

令和元年5月28日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19176

研究課題名(和文) 出血リスクを増大しない抗血栓療法に向けて：スタチンによる新たな血栓阻止機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of antithrombotic properties of statins; New insight to its therapeutic potential for the prevention of thrombotic diseases.

研究代表者

關谷 暁子 (SEKIYA, Akiko)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：10452111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、HMG-CoA還元酵素阻害剤(スタチン)が、抗血栓作用をもたらすメカニズムを明らかにすることを目的とした。血管内皮細胞をフルバスタチンの存在下で培養すると、組織因子経路インヒビター(TFPI)産生が増加した。また、肝星細胞をフルバスタチンの存在下で培養すると、a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13(ADAMTS13)産生が増加した。TFPIとADAMTS13はともに血栓形成を阻止する因子であり、これらの因子の増加がスタチンの抗血栓作用に寄与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スタチンには、抗血栓作用もあることが知られているが、その機序については不明な点が多かった。スタチンはコレステロール低下薬として既に臨床で広く用いられており、出血リスクを増大しないことが立証されていることから、スタチンを抗血栓療法に用いることへの期待度は高いといえる。また、本研究の「抗血栓作用」の機構に特異的に作動する薬剤を開発できれば、それはまさに「出血リスクを増大しない理想的な抗血栓薬」となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the mechanism of how HMG-CoA reductase inhibitors (statins) play a role of antithrombotic properties. In our in-vitro experiments, fluvastatin increased tissue factor pathway inhibitor (TFPI) expression in human umbilical vein endothelial cells. Fluvastatin also increased a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13 (ADAMTS13) expression in human hepatic stellate cells. Both TFPI and ADAMTS13 play crucial roles in inhibition of thrombus formation. This study revealed unknown mechanisms of the anticoagulant effect of statins and gave a new insight to its therapeutic potential for the prevention of thrombotic diseases.

研究分野：血栓止血学

キーワード：HMG-CoA還元酵素阻害剤(スタチン) TFPI ADAMTS13 抗血栓療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞、心筋梗塞、閉塞性動脈硬化症、深部静脈血栓症、肺塞栓症などの血栓症は、癌に次ぐ日本人の主要な死亡原因となっている。現在、抗血栓薬として用いられている抗血小板薬や抗凝固薬は、生理的な止血に必要な血栓形成まで抑制してしまうため、出血のリスクがある。そのため、「出血リスクを増大しない理想的な抗血栓療法」の確立が求められている。

HMG-CoA 還元酵素阻害剤(スタチン)はコレステロール合成経路の HMG-CoA 還元酵素を阻害することで、コレステロール産生を抑制する。そのため、コレステロール低下薬として臨床で広く用いられているが、その他にも様々な作用(多面的作用: 抗炎症、血管内皮保護、粥状硬化性プラークの安定化など)を持ち、抗血栓作用もそのうちのひとつである。われわれは以前、スタチンが血管内皮における組織因子発現を抑制、トロンボモジュリンの発現を増加させることにより抗血栓作用を発揮することを報告した。しかし、スタチンのもつ抗血栓作用については、他にも未知の機序が存在するのではないかと考えられている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、スタチンのもつ抗血栓作用のメカニズムを明らかにし、スタチンの新規抗血栓薬としての有効性について検討することである。今回注目したのは、おもに血管内皮で産生される組織因子経路インヒビター (Tissue factor pathway inhibitor: TFPI) および、肝で産生される a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13 (ADAMTS13) である。両者はともに血栓形成を阻止する因子である。本研究では、スタチンによる抗血栓作用の機序の一つとして、これらの因子の発現を増加させるかどうか、およびその機序について検討した。

3. 研究の方法

(1) スタチンが血管内皮細胞における TFPI 発現に与える影響

培養細胞は、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた。スタチンは細胞透過性の高さが特徴の脂溶性スタチンであるフルバスタチンを用いた。細胞を以下に示す条件で培養後、トータル RNA を抽出し、TFPI mRNA をリアルタイム PCR 法にて定量した。TFPI mRNA 量はハウスキーピング遺伝子である GAPDH の mRNA 量で補正し、培養液のみで培養した場合の mRNA 発現量を 100% として増加率を算出した。また、同様の条件で培養した細胞の溶解液を用いてウェスタンブロッティングを行い、TFPI の蛋白発現量を半定量的に定量した。また、フルバスタチンが TFPI 遺伝子のプロモーター活性に影響を与えるかどうかを、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した。フルバスタチンが TFPI mRNA の半減期に与える影響を、アクチノマイシン D (AD) 添加による mRNA 合成阻害実験により検討した。

フルバスタチン単独添加

フルバスタチン+コレステロール合成経路中間代謝産物(メバロン酸、ファルネシルピロリン酸 (FPP)、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP)) 添加

Ras/Rho family inhibitor (FTI276、TcdB、Y27632、NSC23766) 添加

フルバスタチン+シグナル伝達阻害物質 (SB203580、U0126、SP600125、GF109203X、LY294002) 添加

(2) スタチンが肝星細胞における ADAMTS13 発現に与える影響

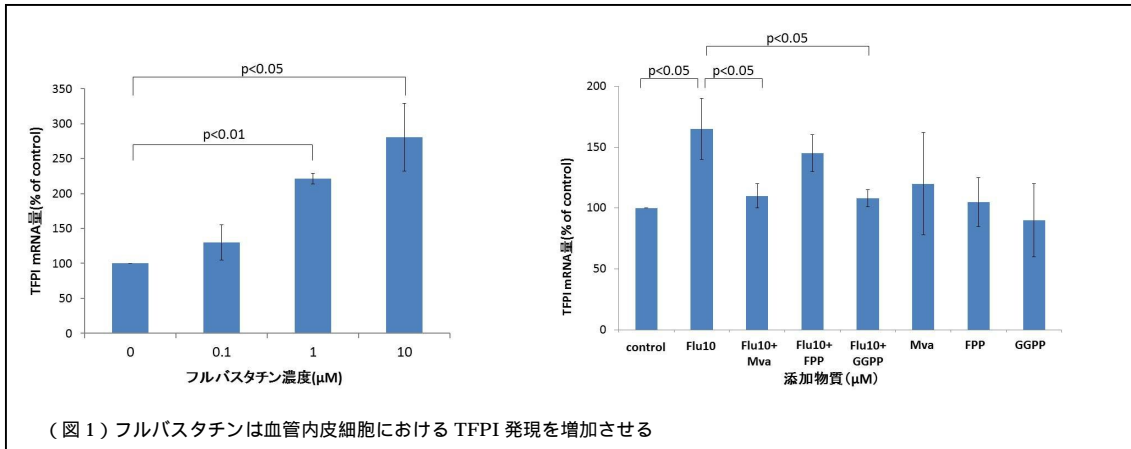
培養細胞はヒト肝星細胞由来 LX2 を用いた。(1) と同様の条件で培養後、トータル RNA を抽出し、ADAMTS13 mRNA をリアルタイム PCR 法にて定量した。ADAMTS13 mRNA 量の増加率を (1) と同様に算出した。

4. 研究成果

(1) スタチンが血管内皮細胞における TFPI 発現に与える影響

HUVEC をフルバスタチンの存在下で培養すると、TFPI mRNA 発現量および蛋白量はスタチンの濃度に依存して増加した。この効果はメバロン酸経路の中間代謝産物であるメバロン酸およびゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) の共存下では打ち消されたが、ファルネシルピロリン酸 (FPP) の共存下では打ち消されなかった (図 1)。GGPP の下位に存在する低分子量 GTP 結合蛋白である Rac1 および Rho キナーゼの阻害剤は TFPI 発現に影響を与えなかった。シグナル伝達経路の検討において、p38MAPK、PKC および PI3K 経路の阻害によりフルバスタチンの効果が打ち消された。ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、フルバスタチンは TFPI のプロモーター活性に影響を与えなかった。アクチノマイシン D (AD) 添加による TFPI mRNA 安定性の検討では、AD 添加後、細胞内の TFPI mRNA 量は、フルバスタチン非存在下では経時的に減少したが、フルバスタチン存在下では維持された。

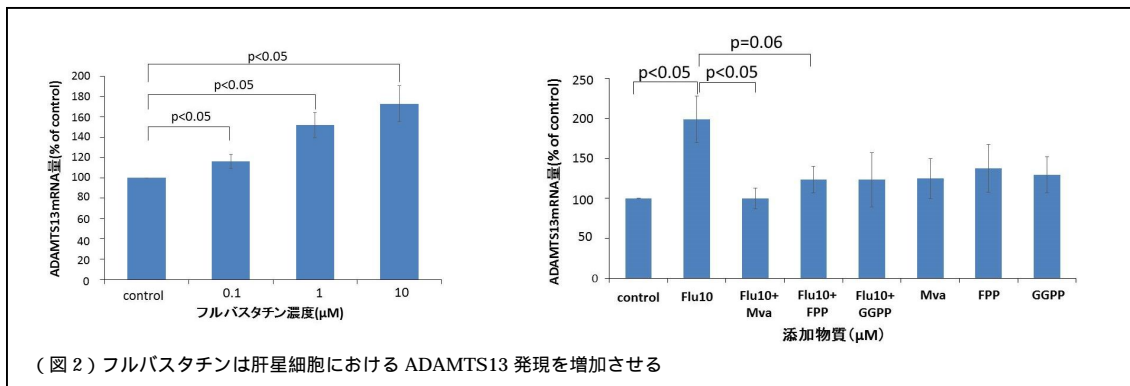
以上の結果から、フルバスタチンは TFPI mRNA を安定化し、その半減期を延長させることにより、血管内皮における TFPI 産生を増加させ、血栓形成阻止に働く可能性が示された。この効果は、メバロン酸経路の GGPP 以降の阻害を介するが、Rac1 および Rho キナーゼ阻害の関与は否定され、GGPP 以降に存在するもうひとつの低分子量 G 蛋白である Cdc42 以降の経路の阻害が、TFPI 増加をもたらすと考えられた。また、p38MAPK、PKC および PI3K シグナル伝達経路の活性化が TFPI 増加をもたらすと考えられた。



(図1) フルバスタチンは血管内皮細胞における TFPI 発現を増加させる

(2)スタチンが肝星細胞における ADAMTS13 発現に与える影響

ヒト肝臓星細胞由来 LX2 細胞をフルバスタチンの存在下で培養すると、ADAMTS13 mRNA 発現量はスタチンの濃度に依存して増加した。この効果はメバロン酸の共存下でほぼ完全に打ち消され、FPP の共存下でも部分的に打ち消されたが、GGPP の共存下では打ち消されなかった(図2)。FPP の下位に存在する低分子量 GTP 結合蛋白である Ras の阻害剤、GGPP の下位に存在する Rac1 および Rho キナーゼの阻害剤は ADAMTS13 mRNA 発現量に有意な影響を与えなかった。シグナル伝達経路の検討において、JNK および PI3K 経路の阻害によりフルバスタチンの効果が打ち消された。また、MEK および JNK 経路の阻害は、フルバスタチン添加と同様に ADAMTS13 mRNA 発現量を増加させた。



(図2) フルバスタチンは肝星細胞における ADAMTS13 発現を増加させる

以上の結果から、フルバスタチンはヒト肝臓における ADAMTS13 の発現量を増加させることが示唆された。この効果は FPP を介した経路の阻害によるものであると考えられる。また、シグナル伝達経路における JNK および PI3K 経路の阻害によるものであることが示された。しかしながら、FPP 以下に存在する、低分子量 GTP 結合タンパク質の関与については特定できなかった。今回使用したスタチンは、肝臓よりも、血管内皮への作用が強いフルバスタチンであったため、今後、他の種類のスタチンを用いてさらなる検討をすること、スタチンによるシグナル伝達経路の活性化の動態など、さらなる検討が必要である。

本研究は、フルバスタチンが血管内皮における TFPI および ADAMTS13 の産生を増加させることを、その機序とともに明らかにした。スタチンは既に臨床で広く用いられており、出血リスクを増大しないことが立証されていることから、スタチンを抗血栓療法に用いることへの期待度は高いといえる。また、スタチンは極めて多面的な生理作用をもたらす薬剤であるが、本研究によって明らかになった「抗血栓作用」の機構に特異的に作動する薬剤を開発できれば、それはまさに「出血リスクを増大しない理想的な抗血栓薬」となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Nagaya S, Akiyama M, Murakami M, Sekiya A, Asakura H, Morishita E. Congenital coagulation factor X deficiency: Genetic analysis of five patients and functional characterization of mutant factor X proteins. *Hemophilia*, 24(5):774-785, 2018. (査読有)

DOI: 10.1111/hae.13606

Sekiya A, Hayashi T, Kadohira Y, Shibayama M, Nomoto H, Asakura H, Wada T, Ohtake S, Morishita E. Thrombosis prediction based on reference ranges of

coagulation-related markers in different stages of pregnancy. Clin Appl Thromb Hemost, 23(7):844-850, 2017. (査読有)

DOI: 10.1177/1076029616673732

Kamijima S, Sekiya A, Takata M, Nakano H, Murakami M, Nakazato T, Asakura H, Morishita E. Gene analysis of inherited antithrombin deficiency and functional analysis of abnormal antithrombin protein (N87D). Int J Hematol, 107(4):490-494, 2017. (査読有)

DOI: 10.1007/s12185-017-2352-8

Sekiya A, Taniguchi F, Yamaguchi D, Kamijima S, Kaneko S, Katsu S, Hanamura M, Takata M, Nakano H, Asakura H, Ohtake S, Morishita E. Causative genetic mutations for antithrombin deficiency and their clinical background among Japanese patients. Int J Hematol, 105(3):287-294, 2017. (査読有)

DOI: 10.1007/s12185-016-2142-8

Taniguchi F, Morishita E, Sekiya A, Nomoto H, Katsu S, Kaneko S, Asakura H, Ohtake S. Gene analysis of six cases of congenital protein S deficiency and functional analysis of protein S mutations (A139V, C449F, R451Q, C475F, A525V and D599TfsTer13). Thromb Res, 151: 8-16, 2017. (査読有)

DOI: 10.1016/j.thromres.2016.12.018

Sekiya A, Morishita E, Maruyama K, Torishima H, Ohtake S. Fluvastatin upregulates the expression of tissue factor pathway inhibitor in human umbilical vein endothelial cells. J Atheroscler Thromb. 22(7):660-668, 2015. (査読有)

DOI:10.5551/jat.28175

6. 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：森下 英理子

ローマ字氏名:(MORISHITA, eriko)

研究協力者氏名：丸山 慶子

ローマ字氏名:(MARUYAMA, keiko)

研究協力者氏名：朝倉 英策

ローマ字氏名:(ASAKURA, hidesaku)

研究協力者氏名：大竹 茂樹

ローマ字氏名:(OHTAKE, shigeki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。