

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24390202

研究課題名(和文) 血小板細胞の構成論的理解による心筋梗塞発症メカニズムの理解と制御法の開発

研究課題名(英文) Constructive Understanding of the Platelet Function for the Onset of Myocardial Infarction.

研究代表者

後藤 信哉 (GOTO, Shinya)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：50225653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞などの血栓性疾患の発症に血小板細胞は必須の役割を演じる。血流による血管壁損傷部位への血小板の運搬と接着、接着部位から局所的に開始される細胞内活性化シグナル伝達とエネルギー代謝の連成、活性化血小板から生理活性物質の局所放出とその物質拡散におよぼす血流の影響、活性化血小板膜上における凝固系の活性化など血栓イベント発症における血小板の生理機能をコンピューターシミュレーターを用いて構成論的に理解する。血小板細胞接着現象は膜糖蛋白GPIbとvon Willebrand因子の結合のみにより仲介される。両蛋白質と周囲の水分子を構成する全原子の運動から、両分子の接着構造、接着力を予測する。

研究成果の概要(英文)：Platelet cell play crucial roles for the onset of thrombotic diseases such as acute myocardial infarction. We aim to construct the physiological function of platelet cell on computer with the use of simulation technology. Platelet adhesion under blood flow condition, activation locally started at site of platelet adhesion, transduction of activation signals and energy metabolism, local release of vaso-active substances from dense or alpha granules, the impact of local blood flow conditions on the distribution of locally released substances, local activation of coagulation on the surface of platelet membrane, are all implemented in our platelet cell simulator. Platelet adhesion at site of endothelial injury was mediated exclusively by platelet glycoprotein Ib binding with von Willebrand factor. All physical interaction among atoms constructing GPIb, VWF and waters were solved to predict dynamic three-dimensional structure and binding force between GPIb and VWF.

研究分野：循環器内科学

キーワード：血小板細胞 血栓 数理モデル 抗血小板薬 シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

心筋を灌流する冠動脈の血栓性閉塞により心筋梗塞を発症する。心筋梗塞は世界人類の死因の 30%を占める社会的に重要な疾病である。発症の契機は冠動脈内の動脈硬化巣の破綻、血管内皮細胞機能の損傷とされる。これら血管性状の変化から、疾病の発症、さらには心停止、突然死などの破局的イベントの発症までの時間は分単位から時間の単位と極めて短い。心筋梗塞の克服のためには、いつ起こるか分からない冠動脈内の動脈硬化巣破綻から冠動脈の閉塞血栓の形成の構成論的理解が必須である。動脈硬化巣破綻部位には血小板細胞が速やかに集積する。心筋梗塞急性期症例の冠動脈閉塞血栓を血栓吸引療法にて吸い出して病理学的に検索すると、閉塞血栓の主成分は血小板と白血球細胞、フィブリンであった。血小板は血管壁損傷部位に接着し、その後生物学的活性化する。活性化血小板は白血球を誘引し、また凝固系を活性化させる。個別に理解されている血小板細胞と炎症細胞、凝固系との関連をコンピューターと数理モデルを用いた構成論的理解を目指す。

健常血管は抗血栓性内皮細胞により被覆されている。血管内皮細胞が機能的、器質的に傷害を受けると近傍を流れる血小板の集積が始まる。集積する「血小板細胞」のサイズが直径 2-5 μm 程度であるのに比較して、心筋梗塞などの症候を呈する臓器灌流血管の内径は数 mm である。血管内皮傷害の多くは無症候の「血小板細胞」集積にて冠動脈の血流動態に影響をおよぼすことなく収束する。「血小板細胞」の血管内皮損傷部位への集積は、血液中の「血小板細胞」の濃度、赤血球濃度、局所血流、「血小板細胞」の血管壁への接着力とその時間発現などにより受動的に決定される。その接着メカニズムの構成論的理解を目指す。

「血小板細胞」は核のない直径 2-5 μm の小さな細胞である。しかし、ミトコンドリア、ゴルジ体、小胞体などの細胞内小器官を備え、エネルギー代謝の活力は高い。また、細胞外からの刺激に応じる多数の活性化受容体と複雑な細胞内活性化シグナル経路を有する。RNA を用いた蛋白産生機能を有するが、核がないため新規の蛋白産生は最小限である。「血小板細胞」が活性化すると、細胞内に蓄積した ADP、セロトニン、CD40 ligand、フィブリノーゲン、von Willebrand 因子など細胞周囲の血管収縮、炎症、血栓形成に寄与する生理活性物質を局所放出する。また、RANTAS などのケモカインを放出し、P-selectin など炎症性細胞に対する接着蛋白が細胞表面に移動する。これらの生理活性物質の局所放出を介して炎症細胞、血管内皮細胞などの調節に寄与する。「血小板細胞」が活性化すると細胞膜の脂質構成が変化して、細胞表面にフォスファチジルセリンなどの陰性荷電したリン脂質を発現する。その周

囲には、血液凝固因子が集積する。活性化した「血小板細胞」の表面では血液凝固反応が効率化してフィブリン産生が起こる。これら「血小板細胞」による血管収縮、炎症、凝固系の調節機構が、動脈硬化巣破綻を無症候にて終わらせるか、症候性の心筋梗塞の発症につなげるか、の規定因子となる。「血小板細胞」反応の一部は抗血小板薬により制御可能である。それゆえ一部の症例の心筋梗塞の発症は抗血小板薬により予防される。症候性の血栓症発症に寄与する因子が十分に解明されていないため、抗血小板薬による心筋梗塞の発症予防も不十分である。

冠動脈内の動脈硬化巣破綻部位への「血小板細胞」の接着、集積プロセスは物理現象として構成論的に理解できる。接着、集積した「血小板細胞」の活性化機転、周囲の血管収縮、炎症、凝固系活性化制御のメカニズムを分子スケールから構成論的に理解できれば、「血小板細胞」構成分子の機能制御から「血小板細胞」機能制御を介した心筋梗塞発症制御理論を構成できる可能性がある。

2. 研究の目的

冠動脈内動脈硬化巣破綻後の閉塞血栓にて心筋梗塞が惹起される。動脈硬化巣破綻部位には「血小板細胞」が集積する。しかし、「血小板細胞」集積とフィブリン形成の同時進行による、症候性の閉塞血栓形成に寄与する因子の全てが解明されているわけではない。「血小板細胞」濃度、それを規定する赤血球細胞数と容積、血流条件下での赤血球の血流中心部への集積、血栓周囲の局所の血流、動脈硬化巣破綻の形態、血流に曝露される血栓性マトリックスの種類、曝露面積、などの寄与が定性的には想定されるが、血栓の成長速度に及ぼす各因子の定量的寄与は未知である。近年のコンピューターの高速化と情報工学の進歩により、シミュレーションにより血栓形成速度を規定各因子の定量的評価が可能となった。流体力学、移流拡散などの基礎方程式により作成した血栓シミュレーターの定数項に、精緻な定量的生物学的実験結果に基づく値を入れ込み基本シミュレーターを作成する。「血小板細胞」を軸として、「心筋梗塞発症メカニズムの構成論的理解と制御」の定量的理解を目指す。

3. 研究の方法

心筋梗塞などの血栓性疾患の発症に寄与する「血小板細胞」の生理機能を接着、活性化などの現象に分割し、各々現象を数理モデル化する。基本原則となる数理モデルを方程式化し、方程式を解くことにより「血小板細胞」の各種機能の構成論的理解を行う。

(1) 血小板細胞接着の構成論的理解と制御

大きく重い赤血球は血流の中心を流れる。血小板細胞は赤血球よりも小さく軽いため血管壁近傍を流れる。赤血球存在下の血小板

の流動については別プロジェクトにて大規模計算を行っている。本研究では、赤血球が作り出す血管壁に向う速度ベクトルは任意とした。Navier-Stokes の式を差分法により解いた。血管壁損傷部位に接着した血小板細胞の接着力と、血小板細胞の受ける流体力が釣り合うとした。

コンピューターモデル計算の妥当性を評価するためにヒト血液を flow chamber を用いて固相化した von Willebrand 因子 (VWF) 上に灌流した。単位時間の血小板細胞接着数を指標としてコンピューターモデルを精緻化した。

(2) 血小板細胞活性化モデル

実証的実験によりオルガネラの局在情報を得た。RiCS に組み込んで血小板細胞とした。ボクセル間では物質の拡散、透過、チャンネル輸送などの機能を実装した。実際の血小板細胞のオルガネラとしてミトコンドリア、ゴルジ体、小胞体を血小板モデルに実装した。ボクセルモデルを用いたため場を考慮したシミュレーションが可能である。血流により運搬された血小板細胞は VWF と相互作用して局所的に活性化が開始するとした。血小板細胞中心部にはミトコンドリアが存在するため、細胞中心部では ATP の産生が過剰、血小板細胞膜直下ではリン酸化を伴う活性化シグナルが開始するので、細胞膜直下では ATP 消費が過剰として、ATP の産生、消費が細胞内にて釣り合うモデルとした。

(3) 活性化血小板細胞上における凝固系活性化

血小板細胞が活性化すると細胞膜のリン脂質の組成が変化する。陰性荷電したリン脂質が細胞外に曝露されると活性化した凝固因子が集積してプロトロンビナーゼ複合体が形成される。プロトロンビナーゼ複合体の形成を、局所的に起こるトロンビン産生速度の増加にて表現した。血小板細胞膜上にて産生されたトロンビンは、フィブリンノーゲンをフィブリンに転換するとともに、血小板細胞上のトロンビン受容体 PAR-1 刺激を介して血小板細胞の継続的活性化に寄与するモデルとした。

(4) 血小板細胞と近傍の流体の連成

血小板細胞が活性化すると濃染顆粒、顆粒などに蓄積された各種生理活性物質を局所放出する。放出された物質は細胞が血流に曝露されていない場合には単純に拡散し、細胞が血流に曝露されている場合には拡散と粘性流動を組み合わせた移流拡散として細胞からの生理活性物質の局所放出と、放出された物質による周囲の血小板活性化への影響を定量予測するモデルを作成した。

(5) 血小板細胞を構成する分子から血小板

細胞機能の構成論的理解

流動条件下における血小板細胞の接着は血小板膜糖蛋白 Glycoprotein (GP) I β と von Willebrand 因子 (VWF) の結合のみにより仲介されることを過去の実証的研究により明らかにしてきた。血小板細胞の接着という生物現象は GPI β と VWF の分子スケールの結合動態により構成論的理解が可能である。GPI β と結合する VWF および周囲の水分子を構成する 18 万程度の原子について、その物理的相互作用を力 (Force: F) = 質量 (Mass: M) x 加速度 (Acceleration: A) のニュートンの運動方程式を解くことにより予測計算した。コンピューターとして、外部の高速スパコンとして東京大学の FX-10 を用いた。自らの研究室に有する 8 ノードコンピューターラック、およびマックプロも用いた。

力場としては化学結合など距離の近い原子間相互作用には量子力学計算を行い、その結果を原子間の屈曲、回転可能なバネで表現する CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) 力場を用いた。化学結合していない原子間相互作用は古典力学を解いた。ソフトウェアとして NAMD (Nanoscale Molecular Dynamics) ソフトウェアパッケージを用いた。Wild type GPI β と VWF の接着構造、接着力、接着エネルギー構造算出後、GPI β 内の G233V 変異体、G233A 変異体、VWF の G561A, C509R などの高次構造予測計算を行った。

4. 研究成果

(1) 血小板細胞接着の構成論的理解と制御

赤血球と混在する血小板細胞の血管内における運動の解析には大規模計算が必須である。実証的生物学実験において、血管壁に塗布する VWF 量、血流を一定として、赤血球数を変化させたときの単位時間当たりの血

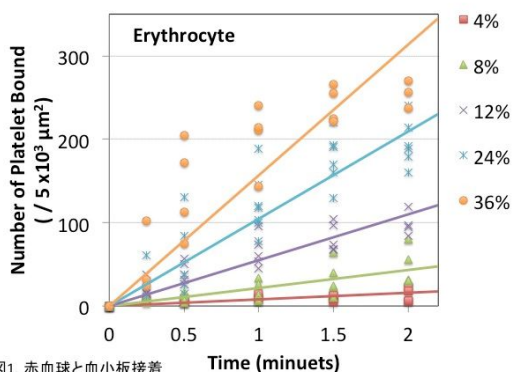


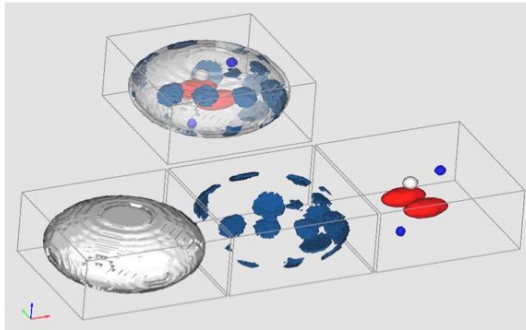
図1. 赤血球と血小板接着

血小板細胞接着数を計測した。図 1 に示すように、赤血球数が減少すると単位時間当たりの血小板細胞接着数は減少した。この定量関係を妥当性の根拠とした大規模計算プログラムを作成した。大規模計算と実証研究を連成した成果の論文を作成し、投稿雑誌を選択している段階である。

(2) 血小板細胞活性化モデル

実証的実験により血小板細胞内のミトコンドリア、ゴルジ体、小胞体、濃染顆粒を RiCS

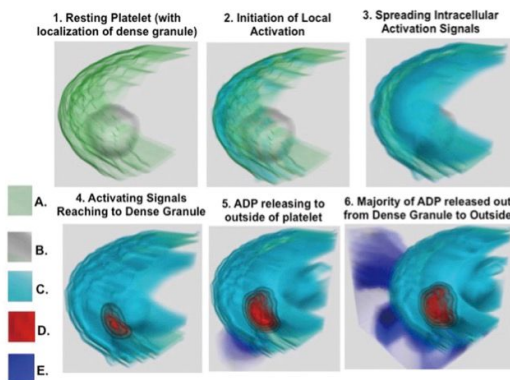
に配置した。血小板細胞膜上に GPIIb/IIIa は均質に配置されており、GPIb α は局在している。この膜蛋白の分布もモデルに組み込んだ(図2)。血小板膜上の GPIb α が VWF と結合して局所的に活性化刺激を受けた時の細胞内の活性化シグナル伝達、濃染顆粒へのシグ



[血小板モデル]
細胞膜 | GPIIb | 細胞内オルガネラ

図2. RICS上に表現した血小板細胞。

ナルの到着、到着したシグナルによる濃染顆粒からの生理活性化物質の局所放出をシミュレーション予測計算した(図3)。図2では



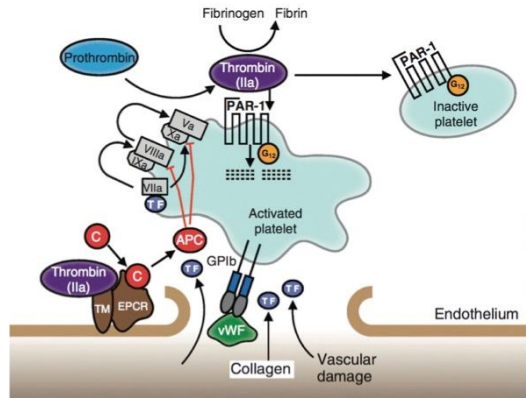
(Goto S, et al. Circ J, 2015)

図3. 血小板細胞が局所刺激されたときの細胞内シグナル伝達と濃染顆粒からの放出

計算資源節約のため、血小板細胞を半切して計算している。

(3) 活性化血小板細胞上における凝固系活性化

血小板と凝固系の連成モデルに図4を用いた。血流速度、血小板活性化速度、活性化血小板によるトロンビン産生速度、トロンビンによるフィブリン産生速度などをパラメータとして任意に設定できるモデルとした。当初



Goto S. Clin Cardiol 2014

図4. 血小板と凝固系を連成するモデル

の計画は血小板と凝固系の連成モデルであったが、線溶系も組み込み、血小板、凝固系、線溶系の連成モデルとした。パラメータを初期値の20%から200%まで変化させ、血栓のサイズに及ぼす血流の重要性を示した。成果を第40回日本バイオレオロジー学会年会にて発表した。同会にて本研究代表者のグループが「シミュレーションによる血栓止血システムの構成論的理解」の題名にて学術症例賞を受けた。論文は Journal of Biorheology に投稿済みである。

(4) 血小板細胞と近傍の流体の連成

RICS から作成した血小板細胞モデルと細胞周囲の流体を連成計算した。血小板細胞を流れの方向に対して自由に配置できる。図5のように流れの上流から下流に配置した時の流速分布を計算した。血小板細胞が活性化す

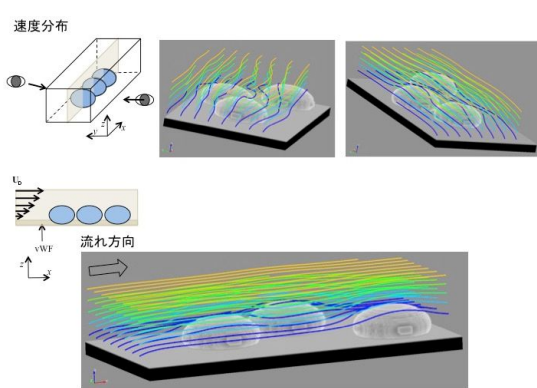


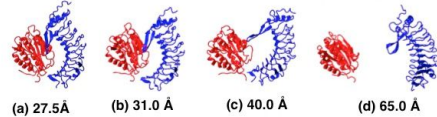
図5. 血小板細胞と周囲の流体の連成計算

ると ADP などが濃染顆粒から局所放出される。放出された ADP の拡散、移流拡散を計算した。血液の粘性条件では移流の効果が大きいことを示した。

(5) 血小板細胞を構成する分子から血小板細胞機能の構成論的理解

血小板細胞の血管壁への接着は GPIb α と von Willebrand 因子 (VWF) の結合により仲

A. VWFとGPIb α の重心間距離に応じた両分子の立体構造のスナップショット



B. GPIb α とvon Willebrand因子の重心間距離とPotential of Mean Forceの関係

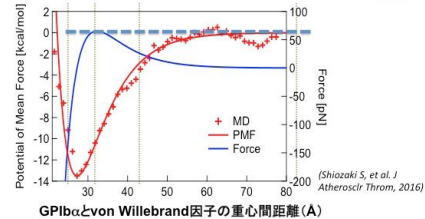


図6. 単一GPIb α とVWFの結合構造および結合力のQM/MM法による予測計算

介される。両分子を構成する水分子を含む全ての原子間の相互作用を高速スーパーコンピュータ「京」および東京大学のFX-10にて計算し、高次構造予測を行った。両分子の重心間距離を0.5Å毎に変化させてPotential of Mean Force を算出した。PFM から両分子

の接着力を予測計算した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 25 件)

1. Shiozaki S, Takagi S, and Goto S. Prediction of Molecular Interaction between Platelet Glycoprotein Iba and von Willebrand Factor using Molecular Dynamics Simulations. **J Atheroscler Thromb** 23, 455-464 (2016) ・査読あり
2. Bonaca MP, 21 名の著者の 8 番目, Ischaemic risk and efficacy of ticagrelor in relation to time from P2Y12 inhibitor withdrawal in patients with prior myocardial infarction: insights from PEGASUS-TIMI 54. **Eur Heart J** 37(14):1133-42.2016 ・査読あり
3. Goto S, 他 4 名. Ticagrelor versus Clopidogrel in Japanese, Korean and Taiwanese Patients with Acute Coronary Syndrome: The Randomized, Double-blind, Phase III PHILO Study. **Circ J**, ; 79: 2452-2460 (2015) ・査読あり
4. Bonaca MP, 25 名中 17 番目 PEGASUS-TIMI 54 Steering Committee and Investigators. Long-Term Use of Ticagrelor in Patients with Prior Myocardial Infarction. **N Engl J Med**, 372:1791-1800 (2015) ・査読あり
5. Tomimatsu H, Nishibuchi Y, Sudo R, Goto S and Tanishita K. Adhesive force between A1 domain of von Willebrand Factor and N-terminus domain of Glycoprotein Iba measured by AFM. **J Arterioscler Thromb**, 22(10):1091-9. (2015) ・査読あり
6. Lip GYH, 20 名中 6 番目: Does Sex Affect Anticoagulant Use for Stroke Prevention in Nonvalvular Atrial Fibrillation? **Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes**, 8(2 Suppl 1):S12-20, (2015) ・査読あり
7. Tomita A, 5 名中 5 番目. Development of Virtual Platelet Implementing the Function of Three Platelet Membrane Proteins with Different Adhesive Characteristics. **J Atheroscler Thromb**.: 22(2):201-10(2015)査読あり
8. Goto S and Goto S. Selection of a suitable patient population for new antiplatelet therapy from the large clinical trial database of the thrombin receptor antagonist in secondary prevention of atherothrombotic ischemic events-thrombolysis in myocardial infarction 50 trial. **Circulation** 131, 1041-1043 (2015). ・査読あり
9. Goto, S. and Goto S. A novel approach indirectly comparing benefit: risk across oral antithrombotic therapies in patients with atrial fibrillation. Are the evidences of current dose-adjusted anticoagulation with warfarin stroke prevention for patients with atrial fibrillation sufficient enough to compare with newly developed non-vitamin K oral anticoagulants? **Eur Heart J- Cardiovascular Pharmacotherapy** 1, 83-85, 2015 ・査読あり
10. Potier L, Roussel R, Labreuche J, Marre M, Cacoub P, Röther J, Wilson PW, Goto S, Bhatt DL, Steg PG. Interaction between diabetes and a high ankle-brachial index on mortality risk. **Eur J Prev Cardiol**. 22, 615-621 (2015) ・査読あり
11. Udell JA, 11 名中 5 番目: Metabolic syndrome, diabetes mellitus, or both and cardiovascular risk in outpatients with or at risk for atherothrombosis. **Eur J Prev Cardiol**. 21(12): 1531-40, (2014) ・査読あり
12. Levine GN, 8 名中 3 番目. World Heart Federation expert consensus statement on antiplatelet therapy in East Asian patients with ACS or undergoing PCI. **Nature Review Cardiology** 11: 597-606, 2014 ・査読あり
13. Goto S, 15 名中 1 番目. Efficacy and Safety of Apixaban Compared with Warfarin for Stroke Prevention in Patients with Atrial Fibrillation from East Asia: A Sub-Analysis of the Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation (ARISTOTLE) Trial. **Am Heart J**, 168: 303-9, 2014 査読あり
14. Sorbets E, 11 名中 7 番目 . Renin-Angiotensin System Antagonists and clinical outcomes in stable coronary artery disease without heart failure. **European Heart Journal** 35: 1760-8, 2014 ・査読あり
15. Matsumoto M, 13 名中 6 番目 J-ROCKET AF Study Investigators. Rivaroxaban versus warfarin in Japanese patients with non-valvular atrial fibrillation in relation to hypertension: a subgroup analysis of the J-ROCKET AF trial. **Hypertens Res**. 37(5):457-62, 2014 ・査読あり

16. Bonaca MP, 9名中5番目. New ischemic stroke and outcomes with vorapaxar versus placebo: results from the TRA 2 °P-TIMI 50 trial. **J Am Coll Cardiol.** 264(22):2318-26, 2014・査読あり
17. Baghai M, 9名中8番目. Platelet repellent properties of hydrogel coatings on polyurethane-coated glass surfaces. **ASAIO J.** 201460(5):587-93, 2014・査読あり
18. Ruff CR, 10名中最後. Long-term cardiovascular outcomes in patients with atrial fibrillation and atherothrombosis in the REACH Registry. **Int J Cardiol.** 170(3):413-8, 2014・査読あり
19. Uchiyama S, 13名中6番目. Net clinical benefit of rivaroxaban versus warfarin in Japanese patients with nonvalvular atrial fibrillation: a subgroup analysis of J-ROCKET AF. **J Stroke Cerebrovasc Dis.** 23(5):1142-7, 2014・査読あり
20. Goto S, Tomita A. New Antithrombotics for Secondary Prevention of Acute Coronary Syndrome. **Clin Cardiol.** 37(3):178-87, 2014・査読あり
21. Kohli P, 13名中12番目; REACH Registry Investigators. NSAID Use and Association with Cardiovascular Outcomes in Outpatients with Stable Atherothrombotic Disease. **Am J Med.** 127(1):53-60, 2014・査読あり
22. Hori M, 13名中6番目; J-ROCKET AF Study Investigators. Rivaroxaban versus warfarin in Japanese patients with nonvalvular atrial fibrillation in relation to the CHADS2 score: a subgroup analysis of the J-ROCKET AF trial. **J Stroke Cerebrovasc Dis.** 23(2):379-83 (2014)・査読あり
23. Ducrocq G, 10名中6番目. A History of Stroke/Transient Ischemic Attack Indicates High Risks of Cardiovascular Event and Hemorrhagic Stroke in Patients with Coronary Artery Disease. **Circulation.** 127(6):730-85 (2013)・査読あり
24. Goto S, Tomita A. High on-treatment platelet reactivity (HPR): what does it mean, and does it matter? **Thromb Haemost.** 109(2):177-8, 2013・査読あり
25. Bangalore S, 12名中6番目. L.β-Blocker Use and Clinical Outcomes in Stable Outpatients With and Without Coronary Artery Disease. **JAMA** 308 (13): 1340-1349, 2012・査読あり

〔学会発表〕(計7件)

1. Goto S. Application of High

- Performance Computer Technology for Cardiology. 77th Italian Society of Cardiology, Rome, Italy (12/2016)
2. 後藤信哉. 血栓形成メカニズムに基づいた抗血栓薬の選択. 第114回日本内科学会総会・講演会 東京・国際フォーラム、(04/2017)
3. Goto S. Potential Impact of Blood Flow on Thrombus Formation in Normal and Aneurysmal Arteries. 13th International IntraCranial Stent meeting, Kobe, ・Kobe International Hall, Japan (11/2016)
4. Goto S. Systems of Care and Challenges to the Treatment of ST Elevation Myocardial Infarction in Japan. The American College of Cardiology.16, Chicago, McMick Place USA (04/2016)
5. Goto S. Application of high performance computer technology to the area of cardiovascular research. 80th Japanese Circulation Society, Sendai, Sendai International Hall, Japan (03/2016)
6. 後藤信哉. 個別化・予防医療での新たなパラダイムの創出-健康ビッグデータとスーパーコンピューターがもたらすもの. 第38回日本分子生物学会ワークショップ、神戸・神戸国際会議場(12/2015)
7. Goto S. Risk of Thrombosis in Japanese Patients as Compared to Other Regions of the world. The 79th Japanese Circulation Society, Osaka, Japan (04/2015)

〔図書〕(計2件)

1. Goto S. Vascular Engineering of Blood Coagulation. In Tanishita K and Yamamoto K (eds) Vascular Engineering 2016 (Springer): 211-219, (2016)
2. 後藤信哉: ここが知りたい・理屈がわかる抗凝固、抗血小板療法. 中外医学社(東京)全144ページ, 2016年

〔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

6. 研究組織
- (1)研究代表者
後藤 信哉 (GOTO, Shinya)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 50225653