

論文審査の結果の要旨

関 要氏（国際医療センター 心臓内科・助教）の学位審査委員会は、平成 29 年 4 月 13 に毛呂山キャンパス本部棟アドミッションセンターにて開催された。初めに申請書類により資格条件の確認が行われ、学位申請資格を有すると判断された。

申請論文のタイトルは”Demeanor of rivaroxaban in activated/inactivated FXa”であり、申請者により雑誌 Journal of Pharmacological Sciences に投稿、2017 年 2 月 16 日に受理されている。

循環器疾患治療における凝固活性制御は中心的な位置を占めるようになってきている。非ビタミン K 拮抗経口抗凝固薬の標的である活性型第 X 因子(FXa)は、凝固カスケードの外因、内因系の合流部を構成する重要な因子である。さらにプロテアーゼ活性型受容体(PAR)を介した炎症惹起にも関わることが知られている。そのため FXa 阻害薬である Rivaroxaban(Rxb)は、抗凝固および抗炎症の両面から血管障害を抑制することが期待される。一方、循環器疾患患者において全身性に FX が活性化されているわけではないことから、FXa に関わらない Rxb の内皮細胞への直接作用は明らかにしておく意味がある。そこで本研究では、ヒト臍帯静脈内皮細胞株(HUVEC)への Rxb 単独処理および FXa との共処理における細胞 mRNA と培養上清を回収し、DNA マイクロアレイと qRT-PCR、および ELISA を用いて遺伝子発現および蛋白産生の変化を検討した。主たる結論は、以下の通りである。

- 1) Rxb 単独処理では、HUVEC において有意な増減を示した遺伝子は認めなかった。
- 2) Rxb と FXa との共処理では、FXa による PAR-1、PAR-2 遺伝子発現の上昇を Rxb が有意に抑制した。
- 3) FXa 単独処理の 4 時間後、炎症関連因子である MCP-1、ICAM-1、IL-8 の遺伝子発現が有意に上昇し、Rxb の共処理によって抑制された。
- 4) FXa 単独処理の培養上清中では、24 時間後に MCP-1 蛋白濃度がピークを示したが、Rxb の共処理によってその上昇が抑制された。
- 5) Rxb は FXa 非存在下では内皮細胞における遺伝子発現に影響せず、FXa 存在下において抗凝固、抗炎症の両面から内皮細胞障害を抑制すると考えられた。

口頭発表の後に以下の討論が行われた。主たる質疑応答と指摘は、

- 1) Rxb の適応となる心房細動患者では、心房血栓が形成されるので、流血中の凝固系が亢進しているのではないか？
- 2) 刺激に用いた FXa の濃度はどのように決めたのか？
- 3) FXa による内皮細胞の PAR 遺伝子発現上昇を、内皮細胞の炎症惹起と解釈しているがその根拠は？
- 4) 凝固促進作用を担う FXa ポケット部分への Rxb の結合が凝固を抑制するが、FXa と PAR の結合も抑制するのか？また FXa が PAR に結合すると働くシグナルは何か？
- 5) FXa が内皮細胞で誘導する MCP-1 の作用は？

- 6) 3 群以上の多重比較にも関わらず、特定の 2 群間の比較に t-検定を繰り返しているが、まずは分散分析による群間差の検定が必要ではないか？
- 7) DNA マイクロアレイ結果の網羅的解析がなされていないのはなぜか？
- 8) 本研究が明らかとした新しい所見は何なのか？

また論文全体に対する講評として、グラフ軸に単位が欠落しており、また FX、FXa、activated FXa, inactivated FXa、non-activating FXa など、最重要分子の名前が論文中で不統一かつ不正確であり、申請者の最終的な英文推敲が不十分である点が指摘された。

申請者は研究内容を簡潔に説明し、審査委員の質問に誠実に回答した。そして 1) 心房細動患者で全身性に凝固系が亢進しているという証拠はなく、心房は血流が淀んでいるために血栓が形成されると考えられる。2) 既報の実験方法に準じたもので、in vivo での病変における FXa 濃度は不明である。3) PAR を介した炎症関連分子の発現誘導が多数報告されており、発現が増えた PAR を介して炎症が惹起されると解釈したが、今後、直接の証明が必要である。4) Rxb による FXa-PAR 系の阻害機序は不明である。FXa-PAR 系は MAPK 経路を活性化することが報告されている。5) MCP-1 は細胞外に分泌されて炎症性細胞を誘導し、炎症惹起に関与すると考えられる。6) 知識不足で分散分析は行っていない。今後、同様の検討の際には分散分析の後、多重検定を行うようにする。7) 時間と経験の制約から DNA マイクロアレイデータ解析が不十分に終わっている。今回は有意な変動を示した炎症関連分子のみに着目し、検討することとした。8) もともとは Rxb の内皮細胞への直接作用を明らかにする目的で研究を始めたが、結果として内皮細胞の遺伝子発現に影響を認めなかったため、そのことを新たな知見として論文化した。

申請者は審査員との質疑に際して誠実に対応し、その研究者としての見識と人格は博士号にふさわしいとの意見で一致をみた。本論文には未完成な部分が残されているが、申請者は Rxb と他の臓器由来の血管内皮細胞株を用いる研究や FXa に代わる刺激としてずり応力などを用いる研究を計画しており、また本研究の DNA マイクロアレイデータの未解析部分には新たな発見の可能性が残されていることから、申請者によるさらなる発展が期待される。結論として、学位審査委員会は申請者の将来性も加味し、学位に適格と判定することとした。