。

【結論】

本研究では、心筋虚血再灌流障害を作成後、2 次イベントとして組織因子を投与したが、リバーロキサバンにより FXa を阻害することでそれ以下の経路であるトロンビン、フィブリノーゲン、凝固因子、血小板などの活性化が低下し、さらに、PAR の発現低下による炎症抑制、線維化抑制や血栓抑制が心臓線維化抑制に伴うリモデリング抑制から心機能改善のへと繋がったと考えられた。

しかし、本研究では、マウスの死因が特定されていないため、リバーロキサバンが、リモデリング抑制に伴う心不全を改善させたのか、致死的不整脈の発生を抑えたのか、心破裂を予防したのか、全身血栓症の発症を抑制したのか不明である。今後、細胞による詳細なメカニズムの解明ができれば死因を究明する手がかりとなるかもしれない。

審査の結果の要旨

本研究は、ATLAS ACS 2-TIMI51 試験の結果を基に実施したマウス実験である。

ATLAS ACS 2-TIMI51 試験では、FXa 阻害薬であるリバーロキサバンが急性冠症候群後の心血管イベントに対する 2 次予防効果を有するとの結果が報告された。しかし、その詳細なメカニズムは明らかでなく、本研究はそのメカニズムを解明すべく開始された研究である。研究方法としては、9-12 週齢の雄性 C57BL6/J マウスに心筋虚血再灌流障害を作成し、リバーロキサバン高用量群 (1.2g/kg deed/day) と低用量群 (0.6g/kg deed/day)、コントロール群の 3 群に振り分け混餌投与した。1 週間後に 2 次イベントとして組織因子を静脈注射し、さらにその 1 週間後に各種パラメーターを評価した。結果として、実験開始後 14 日の生存率に有意差は認めなかったが、組織因子の静脈投与後では高用量群で有意な生存率の改善を認めた (vs. コントロール群, $p < 0.05$)。またミラーカテーテルによる心機能評価において、リバーロキサバン群でコントロール群と比較し左室駆出率が高い傾向が認められた。この理由として、注目したのがプロテアーゼ活性化受容体 (PAR) である。FXa は PAR

を活性化し、炎症促進性に働くと考えられている。今回、左室における PAR の mRNA レベルを測定したところ、リバーロキサバンが PAR-2 と PAR-4 の発現を有意に低下させた。つまりリバーロキサバンが PAR の発現を低下させ炎症抑制、線維化抑制、血栓抑制が、心臓線維化抑制に伴うリモデリング抑制から心機能改善のへと繋がったと申請者は報告した。

1. 斬新さ

2006 年に Direct Oral Anti Coagulants (DOAC) が登場し、今日では広く臨床で使用されている。その中でリバーロキサバンは、抗凝固作用以外に多面的作用が報告されている。本研究は、ATLAS ACS 2-TIMI51 試験を基に、リバーロキサバンの急性冠症候群後の心血管イベントに対する 2 次予防効果のメカニズムについて、マウスを用いた動物実験において検証した点に斬新さがある。さらに、リバーロキサバンの心保護作用には、PAR 阻害を介した機序を証明できた点においても斬新さがある。

2. 重要性

今日では、心筋梗塞後のステント血栓症予防として、抗血小板 2 剤併用療法 (dual antiplatelet therapy: DAPT) が、ステント植え込み後の標準治療法となっている。もちろんステントの種類により DAPT 継続期間は異なるが、薬剤溶出性ステント (drug-eluting stent: DES) を使用した場合、DAPT を長期的に継続するケースが多い。DAPT を継続する場合には出血等が問題となるが、心房細動患者のような抗凝固療法を必要とし、抗凝固療法と抗血小板療法を組み合わせる場合はさらに出血が問題となってくる。この抗凝固療法と抗血小板療法の組み合わせについては、様々な臨床試験で議論されているものの現在のところ最終的な結論は出ていない。本研究の基となった ATLAS ACS 2-TIMI51 試験では、抗血小板療法に抗凝固療法としてリバーロキサバンを加えて、ACS 後の心血管イベントに対する 2 次予防効果を証明した。さらには、そのメカニズムを解明することで、抗凝固療法としてリバーロキサバンを追加することの重要性を示した点で評価できる。また、本研究の結果が、今後の抗凝固療法と抗血小板療法の組み合わせの選択に影響を与える可能性があるため重要である。

3. 研究方法の正確性

本研究は、福岡大学動物実験委員会の承認 (承認番号 1311699) を受けた研究である。また International Journal of Cardiology にも掲載された論文であり、研究方法は評価されている。

4. 表現の明確さ

目的、方法、結果は、正確かつ詳細に表現されている。結果に基づいた考察については、過去の論文などと比較しながら十分に検討し、リバーロキサバンの心臓に与える影響についてメカニズムを示した。

5. 主な質疑応答

Q1: sham 群として虚血再灌流障害をきたしてない群を作らなかったのか？

A1: ATLAS ACS 2-TIMI51 試験をベースに実験を施行したため、今回は全ての群において心筋虚血再灌流障害を起こした。sham 群はプロトコールになかった。

Q2: 虚血再灌流障害の方法は具体的にどのようにするのか？

A2: 他の論文と同様のマウス心筋梗塞作成方法に従い施行した。具体的には、開胸したのちにマウス心臓（冠動脈）の前下行枝(LAD)を結紮し、心筋梗塞を作成した。今回は、虚血再灌流障害モデルのため、30分結紮した後に再灌流した。

Q3: 心重量についての有意差の検討はしていないのか？左室肥大など心臓自体に変化は認めなかったのか？

A3: 各群で心重量を測定したが有意差はなかった。また心肥大に関しては、心筋染色を行っていないため正確には不明である。

Q4: 2週間の各群の生存率はどれくらいであったか？

A4: リバーロキサバン高用量群で70%、低用量群で62%、コントロール群で40%であった。

Q5: 組織因子(TF)の用量設定はどのようにしたのか？

A5: 予備実験として、WTマウスの眼窩静脈叢よりTF投与し、死亡率が10%以上となるTFの濃度に設定した。

Q6: 今回のマウスの死亡の原因としては何が考えられるか？

A6: 急性心不全や致死的不整脈、心破裂、肺塞栓症を含めた全身血栓症が考えられた。また、組織因子(TF)投与前後に分けると、投与前は急性心不全、致死的不整脈、心破裂が考えられ、組織因子投与後は肺塞栓症や全身塞栓症、呼吸不全が考えられた。実際に死亡したマウスの解剖を試みたところ、出血、心破裂などを認めていたものもあるが、肺塞栓症などは正確な評価できず、他のTF静脈投与している論文を参考に死因を推測した。

Q7: 左室機能低下は何によって起こり、何によって改善を認めたか？

A7: 左前下行枝の心筋梗塞による心機能低下が考えられた。心機能改善の要因は、非梗塞範囲の心筋の肥大化線維化を抑制することでリモデリング抑制が心機能改善へと繋がった。

Q8: mRNAの抽出はどこからどうやって行なったか？

A8: 左室心筋からRNAを抽出し、cDNAを作成、RT-PCR法を用いて測定を行なった。

Q9: PAR の選択的阻害薬はあるのか？

A9: 細胞を用いた *in vitro* のいくつかの論文では報告がある。

Q10: PAR-2 は何にどう作用しているのか？

A10: 大血管において、PAR-2 は血管内皮に存在し、その活性化により NO 依存性の弛緩反応が起こるとの報告がある。一方、冠動脈、腸間膜動脈などでは PAR-2 活性化による弛緩反応は、血管内皮由来過分極因子 (EDHF) を介しておこるとされる。また、様々な臓器に PAR-2 の発現が確認されており、未だに解明されていない作用も多くある。

Q11: 今回測定されている PAR は受容体の発現量を測定しているが、活性の低下ではないのでは？

A11: 今回は PAR の発現量を測定しており、ご指摘の通り活性化は正確には測定できていない。現在細胞にて、その PAR 活性について測定を試みている。

その他の質問に関しても申請者は適切に答えた。本論文はリバーロキサバンが心筋虚血再灌流障害後の 2 次イベント予防効果を有することをマウスの実験から示し、そのメカニズムを解明した研究であり、学位論文に値すると評価された。