

氏名 (本籍)	辻 本 真 範 (岐阜県)
学位の種類	博 士 (医学)
学位授与番号	甲第 1023 号
学位授与日付	平成 28 年 3 月 25 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Factor Xa inhibitor suppresses the release of phosphorylated HSP27 from collagen-stimulated human platelets: inhibition of HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAP kinase
審査委員	(主査) 教授 深 尾 敏 幸 (副査) 教授 山 本 哲 也 教授 柴 田 敏 之

### 論文内容の要旨

活性化第 X 因子 (FXa) 阻害薬はワルファリンに替わる新たな経口抗凝固薬として注目されている。生体内の血栓形成において血小板の粘着および凝集は最初のステップであり、その後凝固系の因子が活性化され血栓は形成される。血小板の活性化に伴い、FXa はプロトロンビンを活性化し、トロンビンが生成される。トロンビンはフィブリノーゲンを活性化し最終的にフィブリン血栓の形成に至る。FXa 阻害薬の血小板へ及ぼす影響に関して、FXa 阻害薬は組織因子刺激による血小板凝集を低下させるが、コラーゲン刺激による血小板凝集には影響しないと報告されている。しかし、血小板機能に対する FXa 阻害薬の直接作用の詳細は未だ明らかとされていない。

血管内皮の障害が起こると内皮下に存在するコラーゲンが露出し、血小板細胞膜上に存在する Glycoprotein VI およびインテグリン  $\alpha 2 \beta 1$  を介して血小板の 1 次凝集が惹起される。私共は先行研究にてコラーゲン刺激による血小板の活性化において p44/p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase を介する heat shock protein (HSP) 27 のリン酸化が血小板顆粒からの platelet-derived growth factor (PDGF)-AB の分泌に促進的に作用していることを報告している。さらに、血小板内の HSP27 のリン酸化に伴い、リン酸化 HSP27 が血小板外へ遊離されることを報告した。本研究ではコラーゲン刺激による血小板の活性化に対する FXa 阻害薬の直接作用の詳細を明らかとすることを目的とし、以下の研究を行った。

#### 【対象と方法】

健常者から安静空腹時に静脈血を採取し、遠心分離法により多血小板血漿 (PRP) を調整した。PRP を FXa 阻害薬 (rivaroxaban および edoxaban) にて前処置をした後にコラーゲンで刺激し、光透過法およびレーザー光散乱システムを用いて血小板凝集能を測定した。コラーゲン刺激後の血小板を可溶化し、ウェスタンブロット法にて p44/p42 MAP kinase および HSP27 のリン酸化レベルを解析した。また、コラーゲン刺激による血小板からの PDGF-AB の分泌、リン酸化 HSP27 の遊離を ELISA 法にて測定した。

さらに、心房細動もしくは深部静脈血栓症患者 5 名を対象に rivaroxaban 投与前後においてコラーゲン刺激による血小板凝集能を測定し、加えて血小板を可溶化後、ウェスタンブロット法にて HSP27 のリン酸化レベルを解析した。

## 【結果】

- 1) 健常者血小板において、rivaroxaban は光透過法、レーザー光散乱法いずれにおいても血小板凝集能には何ら影響しなかった。rivaroxaban および edoxaban は用量依存性 (0, 500, 1000 ng/ml) にコラーゲン刺激による p44/p42 MAP kinase のリン酸化および HSP27 のリン酸化を有意に抑制した。rivaroxaban および edoxaban はコラーゲン刺激による p38 MAP kinase のリン酸化に何ら影響しなかった。rivaroxaban はコラーゲン刺激による PDGF-AB の分泌には何ら影響しなかった。rivaroxaban はコラーゲン刺激によるリン酸化 HSP27 の遊離を有意に抑制した。
- 2) 患者血小板において、rivaroxaban 投与後のコラーゲン刺激による血小板凝集能は投与前と比し何ら変化がなかったが、HSP27 のリン酸化は抑制された。

## 【考察】

rivaroxaban は血小板凝集に対して光透過法、レーザー光散乱法いずれにも影響しないことを確認した。rivaroxaban および edoxaban はコラーゲン刺激による p44/p42 MAP kinase および HSP27 のリン酸化およびその遊離を抑制したが、p38 MAP kinase のリン酸化には何ら影響を与えなかった。また、rivaroxaban はコラーゲン刺激による血小板からの PDGF-AB の分泌には何ら影響しなかった。以上の結果から FXa 阻害薬は選択的にコラーゲン刺激における p44/p42 MAP kinase を介してリン酸化 HSP27 の遊離を抑制する可能性が示唆された。また、実際に rivaroxaban を内服している患者の投与前後においてコラーゲン刺激による血小板凝集能は変化がなかったが、HSP27 のリン酸化は抑制されていることを明らかとした。本研究では、これまで明らかとなっていなかったコラーゲン刺激による血小板活性化に FXa 阻害薬が直接影響を及ぼすことを明らかとした。細胞外 HSP は炎症に関与することが報告されており、FXa 阻害薬は活性化血小板からの HSP 遊離を抑制することで炎症を modulate する可能性が示唆された。

## 【結論】

ヒト血小板において、FXa 阻害薬はコラーゲン刺激による p44/p42 MAP kinase を介した HSP27 のリン酸化を阻害し、リン酸化 HSP27 の遊離を抑制する可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 辻本 真範は、活性化第 X 因子 (FXa) 阻害薬がヒト血小板に作用し、p44/p42 MAP kinase を介した HSP27 のリン酸化を抑制し、活性化血小板からのリン酸化 HSP27 の遊離を抑制することを明らかにした。本研究の成果は、抗血栓療法の治療戦略に新たな知見をもたらし、血栓止血学、脳卒中学、脳神経外科学の発展に少なからず寄与するものと認める。

---

### [主論文公表誌]

Masanori Tsujimoto, Gen Kuroyanagi, Rie Matsushima-Nishiwaki, Yuko Kito, Yukiko Enomoto, Hiroki Iida, Shinji Ogura, Takanobu Otsuka, Haruhiko Tokuda, Osamu Kozawa, Toru Iwama : Factor Xa inhibitor suppresses the release of phosphorylated HSP27 from collagen-stimulated human platelets: inhibition of HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAP kinase

PLoS One 11, e0149077 (2016).