

# 主 論 文

## Reduction of Intracerebral Hemorrhage by Rivaroxaban after tPA Thrombolysis Is Associated with Downregulation of PAR-1 and PAR-2

(リバロキサバン前投与における tPA 療法後の脳出血減少は、PAR-1, PAR-2 減少に関連する)

### **【緒言】**

tPA による血栓溶解療法は脳梗塞発症後 4.5 時間以内に使用した場合に改善効果を示しうるが、抗凝固薬内服中の tPA 療法は出血リスクを高めるために慎重投与に当たる。一方、プロテアーゼ活性化受容体 (PARs) は脳内に広く分布する G タンパク質共役受容体であり、PAR-1 から PAR-4 までのファミリーを形成している。PARs はトロンビンや凝固第 Xa 因子などのセリンプロテアーゼに対して様々な修飾を与えることがこれまで報告されており、抗凝固薬内服患者における tPA 投与において、脳内で何らかの影響を及ぼしている可能性がある。そこで今回、ワーファリンもしくはリバロキサバンを内服させたラット脳梗塞モデルに対して tPA 投与を行い、PARs の脳梗塞及び頭蓋内出血への関与について検証する。

### **【材料と方法】**

#### 動物と薬物投与

11 週齢のオスの Wistar ラットを vehicle 群 (V+tPA)、ワーファリン投与群 (W+tPA, 0.2mg/kg/日)、リバロキサバン低用量投与群 (R(L)+tPA, 60mg/kg/日)、リバロキサバン高用量群 (R(H)+tPA, 120mg/kg/日) の 4 群に分けた (図 1)。ワーファリンは 1 日 1 回経口投与、リバロキサバンは混餌にて投与した。各凝固薬の用量は、既出論文をもとにラット静脈血栓モデルにおける血栓形成を 70% 抑制する用量を参考とし、リバロキサバンは薬物動態試験 (図 2) を行って血中濃度の測定を行った。これら薬物を 14 日間負荷し、最終日に採血を行ってプロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT)、トロンビン-アンチトロンビン複合体 (TAT) を測定した。

#### 一過性脳虚血モデル

上記採血後にラットの頸部を切開し、シリコンコーティングしたナイロン糸を右総頸動脈から右中大脳動脈に挿入。一過性脳虚血を負荷し、90 分後にナイロン糸を引き抜いて脳血流を再灌流させ、tPA (10mg/kg/ml) を静脈投与し、24 時間後に断頭し脳を摘出。脳を凍結保存した後、20  $\mu$ m 厚でスライスした。

#### 免疫染色

脳梗塞領域の決定には HE 染色を行った。切片は bregma から 2, 0, -2, -4, -6mm の 5 箇所を用い、梗塞面積は pixel 数のカウントで決定され、梗塞体積は各切片 2mm 厚による積分にて計算した。頭蓋内出血の同定には鉄染色を行った。

ラット IgG は血液脳関門 (BBB) が破綻した部位に染色される。各切片をビオチン標識された抗ラット抗体で反応させた後、アビジン-ビオチン標識酵素複合体にて増幅し、DAB にて発色さ

せた。

PAR-1, 2, 3, 4 の発現量を見るために、抗 PAR-1, 2, 3, 4 抗体を一次抗体として切片と反応させた後、それぞれ特定の 2 次抗体と反応させた。各個体につき脳梗塞周辺部位と対側皮質を光学顕微鏡で観察して撮影。陽性細胞数と pixel intensity を測定した。

PARs の発現部位を見るために 2 重免疫染色を行った。抗 PAR-1, 2, 3, 4 抗体に対し、抗 NeuN 抗体（神経細胞）、NAGO（血管内皮細胞）、抗 GST- $\pi$  抗体（オリゴデンドロサイト）、抗 GFAP 抗体（アストロサイト）、抗 Iba-1 抗体（ミクログリア）をそれぞれ掛け合わせて切片に反応させた後、特定の蛍光標識 2 次抗体にて発色させ、共焦点顕微鏡にて観察した。

### 統計分析

4 群の比較には、正規分布に従うデータについては一元配置分散分析の後に Turkey 法を適応。正規分布に従わないデータに対しては Kruskal-Wallis 検定の後に Ryan 法で有意水準を補正した Mann-Whitney 検定を行った。P<0.05 を統計学的に有意とした。

### **【結果】**

#### 梗塞体積、頭蓋内出血体積、IgG 漏出

生存率は、V+tPA 群で 93.3% (14 匹)、W+tPA 群で 76.5% (13 匹)、R(L)+tPA 群で 88.2% (15 匹)、R(H)+tPA 群で 86.7% (15 匹) だった (図 3A)。梗塞体積は各群で差がなかった (図 3B)。一方頭蓋内出血は他の 3 群に比べて W+tPA 群において多かった (図 3C)。W+tPA 群における頭蓋内出血の増加は量的分析においても有意であり (P<0.05)、この増加は R(L)+tPA 群及び R(H)+tPA 群においては認められなかった。

BBB の破綻は血管内のラット IgG の脳実質内への漏出として捉えることができる。有意差はないものの、W+tPA 群において IgG 染色が増加傾向にあった。

#### 凝固機能検査

PT 値は V+tPA 群に比べて W+tPA 群、R(L)+tPA 群、R(H)+tPA 群において増加していた (P<0.05, 図 4A)。aPTT 値は各群で差がなかった (図 4B)。TAT は V+tPA 群に比べて他の 3 群において有意に低下していた (P<0.05, 図 4C)。これらの結果は、抗凝固薬を投与された 3 群における凝固能が同等に低下していることを示唆するものであった。

#### PAR-1, 2, 3, 4 の免疫染色

PAR-1, 2, 3, 4 は正常側にも広範に発現していたがその発現は弱く、梗塞周囲において顕著に上昇していた (P<0.05, 図 5B-E)。V+tPA 群において、PAR-1 と PAR-2 は主として脳梗塞周囲の神経細胞で認められ (図 5A, a, b)、一部血管にも発現していた (図 5A, a, b, 差し込み図)。PAR-3 は神経 (図 5A, c) と血管 (図 5A, c, 差し込み図) の双方で発現し、PAR-4 は神経のみに発現していた (図 5A, d)。

V+tPA 群と比較して、W+tPA 群における PAR-1 の発現は上昇していたが、これらの上昇は R(L)+tPA 群においては認められなかった (P<0.05, 図 5A, B)。PAR-2 の発現も W+tPA 群において増加していたが、この増加は R(L)+tPA 群においては認められなかった (P<0.05, 図 5A, C)。

PAR-3 は正常側にて W+tPA 群と比べて R(L)+tPA 群と R(H)+tPA 群において発現が低下していたが ( $P<0.05$ ), 梗塞周囲では有意な差を認めなかった (図 5D)。PAR-4 は各群で有意差を認めなかった (図 5E)。

#### 蛍光二重染色による PAR-1, 2, 3, 4 の発現部位同定

V+tPA 群における蛍光二重染色において, PAR-1 は NeuN 陽性の神経細胞と共染色しており (図 6a, 矢印), NAGO 陽性の血管内皮細胞とは一部のみ共染色していた (図 6b, 矢頭)。GST 陽性のオリゴデンドロサイト (図 6c), GFAP 陽性のアストロサイト (図 6d), Iba-1 陽性のミクログリア (図 6e) とは共染色しなかった。PAR-2 もほぼ同様で, 神経細胞にて共染色され (図 6f, 矢印), 血管内皮細胞とは一部のみ共染色したものの (図 6g, 矢頭), グリア細胞 (図 6h-j) とは共染色しなかった。一方 PAR-3 は神経細胞 (図 6k, 矢印) と血管内皮細胞 (図 6l, 矢印) にて強く染色された。PAR-4 は神経細胞のみにおいて染色され (図 6p, 矢印), その他では染色されなかった (図 6q-t)。

### **[考察]**

#### 脳における PAR-1 の発現

既報告では PAR-1 は脳内の神経細胞, 血管内皮細胞を始め各種グリア細胞に広く発現していたが, 本研究において PAR-1 は主として神経細胞に発現し, 一部血管内皮細胞に発現していた。

PAR-1 アゴニストは脳虚血時の炎症性サイトカインを増加させて脳梗塞体積を増加させるとした報告が多く, PAR-1 の活性化は神経障害作用をもたらすとされる。本研究においては, ワーファリン投与群において PAR-1 の発現が増加していた。

#### 脳における PAR-2 の発現

PAR-2 も既報告で脳内の神経細胞及びグリア細胞における発現が確認されているが, 血管内皮細胞における発現の確認はこれまで *in vitro* によるものだけだった。本研究では *in vivo* ラット動物モデルにおいて PAR-2 の血管内皮細胞における発現を確認し得た。自己免疫性脳炎モデルマウスにおいて PAR-2 をノックアウト(KO)したところ IL-6 が減少したとの報告がある一方で, 我々は以前 PAR-2 KO マウスにおいて脳梗塞体積が増加することを報告している。このように PAR-2 の脳神経に対する意義は両義的であり, 神経障害作用と神経保護作用の双方を併せ持っており, 発現量や発現する細胞の種類によるのではないかと考えられている。本研究ではワーファリン投与群において PAR-2 の発現が増加していた。

#### リバロキサバンは PAR-1 と PAR-2 の活性に関与している可能性がある

本研究はより大きな脳梗塞プロジェクトの後半部分であり, その前半部分は副論文 1 (商ら, 2016) で報告されている。この副論文 1 では, ワーファリン群において MMP-9 が上昇して神経血管ユニットが破綻していたが, これらの変化はリバロキサバン群において認められなかった。

これまでの報告では, Xa 因子は PAR-1 と PAR-2 を刺激することで多様な生理学的効果を引き起こすが, リバロキサバンはその Xa 因子の活性を阻害することでその下流にある PAR-1 と

PAR-2 を抑制し、ひいては炎症反応を抑制する効果がある可能性があるとして示されている。

本研究と副論文 1 の結果を合わせて考えると、ワーファリン群では何らかの要因で PAR-1 と PAR-2 が亢進しており、これが MMP-9 などの炎症亢進、血管破綻、及び神経血管ユニットの破綻をもたらす、それが頭蓋内出血の増加をもたらしていたが、リバロキサバンは Xa 因子を阻害することで PAR-1 と PAR-2 亢進を抑制し、その後の炎症や頭蓋内出血を抑制することが出来た可能性が示唆された。

#### 脳における PAR-3 と PAR-4 の発現

PAR-3 は齧歯類の血小板に存在してトロンビンのシグナル応答に関与する。本研究では PAR-3 が脳梗塞周囲の神経細胞と血管内皮細胞において亢進していたが、これは PAR-3 が脳虚血時に何らかの神経障害作用や神経保護作用を有している可能性を示唆する。

PAR-4 は脳障害時の凝固系及び炎症反応のキーファクターとして働く。PAR-4 KO マウスは脳梗塞体積が減少するとの報告がある。既報告と同様に本研究でも PAR-4 は虚血脳において上昇していた。

#### 本研究の問題点

本研究の結果のみでは PARs の亢進と頭蓋内出血とはどちらが原因でどちらが結果なのかを区別するのが困難である。PARs が亢進したのは頭蓋内出血が増えたからかもしれない。ワーファリン群で PAR が増加した理由も不明である。今後さらなる薬理的アプローチやトランスジェニックマウスによる検討が必要である。

#### **[結論]**

リバロキサバン投与群はワーファリン投与群と比較して、脳梗塞時の tPA 投与において頭蓋内出血のリスクが低い事が示唆された。ワーファリンで誘導された PAR-1 と PAR-2 の亢進がリバロキサバンでは認められず、PAR-1 及び PAR-2 亢進が BBB 破綻や頭蓋内出血と関連している可能性がある。これらの結果は ROCKET-AF 試験においてリバロキサバン投与患者で出血性合併症が減少していたメカニズムの一部を説明できるかもしれない。