

## 論文の内容の要旨

### 新規血小板 GPIIb/IIIa 拮抗薬 FK419 の脳梗塞治療薬としての有効性に関する研究

氏名 森口 聡

脳梗塞の発症要因として脳内の血栓や塞栓あるいは血行力学的障害等が挙げられ、これらが複雑に絡んで脳が虚血状態に陥ると考えられている。薬物治療としては、虚血による脳細胞死を防ぐ脳保護薬と血栓や塞栓の溶解や形成を抑制する抗血栓薬が開発されてきた。抗血栓薬としては米国で recombinant tissue-plasminogen activator(t-PA)が認可されているが、脳出血リスクや発症 3 時間以内の制限で使用は限られている。我国では抗血小板薬 ozagrel, 抗ロロンビン薬 argatroban, 抗血栓溶解薬 urokinase が使用されているが、有効性が限られ新たな薬物の出現が待たれている。

急性期脳梗塞患者で発症後 48 時間迄血小板が活性化していること、抗血小板薬 aspirin が大規模臨床試験で僅かだが有効だったこと、脳梗塞患者剖検脳で梗塞巣周囲に高頻度に微小塞栓が存在し、更には患者の 15-34%で発症後に神経症状が増悪することが報告されている。これらは、血小板活性化が脳梗塞の発症原因の一つであること、またその後の二次血栓形成により更なる循環障害が惹起され、梗塞巣拡大や神経症状悪化等の病態進展が起こることを示唆し、抗血小板薬は急性期脳梗塞治療薬として有用と考えられる。血小板膜糖蛋白 (Glycoprotein: GP)IIb/IIIa は血小板膜表面上に存在し、フィブリンゲン(Fg)受容体として血栓形成過程に関与する。GPIIb/IIIa と Fg の結合が血小板凝集の最終過程の為、GPIIb/IIIa 拮抗薬は血小板刺激経路に関わらない強力な抗血小板薬となる。但し、強い血小板凝集抑制作用に伴い、出血性副作用が強い可能性が危惧されている。近年、in vitro の検討より、血小板の血管壁への接着や初期血栓形成に GPIIb/IIIa と vWF の結合が重要であり、血小板凝集を含む血栓成長に Fg の結合が重要と報告されている。本論文ではヒト精製 GPIIb/IIIa と Fg 及び vWF との結合試験をスクリーニングに組み込み見出した出血性の低い新規 GPIIb/IIIa 拮抗薬 FK419((S)-2-acetylamino-3-[(R)-[1-[3-(piperidin-4-yl)propionyl]piperidin-3-ylcarbonyl]amino]propionic acid trihydrate)の薬理作用を纏めた。

#### 1. 新規血小板GPIIb/IIIa拮抗薬FK419の抗血小板作用プロファイルの特徴

フローセル等の試験で、GPIIb/IIIa のリガンドである Fg とフォンビルブラント因子(vWF)が異なった役割を担っていると報告されている。我々は vWF の結合が出血性に重要と考え、一次にヒト血小板凝集を、二次にヒト精製 GPIIb/IIIa と Fg 及び vWF との結合試験を用いてスクリーニングし、既存の GPIIb/IIIa 拮抗薬に比べ vWF よりも Fg との結合を選択的に阻害する FK419 を見出した。FK419 は既存の GPIIb/IIIa 拮抗薬よりヒト血小板の凝集抑制作用に比べ接着抑制作用が弱かった。イヌ出血時間の検討で、FK419 は既存薬と同等の血小板凝集抑制作用を有するが出血時間延長作用は弱かった。出血時間延長作用と凝集抑制作用の血中濃度比は、GPIIb/IIIa に対する vWF と Fg の結合阻害作用の比に良く相関し、更には in vitro での血小板接着抑制作用と血小板凝集抑制作用の濃度比とも良く相関した。

以上より, Fg と vWF の GPIIb/IIIa との結合に対する阻害作用が分離可能であること, GPIIb/IIIa 拮抗薬の出血時間延長作用は血小板凝集抑制作用と分離可能であることが判明した。血小板凝集は GPIIb/IIIa と Fg の反応なので, 出血時間延長作用の程度は GPIIb/IIIa への vWF の結合を阻害する程度に関連しており, vWF を介する血小板の接着が初期の止血機構にとって重要であることが in vivo で始めて示唆された。

表 1 各種 GPIIb/IIIa 拮抗薬のリガンド選択性

	Fibrinogen(Fg) IC50 (nM)	vWF(vWF) IC50 (nM)	Ratio vWF/Fg
FK419	53±2.7	3.2±0.34	0.06
FK633	200±14	2.8±0.49	0.014
Xemilofiban	45±0.2	0.87±0.15	0.019
Lamifiban	20±4.9	0.76±0.06	0.038
Tirofiban	26±0.2	0.73±0.30	0.028
FR184764	34±3.6	0.68±0.14	0.02
FR233229	9.5±0.6	0.47±0.07	0.049
FR231643	24±2.8	1.2±1.3	0.05

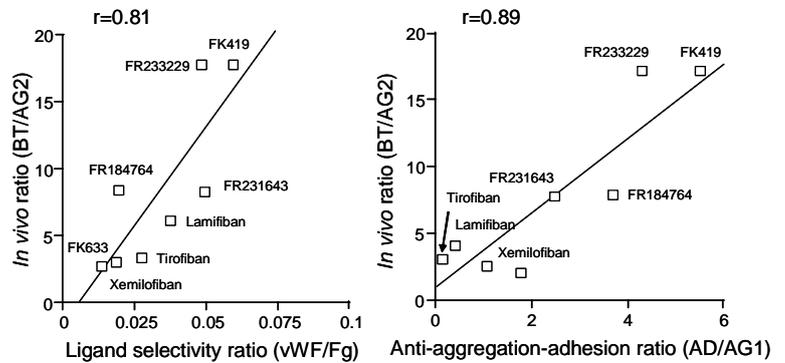
表 2 各種 GPIIb/IIIa 拮抗薬の血小板凝集抑制作用と接着抑制作用

	ADP-induced Aggregation (AG1) IC50 (nM)	vWF-mediated adhesion (AD) IC50 (nM)	Ratio (AD)/(AG1)
FK419	53±8.3	219±12	5.5
FK633	103±5.3	190±23	1.8
Xemilofiban	26±7.8	29±6.1	1.1
Lamifiban	45±3.0	20±1.6	0.44
Tirofiban	46±7.6	6.7±2.2	0.15
FR184764	43±5.3	157±10	3.7
FR233229	21±1.1	92±14	4.3
FR231643	37±2.5	94±6.2	2.5

表 3 鼠における凝集抑制作用及び出血時間延長作用

	ADP-induced Aggregation (AG2) IC50 (ng/mL)	Bleeding time (BT) BT2.5 (ng/mL)	Ratio (BT)/(AG2)
FK419	46±4.0	770±20	17
FK633	108±23	238±16	2.2
Xemilofiban	16±0.2	43±1.6	2.7
Lamifiban	50±5.4	212±5.7	4.2
Tirofiban	57±1.0	184±5.8	3.2
FR184764	33±1.0	260±8.0	7.9
FR233229	2.8±0.51	47±3.0	17
FR231643	31±3.0	244±12	7.8

図 1 リガンド選択性, 血小板接着抑制作用と出血性との相関

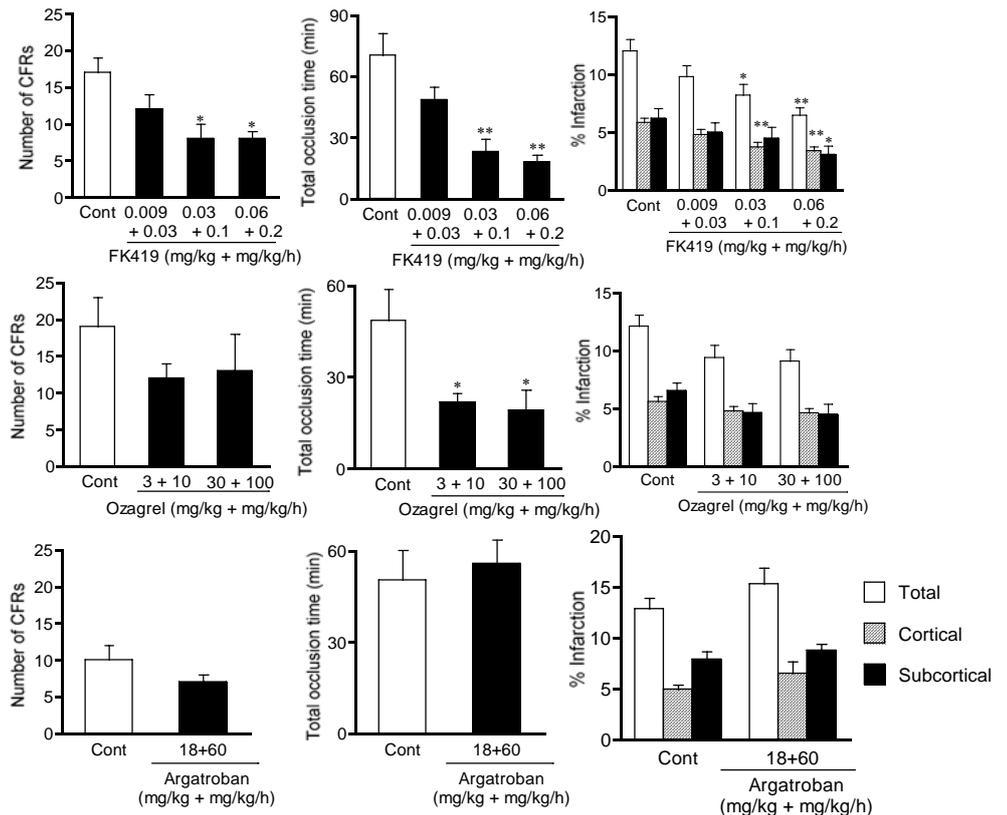


## 2. モルモット血栓性脳梗塞モデルにおける FK419 の二次血栓形成抑制作用及び脳障害改善作用

光感受性色素のローズベンガルを投与しつつモルモット中大脳動脈(MCA)に緑色光を照射すると, 発生したラジカルで内皮損傷が起こり損傷部位に血栓を形成できる。照射強度で血栓の性質が変わり, 本研究では二次血栓形成抑制作用を検討する為, 軽度の照射条件で閉塞後早期に自然再開通し, 以後閉塞再開通を一定時間繰り返す (cyclical flow reductions: CFRs) 条件とした。薬物は初期血栓形成に影響せず, 臨床に近い閉塞後投与とした。FK419 は CFRs 回数と総血管閉塞時間を減少した。一方, ozagrel は総血管閉塞時間のみ短縮し, argatroban は何ら改善しなかった。FK419 は 24 時間後の脳梗塞巣及び神経症状も改善したが, ozagrel 及び argatroban は改善しなかった。脳傷害巣の大きさは総血

管閉塞回数 (Number of CFRs) を減少させた。一方, ozagrel は総血管閉塞時間のみ短縮し, argatroban は何ら改善しなかった。FK419 は 24 時間後の脳梗塞巣及び神経症状も改善したが, ozagrel 及び argatroban は改善しなかった。脳傷害巣の大きさは総血

図 2 モルモット血栓性脳梗塞モデルにおける有効性



管閉塞時間との相関が高く、CFRs 回数とも相関した。

以上より、二次血栓形成が脳傷害巣形成に関与しており、FK419 は二次血栓形成を抑制することにより脳傷害を改善することが示唆された。GPIIb/IIIa 拮抗薬の閉塞前投与での有効性は報告されていたが、本試験で閉塞後投与でも有効であることが判明した。

### 3. モルモット血栓性脳梗塞モデルにおける FK419 の血栓溶解作用及び溶解後の微小循環障害改善作用

第二章で FK419 は初回再開通時間の短縮傾向、即ち血栓溶解作用を有する可能性を示した。そこで本検討では FK419 の血栓溶解作用を、光照射を強くして閉塞性の MCA 血栓を作成する条件で検討した。In vitro の検討で FK419 と tirofiban は血小板凝集抑制作用に加え凝集血小板解離作用を示した。モルモット脳梗塞モデルで、FK419 及び tirofiban は用量依存的に初回再開通時間を短縮した。FK419 は脳傷害巣も用量依存的に縮小し、神経症状も改善したが、tirofiban は明らかな作用を示さなかった。FK419 と tirofiban の差を解明する為、虚血中心部の線条体局所脳血流量(rCBF)を測定した。MCA 閉塞で何れの動物も速やかに rCBF は消失した。対照群では MCA 血流の自然再開通後 rCBF が回復する動物としない動物がいた。FK419 投与で MCA 血栓は早期に溶解し、rCBF は虚血前のレベルに回復した。Tirofiban 投与でも MCA 血栓は早期に溶解したが、rCBF は回復しなかった。In vitro の追加検討で FK419 はコラーゲンピースへの血小板及び好中球の接着を抑制したが、tirofiban のその作用は弱かった。

T-PA は血栓を溶解するものの、aspirin, ozagrel, argatroban 及び heparin は全く無効な本モデルで、GPIIb/IIIa 拮抗薬は血栓溶解作用を示すことが明らかになった。凝集血小板解離作用の無い aspirin 及び ozagrel は血栓溶解作用を示さないことより、血栓溶解作用には同作用が寄与している可能性が示唆された。また、本モデルでは MCA 閉塞再灌流後に no reflow 現象と言われる微小循環障害が発生しており、FK419 は MCA 本幹部の血栓を溶解するだけでなく、微小循環障害も改善することにより脳障害を改善することが明らかになった。この作用には FK419 の血小板接着抑制作用及び好中球接着抑制作用が関与している可能性が示唆された。

図 3 FK419 及び tirofiban の in vitro プロファイル

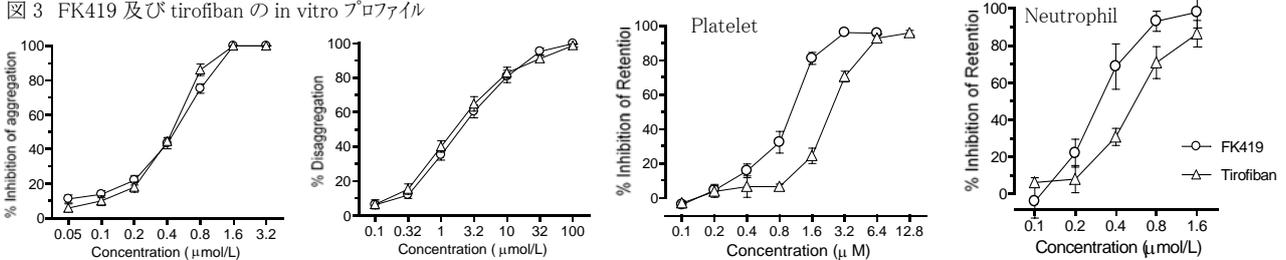


図 4 モルモット血栓性脳梗塞モデルにおける有効性

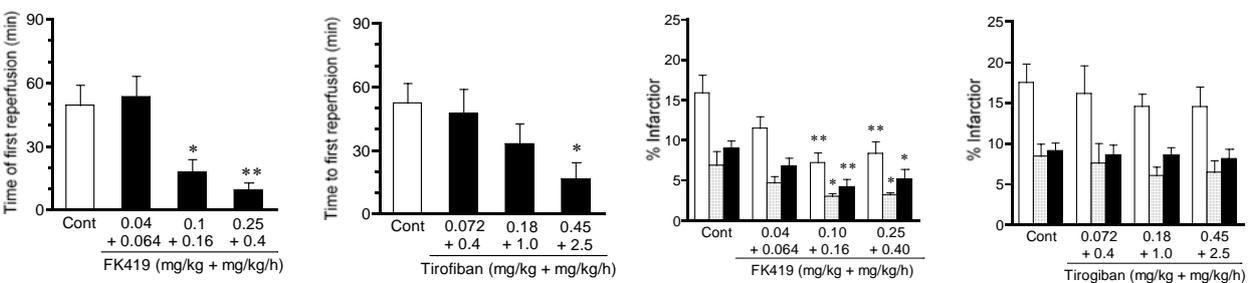
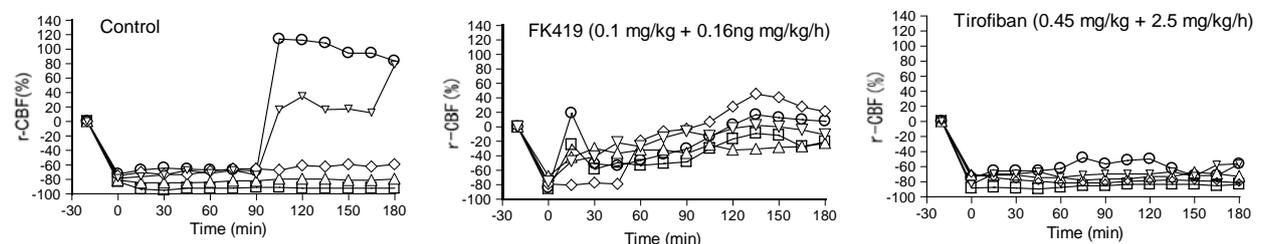


図 5 虚血中心部位の線条体局所脳血流量の変化(個々の動物の変化)



#### 4. リスサル血栓性脳梗塞モデルにおける FK419 の血栓溶解作用及び脳障害改善作用

臨床での有効性をより正確に予測する為にはヒトに近い動物を用いて評価することが重要である。我々は、モルモットの実験技術を応用してリスサルで血栓性 MCA 閉塞脳梗塞モデルを確立し、米国で承認されている t-PA と比較検討した。白質/灰白質の割合等ヒトの脳構造と類似点の多いリスサルを用いた本モデルでは、覚醒状態、手足の麻痺、歩行異常等の運動障害といったヒトの症状に類似した項目が観察できた。また、梗塞範囲として外側溝周辺の大脳皮質、基底核及び内包が広範に傷害され、脳梗塞好発部位である中大脳動脈系閉塞患者を想定した評価系が確立できた。FK419 は用量依存性に血栓を溶解し、神経症状を改善し、脳梗塞巣を縮小した。T-PA は血栓を溶解し、脳梗塞巣を縮小したが、神経症状は改善傾向を示す動物と悪化を示す動物に分かれた。組織学的な観察で、t-PA 投与動物脳には微小出血像が観察された。In vitro の検討で、FK419 は血小板凝集を抑制するだけでなく、凝集惹起後に添加した場合凝集血小板塊を解離させた。

以上より、FK419 はリスサル脳梗塞モデルにおいて t-PA と同様に閉塞血栓溶解作用を示し、脳障害を改善することが明らかとなった。

図 6 リスサル血栓性脳梗塞モデルにおける有効性

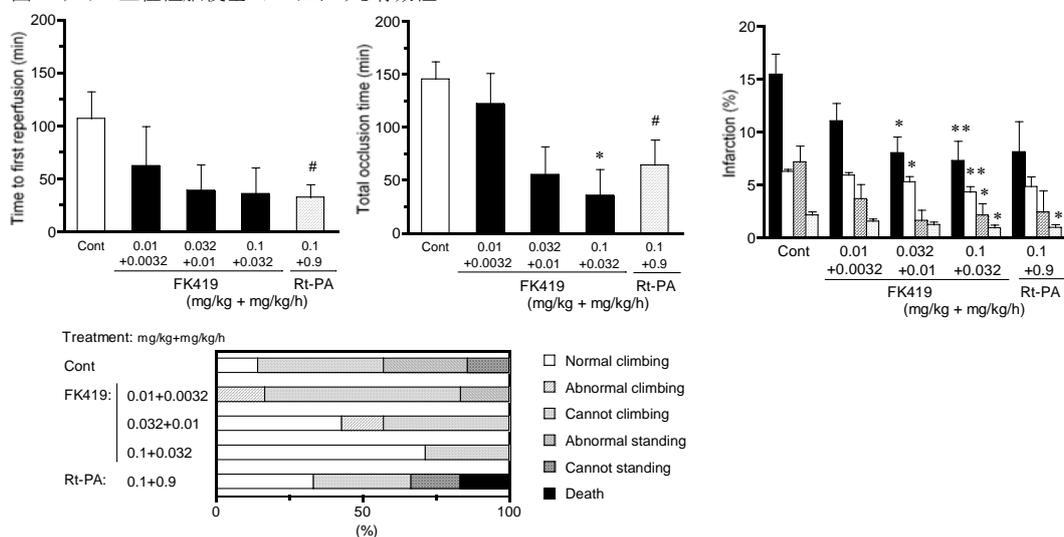
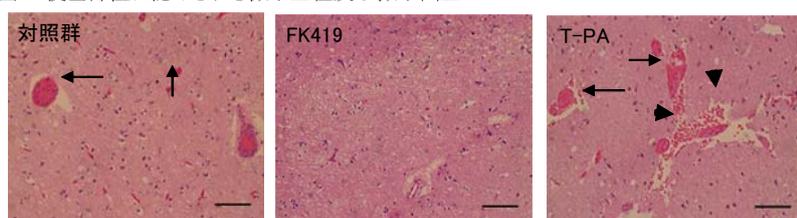


図 7 梗塞部位に認められる微小血栓及び微小出血



#### 結論

- ✓ GPIIb/IIIa とそのリガンドである Fg 及び vWF の結合を選択的に阻害可能であること、両阻害作用と出血性との相関が認められること、新規 GPIIb/IIIa 拮抗薬 FK419 はそのリガンド選択的な阻害作用により出血性副作用と分離した血小板凝集抑制作用を持つことが判明した。
- ✓ FK419 は脳虚血病態の進展に重要な役割を果している二次血栓形成を抑制するだけでなく、一次血栓を溶解し、更には脳虚血後に発生する微小循環障害も改善することが判明した。これらの作用には凝集血小板解離作用や血小板及び好中球接着抑制作用が関与している可能性が示唆された。
- ✓ FK419 の血栓性脳梗塞モデルでの有効性はモルモットだけでなくリスサルでも同様に発揮されることが判明した。

以上より、脳虚血病態の形成には、初期血栓だけでなく、二次血栓や微小循環障害も重要であり、これらに有効な新規 GPIIb/IIIa 拮抗薬 FK419 は t-PA と並ぶ脳梗塞急性期治療薬になりうる可能性が示唆された。