

東海大学大学院令和元年度博士論文

コンピューターシミュレーターを用いた
直接トロンビン阻害薬と Xa 阻害薬の
薬効の差異の予測

指導 後藤 信哉 教授

東海大学大学院医学研究科
先端医科学専攻

綾部 健吾

この学位申請論文は、Thrombosis Research に掲載された主要公刊論文を基に作成された。Thrombosis Research に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ[電子書庫システム]で公開することの承諾を得ている。

1. 総括

日本は超高齢化社会を迎える。心房細動の有病率は増加する。また、血管の老化による動脈硬化の有病率も増加する。血栓性疾患の有病率、発症率の増加が想定される。食生活の欧米化、肥満の増加も日本人の血栓イベント増加に寄与する。動脈硬化を基盤としない深部静脈血栓症の増加も想定される。

血栓塞栓症予防ならびに治療目的の抗凝固薬使用は増加している。従来、ビタミン K 依存性凝固因子の機能的完成を阻害するワルファリンのみが経口抗凝固薬として臨床使用されていた。近年、Non-Vitamin K Oral Anticoagulant (NOAC) と総称される直接的凝固因子機能阻害薬が、非弁膜症心房細動の脳卒中予防、静脈血栓症予防・治療の適応を取得して臨床使用されるようになった。

ワルファリンと異なり、NOAC はトロンビンまたは第 Xa 因子の酵素機能を可逆的、選択的に阻害する。本邦では、2011 年に直接トロンビン阻害薬であるダビガトランの使用が開始された。実臨床の NOAC の使用経験はワルファリンより短いため、各種 NOAC の実臨床のワルファリンとの比較における有効性と安全性、NOAC 間の有効性、安全性の差異には未知の部分がある。

凝固カスケードを構成する個別の凝固因子の選択的機能阻害薬は、体内局所にて大量の凝固因子が活性化される病態では抗凝固機能を

発揮できない。実際、局所の血栓性が亢進する機械弁を対象として、NOAC の一つであるダビガトランとワルファリンの有効性、安全性を検証したランダム化比較試験では、ダビガトランを増量して出血リスクを著しく増加させた場合においても、ワルファリンに勝る有効性を示すことができなかった。Xa 阻害薬と直接トロンビン阻害薬は作用メカニズムが異なる。Xa 阻害薬とワルファリンを人工弁患者にて比較する試験は、動物実験レベルでの用量設定などは行われているが、ヒトを対象としたランダム化比較試験は施行されていない。

全ての病態において最適の抗凝固薬を決定する目的で、その病態を対象としたランダム化比較試験を行うことは時間的、コスト的に非効率である。病態の特性に応じた最適の抗凝固薬を予測可能とするシステムの開発が期待される。

19 世紀に確立された血液凝固カスケードセオリーには、血流、細胞などの重要な寄与因子が包括されていない。各種病態における抗凝固薬の薬効予測を血液凝固カスケードセオリーに基づいて行うことには限界がある。直接トロンビン阻害薬と Xa 阻害薬の効果発現の差異の理解を目指して、血流と血小板を考慮した新規の血液凝固モデルを開発した。本モデルでは血栓形成に寄与する支配的因子と血流、血小板、血液凝固カスケード、血管内皮細胞および線溶系を考慮した。各因子の血栓形成に及ぼす効果を物理、化学反応として数理モデル化した。本モデルにてトロンビンの酵素機能（直接トロンビン阻害薬により阻害される）、トロンビンの産生速度（Xa 阻害薬により阻害される）を変化させ、血栓形成における直接トロンビン阻害薬と Xa 阻害薬の差異をコンピューターシミュレーションにて予測計算した。

シミュレーションモデルにて、血管損傷部位への単位時間の血液灌流により産生される血栓量とトロンビン酵素機能の間には正の相関関係を認めた。単位時間に産生される血栓量とトロンビン産生速度の間には相関を認めなかった。トロンビン阻害と Xa 阻害の血栓形成に及ぼす効果は異なることが示唆された。予測計算の妥当性は、シミュレーションモデルの精緻化および今後の臨床試験により検証される必要がある。

2. 研究の背景

コンピューターが高性能化したため、複雑な生体システムの理解を目指す研究への応用が可能となった。ヒトの脳が 3 次元以上の情報の理解が困難であるのに比較して、コンピューターでは、入力、出力情報の次元の制限がない。膨大かつ一見無意味な情報を入力し、それら情報間での関連を見出す人工知能（AI：Artificial Intelligence）は、多次元情報の扱いに優れるコンピューターの応用技術として医学分野に応用されている。複雑な生命現象を構成する膨大な因子を入力すれば、人工知能は過去に予期しなかった因子間の関連を見出す可能性がある。しかし、AI は因子間の関連の有無を判定できても、因子間の因果関係の解明には役立たない。帰納的推論の本質的限界を AI にて打破することはできない。

生命現象のメカニズムを理解するためには、現象を構成する因子を同定し、因子間の定量的因果関係を解明する必要がある。複雑な生命現象であっても、多数の並行する物理、化学現象の集積として理解できる場合がある。近年の高性能コンピューターは並列計算機能に優れるため、複雑な現象を構成する個別の反応を数理モデル化

できれば、血栓形成などの複雑系の再現も可能となる。

血管損傷部位での止血、血栓形成はヒトの恒常性維持の基盤メカニズムである。全身臓器に酸素を運搬する赤血球を含む血液は血管内を循環する。血管の内側は内皮細胞により覆われている。血管内皮細胞は Nitric Oxide (NO)、Tissue type plasminogen activator (t-PA) などを局所放出して血液の流動性維持に寄与する。血管壁が外傷などにより損傷されると、器質的、機能的に傷害された箇所に血小板が接着する。血管壁の損傷と血小板の接着は同時に起きる。すなわち、血管壁損傷部位では von Willebrand 因子 (VWF) が血流サイドに曝露され、血管壁近傍を流れる血小板細胞の膜糖蛋白 (Glycoprotein) I b α により血小板が接着する。GPIb α は、既に VWF に結合可能な構造にて膜上に存在している。血管壁損傷部位への血小板細胞の接着は受動的物理現象である。血管内皮損傷部位への血小板細胞接着現象は、流体力学、接着した血小板細胞の受ける応力ならびに抵抗力などを考慮することで数理モデル化できる。

血管壁損傷部位に接着した血小板は、細胞として活性化する。血小板活性化には、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が寄与する。カルシウムイオンを上昇させる刺激として、コラーゲン受容体 GPIV による刺激、活性化血小板から局所放出される Adenosine diphosphate (ADP) による ADP 受容体 P2Y₁₂ を介する刺激などの重要性が示されている。Spleen tyrosine kinase (Syk) などのシグナル蛋白のリン酸化が血小板活性化に寄与する。Adenosine triphosphate (ATP)/ADP 転換による細胞のエネルギー代謝とシグナル蛋白リン酸化を共役した血小板細胞活性化モデルは、既に確立されている。本研究では凝固系に着目したため、細胞内の代謝・活性

化モデルを使用せず、血小板細胞活性化に伴う細胞膜外側の脂質組成変化に着目した。血小板細胞が活性化すると、陰性荷電したリン脂質が細胞周囲に発現する。リン脂質の周囲にはビタミン K 依存性の Gla domain を有する血液凝固第 II, VII, IX, X 因子が集積する。第 V, VIII 因子も確率的に集積し、トロンビン産生速度の著しく早いプロトロンビナーゼ複合体を形成する。プロトロンビナーゼ複合体によるトロンビン産生速度は、液相の凝固カスケードによるトロンビン産生速度に比較して極めて速い。そのため、シミュレーションモデルでは、血小板細胞活性化部位においてトロンビン産生能が発現するとした。活性化血小板は、microparticle を局所放出して凝固系亢進に寄与するが、本モデルには microparticle による凝固促進は組み入れなかった。動脈硬化巣では、単球が産生した組織因子が蓄積されている。動脈硬化巣破綻部位における血小板細胞活性化には組織因子も寄与する。本モデルでは、血管壁損傷部位において、血小板を接着させる成分と活性化させる成分の存在を仮定した。血管壁に局在する組織因子は血小板を活性化させる成分として本モデルに取り込まれている。活性化血小板は、セロトニン、CD40 リガンドなどの各種液性因子を局所で放出し、血管を収縮させ。炎症性細胞機能を調節する。血管の局所収縮、炎症は、本モデルには組み込まれていない。本研究では、血管壁損傷部位への血流条件下の血小板の集積、活性化、活性化血小板周囲でのプロトロンビンからトロンビンへの転換、トロンビンによるフィブリン産生と血小板の活性化、血管内皮細胞周囲の線溶をモデルの主要構成因子とした。血流の影響は、血小板細胞への力学的負荷に関する諸方程式および化学反応と物質拡散における移流の寄与を考慮した移流拡散方程式

とした。

時間依存の現象の変化を表現する方程式は微分方程式となる。コンピュータにより微分方程式を直接解く方法は開発されていない。微分方程式では Δ を無限小としている。コンピュータは無限小を扱うことはできないが、 10^{-3} 、 10^{-10} 、 10^{-12} など、対象とする現象に応じて無限に近く小さい Δ を扱うことはできる。オングストロームスケールの原子の運動の記述の際に、時間軸の Δ は慣習的に 10^{-12} 秒程度としている。微分方程式を差分方程式に変換し、数学的解の近似値を予測する方法を方程式の離散化という。本研究では、高性能コンピュータを用いて、血流、血小板、凝固系、線溶系の各種方程式を離散化して解く。

心筋梗塞、脳梗塞などの血栓イベントは人類の生存、長期の Quality of Life に寄与する重要な問題である。さまざまな抗血小板薬が脳梗塞、心筋梗塞予防目的で開発された。アスピリン、クロピドグレルが二次予防で広く使用されている。心房細動に合併する脳梗塞予防、肺塞栓症や下肢静脈血栓症などの静脈血栓症の予防、治療には抗凝固薬が使用されている。古典的なワルファリン以外の抗凝固薬では、NOAC として、ダビガトラン、アピキサバン、リバーロキサバン、エドキサバンが日常診療で使用されている。ダビガトランは直接トロンビン阻害薬であり、他の 3 種類の NOAC は Xa 阻害薬である。

ダビガトランとそれ以外の 3 種類では作用メカニズムが異なる。実臨床にてダビガトランとリバーロキサバンを比較すると、Xa 阻害薬であるリバーロキサバンで出血が少ないとの報告もある。アピキサバンではさらに重篤な出血が少ないとの報告もあるが、いずれも

観察研究による比較である。凝固カスケードへの作用機序の違いは、臨床効果に差異をもたらす可能性がある。本研究では、血流・血小板・凝固・線溶シミュレーターを用いて、直接トロンビン阻害薬とXa 因子阻害薬の血栓形成に与える影響を予測計算する。

3. 考察と展望

血流速度、血小板の接着速度、活性化速度、トロンビンによるフィブリン産生速度、血小板活性化速度ならびにアンチトロンビンによるトロンビン不活化速度、プラスミン産生速度、そして、プラスミンによるフィブリン溶解速度を可変パラメータとした壁損傷部位の血栓形成のコンピューターシミュレーションモデルを開発した。トロンビン機能、トロンビン産生速度を変化させた時の、血栓形成に対する効果が異なることをシミュレーション計算にて示した。本研究の予測計算は、実臨床の各種抗血栓薬の作用の差異を反映している可能性がある。

本血栓モデルでは、血流、血小板接着、活性化、トロンビン産生、トロンビン機能の重要性に着目した。モデルの作成には過去の実証実験の成果を参照した。マウスの精巣動脈を用いた動脈血栓形成の実験にて血管内皮損傷部位には速やかに血小板接着が起こり、動脈血流下の血栓は3次元的に成長した。ヒト血液を用いた実験でも、コラーゲン、VWFを固相化したガラス板上の血小板の血流下の速やかな接着を示した。血流下の血小板の接着は、血小板細胞活性化の有無に関わらず、VWFとGPIIb/IIIaの相互作用が必須の役割を演じることを示した。本血流・血小板連成モデルは、これらの自らの施設の過去の実証実験を反映させたモデルとした。

血小板細胞活性化時に、細胞膜上に陰性荷電したリン脂質が発現し、活性化血小板存在下の血液凝固時間が短縮することを過去に示した。VWF とコラーゲンを固相化し、接着した血小板が活性化すると、血小板血栓表面にトロンビンが産生されることを過去に示した。これら過去の研究成果に基づき、活性化血小板上において、凝固系が活性化する本研究の血小板・凝固系連成モデルを作成した。

血管内皮細胞は t-PA ならびに plasminogen activator inhibitor (PAI) -1 を局所分泌して線溶系の調節に寄与する。本モデルでは健常血管内皮細胞の存在を考慮し、内皮作用による線溶調節機能を組み込んだ。今回の解析では、トロンビン阻害とトロンビン産生阻害の差に注目したため、線溶系のパラメータは変化させなかった。

モデル計算として、トロンビンの酵素機能、トロンビン産生速度を 200%に増加した場合の予測計算を行った。トロンビンによる血小板活性化速度、フィブリン産生速度が上昇すると、単位時間灌流後の血栓のサイズは増大した。トロンビン産生速度を増加させた場合には、血栓のサイズの増大を認めなかった。本モデルにおけるアンチトロンビンによるトロンビン不活化速度の設定が、この差異に寄与している可能性がある。今後、複数のパラメータを同時に変化させた時の計算結果を比較し、各パラメータの妥当性を検証する必要がある。

血小板細胞の活性化には 2 経路を想定した。血小板接着後、VWF/コラーゲン受容体を介した活性化と、活性化血小板の周囲で産生されたトロンビンなどの液性因子による活性化である。本研究では、トロンビン機能と血栓サイズが相関することを示した。この事実は、血小板の安定接着に、トロンビン受容体が寄与することを示唆して

いる。血小板血栓の安定化には、 $P2Y_{12}$ Adenosine diphosphate (ADP) 受容体の持続的刺激の重要性である。本モデルでは液性の活性化因子としてトロンビン进行想定しているが、ADPの寄与も包括している。 $P2Y_{12}$ ADP 受容体阻害薬使用時の血栓サイズ予測への応用も可能である。

過去に発表したモデルでは、アンチトロンビンの機能を十分に表現していなかった。今回は、アンチトロンビンによりトロンビン进行消失させるという設定をした。トロンビン产生速度の初期値、トロンビン機能の初期値には実証的裏付けが乏しい。本研究結果は、限られた条件においてのみ成立し、一般性がない可能性はある。

今回のモデルでは、複雑な凝固カスケードのうち、プロトロンビンからトロンビンへの転換のみを取り込み、凝固カスケードの上流部分を簡略化している。今後、プロトロンビンよりもさらに上流の凝固カスケードをモデルに取り込み、シミュレーションの精緻化を図りたい。

直接トロンビン阻害薬、Xa 阻害薬は、心房細動による脳梗塞予防で広く臨床で使用されている。また、Xa 阻害薬は、肺塞栓症や深部静脈血栓症な静脈血栓塞栓症の予防ならびに治療の適応を取得している。シミュレーションモデルでは、直接トロンビン阻害薬は、トロンビンの機能を阻害し、Xa 阻害薬は、トロンビンの产生速度を阻害するとした。しかし、Xa 阻害薬の薬効が、トロンビン产生速度抑制のみにて判定できるか否かは不明である。

直接トロンビン阻害薬では、塞栓リスクが高い機械弁などの塞栓予防には効果がなかった。本研究で示したトロンビン阻害と Xa 阻害における血栓形成の相違に臨床的意味があれば、機械弁への Xa 阻

害薬の応用を目指したランダム化比較試験の妥当性の根拠を与えることになる。

抗血小板薬と少量の Xa 阻害薬の組み合わせにより、心血管死ならびに急性心筋梗塞などの動脈血栓イベントの減少効果が臨床的に示された。しかし、血栓イベントリスク低下とともに出血イベントリスクが増加した。シミュレーションモデルにおいて、血流速度と同時に血小板活性化速度、トロンビン産生速度を変化させれば出血イベント増加効果を最小としつつ、血栓イベント発症予防効果を最大化する個別最適治療に応用できる可能性がある。

シミュレーション研究の利点は、多くの生物学的研究では不可能である定量性の実現にある。限界点としては、結果を支配する因子が条件により異なり、モデル自体に組み込まれていない可能性がある。予測計算の妥当性は生物学的実験による確認が必要である。

遅い血流条件では、白血球などの炎症細胞も血栓形成に寄与すると想定される。今回のシミュレーションモデルに炎症性細胞は組み込まれていない。コンピューターの計算力の限界により、本研究では、血管壁損傷後 30 秒間での血栓形成のみに注目した。本研究の対象とした「血液灌流開始 30 秒後の血栓」と「虚血症候を惹起する臨床的血栓」の関連が少ない可能性がある。

過去の定量的生物学的実験の成果がないため、シミュレーションに含めたトロンビン生成速度 1.0/sec、トロンビンによる血小板活性化速度 0.01/sec といったパラメータの設定は恣意的である。生態条件における化学反応の反応係数を正確に算出するために、今後の精緻な定量的実証実験が必須である。

本研究では、血栓の定義を高濃度の活性化血小板を認める箇所と

した。予備的検討により、活性化血小板濃度の高いボクセルではフィブリン濃度も高かった。今回のモデルでは血栓の定義としてフィブリンは考慮しておらず、その点において、今回の研究における血栓の定義は恣意的である。しかし、心筋梗塞を惹起した血栓の病理組織学的検討により、血栓中の血小板と凝固系の共局在は、臨床的に証明されている。血流の速い部位に形成される冠動脈血栓、血流の遅い部位に形成される心房細動の脳塞栓の両者において、血小板とフィブリンの局在に差異はなかった。本研究に用いた血小板と凝固系の連成モデルにおける、定性的生物学的妥当性は証明された。

第Xa 因子の作用として、PAR-1(Protease-Activated Receptor-1) ならびに PAR-2 への作用を介する炎症調節作用が指摘されている。本モデルに組み込まれていない炎症のシミュレーションモデルへの取り込みを将来の課題とする必要がある。本モデルの血流解析は、移流拡散に局限している。確率的な乱流の取り込みは、将来の課題である。

今回の検討にて、トロンビン機能とトロンビン産生速度は、血栓形成に異なる影響を与える可能性が示唆された。生体の複雑系を理解する手段として、コンピューターシミュレーションの有用性が示唆された。

4. 結論

血流・血小板・凝固・線溶連成シミュレーターにより、直接トロンビン阻害薬とXa 阻害薬の血栓形成におよぼす効果に差異がある可能性を示唆した。