

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07151

研究課題名(和文) DICの多発血栓形成プロセスで鍵となる線溶病態の解明と新規治療戦略の提案

研究課題名(英文) Development of new therapeutic strategy and elucidation of fibrinolytic pathophysiology which play a key role in multiple thrombus formation in disseminated intravascular coagulation

研究代表者

菅 幸生 (Suga, Yukio)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：00467101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：二種類の動物DICモデルに対し、組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター(PAI)-1阻害薬によるDIC病態の改善効果を検証した。その結果、線溶亢進薬であるtPAは、DIC病態(特に、線溶抑制型DIC)における凝血学的マーカー、臓器障害を有意に改善した。すなわち、線溶抑制型DICでは、通常の抗凝固療法での改善効果が不十分であることが多く、線溶を活性化する薬剤または線溶抑制を解除する薬剤は、有用な新規DIC治療薬となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身の最小血管内に微小血栓が多発するDICは、病態が複雑であることから、治療に難渋することが多く、救命率が低いことが大きな問題となっている。DICの救命率を向上させるには、血栓症の標準治療である抗凝固療法に加え、新しく有効性の高い治療戦略を確立する必要がある。本研究では、血栓形成に対する生体内防御機構である線溶機序を標的とした新規DIC治療法の有効性を検証した結果、線溶機序は、新たな治療標的となり得る成果が得られた。本研究で得られた知見は、今後の医薬品開発に対する一つの方向性を示す結果であり、社会的意義・学術的意義を有するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The effects of tissue-type plasminogen activator (tPA) and plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 inhibitors on DIC pathophysiology were assessed in two types of rats DIC models. The results showed that tPA, a hyperfibrinolytic agent, significantly improved hemostatic markers and organ dysfunction in DIC, especially in suppressed-fibrinolytic-type DIC. In other words, the results indicated that drugs that activate fibrinolysis or release fibrinolysis suppression may be useful novel DIC therapies, because conventional anticoagulation therapy is often inadequate to improve the suppressed-fibrinolytic-type DIC.

研究分野：臨床薬学

キーワード：DIC 線溶療法 血栓 多臓器不全 出血症状

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における死因の第一位は癌であり、第二位が血栓症(心疾患)である。そのため、血栓症の克服は、日本国民の健康寿命を延伸するための最重要課題の一つである。播種性血管内凝固症候群(DIC)を含めた血栓症の治療・研究では、ヘパリン製剤やワルファリンなどの抗凝固薬が長年にわたり、ゴールドスタンダードの位置づけにあり、研究の主眼は、凝固活性化をいかに抑制するかに置かれていた。血栓症に対して、凝固活性化の制御をターゲットとした様々な治療法の開発が行われてきたものの、現在、敗血症にDICを合併した際の救命率は約60%であり(全国規模疫学調査)、十分な治療成績とは言えない。そのため、凝固活性化の制御以外を標的とした新しい血栓症治療を確立する必要がある。心筋梗塞、脳梗塞などは、単一の臓器に血栓が生じる疾患であるが、DICは全身臓器の最小血管内に微小血栓が多発する「究極の血栓症」と言える病態である。そのため、DIC病態における多発血栓形成プロセスを制御可能な抗血栓療法は、単一臓器での血栓症治療でも有効性の高いものとなる。すなわち、DICに対する病態解析の手法や治療法改善の考え方は、そのまま一般的な血栓症に応用可能である。また、我々は、ラットDICモデルを確立しており、このモデルを用いた研究は、広く血栓症全体の病態解析や治療法の改善に応用可能であることを報告している(Crit. Care Med. 2002)。

我々は、心筋梗塞、脳梗塞などの致死的な血栓症を克服するために、究極の血栓症であるDICを研究対象として、その病態解明や新規治療法の確立に取り組んでいる。本研究では、生体内で生成した血栓を溶解し、血栓による循環障害を回避するための重要な生体内防御機構である「線溶」に着目した。多発血栓生成プロセスでは、炎症により発現するサイトカイン(TNF- α やIL-6など)が引き金となり、凝固機序が活性化される。そして、凝固活性化により産生されたトロンピンは、血栓の形成を促進するだけでなく、Protease-activated receptorsを介して炎症を惹起する。いわゆる、凝固と炎症のクロストークが生じている。さらに、炎症性サイトカインは、凝固活性化に加え、強力な線溶抑制因子であるプラスミノゲンアクチベーターインヒビタ(PAI)の過剰発現を引き起こし、血栓の溶解を阻害して、強力に血栓形成を後押しする。我々は、「凝固と炎症のクロストークが線溶機序に相互作用を及ぼす際のkey factorとしての役割をPAIが担う」との仮説を立て、DICの多発血栓形成プロセスの鍵となる線溶制御因子として、PAIに着目している。一方で、血栓形成時には、線溶活性化(=血栓の溶解)を促進する組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)も血管内皮細胞から放出されるが、過剰なtPAは線溶機序の異常亢進を惹起し、致死的な臓器出血を引き起こす。

以上の背景より、DICの多発血栓形成プロセスにおけるPAI動態を解明し、血栓を溶解するが出血は起こさないレベルに線溶活性化を制御することは、すべての血栓症に対する有効な新規治療戦略になることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、DIC病態における多発血栓形成および病態進展に対する線溶機序、特にPAIの寄与・役割を明らかにする。具体的には、病態の異なる二種類のDICモデル(線溶抑制型DIC、線溶亢進型DIC)にPAI阻害薬(TM5441)および線溶亢進薬(tPA:アルテプラナーゼ)を投与し、凝血的マーカー、腎臓における血栓の沈着等、DIC病態の変動を詳細に比較検討する。この結果を基に、線溶機序の制御を標的とした新たな治療戦略を提案する。

3. 研究の方法

(1) ラットDICモデルの作成

1) LPS誘発DICモデル(LPSモデル)の作成

7~8週齢のWistar系雄性ラットを一晩絶食後、イソフルラン麻酔下、尾静脈より留置針を留置し、LPS 40 mg/kgを4時間かけて持続点滴した。

2) 組織因子(TF)誘発DICモデル(TFモデル)の作成

7~8週齢のWistar系雄性ラットを一晩絶食後、イソフルラン麻酔下、尾静脈より留置針を留置し、TFを含むウサギ脳由来トロンボプラスチン(トロンボチェックPT) 0.32 g/kgを4時間かけて持続点滴した。

(2) 薬物の投与

1) tPA(アルテプラナーゼ)

アルテプラナーゼ 0.3 mg/kg/4 hr、3 mg/kg/4 hr および 6 mg/kg/8 hr を、LPS または TF と混合して、尾静脈より 2.5 mL/hr の投与速度で持続点滴した。

2) TM5441

TM5441 5 mg/kg、10 mg/kg および 20 mg/kg を DIC 誘発物質(LPS または TF) の投与開始と同時に経口投与した。

(3) 凝血的パラメーター、血中サイトカイン等の測定

1) 採血、採尿

DIC 誘発物質(LPS または TF) の投与開始時間を 0 時間とし 4、8 時間後にイソフルラン麻酔

下、仰臥位に固定し、回復し腹部大動脈より採血を行った。なお、採血は 4 % sodium citrate 液を 1/10 容入れた注射筒で採血した。また、採血終了後、膀胱に穿刺し、採尿した。

2) 血液検査

採血した血液より、血小板数、血中フィブリノゲン濃度、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、血中 D-dimer を測定した。また、血液検体を 3000 rpm、15 分で遠心後、血漿は -80 で凍結保存し、トロンビン-アンチトロンビン複合体 (TAT) をヒト用 ELISA キットで測定した。PAI、プラスミンインヒビター-プラスミン複合体および IL-6 は、ラット用 ELISA キットで測定した。臓器障害のマーカーとして、血中アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) および血中クレアチニン (Cr) を測定した。

3) 尿検査

採尿後 30 分以内に、尿中ヘモグロビン濃度を測定した。

(4) 病理組織学的検討

脱血死後、速やかに解剖し腎臓を摘出し、ホルマリンで固定した。腎糸球体におけるフィブリン沈着の程度を検討するため、リンタングステン酸ヘマトキシリン染色 (PTAH 染色) を行い、100 個の糸球体中フィブリン沈着陽性の糸球体の個数を数え、percentage of glomerular fibrin deposition (%GFD) を算出した。

(5) 統計学的検討

データは中央値 (median (range)) で示し、Mann-Whitney U test を用いて $P < 0.05$ を有意差有りとした。

4. 研究成果

1) tPA による DIC 病態の改善

LPS モデルおよび TF モデルにおいて、tPA 投与により血中 PAI 活性の抑制がみられた。LPS モデルにおいては、PAI 活性の低下に相応した血中 D-dimer の増加も認められた (Fig. 1)。TF モデルでは、tPA 投与による血中 D-dimer の増加がみられなかった。これは、TF 投与開始 4 時間後の時点で既に線溶が高度に活性化した状態であり、tPA を投与してもそれ以上の亢進はみられなかったためと考えられた。

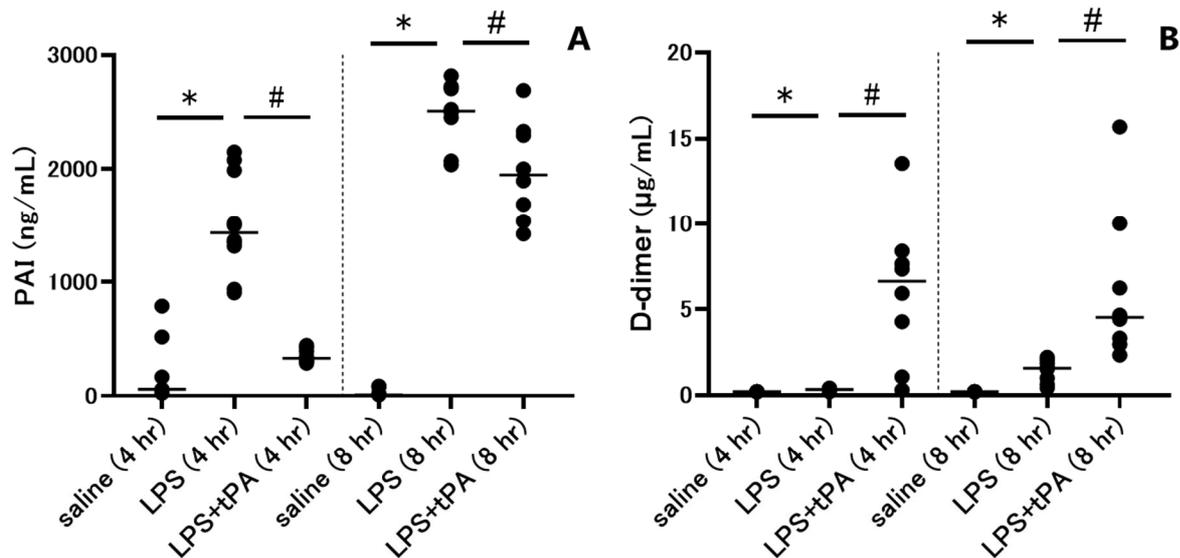


Fig. 1 Changes in plasma levels of plasminogen activator inhibitor (A) and D-dimer (B) at 4 hr and 8 hr in the LPS-induced DIC model treated with 3 mg/kg of tPA

n = 6~8 / *, $P < 0.05$ compared with Control (Mann-Whitney U test) / #, $P < 0.05$ compared with LPS (Mann-Whitney U test)

驚くべきことに両モデルにおいて、tPA は線溶活性化のみならず、血小板減少の抑制、血中 TAT の減少など、凝固活性化を抑制する効果がみられた (Fig. 2 and 3)。特に、血中 TAT の減少については、凝固カスケードにおけるトロンビン産生経路より上流で、tPA 投与により凝固因子の産生または活性化が抑制され、トロンビンの生成量が減少したことに起因すると考えられた。

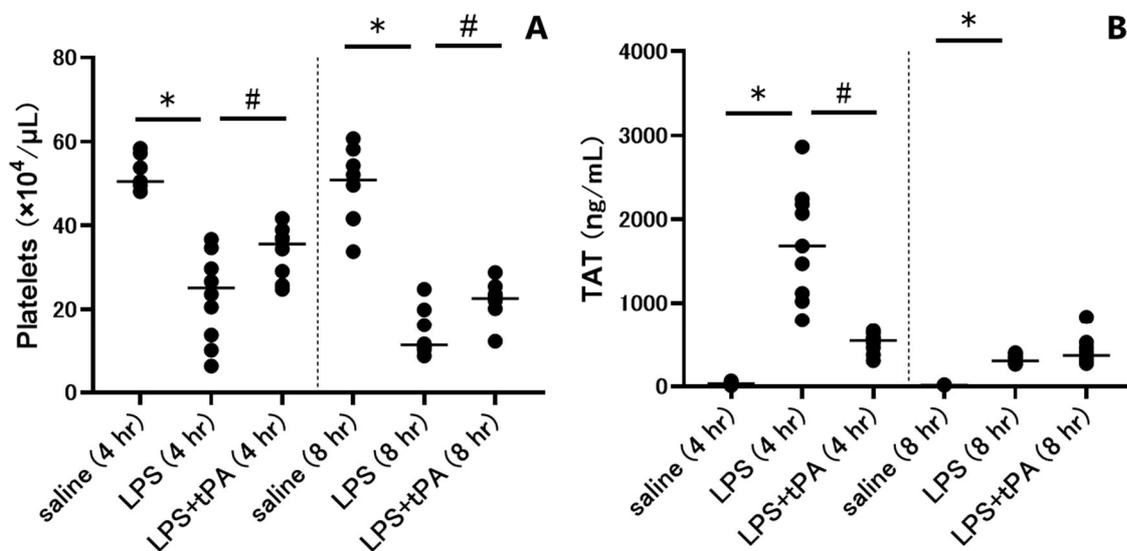


Fig. 2 Changes in plasma levels of platelet (A) and thrombin-antithrombin complex(B) at 4 hr and 8hr in the LPS-induced DIC model treated with 3 mg/kg of tPA
 n = 6~8 / *, P < 0.05 compared with Control (Mann-Whitney U test) / #, P < 0.05 compared with LPS (Mann-Whitney U test)

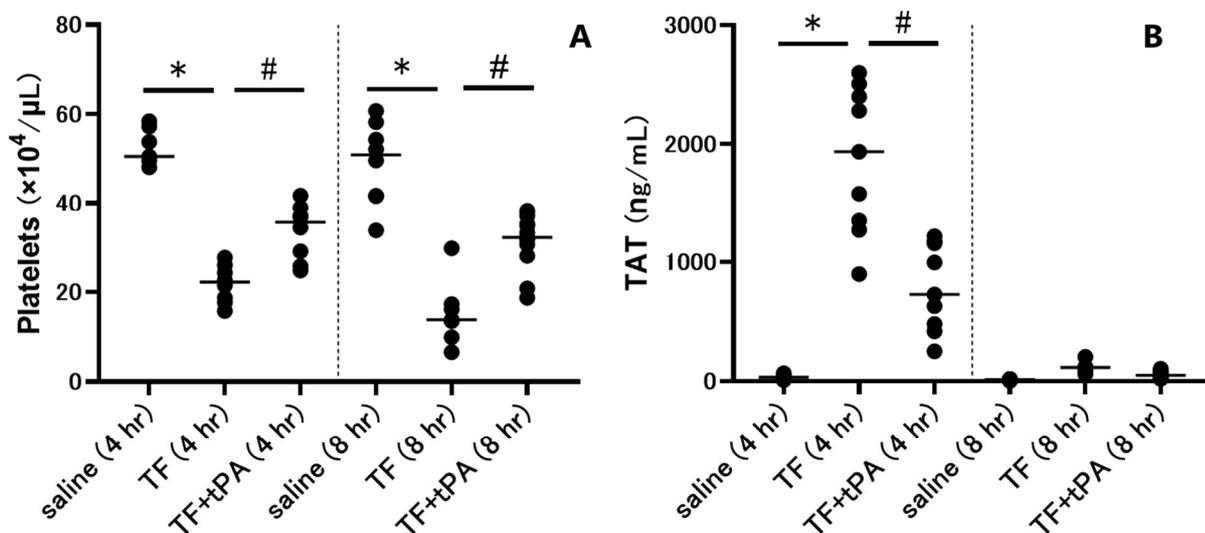


Fig. 3 Changes in plasma levels of platelet (A) and thrombin-antithrombin complex(B) at 4 hr and 8hr in the TF-induced DIC model treated with 3 mg/kg of tPA
 n = 6~8 / *, P < 0.05 compared with Control (Mann-Whitney U test) / #, P < 0.05 compared with LPS (Mann-Whitney U test)

加えて、tPA 投与により両モデルにおいて血中 IL-6 が減少した。tPA 投与により IL-6 の産生が抑制された結果、炎症性サイトカインによる凝固活性化の要素が大きい LPS モデルでは、それに引き続く凝固の亢進も抑制されたと考えられた。対照的に、TF モデルでは凝固活性化の機序において炎症の関与が少なく、tPA による抗凝固作用は別の経路によるものだと考えられた。臓器障害については、血中 ALT・Cr および%GFD の減少がみられ、tPA 投与によって臓器内の微小血栓が溶解され、それに伴い臓器障害が改善したことが示された。tPA の主な副作用の 1 つとして出血症状が挙げられるが、興味深いことに両モデルにおいて tPA 投与によって尿中ヘモグロビンの減少がみられ、むしろ出血傾向が低下していることが示された。これは、臨床での使用量と比較し、より低用量の tPA の投与によって出血症状が発現しにくかったことに加え、tPA の投与によって消費性凝固障害が是正されたためであると考えられた。

以上、tPA 投与によって、線溶機序が活性化されるだけでなく凝固活性化も抑制され、DIC 病態が改善することを明らかにした。従来、血栓性疾患の治療にのみ用いられてきた tPA による線溶療法が、新たに DIC の治療戦略となる可能性を示した。また、tPA は本来 1 時間程度かけて投与する薬剤であるが、低用量の tPA を長時間持続的に投与することにより、出血傾向を出現させることなく線溶抑制状態を是正できるという可能性も見出した。

2) TM5441 による DIC 病態の改善

LPS モデルにおいてのみ、血中 PAI 活性の低下がみられたものの、血中 D-dimer の上昇は認められなかった。したがって、TM5441 は LPS モデルにおいて、PAI を阻害するが、線溶を活性化するまでには至らないことが示された。TF モデルでは PAI 活性の低下傾向がみられたものの、TF モデルにおける PAI 活性はもともと低く、D-dimer についても TF 投与開始 4 時間後の時点で著増しているため、TM5441 投与による影響は少なかったと考えられた。両モデルにおいて血中 ALT は変動しなかったが、TF モデルにおいては血中 Cr の減少が認められ、腎障害の一部が回復したことが示唆された。一方、LPS モデルにおいても、血中 Cr・%GFD の減少が認められた。出血症状に関しては、TF モデルにおいては TM5441 投与により尿中ヘモグロビンが増加しており、出血症状が確認された。

今回の検討では、重度の DIC モデルに対する TM5441 の投与は、PAI 活性を低下させ一部の臓器障害を改善させるものの、病態の大きな回復にはつながらないことが明らかになった。

【総括】

本研究により、LPS-DIC モデル（線溶抑制型 DIC）、TF-DIC モデル（線溶亢進型 DIC）のいずれにおいても、線溶亢進薬である tPA の投与により、DIC による多発血栓の形成、臓器障害の進展を抑制できることが示された。一方で、PAI 阻害薬による線溶抑制の解除による抗 DIC 効果は乏しかった。この点、本研究では DIC 病態が重篤なモデルを使用していたため、十分な抗血栓効果を発揮できなかった可能性も否定できず、さらなる検証が必要であると考えられた。線溶機序の抑制は、DIC の進展における重要な要因の一つであることが明らかとなり、線溶機序は、DIC 治療の新しい治療標的となることが示された。今後は、出血を起こさず、血栓を溶解する程度（＝出血は起こさない）に線溶を制御するための tPA の投与方法を検証することで、安全性・有効性が高い新しい血栓症治療戦略の構築、DIC 患者の救命率の向上に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suga Y*, Tashiro K, Staub Y, Komura S, Yamada S, Morishita E, Asakura H	4. 巻 206
2. 論文標題 Potential of continuous tPA infusion for multiple-organ failure from lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thromb Res	6. 最初と最後の頁 84-87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.thromres.2021.08.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅 幸生, 朝倉英策
2. 発表標題 ラットDICモデルを用いた研究のピットフォール-DIC誘発物質の違いによる病態の違い-
3. 学会等名 第15回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅 幸生, スタッフ由紀子, 田代精亨, 朝倉英策
2. 発表標題 LPS誘発DICモデルに対するtPAによる臓器障害の軽減効果
3. 学会等名 第21回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------