

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390332

研究課題名(和文)TFPI・アンチトロンビン・トロンボモジュリンによる体外循環中の複合的抗凝固戦略

研究課題名(英文)Combined anticoagulation protocol using TFPI, antithrombin and thrombomodulin during cardiopulmonary bypass

研究代表者

平松 祐司(Hiramatsu, Yuji)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：30302417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,500,000円

研究成果の概要(和文)：TFPIによる体外循環中の外因系凝固の遮断と、アンチトロンビン・トロンボモジュリンによる接触-内因系路の阻害および生理的thrombin-antithrombin相互作用バランスの維持により、凝固線溶・炎症の亢進を初期段階でブロックする新たな体外循環中の抗凝固プロトコル確立を目的とした。霊長類医科学研究センターにて、体重5kgのカニクイザルを用いて完全体外循環実験を行った。仮説に即した外因系凝固阻害効果がTFPI早期誘導によって得られ、アンチトロンビンまたはトロンボモジュリン添加のいずれによってトロンビン産生抑制効果はさらに高まった。本プロトコルは、体外循環中の新たな抗凝固戦略となり得る。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish a new anticoagulation protocol during cardiopulmonary bypass (CPB). Our hypothesis was that administration of high-dose heparin causes massive release of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from endothelial cells, and antithrombin or thrombomodulin provides additional thrombin inhibition. We performed experiments using primate (*Macaca fascicularis*, 5kg) CPB model. Plasma TFPI was enhanced by pre-heparinization, and levels of thrombin generation were reduced through inhibition of extrinsic pathway when compared with control group. Inhibition of thrombin generation was further enhanced by the addition of antithrombin and thrombomodulin. Anti-inflammatory effects of either drug were not revealed in our anticoagulation protocol. Combined anticoagulation protocol with TFPI, antithrombin and thrombomodulin may be a promising alternative to heparin toward inhibition of both intrinsic and extrinsic pathways during CPB.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：体外循環 トロンビン 組織因子 外因系凝固 内因系凝固 TFPI アンチトロンビン トロンボモジュリン

1. 研究開始当初の背景

(1) 応募者らは長く、体外循環における凝固線溶・炎症を薬理制御する“Blood Anesthesia”の研究に携わってきた。最新の理論によれば、体外循環における凝固線溶亢進のトリガーは接触系-内因系凝固よりも組織因子を発端とする外因系凝固にあるとされ、特に開心術開始早期に心嚢内血液に増加する可溶性組織因子とこれを制御する内因性 TFPI (tissue factor pathway inhibitor) の応答様式、および単核球による第 VII および X 因子の賦活化が重要視されている。TFPI は、可溶性組織因子/VIIa 複合体が Xa を活性化する段階を阻害して抗凝固作用を発揮すると言われる。また、TFPI は好中球細胞内への Ca 流入を阻害し、接着分子 CD11b/CD18 の発現や放出反応を抑制する。さらに内皮細胞にも作用し TNF- α や IL-6 の放出を抑制する。単球や microparticle の活性化抑制の可能性も示唆され、炎症機転の制御にも関わっていると考えられている。

(2) 一方、アンチトロンビン(antithrombin III) は肝や血管内皮で産生される生理的プロテアーゼ阻害剤で、ヘパリンによって増幅される抗トロンビン作用の他に、IXa、Xa、XIa および XIIa 因子への阻害作用を有する。アンチトロンビンは“suicide substrate”とも呼ばれ、トロンビン産生が著しく亢進する体外循環中には急速に消費され、体外循環終了時には thrombin-antithrombin バランスが崩れて過凝固状態を招く。最近アンチトロンビンについてもその抗炎症作用が認識されつつあり、X 因子やトロンビンの阻害を通じた間接的抗炎症作用に加え、内皮細胞の syndecan-4 受容体を介した prostacyclin 放出による好中球活性化抑制作用が注目されている。

(3) また、血管内皮細胞上のトロンビン受容体であるトロンボモジュリンは、活性化プロテイン C の生成を通じて Va および VIIIa 因子を分解・失活化し、凝固を制御する。トロンビン活性を直接阻害する作用も有し、さらには HMGB1 蛋白の捕捉を介して好中球活性化抑制作用、抗炎症作用を発揮することも明らかにされている。

(4) 本研究においては、上記 3 つの重要な生理的プロテアーゼ阻害タンパク、すなわち TFPI、アンチトロンビンおよびトロンボモジュリンに注目した。3 者を体外循環を通じて血中に高濃度に維持して個々の特性と複合作用を引き出すことにより、外因系および接

触-内因系から共通系路に至る凝固カスケードの最上流部分を集中的に制御する革新的な抗凝固手段確立に至るのではないかと着想した。また TFPI、アンチトロンビン、トロンボモジュリン各々が有する直接・間接の抗炎症作用を併せることにより、高い抗炎症効果獲得を狙った。

(5) 本研究は平成 18-19 および 20-22 年度基盤研究(B)を進展させるものである。先行研究では、体外循環モデルにおいて rTFPI および内因性 TFPI のトロンビン産生抑制効果を確認し、心嚢内の可溶性組織因子が外因系凝固亢進の主因となっていることを示した。本研究はこれらの成果を進展させ、TFPI の機能を中心に据え、ヘパリン単独に依存している現状に代わる革新的な体外循環中の抗凝固戦略を追求したものである。

2. 研究の目的

(1) 心臓外科手術において、体外循環が惹起する凝固線溶・炎症の亢進とこれに伴う臓器障害を軽減すべく、従来のヘパリンに代わる新たな抗凝固手段の開発を目指した。内因性 TFPI 誘導による組織因子阻害に、アンチトロンビンとトロンボモジュリン添加によるトロンビン産生・活性阻害を組み合わせ、外因系・接触-内因系 2 方向からの徹底した凝固線溶および炎症の制御を試みた。体外循環中の主要凝固系路と目される外因系の遮断と、アンチトロンビン・トロンボモジュリンによる接触-内因系路の要所の阻害および生理的 thrombin-antithrombin 相互作用バランスの維持により、凝固線溶・炎症の亢進を初期段階で強力にブロックする革新的な抗凝固プロトコルを確立し、体外循環の安全性向上に寄与することを目的とした。上記の理論から以下の仮説を立てた；『体外循環において、内因性 TFPI、アンチトロンビン、トロンボモジュリンの併用が、組織因子と外因系凝固の賦活化、接触-内因系初期反応の進行、thrombin-antithrombin 相互作用バランスの崩壊、さらには炎症の亢進を阻止し、有意な凝固線溶・炎症制御効果をもたらす。』

(2) 体外循環の抗凝固薬としてヘパリンが万全でないことは広く認識されているにも拘わらず、未だこれを凌駕する抗凝固手段は獲得されていない。近年応募者らは、体外循環における凝固線溶機転亢進の主要なトリガーが外因系凝固系路にあるとする近年の理論に基づき、可溶性組織因子とこれを制御す

る TFPI の役割に焦点を当てて来た。In vitro 体外循環モデル実験において、早期ヘパリン化が内皮からの約 6 倍の TFPI 誘導を果たし、誘導された TFPI がトロンビン産生抑制効果を示すことを確認した。これは内因性 TFPI を体外循環の新たな抗凝固戦略に利用する独自の理論の実証である。本研究ではこの独自の抗凝固理論をさらに発展させ、内因性 TFPI 誘導による可溶性組織因子阻害にアンチトロンビン、トロンボモジュリン添加を組み合わせることより、外因系および接触-内因系系路を初期段階から広範に抑制し、体外循環が惹起する凝固線溶・炎症機転を革新的なレベルで制御することを目指した。独自の抗凝固戦略であり、霊長類体外循環モデルを用いた前臨床研究の意義は深い。

(3) 内因性 TFPI の誘導によって可溶性組織因子を起点とする外因系凝固活性化を効果的に阻害し、これにアンチトロンビン、トロンボモジュリン添加による接触-内因系路の阻害および生理的 thrombin-antithrombin 相互作用バランスの維持を組み合わせることにより、凝固線溶・炎症機転の亢進を初期段階で強力に制御し得ると予想した。ヘパリンに依存したままの現行の抗凝固戦略から脱皮し、生理的プロテアーゼ阻害タンパクの特性を活用した外因系・接触-内因系 2 方向からのかつてない強力な凝固線溶・炎症機転制御手段を探求した実験研究である。体外循環技術の安全性を高める可能性、意義を有する。

3. 研究の方法

(1) 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター（つくば市）においてカニクイザル体外循環実験を実施し、同施設と筑波大学において分析、データ解析を行った。ヘパリンに代わる新たな抗凝固手段の開発を目指し、120 分間のサル体外循環において、ヘパリン早期投与による高濃度内因性 TFPI 誘導とアンチトロンビン・トロンボモジュリン添加を併用し、外因系凝固と接触-内因系凝固系路の複合的阻害を図り、凝固線溶系をその初期段階から広範に遮断することを試みた。また TFPI、アンチトロンビン、トロンボモジュリン各々が有する直接・間接の抗炎症効果を検証した。薬理プロトコル別に 4 群に分け、各グループのベ 10 頭ずつの体外循環実験を行い、凝固線溶・炎症機転の活性化を表す各種の血液学的マーカーを測定した。

(2) カニクイザル体外循環実験モデル；医薬

基盤研究所霊長類医科学研究センターにて飼育されている体重 5kg 前後のオスのカニクイザル（*Cynomolgus monkeys*, *Macaca fascicularis*）20 頭を使用した。実験動物の取り扱いにあたっては、同研究センターおよび筑波大学における実験動物取り扱い規約を遵守し、感染予防等に配慮した（サル体外循環モデルとして既に確立済み）。全身麻酔；squeeze cage 内で ketamin 筋注により麻酔を導入、静脈路確保ののち atropin, thiopental を用いて気管内挿管した。人工呼吸器・麻酔器に接続し、酸素とフォーレンにて全身麻酔を維持した。仰臥位で手術台に固定し、動脈圧モニターラインは大腿動脈をカットダウンして留置した。心電図、動脈圧、体温を連続モニターした。剃毛、適切な術野消毒ののち、ドレーピングを行った。手術；胸骨正中切開、心膜切開し、ヘパリン 3mg/kg を静注して ACT を 480 秒以上に延長した上、上行大動脈に 10Fr. の送血用カニューラを、上下大静脈に 12, 14Fr. の脱血用カニューラを挿入した。カニューラを人工心肺回路に接続して体外循環を開始し、120 分間の軽度低体温無輸血体外循環をおこなった。体外循環開始から 30 分後、上下大静脈のターニケットを絞って完全体外循環とし、右心房を切開して血液を心嚢内に静置し、さらに 30 分後に吸引回路からリザーバーに戻した（心嚢での可溶性組織因子発現を惹起する操作）。開始後 90 分に心房を閉鎖し（60 分間の完全体外循環）、開始後 120 分で体外循環を停止、カニューレを抜去して止血操作を行った。安全上ドレーンの留置ができないため完全な止血ののち閉創し、覚醒後サルを cage に戻した。人工心肺；膜型人工肺（MERA, Tokyo）、ソフトリザーバー（同）、ローラーポンプを組み込んだ回路を lactate ringer 液で充填した（充填量約 250 ml、無血充填）。流量 2.0 L/min/m² で、120 分間の体外循環を行った（脱血温 32 度の軽度低体温、途中 60 分間の完全体外循環）。体外循環中は ACT 480 秒以上をヘパリンで維持し、これを下回る場合は初回量の半量のヘパリンを追加した。体外循環終了後、ヘパリンをプロタミンで中和した。

(3) 実験プロトコル；上記のカニクイザル体外循環基本モデルを用い、手術開始前にヘパリンを予備投与することにより常時の約 6 倍の内因性 TFPI を血中に誘導して可溶性組織因子を阻害する手法と、アンチトロンビンあるいはトロンボモジュリンを添加して接触-内因系路を広範に遮断する手法のいかな

により次の4群に分けた。各群10例ずつ、のべ40回の体外循環実験を予定した。

4群の分類；

[コントロール群]；ヘパリン3mg/kgを体外循環直前に静脈内投与する基本的な体外循環（この群を含む全ての群で、体外循環開始30分後に右心房切開して血液を心嚢内に30分間留置し、心嚢での可溶性組織因子発現を惹起した）。途中右心房切開している60分間は完全体外循環とした。体外循環中はACT480秒以上を維持、これを下回る場合は初回の半量のヘパリンを追加した。体外循環終了後、ヘパリンをプロタミンで中和した。

[内因性TFPI誘導群]；コントロールと同様の操作に加え、手術開始10分前にヘパリン3mg/kgを静脈内投与することにより、あらかじめ内因性totalTFPIを誘導し、可溶性組織因子の阻害効果を高めた。

[内因性TFPI誘導+アンチトロンビン群]；コントロールと同様の操作+内因性totalTFPI誘導による可溶性組織因子阻害+アンチトロンビン添加（100U/kg；半減期61時間）による接触-内因系凝固カスケード阻害を図った。

[内因性TFPI誘導+アンチトロンビン+トロンボモジュリン群]；群にトロンボモジュリン添加（recombinantTM, 380U/kg；半減期4時間）を加えた。

(4) 各群の記録、測定項目は以下のとおり。
<循環・体温モニター>；心拍数、血圧、体温（直腸温）、体外循環の送血・脱血温
<血液凝固・線溶関連マーカー>；血球算定、TAT、F1.2、D-dimer、totalTFPI、thrombomodulin、antithrombinIII（発色性合成基質法）
<血小板関連マーカー>；血小板数、血小板ADP凝集能（Hematracer凝集計）、microparticle、GMP-140（flow cytometry）
<炎症関連マーカー>；好中球CD11b、L-selectin、好中球F-actin（flow cytometry）、好中球エラストラーゼ、補体C5b-9（ELISA）

(5) 計測および血液検体採取のタイミングは、麻酔導入時（ヘパリン予備投与前）、体外循環開始前（ヘパリン投与前）、体外循環開始後30分、90分（完全体外循環終了時）、120分（体外循環停止時）、プロタミン中和後15分、体外循環終了後60分の7ポイント。血小板凝集能は、麻酔導入時、体外循環終了時、体外循環終了後60分の3ポイントのみ。

(6) 統計学的解析には Repeated measure and/or one-way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc test (Stat-View, Windows) を用いた。

4. 研究成果

(1) 体外循環中のACTは全群において500秒以上に維持された。あらかじめヘパリンを静脈内注射することによりTFPI誘導群では、TFPI非誘導コントロールと比較して約8倍のTFPI血中濃度上昇を認めた($P<0.0001$)。すべての群においてTAT、F1+2およびD-dimerは体外循環開始後有意に増加し、トロンビン産生の亢進が示された。

(2) 内因性TFPI誘導群ではトロンビン産生は有意に低下し、TFによる外因系凝固活性化は主要なトロンビン産生要因であった。

(3) 内因性TFPI誘導にアンチトロンビンを加えた群でもトロンビン産生の低下はTFPI誘導群と同等以上に見られたが、仮説に反して炎症の抑制を示すには至らなかった。

(4) 内因性TFPI誘導にアンチトロンビンとトロンボモジュリンを加えた群では、トロンビン産生の低下はTFPI誘導群およびアンチトロンビンのみを加えた群を凌駕したが、やはり仮説に反して炎症の抑制を示すには至らなかった。

(5) TFPIは血管内皮細胞で合成されるプロテアーゼインヒビターで、分子内に3つのKunitz型阻害領域を有し、組織因子の阻害に加えて、TFPIは直接的あるいは間接的なXa因子およびトロンビンの阻害作用を発揮して体外循環におけるトロンビン産生を抑制したものと考えられる。体外循環においては、開胸操作に伴う組織因子発現以前にヘパリンを静注して血中TFPI濃度を高めておくことにより、外因系凝固系路の活性化を主体とする凝固線溶系の異常亢進状態を制御する可能性が示唆された。また体外循環中に急速に消費され、体外循環終了時にはthrombin-antithrombinバランスが崩れて過凝固状態を招くと言われているアンチトロンビンを補充することにより、X因子やトロンビンの阻害を通じたより高いレベルの内因系凝固制御が実施できた。さらに血管内皮細胞上のトロンビン受容体であるトロンボモジュリンは、活性化プロテインCの生成を通じてVaおよびVIIIa因子を分解・失活するなどして凝固を制御するとされているが、本

研究においてもその効果が実証された。

(6) 体外循環が惹起する凝固線溶・炎症の亢進とこれに伴う臓器障害を抑止すべく、従来のヘパリンに代わる新たな抗凝固手段の開発を目指した。内因性 TFPI 誘導による組織因子阻害に、アンチトロンピンとトロンボモジュリン添加によるトロンピン産生・活性阻害を組み合わせ、外因系・接触-内因系 2 方面からの徹底した凝固線溶および炎症の制御を行なうことによって、体外循環が惹起する主要凝固系路と目される外因系の遮断と、アンチトロンピン・トロンボモジュリンによる接触-内因系路の要所の阻害が実現できた。

(7) 東日本大震災の影響で霊長類医学研究センターの研究環境が被害を受け、また震災後の節電の必要もあって実験計画に遅れを来した。このため予定された実験頭数には至らなかったが、解析に足る研究結果を蓄積し、最終的な論文公表の準備中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Goto Y, Hiramatsu Y, Ageyama N, Sato S, Kanemoto S, Sato Y, Sakakibara Y. Cardiopulmonary bypass induces recruitment of bone marrow-derived leukocytes to the lungs in monkeys. The Annals of Thoracic Surgery 2014; 97: 617-623. DOI:10.1016/j.athoracsur.2013.10.072. Epub 2013 Dec 25

Morizumi S, Hiramatsu Y, Matsuzaki K, Goto Y, Sato S, Abe M, Kato H, Matsubara M, Sakakibara Y. Early heparin administration attenuates tissue factor mediated thrombin generation during simulated cardiopulmonary bypass. Journal of Cardiac Surgery 2014; 29: 35-40. DOI: 10.1111/jocs.12254. Epub 2013 Nov 25

〔学会発表〕(計 3 件)

Goto Y, Hiramatsu Y, Ageyama N, Sato S, Kobayashi N, Suzuki H, Sakai M, Kanemoto S, Sato Y, Sakakibara Y. Cardiopulmonary bypass accelerates bone-marrow leukocyte release and recruitment into the lung in primate model. American Thoracic Society International Conference 2012, May 18-23, San Francisco, CA

後藤行延, 平松祐司, 揚山直英, 佐藤幸夫, 片貝祐子. 体外循環による骨髄からの白血球放出と肺への集積および選択的好中球エラストラーゼ阻害剤の術中投与効果. 第 114 回日本外科学会総会 2014, 4 月 3 日, 国立京都国際会館 (京都市)

森谷忠生, 平松祐司, 古垣達也, 茂木芳賢, 金本真也, 後藤行延, 揚山直英, 松下昌之助, 榊原 謙. カニクイザルを用いた *in vivo* 体外循環モデルの確立. 第 52 回日本人工臓器学会大会, 2014 年 10 月 19 日, 京王プラザホテル札幌 (札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/cardiovascularsurg/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

平松 祐司 (HIRAMATSU, Yuji)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 3 0 3 0 2 4 1 7

(2) 研究分担者

揚山 直英 (AGEYAMA, Naohide)
独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医学科学センター・研究員
研究者番号: 5 0 3 9 9 4 5 8

榊原 謙 (SAKAKIBARA, Yuzuru)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 6 0 1 9 2 0 8 5
(削除: 平成 26 年 8 月 11 日)

長谷川 雄一 (HASEGAWA, Yuichi)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号: 0 0 2 5 1 0 5 9

後藤 行延 (GOTO, Yukinobu)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 2 0 4 5 1 7 0 0