

動脈血栓症に対する新規選択的シクロオキシ
ゲナーゼ-1阻害薬ASP6537の薬理学的研究

坂 田 千 夏

2018年

目次

	頁
序論	1
第1章 シクロオキシゲナーゼ (COX) 選択性及びトロンボキサン A_2 /プロスタグランジン I_2 (TXA ₂ /PGI ₂)産生に対する ASP6537 の作用	10
第1節 緒言	
第2節 実験材料及び方法	
第3節 実験成績	
第4節 考察	
第2章 血小板凝集並びに血栓形成に対する ASP6537 の作用	23
第1節 緒言	
第2節 実験材料及び方法	
第3節 実験成績	
第4節 考察	
第3章 新生内膜形成に対する ASP6537 の作用	44
第1節 緒言	
第2節 実験材料及び方法	
第3節 実験成績	
第4節 考察	
第4章 ASP6537 及びアスピリンの利便性及び副作用に対する比較検討	51
第1節 緒言	
第2節 実験材料及び方法	

第3節 実験成績

第4節 考察

総括及び結論	60
謝辞	64
引用文献	65
略語一覧表	77

序 論

近年の心・血管疾患の治療法の進歩により、その予後は著しく改善している。しかしながら、心血管疾患は依然として世界的に第1位の死亡原因であり、2013年の調査では、全世界の総死亡者数 5,400 万人の内、31.5%にあたる推定 1,730 万人が心血管疾患により死亡したと報告されている (Benjamin et al., 2017)。日本における虚血性心疾患に起因する死亡率は先進国の中で最も低いことが知られているが、悪性新生物に次いで第二位の死亡原因であり、2015 年の 1 年間で急性心筋梗塞及びその他虚血性心疾患合わせて 7 万人以上が死亡している [厚生労働省、平成 27 年 (2015 年) 人口動態統計 (確定数) の概況]。

急性冠動脈症候群 (Acute coronary syndrome: ACS) は、心臓へ血液を供給している冠動脈の狭窄もしくは閉塞により、心筋への血液供給が著しく減少するまたは遮断されることで引き起こされる病態であり、冠動脈におけるアテローム血栓症が主な原因となっている (Viles-Gonzalez et al., 2004; Ohman et al., 2006; Gabriel et al., 2007)。

アテローム血栓症は、主にアテローム動脈硬化 (粥状動脈硬化) 病変部におけるプラーク (粥腫) 破裂により、閉塞性または亜閉塞性血栓が形成されることにより発症する (Yahagi et al., 2016)。冠動脈にて発症した場合には、上述の ACS、脳動脈にて発症した場合は、脳梗塞を引き起こす。血小板は、アテローム血栓症の発症に重要な役割を果たしている。プラークの破裂により内皮下組織が露出し、血小板が内皮下組織の細胞外マトリックス成分に暴露されると、血小板膜表面に存在する糖タンパク質受容体 (Glycoprotein receptor: GP receptor) が血管壁のコラーゲン及びフォン・ヴィレブランド因子 (von Willebrand factor: vWF) と相互作用し、血小板が内皮層へ付着する。血小板は血管内皮細胞もしくは内皮下組織に付着すると活性化し、活性化された血小板は、トロンビン、アデノシン二リン酸 (Adenosine diphosphate: ADP)、トロンボキサン (Thromboxane: TX) A₂ な

どを放出することで、周囲の血小板のさらなる活性化を引き起こす。活性化した血小板膜表面の $\alpha\text{IIb}\beta_3$ インテグリン (GPIIb-IIIa 複合体) は、接着タンパク質、特にフィブリノーゲン及び vWF に結合できるようになり、血管に付着した血小板に血液中の血小板が次々に重合することで (血小板凝集)、血小板血栓が形成される。また、血小板の活性化により血液凝固系も活性化されるため、血小板血栓の周辺では凝固系に起因するフィブリン血栓も生成される。血小板凝集体とフィブリンが物理的に絡み合うことで血栓がより成長し、強固な血栓となっていくことが知られている(Meadows and Bhatt, 2007)。

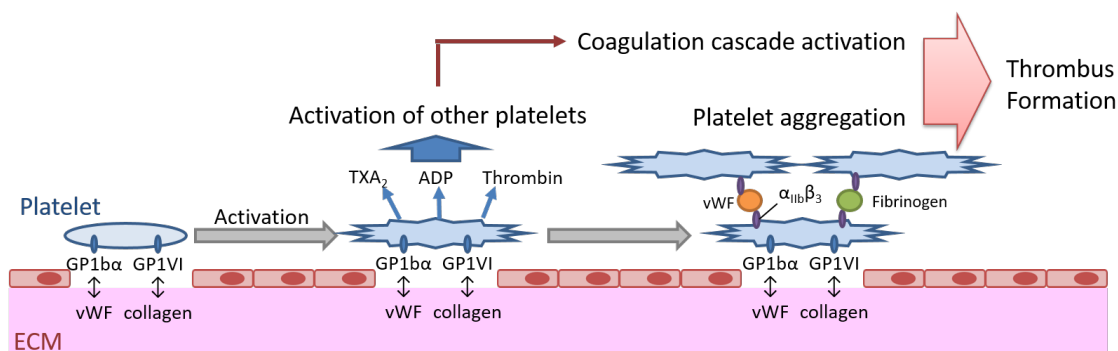


Figure 1. The role of platelets in thrombus formation. (Meadows and Bhatt, 2007 より改変引用)

アテローム血栓症患者の治療として、心血管リスク因子の管理に加え、血栓症の予防のために抗血小板療法が用いられている。上述の通り、血小板接着及び凝集は、血栓症、特に動脈血栓症の発症において重要な役割を果たしている。

血小板凝集を阻害する薬剤 (抗血小板薬) は、ACS 患者における心血管イベント予防、虚血性脳血管障害予防及び経皮的冠動脈形成術 (Percutaneous coronary intervention: PCI) 施行後の血栓症予防に有用である(Awtry and Loscalzo, 2000; Patrono et al., 2005; Mehran et al., 2013)。抗血小板薬には、血小板活性化経路の各段階を阻害する薬剤があり、シクロオキシゲナーゼ (Cyclooxygenase: COX) 阻害

薬であるアスピリン、ADP 受容体である P2Y₁₂ 受容体を阻害するカングレラ、チカグレラ、クロピドグレル及びプラスグレル、GPIIb/IIIa を阻害するチクロピジン、トロンビン受容体アンタゴニストである Vorapaxar などがある(Brown and Austin, 2017)。中でもアスピリンは、50 年以上の歴史を誇る最も使用実績の豊富な抗血小板薬であり、低薬価であることから、抗血小板療法の標準治療薬の中核として位置付けられている。

COX は、膜リン脂質由来のアラキドン酸を種々の生理活性物質に変換する代謝経路 (アラキドン酸カスケード) に関与する酵素である。COX はオキシゲナーゼ活性及びペルオキシダーゼ活性を持つ二機能性の酵素であり、オキシゲナーゼ活性によりアラキドン酸をプロスタグランジン(Prostaglandin: PG) G₂ に変換し、さらにペルオキシダーゼ活性により PGG₂ を PGH₂ に変換する。PGH₂ 下流の代謝物は、細胞特異的酵素を介して産生される。例えば TXA₂ は血小板に発現するトロンボキサンシンターゼを介して産生され、プロスタサイクリン (PGI₂) は、マクロファージ及び内皮細胞などに発現するプロスタサイクリンシンターゼを介して産生される。

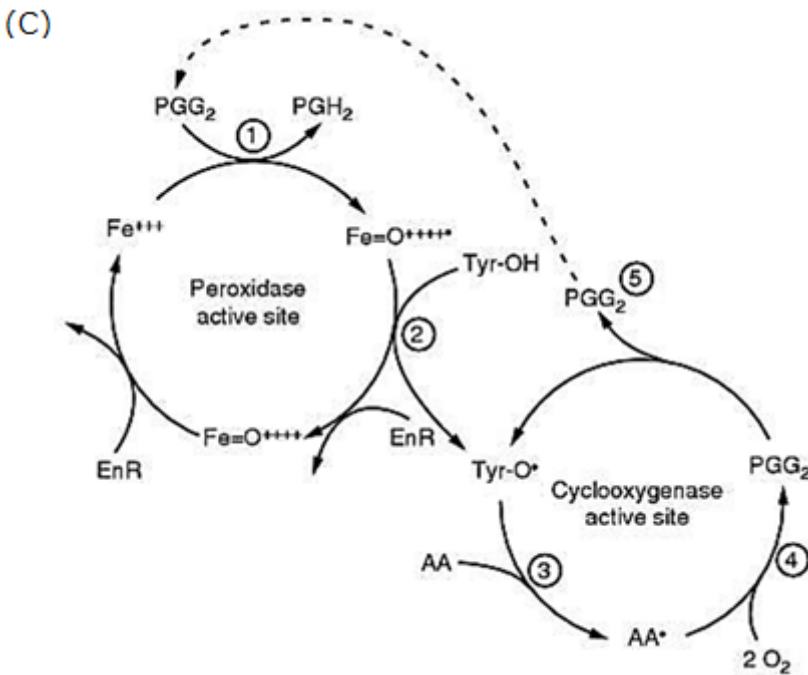
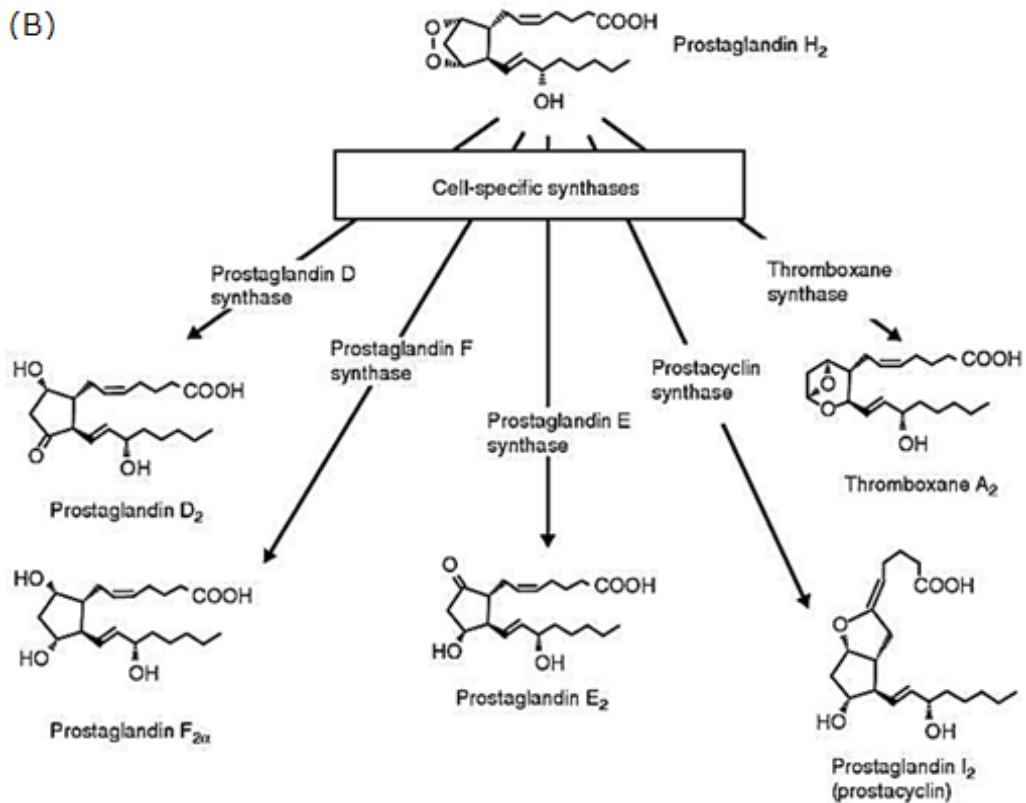
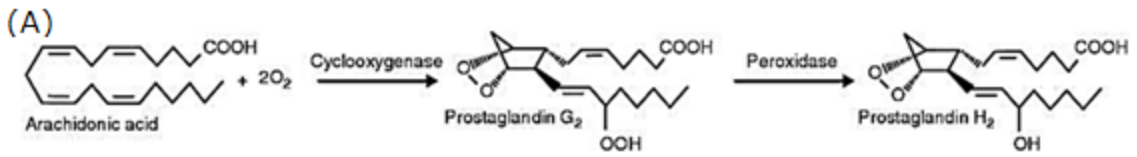


Figure 2. Production of prostaglandins by COXs.

(A) The two reactions performed by cyclooxygenases: the conversion of arachidonic acid to prostaglandin G₂ by the cyclooxygenase activity and the conversion of prostaglandin G₂ to prostaglandin H₂ by the peroxidase activity. (B) The cell-specific synthases that are involved in the conversion of prostaglandin H₂ to the five principal prostaglandins. (C) The reaction mechanism of COX-1. (Chandrasekharan and Simmons, 2004)

COXには、3種のアイソフォームが存在する。COX-1はユビキタスに発現する常在型酵素であり、生体の恒常性維持に関与していると考えられている。COX-2は炎症誘発性サイトカイン、エンドトキシン、腫瘍増殖因子などによって発現誘導される誘導型酵素であり、炎症性疾患などへの関与が示唆されている。COX-3は主に視床下部・下垂体に発現する酵素であるが、その機能は明らかになっていない(Kis et al., 2003)。

アスピリンはCOX-1を阻害することで血小板凝集促進因子であるTXA₂の産生を抑制し、抗血小板作用を発現すると考えられている。しかしながらアスピリンには不明瞭な用量依存性、胃腸粘膜障害作用、Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)との相互作用などの問題点がある。特に不明瞭な用量依存性、すなわち、高用量での薬効頭打ちもしくは減弱については、COX-1/2選択性の低さに基づき、高用量にてCOX-1だけでなくCOX-2の阻害作用も発現するため、血小板の接着及び凝集を阻害する因子であるPGI₂の産生も抑制し、結果として、COX-1阻害に基づく抗血小板作用が相殺されてしまう現象(アスピリンジレンマ)がその原因と考えられている(Antithrombotic Trialists, 2002; Patrono et al., 2005)。

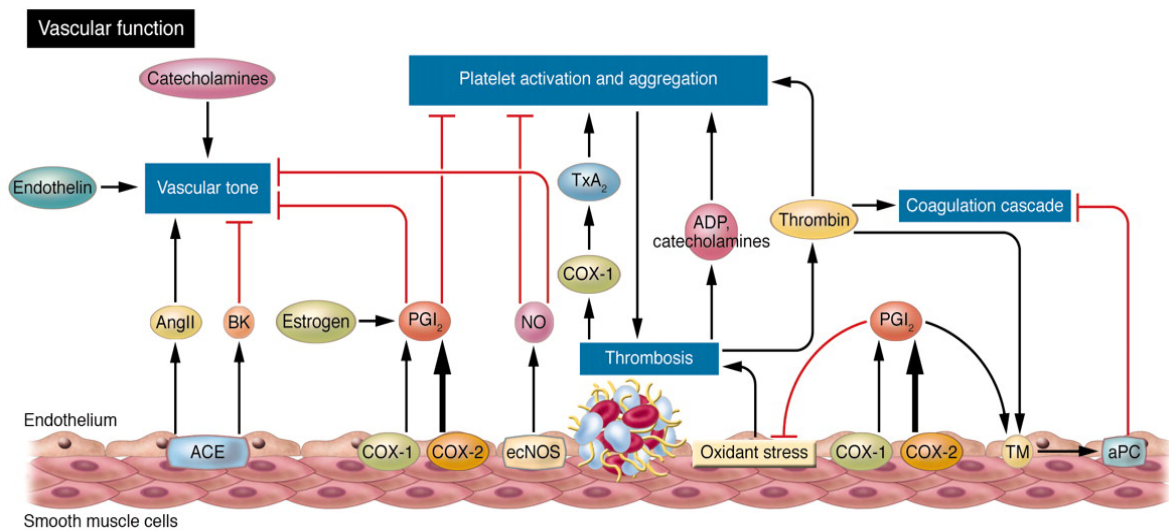


Figure 3. Roles of the COX isozymes in cardiovascular biology.

ACE, angiotensin-converting enzyme; ADP, adenosine diphosphate; aPC, activated protein C; BK, bradykinin; ecNOS, endothelial cell Nitric Oxide Synthase; MBF, medullary blood flow; RAS, renin-angiotensin system; TM, thrombomodulin. (Grosser et al., 2006)

ASP6537 は、アステラス製薬株式会社 (Tokyo, Japan) によって合成された新規化合物で、選択的かつ強力な COX-1 阻害薬である(Imanishi et al., 2011)。

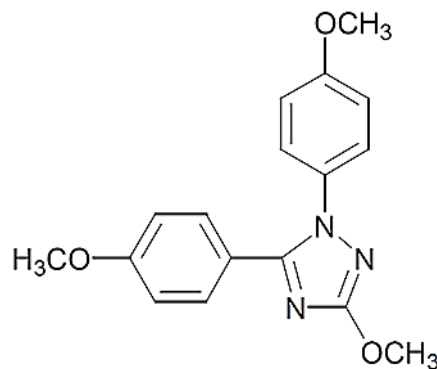


Figure 4. Chemical structure of ASP6537.

本研究では、ASP6537 の動脈血栓予防作用について、アスピリンと比較検討した。すなわち、ASP6537 はアスピリンジレンマが認められるか否かを検証し、抗血栓作用をアスピリンと比較するとともに、血管再狭窄への作用、NSAIDs と

の相互作用、作用の可逆性及び胃粘膜障害惹起作用を検証することで、動脈血栓予防薬としての有用性を証明することを目的として、種々の評価を行った。まず、第 1 章において COX-1 選択性並びに TXA₂/PGI₂ 産生に対する作用を検討した。第 2 章では血小板凝集並びに血栓形成に対する作用について諸種血栓モデルを用いて検証し、第 3 章では血管障害時の新生内膜形成に対する作用を検討した。最後に第 4 章においては、イブプロフェンとの薬物相互作用、抗血小板作用の可逆性並びに胃腸障害に及ぼす影響についてアスピリンと比較検討した。

第1章 COX 選択性及び TXA₂/PGI₂ 産生に対する ASP6537 の作用

第1節 緒言

序章で述べた通り COX-1 は血小板において発現し、血小板凝集促進作用及び血管収縮作用を有する TXA₂ の産生を促進する。一方、抗血小板活性及び血管拡張作用を有する PGI₂ は、内皮細胞において発現する COX-2 に由来する可能性が報告されている(Caughey et al., 2001; Vane, 2002; Yu et al., 2009)。TXA₂/PGI₂ 産生のバランスが TXA₂ 優位に傾くことは、血管収縮及び血小板凝集を引き起こし、多くの心血管疾患の要因である血栓症の発症につながると考えられている(Moncada et al., 1976)。したがって、PGI₂ の産生を相対的に抑制すると考えられる選択性の高い COX-2 阻害薬は、心血管イベントリスクを増大させる可能性がある。実際、特に高リスク患者において、選択的 COX-2 阻害薬が重篤な心血管副作用の発生を増強させることが報告されており、2004 年の Merck and Company の選択的 COX-2 阻害薬 VIOXX® (Rofecoxib) の回収に始まり、その後、選択的 COX-2 阻害薬のほとんどが心血管イベントリスク増大を理由に市場を撤退している(Juni et al., 2004; Singh, 2004; Bresalier et al., 2005; Baron et al., 2008)。

低用量アスピリンは、虚血性イベントの発症抑制作用を有することが臨床で示されているが、同時に用量依存性が不明瞭であり、特に高リスクの患者では効果不十分であることも知られている(Berger, 2013)。アスピリンの抗血小板作用は、COX-1 阻害による血小板 TXA₂ 産生抑制作用に基づいて発揮されるが、一方で高用量においては COX-1 及び COX-2 の両方を阻害するため、血小板における TXA₂ の産生だけでなく、血管壁における PGI₂ の産生も阻害すると考えられる。この現象は「アスピリンジレンマ」と呼ばれ、アスピリンの高用量における薬効の頭打ちや用量依存性の不明瞭さの原因であると考えられている(Antithrombotic Trialists, 2002; Patrono et al., 2005)。したがって、アスピリンよりも COX-1 に対する選択性が高い化合物は、TXA₂/PGI₂ 産生のバランスをより

PGI₂ 優位に傾けることができ、虚血性イベントの予防において有効であると考
えられる。

本章では COX-1 選択的化合物である ASP6537 の COX-1 選択性を明らかにす
るとともに、*in vitro* 及び *in vivo* TXA₂/PGI₂ 阻害作用をモルモット及びラットを
用いて検討し、ASP6537 の TXA₂/PGI₂ バランスにおける PGI₂ 優位性についてア
スピリンと比較検討した。

第 2 節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本試験に用いた薬物及び試薬は以下の通りである。

ASP6537 [3-メトキシ-1,5-ビス (4-メトキシフェニル)-1H-1,2,4-トリアゾール]
は、アステラス製薬株式会社にて合成した。アスピリン及びイブプロフェンナト
リウム塩は Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA)、アラキドン酸は Biopool (Bray,
Co., Wicklow, Ireland) より、Type I collagen from equine tendon (Collagen reagent
Horm[®]) は Moriya (Tokyo, Japan)、ADP は、MC Medical (Tokyo, Japan) よりそれ
ぞれ購入した。Recombinant human COX-1 (rhCOX-1) は Chinese hamster ovary 細
胞で発現させ、Yao らの報告に従って精製し(Yao et al., 2007)、Recombinant human
COX-2 (rhCOX-2) は Sigma-Aldrich Co.から購入した。

2-2 実験動物

雄性 Hartley モルモット (SLC Japan Inc., Tokyo, Japan)、雄性 Wistar ラット
(Clea Japan Inc., Tokyo, Japan) 並びに雄性 F344 / DuCrI CrIj ラット (Charles River
Laboratories Japan Inc., Yokohama, Japan) を使用した。すべての動物実験は、アス
テラス製薬株式会社の動物倫理委員会の規則に基づいて実施した。

2-3 Recombinant human COX-1 及び COX-2 酵素アッセイ

ASP6537 及びアスピリンはジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、反応緩衝液 [2 μ M hematin 及び 5 mM L-tryptophan を含有する 0.1M Tris-HCl (pH7.3)] で希釈した。

rhCOX-1 (0.137 μ g/well) 及び rhCOX-2 (0.288 units/well) を室温で 10 分間被験薬とともにプレインキュベートし、10 μ M のアラキドン酸を添加することにより PGI₂ 合成を開始した。5 分間 (rhCOX-1) または 10 分間 (rhCOX-2) インキュベート後、1 mM インドメタシンを添加することによって PGI₂ 産生を終了させた。バッファー中の PGI₂ の安定代謝物である 6-keto-PGF1 α 濃度を、6-keto-PGF1 α EIA キット (Cayman Chemicals Co., MI, USA) を用い、製品マニュアルに従って測定した。

2-4 モルモット *in vitro* プロスタノイド(TXA₂/PGI₂)合成に対する作用

2-4-1 モルモット多血小板血漿 (Platelet rich plasma: PRP) における TXA₂ 合成

ASP6537 及びアスピリンは DMSO に溶解し、トリス緩衝生理食塩水で希釈した (最終濃度 0.1% DMSO となるよう調整した)。

モルモットを一晩絶食し、3.2%クエン酸三ナトリウム溶液を 10% (v/v) になるよう充填したプラスチックシリンジを用いてジエチルエーテル麻酔下にて腹部大動脈より採血した。全血を 197 \times g (1,100 rpm, KUBOTA 2420, Kubota Co., Tokyo, Japan) にて 7 分間遠心分離することで PRP を採取し、PRP をさらに 1469 \times g (3,000 rpm) にて 10 分間遠心分離することで乏血小板血漿 (Platelet poor plasma: PPP) を採取した。自動細胞カウンター (MEK-6258, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) を用いて血小板数を測定し、PRP を同一個体の PPP で希釈することで血小板数を 3 \times 10⁵ / μ l になるよう調製した。血小板数を調整した PRP に被験薬を添加し、1 分後に 0.5 μ g/ml のコラーゲンを添加して、37 $^{\circ}$ C で 10 分間、血小板凝集を誘導し

た。インドメタシン (最終濃度 10 μM) を反応混合物に加えて反応を停止させ、ついでこれを 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10,000 $\times\text{g}$ で 5 分間遠心分離した。上清中の TXA_2 の安定代謝物である TXB_2 の量を、 TXB_2 EIA キット (Cayman Chemicals Co.) を用い、製品マニュアルに従って測定した。

2-4-2 モルモット単離大動脈片における PGI_2 合成

一晩絶食したモルモットから、ジエチルエーテル麻酔下にて、胸部大動脈を単離し、湿重量 4.0-5.1 mg のスライスに切断した。採取した大動脈片をトリス緩衝生理食塩水 (pH 7.5) に浸し、内因性 PGI_2 産生による影響を排除するため、37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間直ちにインキュベートした。トリス緩衝液を交換後、被験薬を添加して 37 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間インキュベートし、アラキドン酸 (最終濃度 20 μM) を添加して、さらに 37 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間インキュベートした。10 μM のインドメタシンを添加して反応を停止させた後、反応混合物を 10,000 $\times\text{g}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間遠心分離した。上清中の PGI_2 の安定代謝物である 6-keto- $\text{PGF}1\alpha$ 濃度を、6-keto- $\text{PGF}1\alpha$ EIA キット (Cayman Chemicals Co.) を用い、製品マニュアルに従って測定した。

2-5 ラットにおける *in vivo* PGI_2 産生 (尿中 PGI_2 代謝物測定)

ASP6537 (1, 10, 100 mg/kg/day) とアスピリン (30, 100, 300 mg/kg/day) は投与直前に 0.5%メチルセルロース (Methylcellulose: MC) 溶液に懸濁して調整し、5 ml/kg になるように経口投与した。7 週齢の雄性 Wistar ラット (Clea Japan, Inc.) に ASP6537 及びアスピリンを 7 日間、1 日 1 回投与し、1、3 及び 7 日目に、代謝ケージを用いて 24 時間採尿した。採取した尿より二段階固相抽出法にて PGI_2 の安定代謝物である 2,3-dinor-6-keto $\text{PGF}1\alpha$ を抽出し(Riutta et al., 1994)、EIA キット (Cayman Chemicals Co.) を用いて、尿サンプル中の 2,3-dinor-6-keto $\text{PGF}1\alpha$ 濃度を測定した。

2-6 老齢ラットにおける血中 TXA₂/PGI₂ 代謝物濃度測定

老齢群として 28 ヶ月齢の雄性 F344/DuCr1Cr1j ラット (Charles River Laboratories Japan Inc.)、若年群として 11 週齢のラットを本実験に用いた。一晩絶食したラットに ASP6537 及びアスピリンを経口投与し、1 時間後にジエチルエーテル麻酔下にてヘパリンを含むシリンジを用いて採血した。採取した血液はインドメタシン (最終濃度 10 μ M) を含有するプラスチック管に直ちに移し、1469 \times g (3,000 rpm) にて 10 分間遠心分離することで血漿を調整した。血漿中の TXB₂ 及び 6-keto-PGF1 α 濃度を、各 EIA キット (Cayman Chemicals Co.) を用い、製品マニュアルに従って測定した。

2-7 統計学的解析

酵素アッセイ及び *in vitro* プロスタノイド産生試験における 50%阻害濃度 (IC₅₀) 値及び 95%信頼区間 (CI) は、logistic 回帰分析を用いて計算した。*In vivo* の実験成績は平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で示した。統計学的有意性に関しては、Student's paired *t*-test もしくは Dunnett's multiple comparison test より最適な手法を選択して行った。P 値<0.05 を有意水準とした。

第 3 節 実験成績

3-1 Recombinant human COX-1 及び COX-2 酵素アッセイ

rhCOX-1 及び rhCOX-2 の *in vitro* 酵素活性に対する ASP6537 及びアスピリンの阻害作用の評価結果 (平均 IC₅₀ 値及び 95%CI) を Table 1 に示した。ASP6537 は、rhCOX-1 によるアラキドン酸誘発 6-keto-PGF1 α 産生を IC₅₀=0.000703 μ M で阻害したが、100 μ M まで rhCOX-2 による 6-keto-PGF1 α 産生阻害作用は認められなかった。一方、アスピリンは rhCOX-1 及び rhCOX-2 の両アイソフォームに

よる 6-keto-PGF1 α 産生を阻害し、IC₅₀ 値はそれぞれ 37.9 μ M 及び 61.9 μ M であった。ASP6537 の rhCOX-2/rhCOX-1 酵素活性に対する IC₅₀ 比は 142,000 倍以上、アスピリンの rhCOX-2/rhCOX-1 酵素活性に対する IC₅₀ 比は 1.63 倍であり、ASP6537 は本試験においてアスピリンに比べて 87,100 倍以上の COX-1 選択性を有することが示された。

Table 1. Inhibitory effects of ASP6537 and aspirin on recombinant human cyclooxygenase (rhCOX)-1 and rhCOX-2 activities.

Experiment	IC ₅₀ (μ M) (95% confidence intervals)	
	ASP6537	Aspirin
rhCOX-1 inhibition	0.000703 (0.000167-0.00295)	37.9 (20.1-71.4)
rhCOX-2 inhibition	>100	61.9 (34.5-111)
rhCOX-2 inhibition (IC ₅₀) / rhCOX-1 inhibition (IC ₅₀) [relative to Aspirin]	>142,000 [>87,100]	1.63 [1]

IC₅₀ was calculated using logistic regression analysis. Geometric mean IC₅₀ value of 3 separate experiments is shown. rhCOX, recombinant human cyclooxygenase.

3-2 モルモット *in vitro* プロスタノイド(TXA₂/PGI₂)合成に対する作用

モルモットから採取した血小板及び大動脈組織片における *in vitro* TXB₂ 及び 6-keto-PGF1 α 産生に対する、ASP6537 及びアスピリンの阻害作用 (平均 IC₅₀ 値及び 95%CI) を Table 2 に示した。いずれの化合物も血小板におけるコラーゲン誘発 TXB₂ 産生及び血管からのアラキドン酸誘発 6-keto-PGF1 α 産生を阻害したが、ASP6537 及びアスピリンの 6-keto-PGF1 α 産生/TXB₂ 産生に対する IC₅₀ 比はそれぞれ 20.8 及び 0.738 であった。ASP6537 は、6-keto-PGF1 α よりも TXB₂ 合成を低濃度で阻害していることから、TXA₂/PGI₂ バランスの観点でアスピリンと比較して、より選択的に TXA₂ の産生を抑制することが示唆された。

Table 2. Inhibitory effects of ASP6537 and aspirin on platelet aggregation and prostanoid synthesis in guinea pigs.

Experiment	IC ₅₀ (μM) (95% confidence intervals)	
	ASP6537	Aspirin
TXA ₂ released by activated platelets	0.00358 (n = 5) (0.00176-0.00729)	18.3 (n = 5) (11.4-29.4)
Vessel PGI ₂ synthesis by isolated aorta	0.0744 (n = 4) (0.0136-0.406)	13.5 (n = 5) (5.67-32.3)
PGI ₂ synthesis (IC ₅₀) / TXA ₂ synthesis (IC ₅₀) [relative to Aspirin]	20.8 [28]	0.738 [1]

IC₅₀ was calculated using logistic regression analysis. Geometric mean of IC₅₀ value is shown. The number (n) of separate experiment is shown in parentheses. TXA₂, thromboxane A₂; PGI₂, prostaglandin I₂.

3-3 ラットにおける *in vivo* PGI₂ 産生 (尿中 PGI₂ 代謝物測定)

ASP6537 及びアスピリンのラットにおける尿中 PGI₂ 代謝物 (2,3-dinor-6-keto PGF1α) 濃度に対する作用を Figure 5 に示した。ASP6537 は 100 mg/kg/day, p.o. で尿中 2,3-dinor-6-keto PGF1α を有意に低下させたが、それより低い用量では明らかな作用は認められなかった。一方、アスピリンは、day1 において 100 mg/kg/day p.o. 以上で尿中 2,3-dinor-6-keto PGF1α を有意に低下させ、day3 及び day7 では投与したすべての用量 (30, 100, 300 mg/kg/day, p.o.) で尿中 2,3-dinor-6-keto PGF1α を有意に減少させた。

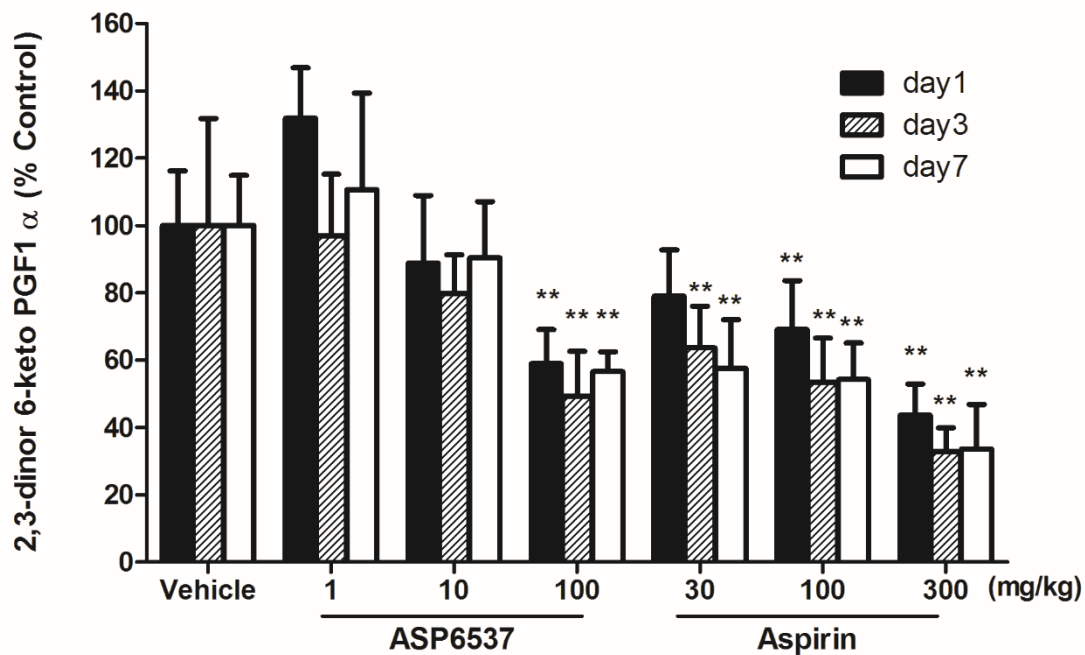


Figure 5. Effects of ASP6537 and aspirin on urinary 2,3-dinor-6-keto PGF1 α excretion in rats.

The effects of ASP6537 and aspirin on urinary concentrations of 2,3-dinor-6-keto PGF1 α in rats were determined on days 1, 3, and 7 after administration of the respective drugs. Urine was collected over a 24-h period on each measurement day. Data represent the mean \pm SEM of five animals. ** $P < 0.01$ compared with the vehicle-treated group (Dunnett's multiple comparison test).

3-4 老齢ラットにおける血中 TXA₂/PGI₂ 代謝物濃度測定

28 ヲ月齡 (老齡群) 及び 11 ヲ月齡 (若齡群) の雄性 F344/DuCrIj ラットにおける血漿中 TXA₂/PGI₂ 代謝物濃度に対する ASP6537 及びアスピリンの作用を検討した。溶媒投与ラットにおいて、TXB₂ 及び 6-keto PGF1 α の両方が、若齡群と比較して老齡群で有意に増加した (Figure 6A)。老齡ラットにおける血漿 TXB₂ 濃度に対する ASP6537 及びアスピリンの作用を Figure 6B に示した。ASP6537 及びアスピリンは、いずれも用量依存的に TXB₂ の量を減少させ、それぞれ 1 mg/kg, p.o. 及び 10 mg/kg, p.o. にて有意な減少が認められた。

老齡ラットにおける血漿中 6-keto PGF1 α 濃度に対する ASP6537 及びアスピリンの作用を Figure 6C に示した。ASP6537 は、100 mg/kg, p.o. の用量まで有意な作用を示さなかったが、アスピリンは用量依存的に 6-keto PGF1 α レベルを低下させ、100 mg/kg, p.o. 以上の用量で有意な 6-keto PGF1 α 低下作用を示した。

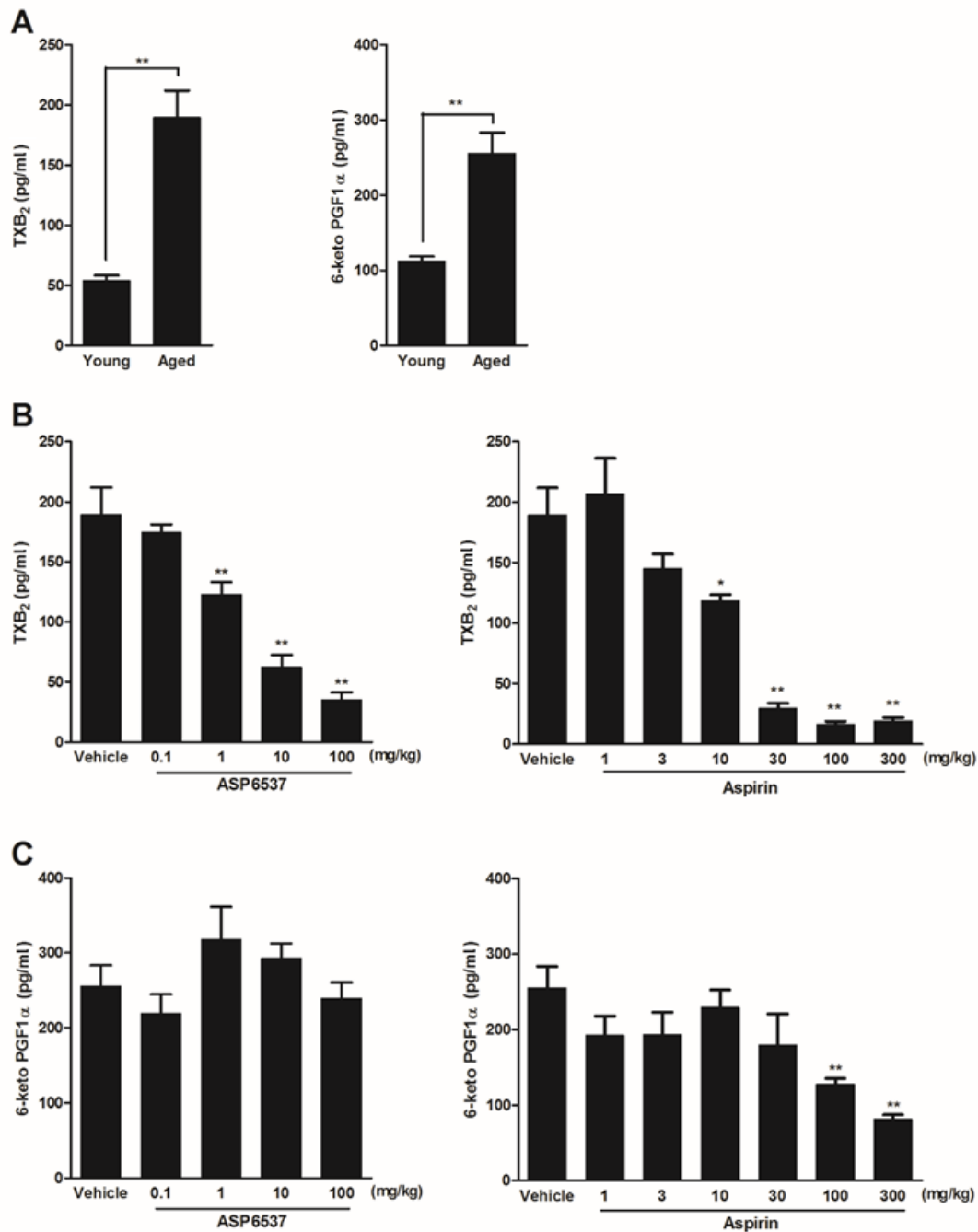


Figure 6. Effects of ASP6537 and aspirin on plasma prostanoid concentrations in aged rats.

(A) In untreated rats, both TXB₂ and 6-keto PGF1_α increased significantly in the aged group (28-week-old male rats) compared with the young group (11-week-old male rats). ** $P < 0.01$ (Student's t-test). (B-C) Effects of ASP6537 and aspirin on plasma TXB₂ and 6-keto PGF1_α concentrations in aged rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle treated group (Dunnett's multiple comparison test). Data represent the mean \pm SEM of five animals.

第4節 考察

本章では、モルモット及びラットにおける ASP6547 及びアスピリンの COX 選択性並びに TXA₂/PGI₂ 産生に対する作用を比較し、ASP6537 がアスピリンと比較して COX-1 に対する選択性の高い阻害薬であること、並びに *in vitro/in vivo* TXA₂ 産生をより選択的に抑制することを明らかにした。

rhCOX-1/2 酵素アッセイにおいて ASP6537 は COX-1 に対して顕著な選択性を示し、ASP6537 及びアスピリンの rhCOX-2/rhCOX-1 酵素活性に対する IC₅₀ 比は、それぞれ、>142,000 及び 1.63 であった (Table 1)。アスピリンの選択性に関してはヒツジ COX-2/COX-1 酵素活性に対する IC₅₀ 比が 1.67 であることが報告されており (Johnson et al., 1995)、これはヒト COX を用いた本研究結果とほぼ一致している。その他、選択的 COX-1 阻害薬として、SC-560 及び FR122047 の COX-2/COX-1 酵素活性に対する IC₅₀ 比がそれぞれ 700 倍及び 2,320 倍である (Smith et al., 1998; Ochi et al., 2000)。さらに、ASP6537 は、rhCOX、ヒト全血及びラット全血を用いた選択性アッセイにおいて、SC-560 よりも高い COX-1 選択性を示している (Imanishi et al., 2011)。各報告での COX 選択性評価方法が異なるため、COX-1 阻害薬の選択性を直接比較することは困難ではあるが、ASP6537 は現在までに同定された COX-1 阻害薬の中でも最も選択性の高い薬剤の 1 つであるといえる。

TXA₂/PGI₂ のバランスが崩れ、TXA₂ 優位となると、血栓症のリスクが増大する (Smyth, 2010)。COX-1 は血小板による TXA₂ の産生を調節していることが知られているが、何れの COX アイソフォームが内皮からの PGI₂ の産生を支配的に調節しているかは明らかにされていない (Catella-Lawson et al., 1999; Caughey et al., 2001; Vane, 2002; Cheng et al., 2006; Bolego et al., 2009)。モルモットにおける *in vitro* TXA₂/PGI₂ 産生試験では、ASP6537 が大動脈片からの PGI₂ 産生を減少させていることから、少なくとも本研究条件下で部分的には COX-1 が PGI₂ 産生の要

因であることが考えられる (Table 2)。さらに、ASP6537 は、100 mg/kg 経口投与群において正常ラットの尿中 PGI₂ 代謝物排泄を減少させていることから (Figure 5)、COX-1 が生理的条件下において、PGI₂ 産生に部分的に関与していると考えられる。しかしながら、モルモット *in vitro* TXA₂/PGI₂ 産生に対する ASP6537 の阻害作用は、アスピリンのそれと比較して約 28 倍選択的であったこと (Table 2)、並びにアスピリンは尿中 PGI₂ 代謝物排泄抑制作用と血小板凝集阻害作用を示す用量が同じであるのに対し、ASP6537 は尿中 PGI₂ 代謝物排泄抑制作用を示す用量が血小板凝集阻害作用を示す用量の約 33 倍高い用量であったことから (ASP6537 及びアスピリンの血小板阻害作用については第 2 章にて詳細記述する)、生理的条件下において COX-1 選択性の高い ASP6537 は、アスピリンに比べてより選択的に TXA₂ を阻害していると考えられる。

老齢ラット試験において、TXA₂ 及び PGI₂ 代謝物の血漿中濃度は、加齢に伴い有意な増加が認められた (Figure 6)。ヒトにおいても高齢者における TXA₂ 及び PGI₂ の尿中代謝物の増加が報告されている (Vericel et al., 1988)。血小板及び内皮細胞における COX-1/2 及び各種プロスタノイドシンターゼの発現に関しては加齢による増加が報告されており (Matz et al., 2000; Feletou et al., 2010)、これがラットやヒトにおける加齢に伴う TXA₂ 及び PGI₂ の産生増加に寄与していると推察される。老齢ラットにおいて ASP6537 及びアスピリンはいずれも血中 TXA₂ 代謝物濃度を低下させた。ASP6537 は PGI₂ 代謝物濃度に対しては有意な低下作用を示さなかったが、アスピリンは 100 mg/kg, p.o.以上の用量で有意に血中 PGI₂ 代謝物濃度を低下させた (Figure 6)。以上から、ASP6537 は老齢ラットにおいてもアスピリンに比べてより選択的に TXA₂ の産生を抑制することが明らかとなった。

ASP6537 の方がより TXA₂ 産生抑制への選択性が高かったものの、ASP6537 及びアスピリンのいずれも TXA₂/PGI₂ 産生抑制作用用量の乖離は正常ラットに

比べて老齡ラットで大きくなっていった。ラットにおいて、若齡では血管での COX-2 は検出限界以下のレベルでしか存在しないが、老化に伴い著しく増加する (Heymes et al., 2000; Matz et al., 2000)。さらに、誘導された COX-2 は、PGI₂ 合成酵素と優先的にカップリングするため、COX-1 よりもより優位に PGI₂ 生合成を促進すると考えられている (Ruan et al., 2011)。ASP6537 及び低用量のアスピリンは、加齡により発現誘導された COX-2 を阻害しなかったため、両化合物とも若齡ラットに比べて老齡ラットで TXA₂/PGI₂ 阻害用量の乖離が大きくなったと推察される。

以上の結果から、生理的条件下、COX-2 誘導下のいずれにおいてもアスピリンと比較して、COX-1 選択的化合物である ASP6537 は TXA₂/PGI₂ バランスを調整し、より PGI₂ 優位に作用することが明らかとなった。ACS 患者は高齡者が多いこと、並びに血管障害に伴う COX-2 の発現増強が起こっていることが想定されるため、ASP6537 は ACS 患者においても同様に、TXA₂ をより選択的に阻害し、PGI₂ 優位に作用することが期待される。以上、ASP6537 はアスピリンジレンマを起こすことなく、心血管イベント予防を目的として使用できる可能性が考えられる。

第2章 血小板凝集並びに血栓形成に対する ASP6537 の作用

第1節 緒言

血小板接着及び凝集は、血栓症の発症において重要な役割を果たしており、アスピリン及び P2Y₁₂ 阻害薬 (クロピドグレル、プラスグレル、チカグレロル) などの抗血小板薬は、ACS の治療に広く用いられている (Lopes, 2011; 2017; Angiolillo et al., 2017)。アスピリンは、血小板 COX-1 阻害作用を介して TXA₂ の産生を抑制することで抗血小板作用を発揮し、ACS 患者における虚血性イベントを抑制する (Awtry and Loscalzo, 2000)。一方、アスピリン単独では、高リスク患者の虚血性イベントを予防するには薬効が十分ではないことも知られている (Collaboration, 2002; Patrono et al., 2005; Lopes, 2011)。

活性化血小板から放出される ADP は血小板の細胞膜にある ADP 受容体 P2Y₁₂ を介して、さらなる血小板凝集を引き起こす。クロピドグレル及びプラスグレルなどのチエノピリジン系抗血小板薬は、P2Y₁₂ への ADP の結合を不可逆的に阻害することで、血小板凝集を阻害し、心筋梗塞または一過性脳虚血発作の予防に有効であることが報告されている (Patrono et al., 2005)。P2Y₁₂ 阻害薬とアスピリンとの併用投与は、冠状動脈疾患、虚血性脳血管疾患、末梢動脈疾患及びアテローム血栓性疾患のリスクが高い患者の虚血性イベントの発症リスクを低減することが種々の臨床試験で明らかにされているが (Markus et al., 2005; Bhatt et al., 2007; Connolly et al., 2009; Squizzato et al., 2017)、同時に重大な出血リスクも上昇する (Diener et al., 2004; Connolly et al., 2009; Zhou et al., 2012; Degrauwe et al., 2017)。

本章では、ASP6537 の *in vitro/ex vivo* 血小板凝集阻害作用を明らかにするとともに、種々の血栓モデルで抗血栓作用を評価し、抗血小板薬としての有用性について検討した。また、ASP6537 と P2Y₁₂ 阻害薬クロピドグレルの併用効果について、モルモット塩化鉄誘発動脈血栓モデルを用いて検討した。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本試験に用いた薬物及び試薬は以下の通りである。

ASP6537 はアステラス製薬株式会社にて合成した。アスピリンは Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA)、クロピドグレル硫酸塩は、Apin Chemicals, Ltd. (Oxfordshire, UK)、アラキドン酸は Biopool (Bray, Co., Wicklow, Ireland)、Type I collagen from equine tendon (Collagen reagent Horm®)は Moriya (Tokyo, Japan)、ADP は、MC Medical (Tokyo, Japan) よりそれぞれ購入した。

2-2 実験動物

雄性 Hartley モルモット (SLC Japan, Inc., Tokyo, Japan) 及び雄性 Wistar ラット (Clea Japan Inc., Tokyo, Japan) を使用した。いずれの試験においても、実験前に一晩絶食させた上で実験に用いた。すべての動物実験は、アステラス製薬株式会社の動物倫理委員会の規則に基づいて実施した。

2-3 *In vitro* 血小板凝集阻害作用

ASP6537 及びアスピリンは DMSO に溶解し、トリス緩衝生理食塩水で希釈し、最終濃度 1% DMSO になるよう調整した。

2-3-1 ヒト血小板を用いた *in vitro* 血小板凝集アッセイ

3.2%クエン酸三ナトリウム溶液を 10% (v/v) になるよう充填したプラスチックシリンジを用いて、健常人ボランティアから 50 ml の血液を採取した。被験者は、採血前に少なくとも 1 週間、医薬品を服用していないことを条件とした。全血を 160×g (Kubota 2420) で 10 分間遠心分離することにより PRP を調製し、PRP をさらに 1,800×g で 10 分間遠心分離することにより、PPP を得た。自動細胞カウンター (MEK-6258) を用いて血小板数を測定し、PRP を同一検体由

来の PPP で希釈することにより、血小板数を $3 \times 10^5 / \mu\text{l}$ に調整した。血小板数を調整した PRP をガラスキュベットに分注し、被験薬を添加して 37°C で 1 分間プレインキュベート後、アラキドン酸 ($0.5\text{-}1.0 \text{ mM}$)、コラーゲン ($0.25\text{~}0.5 \mu\text{g/ml}$) または ADP ($5 \mu\text{M}$) を添加することにより、血小板凝集を誘導した。血小板凝集率は血小板凝集能測定装置 (MCM Hema Tracer 212, MC Medical) を用いて測定し、凝集惹起剤添加後 5 分間 (アラキドン酸及び ADP) または 10 分間 (コラーゲン) における最大凝集率を指標とし、被験薬の血小板阻害活性 (IC_{50}) を算出した。本試験は、アステラス製薬株式会社ヒト組織研究実施規程に則り、ヒト組織研究倫理審査委員会の承認の元、実施した。

2-3-2 モルモット/ラット血小板を用いた *in vitro* 血小板凝集

モルモット/ラットを一晩絶食し、3.2%クエン酸三ナトリウム溶液を 10% (v/v) になるよう充填したプラスチックシリンジを用いてジエチルエーテル麻酔下にて腹部大動脈より採血した。全血を $189 \times \text{g}$ にて 7 分間遠心分離することで PRP を採取し、PRP をさらに $1406 \times \text{g}$ にて 10 分間遠心分離することで PPP を採取した。自動細胞カウンターを用いて血小板数を測定し、PRP を同一個体の PPP で希釈することで血小板数が $3 \times 10^5 / \mu\text{l}$ になるよう調製した。血小板数を調整した PRP に被験薬を添加し、 37°C で 1 分間プレインキュベート後、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ (モルモット) または $5\text{-}10 \mu\text{g/ml}$ (ラット) のコラーゲンを添加して、血小板凝集を誘導した。コラーゲン添加後 10 分間における最大凝集率を指標とし、被験薬の血小板阻害活性 (IC_{50}) を算出した。

2-4 モルモット/ラット *ex vivo* 血小板凝集

被験薬は、使用前に 0.5% MC 溶液に溶解または懸濁させた。一晩絶食させたモルモット/ラットに被験薬または溶媒 (0.5% MC 溶液) を 5 ml/kg となるよう

に経口投与し、ASP6537 及びアスピリンは 1 時間後、クロピドグレルは 2 時間後に、3.2%クエン酸三ナトリウム溶液を 10% (v/v) になるよう充填したプラスチックシリンジを用いてジエチルエーテル麻酔下にて腹部大動脈より採血した。2-3-2 と同様の方法にて PRP を調整し、コラーゲンを 0.5 µg/ml (モルモット) または 5-10 µg/ml (ラット)、もしくは ADP を 1 µM の濃度になるように添加することで血小板凝集を惹起した。コラーゲンは添加後 10 分間、ADP は添加後 5 分間における最大凝集率を指標とし、被験薬の評価を行った。

2-5 モルモット電気刺激誘発頸動脈血栓モデル

ASP6537 及びアスピリンは、使用前に 0.5%MC 溶液に懸濁させ、血栓惹起 1 時間前に、絶食したモルモットに経口投与した。モルモットをケタミン (40 mg/kg, i.p.; Kataral[®], Sankyo Co., Tokyo, Japan) 及びキシラジン (5 mg/kg, i.p.; Seractal[®], Bayer Co., Leverkusen, Germany) にて麻酔し、頸部を切開して左頸動脈を周囲組織より剥離した。直径 1.5 mm の Doppler flow probe (DBF-10R, Primetech Co., Tokyo, Japan) を剥離した頸動脈に装着した後、動脈を 2 mA、30 秒間電気刺激して、血管障害を起こした。頸動脈の血流はドップラー血流速度計 (PDV-20; Crystal Biotech America, Hopkinson, MA, USA) を用いてモニターし、ポリグラフにて 20 分間記録した。頸動脈が閉塞し血流が停止するまでの時間を、閉塞時間 (TTO; time to occlusion) として記録し、抗血栓作用の指標とした。血流が 20 分以上停止しなかった個体は、TTO を 20 分として統計解析を行った。

2-6 ラット動静脈シャント血栓モデル及び出血時間に対する作用

2-6-1 ラット動静脈シャント血栓モデル (Arterio-venous shunt model: A-V shunt model)

ASP6537 及びアスピリンは、使用前に 0.5%MC 溶液に懸濁させ、血栓惹起 1

時間前に、ラットに経口投与した。ウレタン (0.96 g/kg, i.p.) 麻酔下で頸部を切開し、左頸動脈及び右頸静脈を 1 cm 程度、周囲の組織から剥離し、絹糸を含むシャントチューブに接続して、頸動脈-頸静脈シャントを作成し、15 分間血液を灌流することで血栓を形成させた (Figure 7)。

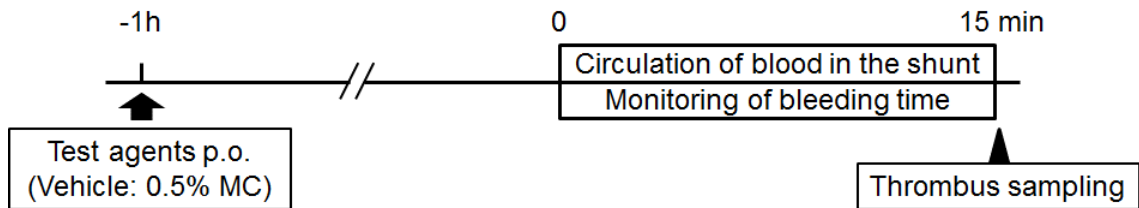


Figure 7. Experimental protocol for the arteriovenous shunt model and bleeding time in rats.

絹糸をシャントから抜き取り、凝固していない血液を生理食塩水で洗い流した後、糸に付着した血栓を 0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液 2 ml に溶解してタンパク質濃度を測定し、付着した血栓量の指標とした。タンパク質濃度は、DC protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。

なお、シャントは長さ 10 cm の SP67 チューブ ([I.D. 0.97 mm, O.D. 1.27 mm]; Natsume, Tokyo, Japan) に絹糸 (No. 1; Shin-Ei Ika Kogyo, Tokyo, Japan) をチューブ内の長さが 9 cm となるように挿入し、SP67 チューブの両端にそれぞれ、12 cm の長さの PE-50 ([I.D. 0.58 mm, O.D. 0.965 mm]; Becton Dickinson, NJ, USA) を接続することで作成した。絹糸に近い方の PE-50 チューブを頸動脈に、反対側を頸静脈に挿入して血液を灌流した (Figure 8)。

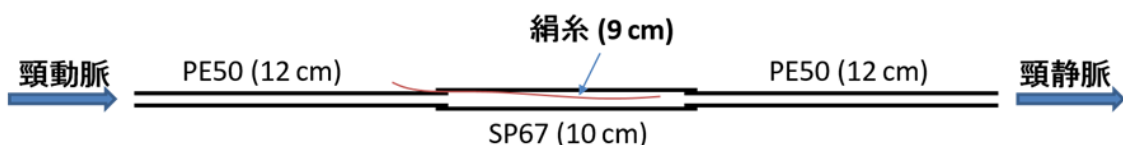


Figure 8. Schema of A-V shunt tube.

2-6-2 出血時間

血液をシャントに灌流し始めると同時に、Surgicutt[®] template bleeding device (International Technidyne, NJ, USA) で左足の裏に切傷を作成した。切開部から流出した血液を 30 秒ごとに濾紙で吸い取り、出血が止まるまでの時間を測定した。15 分以上出血が止まらなかった個体は、出血時間 15 分として統計解析を行った。

2-7 モルモット塩化鉄誘発腹部大動脈血栓モデル

本モデルは、ラット塩化鉄誘発血栓モデルを参考にして作成した(Kurz et al., 1990; Gaddam et al., 2002)。

被験薬は、使用前に 0.5%MC 溶液に懸濁もしくは溶解し、ASP6537 及びアスピリンは血栓惹起 1 時間前に、クロピドグレルは血栓惹起 2 時間前にモルモットに経口投与した。モルモットを血栓惹起の 15 分前にペントバルビタールナトリウム (30 mg/kg, i.p.) を用いて麻酔し、開腹して腹部大動脈を 1 cm 程度、周辺組織から剥離した。単離した血管の下にパラフィルムを敷き、10% FeCl₃ に浸漬した濾紙 (5 mm×4 mm, Advantec; Tokyo, Japan) を血管表面に 10 分間接触させることで血栓を惹起し、濾紙を取り除いた。濾紙を除去してから 45 分後に障害部位を摘出し、血管内の血栓を取り出した (Figure 9)。凝固していない血液を生理食塩水で洗い流した後、0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液 200 µl に溶解してタンパク質濃度を測定し、血栓量の指標とした。タンパク質濃度は、DC protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。

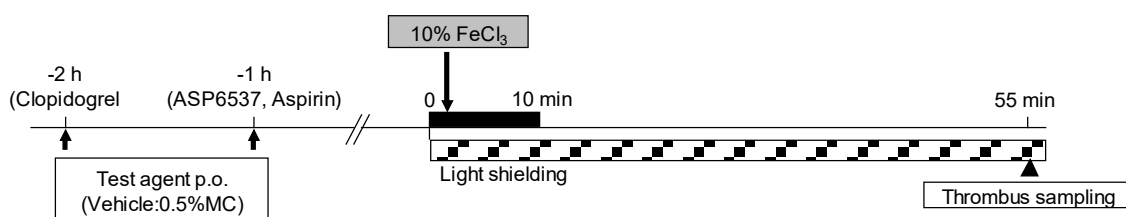


Figure 9. Experimental protocol for the guinea pig model of FeCl₃-induced arterial thrombosis.

2-9 統計学的解析

In vitro 血小板凝集試験における IC₅₀ 値及び 95%信頼区間は、logistic 回帰分析を用いて計算した。

Ex vivo 血小板凝集、ラット動静脈シャント血栓モデル/モルモット塩化鉄誘発腹部大動脈血栓モデルにおける血栓量についての実験成績は、平均値±SEM で示し、統計学的有意性に関しては、Student's paired *t*-test もしくは Dunnett's multiple comparison test より最適な手法を選択して行った。また、クロピドグレルとの ASP6537 の相加効果については、溶媒+クロピドグレル 1 mg/kg, p.o. 群を対照とした Dunnett's multiple comparison test 並びに二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を用いて統計解析を行った。

モルモット電気刺激誘発頸動脈血栓モデルにおける血管閉塞時間及びラットにおける出血時間については、個体ごとの個別値と群ごとの中央値にて表示し、統計学的有意性に関しては、Steel's test を用いた。いずれも、*P* 値<0.05 を有意水準とした。

第3節 実験成績

3-1 *In vitro* 血小板凝集阻害作用

3-1-1 ヒト血小板を用いた *in vitro* 血小板凝集

ASP6537 及びアスピリンのヒト血小板凝集に対する IC₅₀ 値を Table 3 に示した。ASP6537 及びアスピリンは、アラキドン酸及びコラーゲン誘発血小板凝集を阻害したが、ADP 誘発血小板凝集は阻害しなかった。

Table 3. Inhibitory effects of ASP6537 and aspirin on platelet aggregation in human PRP

Inducers	Geometric mean of IC ₅₀ value (μM) (95% confidence intervals)	
	ASP6537	Aspirin
Arachidonic acid	0.0666 (0.0595–0.0745)	342 (278–420)
Collagen	0.0666 (0.0366–0.121)	232 (72.4–743)
ADP	>10	>1000

Data were calculated from 4 separate experiments.

3-1-2 モルモット/ラット血小板を用いた *in vitro* 血小板凝集

ASP6537 及びアスピリンのモルモットまたはラット血小板における *in vitro* 血小板凝集に対する IC₅₀ 値を Table 4 に示した。ASP6537 及びアスピリンは、モルモット・ラットいずれの動物種においても、コラーゲン誘発血小板凝集を阻害した。

Table 4. Inhibitory effects of ASP6537 and aspirin on collagen-induced platelet aggregation in guinea pig and rat PRP

Animal species	n	Geometric mean of IC ₅₀ value (μM) (95% confidence intervals)	
		ASP6537	Aspirin
Guinea pig	5	0.00835 (0.00230-0.0303)	42.3 (28.0-63.8)
Rat	4	9.46 (5.64–15.9)	171 (144–204)

3-2 *Ex vivo* 血小板凝集

3-2-1 モルモット *ex vivo* 血小板凝集に対する ASP6537 及びアスピリンの阻害作用

モルモット *ex vivo* における ASP6537 及びアスピリンの血小板凝集阻害作用を Figure 10 に示した。いずれの化合物も、コラーゲン誘発血小板凝集を用量依存的に阻害し ASP6537 は 3 mg/kg, p.o.、アスピリンは 100 mg/kg, p.o.以上の用量で有意な差が認められた。

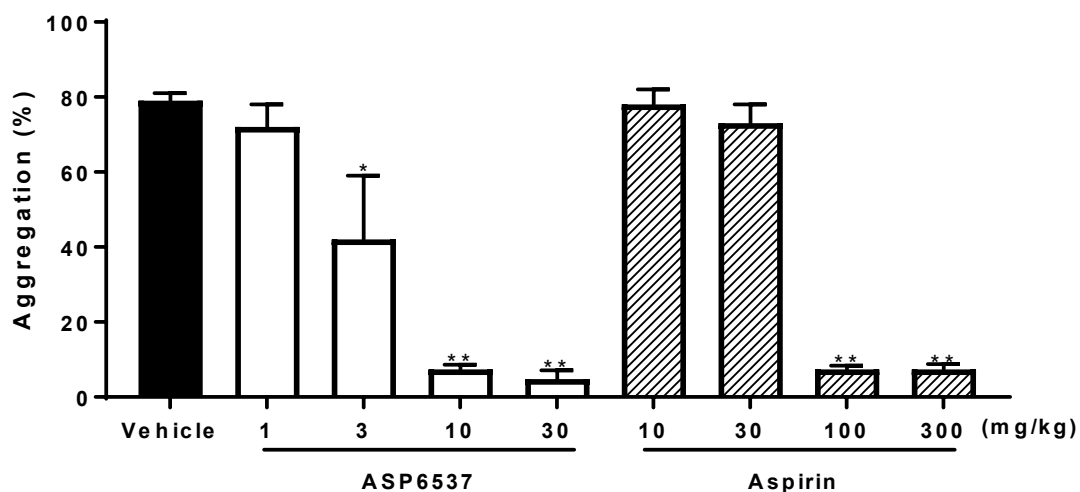


Figure 10. Effect of ASP6537 and aspirin on platelet aggregation induced *ex vivo* by collagen in guinea pigs.

Data represent the mean \pm SEM of 5 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ in comparison with the vehicle-treated group (Dunnett's multiple comparison test).

3-2-2 モルモット *ex vivo* 血小板凝集に対するクロピドグレルの阻害作用

モルモット *ex vivo* におけるクロピドグレルの血小板凝集阻害作用を Figure 11 に示した。クロピドグレルは、コラーゲン及び ADP いずれの凝集惹起物質の場合においても血小板凝集を用量依存的に阻害し、コラーゲン誘発血小板凝集については 30 mg/kg, p.o.、ADP 誘発血小板凝集については 3 mg/kg, p.o.以上の用量で有意な差が認められた。

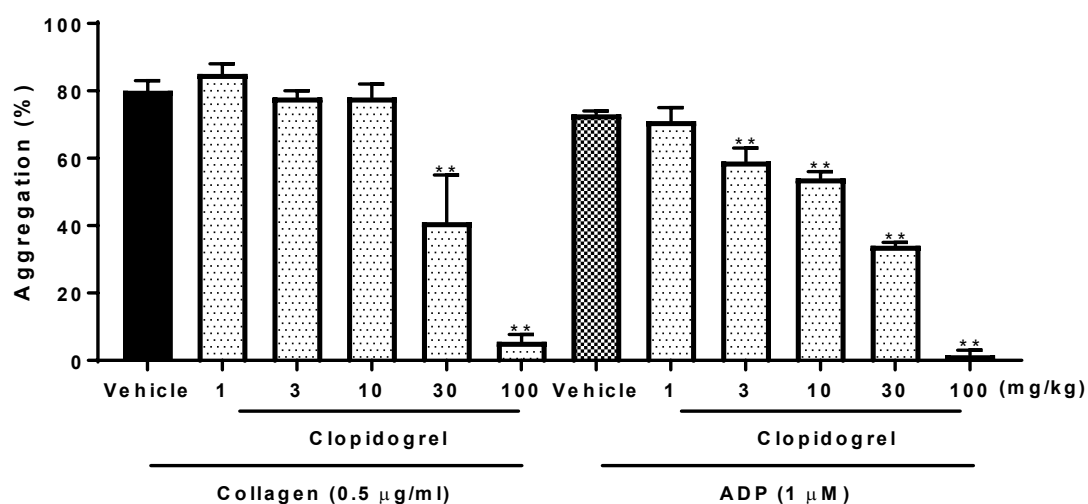


Figure 11. Effect of clopidogrel on platelet aggregation induced *ex vivo* by ADP and collagen in guinea pigs.

Data represent the mean \pm SEM of 4 animals. ** $P < 0.01$ in comparison with the vehicle-treated group (Dunnett's multiple comparison test).

3-2-3 ラット *ex vivo* 血小板凝集阻害

ラット *ex vivo* における ASP6537 及びアスピリンの血小板凝集阻害作用を Figure 12 及び 13 に示した。いずれの化合物も、コラーゲン誘発血小板凝集を用量依存的に阻害し、ASP6537 は 10 mg/kg, p.o.、アスピリンは 30 mg/kg, p.o.以上の用量で有意な差が認められた。

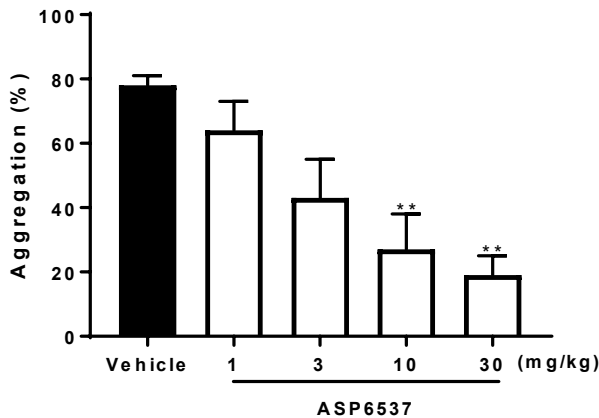


Figure 12. Effect of ASP6537 on platelet aggregation induced *ex vivo* by collagen in rats.

Data represent the mean \pm SEM. of 4 animals. ** $P < 0.01$ in comparison with the vehicle-treated group (Dunnett's multiple comparison test).

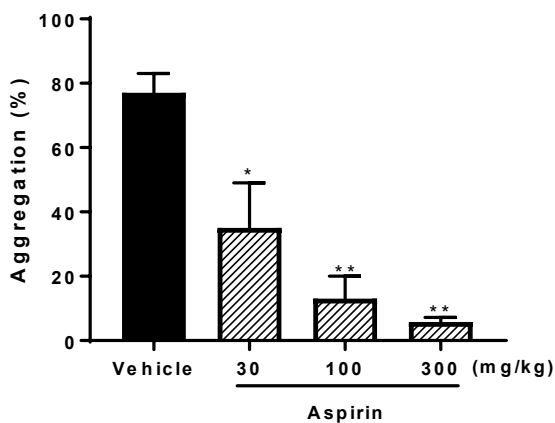


Figure 13. Effect of Aspirin on platelet aggregation induced *ex vivo* by collagen in rats.

Data represent the mean \pm SEM. of 5 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ in comparison with the vehicle-treated group (Dunnett's multiple comparison test).

3-3 モルモット電気刺激誘発頸動脈血栓モデル

モルモット電気刺激誘発頸動脈血栓モデルにおける ASP6537 及びアスピリンの TTO を Figure 14 に示した。Vehicle 群においてはいずれの個体でも、電気刺激後に頸動脈血流が徐々に減少し、10 分以内に閉塞した。ASP6537 では用量依存的に TTO の延長が認められ、3 mg/kg, p.o.以上の用量で有意な TTO の延長が認められた。一方、アスピリンでは用量依存的に TTO を延長する傾向は認められたものの、300 mg/kg, p.o.においても有意な差は認められなかった。

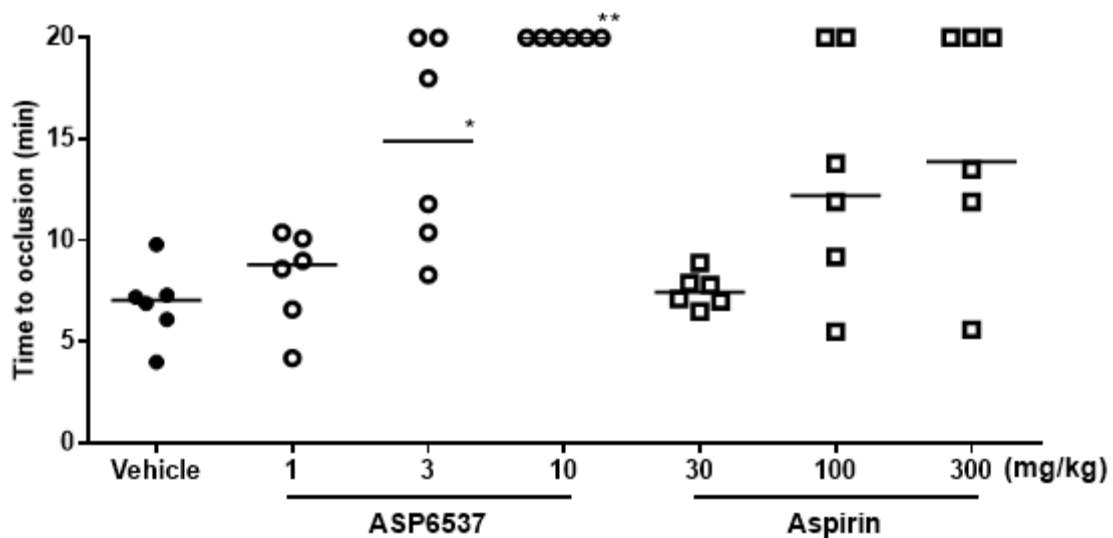


Figure 14. Antithrombotic effects of ASP6537 and aspirin in an electrically induced carotid arterial thrombosis model in guinea pigs.

The effects of ASP6537 and aspirin on time to occlusion (TTO) in an electrically induced carotid arterial thrombosis model in guinea pigs were evaluated at the indicated doses of the two drugs. TTO longer than 20 min was recorded as 20 min for statistical analysis. Circles represent the TTO in each animal. Bars indicate the median values in each experimental group (n=6). Statistical analyses were performed using Steel's test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the control group.

3-4 ラット動静脈シャント血栓モデル及び出血時間に対する作用

ラット動静脈シャント血栓モデルにおける ASP6537 またはアスピリンの作用を Figure 15A 及び B に示した。ASP6537 及びアスピリンは、いずれも用量依存的に絹糸に付着した血栓の量を減少させ、ASP6537 は 3 mg/kg, p.o.、アスピリンは 100 mg/kg, p.o.以上の用量で有意な差が認められた。

ラット足底切創出血時間に対する ASP6537 及びアスピリンの作用を Figure 15C 及び D に示した。いずれの化合物も投与された用量範囲では出血時間を延長しなかった。

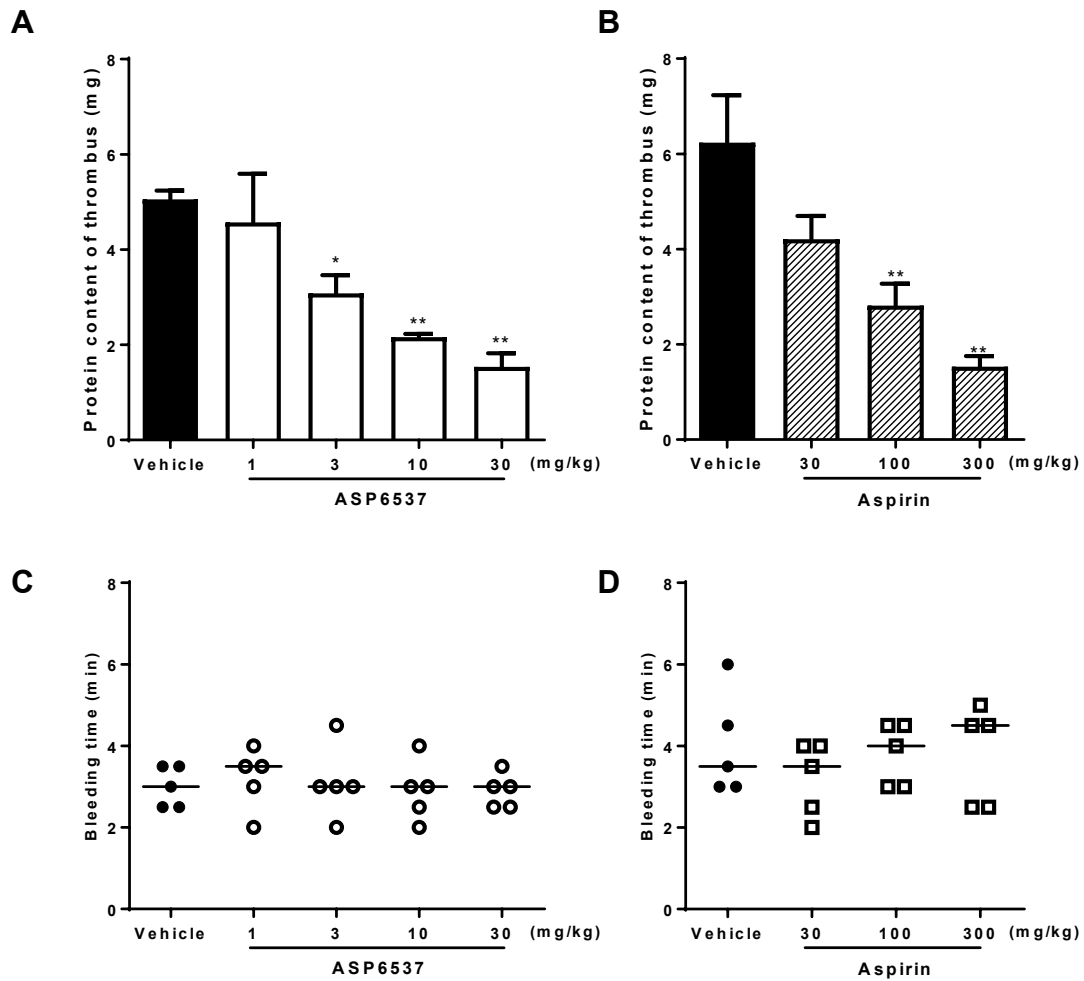


Figure 15. Antithrombotic effects of (A) ASP6537 and (B) aspirin in reducing the thrombus protein content after oral administration in the rat arteriovenous shunt thrombosis model, and effects of (C) ASP6537 and (D) aspirin on bleeding time in rats after a single administration.

(A), (B): Data represent the mean \pm SEM of 5 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the vehicle-treated group (Dunnett's multiple comparison test). (C), (D): Circles and squares represent the bleeding time of each animal. Bars indicate the median values in each experimental group. Each group consists of 5 animals. Statistical analyses were performed using Steel's test compared with the vehicle-treated group.

3-5 モルモット塩化鉄誘発腹部大動脈血栓モデル

モルモット塩化鉄誘発腹部大動脈血栓モデルにおける ASP6537、アスピリン及びクロピドグレルの単独投与での抗血栓作用を Figure 16A に示した。いずれの化合物も、用量依存的に形成された血栓の量を減少させ、ASP6537 は 3 mg/kg, p.o.、アスピリンは 100 mg/kg, p.o.、クロピドグレルは 3 mg/kg, p.o.以上の用量で有意な差が認められた。

クロピドグレル 1 mg/kg, p.o.と併用した場合の ASP6537 の効果を Figure 16B に示した。ASP6537 はクロピドグレル 1 mg/kg, p.o.単独投与と比較して、用量依存的に血栓形成を阻害し、1 mg/kg, p.o.以上の用量で有意な作用を示した。また、二元配置分散分析により、ASP6537 単独群とクロピドグレル併用群において有意な交互作用が認められなかったことから、ASP6537 はクロピドグレルに対して相加的な作用を有していることが示唆された。

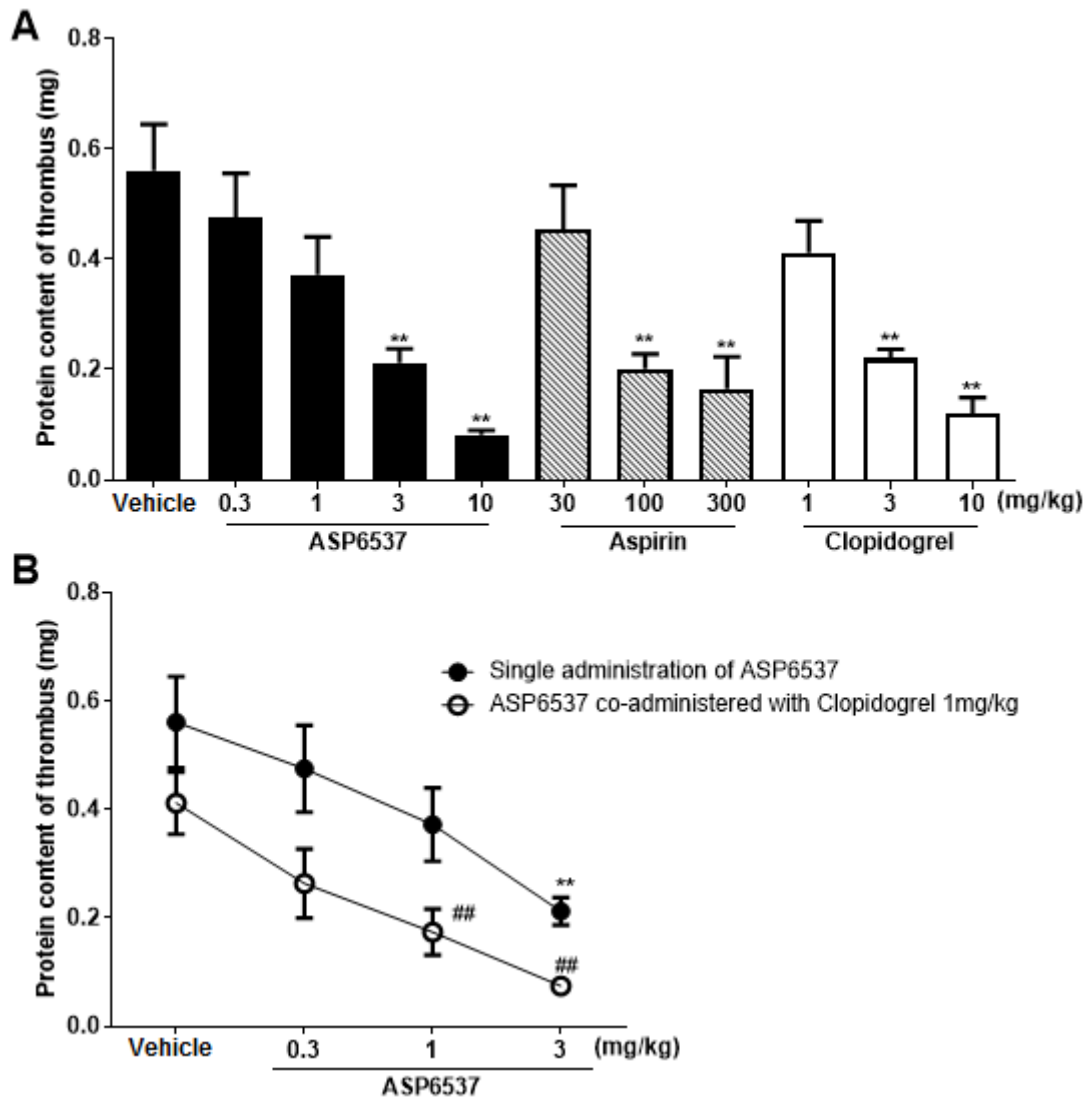


Figure 16. (A) Antithrombotic effects of ASP6537, aspirin, and clopidogrel after single administration, and (B) additive antithrombotic effect of ASP6537 with clopidogrel in a FeCl₃-induced arterial thrombosis model.

Data represent the mean \pm SEM of 5 animals. In the single administration study: ** $P < 0.01$ when compared with the vehicle-treated group. In co-administration of ASP6537 with clopidogrel: ## $P < 0.01$ when compared with vehicle (0.5% MC solution) + clopidogrel 1 mg/kg co-administered group.

第4節 考察

本章ではASP6537及びアスピリンの抗血小板凝集作用並びに抗血栓作用に関して諸種モデルを用いて検討した。また、臨床においてASP6537はP2Y₁₂受容体阻害薬と併用される可能性が高いことから、クロピドグレルとの併用効果についても検討した。

In vitro ヒト血小板凝集試験において、ASP6537及びアスピリン共にADP誘発血小板凝集は阻害しなかったが、アラキドン酸及びコラーゲン誘発血小板凝集は阻害した。ASP6537はアスピリンと比較して、アラキドン酸凝集をIC₅₀比で約5100倍、コラーゲン凝集をIC₅₀比で3400倍以上強力に阻害した。モルモット及びラット血小板を使用した*in vitro* コラーゲン誘発血小板凝集試験においてもアスピリンより強力な作用が認められたが、ASP6537のラット血小板凝集阻害活性は、ヒト及びモルモットに比して弱く、これは種差によるものと考えられた。

電気刺激誘発頸動脈血栓モデルは、抗血小板薬の評価に広く汎用されている (Kawasaki et al., 1998; Mousa et al., 1999; Lorrain et al., 2004; Wong et al., 2009)。ASP6537は、モルモット電気刺激誘発頸動脈血栓モデルにおいて強力な抗血栓作用を示し、用量依存的にTTO延長し、3 mg/kg, p.o.以上の用量で有意差が認められた。3 mg/kg, p.o.はASP6537がモルモット血小板凝集を有意に阻害する用量と同等である。一方、アスピリンはTTOを延長する傾向は認められたものの、300 mg/kg, p.o.においても有意な差は認められなかった。アスピリンはモルモット血小板凝集を100 mg/kg, p.o.以上の用量で阻害するため、モルモット電気刺激誘発頸動脈血栓モデルでの抗血栓用量との間に乖離が認められる。電気刺激誘発頸動脈血栓症モデルにおいて、アスピリンの薬効が不十分であることは他の研究グループからも報告されている (Mousa et al., 1999; Lorrain et al., 2004)。アスピリンにおいて認められる電気刺激誘発血栓形成阻害作用と抗血小板作用との

乖離の理由については明らかになっていないが、第 1 章で検証したように、ASP6537 は COX-1 選択性が高く、TXA₂ 産生をより選択的に抑制でき、且つそのような乖離が認められないことから、アスピリンの高用量投与時における血管壁からの PGI₂ 産生抑制作用 (アスピリンジレンマ) が乖離の一因となっている可能性が考えられる。

ラット A-V シヤントモデルは、血栓症予防を目的とした薬剤の評価に広く使用されている血栓モデルであり、アスピリン、P2Y₁₂ 阻害薬などの抗血小板薬や Factor Xa 阻害薬などの抗凝固薬が、このモデルにて有効性を示す(Iwatsuki et al., 2011; Sugidachi et al., 2013; Perzborn et al., 2015)。

ASP6537 及びアスピリン共に本モデルにおいて、用量依存的な血栓形成阻害作用を示し、ASP6537 は 3 mg/kg, p.o.、アスピリンは 100 mg/kg, p.o.以上の用量で有意であった。ASP6537 はラット *ex vivo* 血小板凝集試験において 10 mg/kg, p.o.より抗血小板活性を示したため、ラット抗血小板作用とラット A-V シヤントモデルでの最小有効用量に乖離があるように考えられるが、ASP6537 3 mg/kg, p.o.投与時におけるラット *ex vivo* 血小板凝集阻害率は約 45%、モルモット血栓モデルの最小有効用量 3 mg/kg, p.o.における *ex vivo* モルモット血小板凝集阻害率は約 47%であることから、統計学的な有意差はないものの、ASP6537 3mg/kg, p.o.はラットにおいても薬理的に血栓形成阻害を示すのに十分な用量であったと考えられる。アスピリンは、ラット *ex vivo* 血小板凝集阻害試験における抗血小板作用と同等の用量でラット A-V シヤントモデルにおける抗血栓作用を示している。なお、同一個体を用いて足底切創からの出血時間を測定したが、ASP6537 及びアスピリンとも、本試験で抗血栓作用を検討した用量範囲では出血時間を延長しなかった。

つぎに、ASP6537、アスピリン及びクロピドグレルの抗血栓作用をモルモット FeCl₃ 誘発血栓モデルで検討した。いずれの薬剤も用量依存的な血栓量低下作用

を示し、ASP6537は3 mg/kg, p.o.、アスピリンは100 mg/kg, p.o.、クロピドグレルは3 mg/kg, p.o.以上の用量で有意であった。これらの最小有効用量はASP6537とアスピリンは、コラーゲン誘発血小板凝集阻害作用と同等の用量、クロピドグレルはADP誘発血小板凝集阻害作用と同等の用量であった。

しかし、ASP6537投与群とアスピリン投与群の血栓量を比較すると、それぞれ中用量群 (ASP6537 3 mg/kg, p.o.、アスピリン 100 mg/kg, p.o.) では平均血栓量がほぼ同等であったのに対し、高用量群 (ASP6537 10 mg/kg, p.o.、アスピリン 300 mg/kg, p.o.) ではアスピリンの平均血栓量がASP6537の約2倍であった。すなわち、アスピリンでは高用量において頭打ち傾向があると考えられる。実際、モルモットの電気刺激誘発腸間膜動脈血栓症モデルにおいて、アスピリンの抗血栓効果が100 mg/kg, p.o.でプラトーに達することが報告されている(Fujitani et al., 1986; Sakata et al., 2013)。ただし、今回試験実施したモデルにおいても電気刺激誘発腸間膜動脈血栓症モデルと同様、アスピリンの薬効が頭打ちになるか否かについて検討するためには、さらなる高用量の評価が必要である。ASP6537とアスピリンの最大薬効に差が生じるメカニズムは不明であるが、前述の電気刺激誘発血栓モデル評価結果同様、ASP6537ではCOX-1選択性が高くTXA₂産生をより選択的に抑制できることが、アスピリンのような頭打ち現象が起こらない要因になっている可能性が考えられる。

本章では、3種類の血栓モデルを用いて、ASP6537とアスピリンの抗血栓作用を比較検討した。電気刺激誘発血栓モデルにて形成される血栓は、主に血小板とフィブリンでできているが(Kawasaki et al., 1993)、A-Vシャントモデル並びに塩化鉄誘発血栓モデルにて形成される血栓は主にフィブリン、赤血球、血小板の混合物である(Vogel et al., 1989; Peters et al., 1991; Eckly et al., 2011)。また、その血栓形成過程もモデルによって異なる。電気刺激誘発血栓モデルにおいては、電気刺激をした部位の血管平滑筋細胞が障害されるとともに損傷した内皮細胞が管

腔に露出し、露出した障害部位に血小板が接着し、そして重合することで血小板リッチな血栓が形成される(Carmeliet et al., 1997)。A-V シャントモデルでは、絹糸への血小板の接着から始まり、活性化された血小板が重合してできる血小板凝集塊が凝固カスケードを活性化し、赤血球及びフィブリンを巻き込んで血栓が成長する(Vogel et al., 1989; Peters et al., 1991)。塩化鉄誘発血栓モデルでは、FeCl₃が血管壁を通過して内皮細胞まで浸透し、活性酸素を発生させることで血管内皮細胞を障害する。障害された内皮細胞は管腔に露出し、その内皮細胞に血小板が付着して血栓の形成が始まる。同時に障害された内皮細胞が Tissue factor/thrombin を産生して凝固カスケードを活性化し、結果として血小板、赤血球及びフィブリンから成る血栓が形成される(Eckly et al., 2011)。ASP6537 はこれらすべてのモデルにおいて抗血栓作用を示したことから、臨床においても、高血糖に起因する血管内皮細胞障害、高血圧に伴うシェアストレス増加による血小板活性化及びステントなどの血管内異物に対する反応など、様々な病態生理学的状態において血栓形成を阻害することが期待される。また、血管内皮細胞の障害を伴う電気刺激誘発血栓モデル及び塩化鉄誘発血栓モデルにおいて、高用量アスピリンは明確な効果を示さなかったが、血管障害を伴わない A-V シャントモデルにおいては明らかな効果を示した。各種モデルの血栓形成部位における COX-2 の発現を精査する必要があるが、高用量のアスピリンが障害された内皮細胞 (もしくは血管平滑筋細胞) における COX-2 の作用を阻害し、結果として PGI₂ の産生を低下させることで、TXA₂ 阻害に基づく抗血栓作用が相殺されている可能性も考えられる。

ASP6537 及びクロピドグレルの併用効果は、モルモット FeCl₃ 誘発血栓モデルを用いて検討した。ASP6537 はクロピドグレル 1 mg/kg, p.o.との併用において血栓のタンパク質含量を用量依存的に減少させ、1 mg/kg, p.o.以上の用量で有意であった。また、ASP6537 とクロピドグレルとの併用効果は相加的であった。以

上、臨床においても ASP6537 及びクロピドグレルの併用投与は、より強い抗血栓作用を示すことが期待される。一方、アスピリンとクロピドグレルの併用投与は臨床における出血リスクの増大が懸念されている(Zhou et al., 2012; Thomson and Anderson, 2013)。ASP6537 及びクロピドグレルの併用投与による出血リスク評価は、今後臨床試験にて確認する必要がある。

第3章 新生内膜形成に対する ASP6537 の作用

第1節 緒言

虚血性心疾患の治療の一つとして、動脈硬化やアテローム血栓などにより狭窄または閉塞した冠動脈を拡張あるいは再建し、血流を回復させる治療が行われている。主にカテーテルによる冠動脈形成術と外科的に新しい血管をつなげて冠動脈血流を再建する冠動脈バイパス術が存在するが、特に侵襲度の低い PCI を行う患者が増えている(Buntaine et al., 2016; Doenst et al., 2016)。

PCI では、冠動脈狭窄部位にバルーンカテーテルを挿入し、バルーンを膨らませることによって狭窄部を直接拡張した後、ステントと呼ばれる小さな金属製の筒を狭窄部に留置することで血流を確保するのが一般的である。PCI においては、術中またはステント挿入後に発生する急性閉塞性血栓症と、回復の過程で発生する新生内膜過形成に起因する血管内腔の再狭窄がしばしば問題となる。血管内に留置されたステントそのもの及び血管拡張術によって物理的に障害された内皮細胞と血小板との相互作用により、血管壁やステントへの血小板接着が起り、血小板のさらなる活性化及び凝集を引き起こす。活性化した血小板は凝固カスケードも活性化し、結果として急性閉塞性血栓症が引き起こされる(Gillette et al., 2016)。また、血小板の活性化は白血球遊走を誘導する。病変部位に集積した活性化血小板及び白血球によって放出される成長因子及びサイトカインは、血管平滑筋細胞の遊走及び増殖を引き起こし、結果として新生内膜形成が促進され、血管の再狭窄をもたらす(Luscher et al., 2007; Qiu et al., 2014)。

PCI 後の急性血栓症予防を目的として、アスピリンと P2Y₁₂ 受容体阻害薬の併用療法がガイドラインにて推奨されている(Mehran et al., 2013; Reejhsinghani and Lotfi, 2015; Sommer and Armstrong, 2015)。向血栓性の TXA₂ と抗血栓性 PGI₂ のバランスは、血栓形成だけでなく新生内膜過形成においても中心的な役割を果たしている(Craven et al., 1996; Zucker et al., 1998; Clapp et al., 2002; Fujino et al., 2002;

Imai et al., 2007; Feng et al., 2016)。第 1 章にて検証したとおり、ASP6538 はより TXA₂ 選択的な産生抑制作用を示すことから、新生内膜過形成に対しても抑制的な作用を示すことが期待される。そこで、ASP6537 が血管損傷後の再狭窄に有効であるか否かを検討するため、ラットバルーン障害誘発内膜肥厚モデルを用いて、新生内膜形成に対する ASP6537 の作用を検討した。

第 2 節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本試験に用いた薬物及び試薬は以下の通りである。

ASP6537 はアステラス製薬株式会社にて合成した。アスピリン及びカプトプリルは、Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA) より購入した。各被験薬は、投与直前に 0.5%MC 溶液に溶解または懸濁させて使用した。

2-2 実験動物

雄性 Wistar ラットは Clea Japan Inc.(Tokyo, Japan) より購入し、餌及び水を自由に摂取できる環境下にて飼育した。すべての動物実験は、アステラス製薬株式会社の動物倫理委員会の規則に基づいて実施した。

2-3 ラット頸動脈バルーン障害誘発内膜肥厚モデル

ラットをペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) にて麻酔した後、頸部を切開して右頸動脈を周囲組織より剥離し、Indolfi らの報告の手順に従ってバルーン障害を施した(Indolfi et al., 1995)。すなわち、バルーンを右頸動脈より導入し、大動脈弓到達直前まで挿入した後、膨張させて頸動脈内腔を 3 回擦過することで血管内膜を障害した。バルーンは 2F-Fogarty balloon catheter (Baxter, Deerfield, IL, US) を用いた。

ASP6537 (3、10、30 mg/kg, twice daily: bid)、アスピリン (30、100 mg/kg, once daily: od) またはカプトプリル (100 mg/kg, od) は、バルーン障害 1 日前から投与開始し、14 日間毎日経口投与した。また、バルーン障害手術の日は、各薬物を手術 1 時間前に投与した。

バルーン障害手術から 14 日後、ラットをペントバルビタールにて麻酔し、太めのカニューレを左心室に留置して、10 U/ml ヘパリン含有 PBS (pH 7.2) 150 ml で全身灌流した。続いて 4%パラホルムアルデヒド含有 PBS 100 ml で灌流することで血管を固定し、外頸動脈分岐部から心臓側に向かって約 1 cm の部位より約 5 mm の動脈サンプルを切り出した。切り出した動脈は 4%パラホルムアルデヒド含有 PBS にて後固定をした後、パラフィン包埋した。

パラフィン包埋されたサンプルより 6 μ m の厚さの切片を作成し、10 枚ごとに 1 枚ずつ画像解析用切片として採取した。すなわち、60 μ m ごとに 6 μ m の切片を切り出し、1 個体の動脈サンプルあたり 6-10 個の断面を採取した。切り出した切片をヘマトキシリン及びエオシンで染色し、中央の 3 つの組織標本について、画像解析を実施し、その平均値を個体値として統計学的解析に用いた。

画像解析は、NIH 画像解析システム (Image J image-processing program; National Institute of Mental Health, MD, USA) を内蔵した光学顕微鏡を用いて、盲検下で行った。外弾性板 (EEL) 内側の面積、内弾性板 (IEL) 内側の面積及び管腔 (Luminal area) の面積を測定し、中膜面積 (Medial area) は外弾性板と内弾性板に挟まれる領域の面積として定義し、新生内膜面積 (Neointimal area) は内弾性板内側で新生内膜により占められる面積と定義し、新生内膜面積と中膜面積の比 (Intima/Media ratio: I/M ratio) を算出した。管腔の狭窄率 (Lumina stenosis) は、以下の式によって計算した (Figure 17)。

狭窄率 (%) = 新生内膜面積 / 内弾性板内側の面積 \times 100

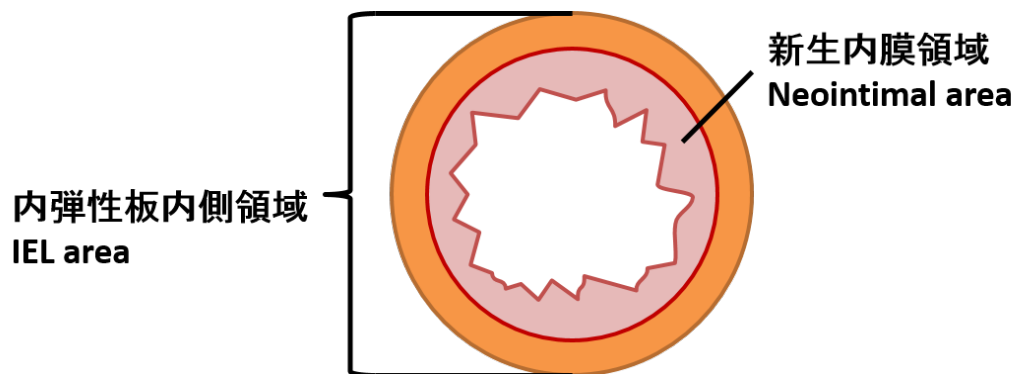


Figure 17. Calculation of luminal stenosis

Luminal stenosis was calculated according to the following formula: $\text{intimal area} / \text{within IEL area} \times 100$. IEL: internal elastic lamina

2-4. 統計解析

実験成績は、平均値 \pm SEM で示し、統計学的有意性に関しては、Student's paired *t*-test もしくは Dunnett's multiple comparison test より最適な手法を選択して行った。いずれも、*P* 値 <0.05 を有意水準とした。

第3節 実験成績

3-1 ラット頸動脈バルーン障害誘発内膜肥厚モデル

血管の組織標本のヘマトキシリン-エオシン染色を施したときの典型例を Figure 18 に示した。未処理群 (Figure 18A) に比べてバルーンにて擦過したコントロール群 (Figure 18B) では、顕著な新生内膜の形成が観察された。

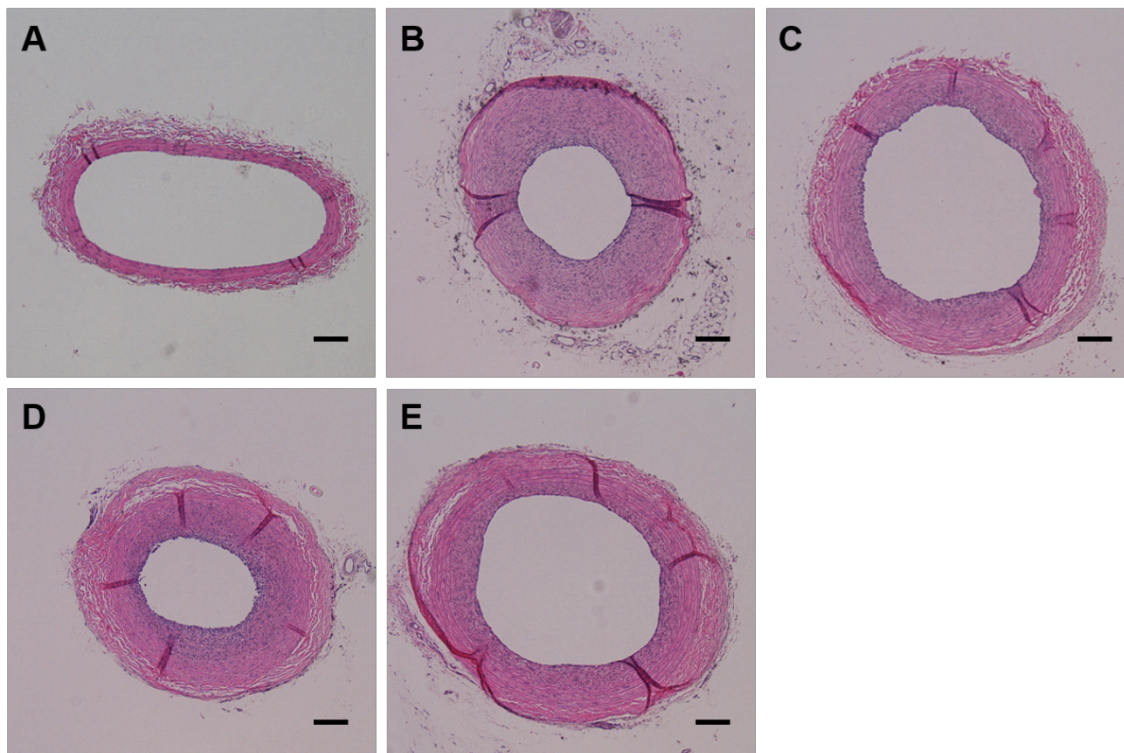


Figure 18. Hematoxylin-eosin stained sections of rat carotid arteries after balloon injury.

Sham-operated animals (A) and those treated with vehicle (B), ASP6537 at 30 mg/kg, bid (C), aspirin 100 mg/kg, od (D), and captopril 100 mg/kg, od (E). All agents were administered orally for 14 days. Bar: 100 μ m

また、ASP6537、アスピリン、カプトプリルの新生内膜面積、中膜面積、I/M ratio 及び狭窄率に対する作用を、Table 5 に示した。ASP6537 及びアスピリンは用量依存的に、新生内膜面積、I/M 比及び狭窄率を低下させた。ASP6537 は新生内膜面積及び I/M 比を 30 mg/kg, bid, 狭窄率を 10 mg/kg, bid 以上の用量で有意に阻害した。アスピリンは新生内膜面積並びに I/M 比については 100 mg/kg, od まで有意な作用を示さなかったが、狭窄率については 100 mg/kg, od で有意な阻害作用を示した。本モデルの陽性対照薬として用いたカプトプリルは、100 mg/kg, od の用量で新生内膜面積、I/M 比及び狭窄率に対して有意な阻害作用を示した。中膜面積についてはいずれの被験薬も明らかな作用を示さなかった。

Table 5. Inhibitory effect of ASP6537 on neointima formation in rats.

Treatment group	Neointimal area (mm ²)	Medial area (mm ²)	I/M ratio	Ratio of stenosis (%)
Vehicle	0.153 ± 0.013	0.109 ± 0.004	1.40 ± 0.10	62.5 ± 2.6
ASP6537 3 mg/kg, bid	0.148 ± 0.015	0.112 ± 0.004	1.31 ± 0.11	55.3 ± 3.0
ASP6537 10 mg/kg, bid	0.130 ± 0.012	0.114 ± 0.004	1.14 ± 0.10	49.1 ± 3.5**
ASP6537 30 mg/kg, bid	0.112 ± 0.006*	0.111 ± 0.003	1.01 ± 0.06*	43.7 ± 2.2**
Aspirin 30 mg/kg, od	0.153 ± 0.013	0.115 ± 0.003	1.34 ± 0.13	59.7 ± 3.2
Aspirin 100 mg/kg, od	0.134 ± 0.009	0.112 ± 0.005	1.18 ± 0.05	51.2 ± 2.3*
Captopril 100 mg/kg, od	0.111 ± 0.012 [#]	0.107 ± 0.004	1.02 ± 0.10 [#]	43.1 ± 5.1 ^{##}

Mean ± SEM of 9 or 10 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle-treated group in the Dunnett's multiple comparison test for ASP6537 or aspirin. [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs. vehicle-treated group in the Student's *t*-test for captopril.

第 4 節 考察

本章では新生内膜形成に対する ASP6537 及びアスピリンの作用について、ラット頸動脈バルーン障害誘発内膜肥厚モデルを用いて検討した。

本モデルにおいて、ASP6537 は、新生内膜形成を阻害した。TXA₂ や PGI₂ に代表されるプロスタグランジン類は、アテローム性動脈硬化症の患者や PCI 施術後において増加することが報告されている (Braden et al., 1991; Belton et al., 2000; Kearney et al., 2004)。また、血管平滑筋細胞 (Vascular smooth muscle cells: VSMC) の増殖は動脈硬化の進展や新生内膜過形成において重要な役割を果たしているが、TXA₂ は VSMC の増殖を促進し (Craven et al., 1996; Zucker et al., 1998; Fujino et al., 2002; Feng et al., 2016)、PGI₂ は VSMC の増殖を阻害することがそれぞれ報告されている (Clapp et al., 2002; Fujino et al., 2002; Imai et al., 2007)。

第 1 章で検証した通り、ASP6537 は *in vivo* TXA₂ 産生を抑制した。また、選択的 COX-1 阻害薬 SC-560 やアスピリンにおいても本試験と同様のバルーン障害モデルや PCI 施術後の患者で、血中の TXA₂ を低下させる (Connolly et al., 2002;

Kearney et al., 2004)。さらに、COX-1 阻害薬だけでなく、TXA₂ 阻害薬も様々なモデルにおいて新生内膜形成を阻害することが報告されている(Pratico et al., 2001; Connolly et al., 2002; Ishizuka et al., 2004)。以上の事から、ASP6537 はラット頸動脈バルーン障害誘発内膜肥厚モデルにおいて、TXA₂ の産生を阻害することにより、血管内腔に遊走してきた VSMC の増殖を阻害し、新生内膜形成阻害作用を示したことが示唆される。また、TXA₂ は直接作用として VSMC の増殖を促進するだけでなく、さらなる血小板の活性化を引き起こす。活性化した血小板は血管障害部位に接着して各種成長因子を放出することで、血栓症の発症だけでなく、新生内膜の過形成にも関与すると考えられる(Clowes and Reidy, 1991; Ross, 1993)。臨床においても、ASP6537 などの COX-1 阻害薬は TXA₂ 産生と血小板活性化を阻害することにより、PCI 後の急性閉塞性血栓のみならず、再狭窄予防に有用である可能性が考えられる。

前述の通り、PCI 後の急性血栓症予防を目的としてアスピリン及び P2Y₁₂ 阻害薬の併用が推奨されている(Mehran et al., 2013; Reejhsinghani and Lotfi, 2015; Sommer and Armstrong, 2015)。第 2 章にて検証した通り、ASP6537 はモルモット血栓モデルにおいて、P2Y₁₂ 阻害薬であるクロピドグレルに対して相加的な抗血栓作用を示した。また、血管内膜肥厚モデルにおける両剤の併用効果は直接評価していないが、ASP6537 はアスピリンより特異的かつ強力な COX-1 阻害薬である。以上の事から、ASP6537 は、PCI 患者の治療においてアスピリンに代替できる抗血小板薬になることが期待される化合物である。

第4章 ASP6537 及びアスピリンの利便性及び副作用に対する比較検討

第1節 緒言

アスピリンは抗血小板薬として最も広く使用されている薬剤であるが、いくつかの欠点がある。第一に、イブプロフェンなどの NSAID との相互作用が挙げられる。NSAID をアスピリンと共に投与すると、アスピリンの血小板阻害作用が減弱する。アスピリンは血栓性イベント予防のため、長期間にわたり投与される薬剤であることから、この薬物相互作用は好ましくないと考えられる(Catella-Lawson et al., 2001; Gaziano and Gibson, 2006; Anzellotti et al., 2011)。第二に、アスピリンによる抗血小板作用の非可逆性が挙げられる。アスピリン休薬後の血小板凝集能の回復率は、3日目で約50%、4日目で約80%の患者にとどまり、これはアスピリンが血小板 COX-1 を非可逆的に阻害することに起因すると考えられる。このため、外科手術や抜歯など、出血リスクのある治療をする際には、7-10日間の休薬期間が必要となり(Jimenez et al., 1992; Ferrandis et al., 2009)、その間の血栓症発症リスクの増大が懸念される。第三に、長期間投与に伴う胃粘膜障害発生率の増加が挙げられる。アスピリンに代表される非選択的 NSAIDs は胃粘膜障害を引き起こす(Garcia Rodriguez and Hernandez-Diaz, 2004; Tomisato et al., 2004)。1990年代には、胃粘膜上皮の COX-1 を阻害することで、胃粘膜保護を担うプロスタグランジン類の産生を抑制し、結果的に胃粘膜保護作用が低下すると考えられており(Kargman et al., 1996; Vane et al., 1998)、これが非選択的 NSAID に代わる抗炎症薬として選択的 COX-2 阻害薬の開発が活発化した要因であった。しかし2000年代になり、選択的 COX-2 阻害薬だけでなく選択的 COX-1 阻害薬についても、非選択的 COX 阻害薬に比べて胃粘膜障害作用が弱い、もしくは検出されないことが報告された(Tanaka et al., 2002; Kakuta et al., 2008)。すなわち、アスピリンなどの非選択的 NSAID は COX-1/COX-2 の両方を阻害することで胃粘膜保護作用を低下させ、胃粘膜障害を発症すると考えられ、選択性の高い COX-1

阻害薬は胃粘膜障害を起こすことなく、心血管疾患患者の治療に使用できる可能性があると考えられる。

本章では、ASP6537 が上述したアスピリンの副作用並びに課題を有しているか否かについて検討することを目的として、イブプロフェンとの薬力学的相互作用、抗血小板作用の可逆性及び胃粘膜障害促進作用について検討した。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

ASP6537 はアステラス製薬株式会社にて合成した。アスピリン及びイブプロフェンは Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA) より、クロピドグレル硫酸塩は、Apin Chemicals, Ltd. (Oxfordshire, UK) より購入した。各被験薬は、投与直前に 0.5%MC 溶液に溶解または懸濁させて使用した。

2-2 実験動物

雄性 Hartley モルモット (SLC Japan Inc., Tokyo, Japan) を使用した。イブプロフェンとの薬力学的相互作用及び抗血小板作用の可逆性試験については、実験前に一晩絶食させた上で実験に用いた。胃粘膜障害促進作用試験については、実験前 36 時間絶食及び 2 時間絶水の後、薬物の経口投与を行った。すべての動物実験は、アステラス製薬株式会社の動物倫理委員会の規則に基づいて実施した。

2-3 ASP6537 とイブプロフェンとの薬力学的相互作用検討

一晩絶食したモルモットに溶媒またはイブプロフェン 30 mg/kg を 5 ml/kg となるように経口投与し、1 時間後に溶媒、ASP6537 30 mg/kg またはアスピリン 100 mg/kg を経口投与した。2 回目の薬剤投与から 8 時間後に、3.2%クエン酸三ナトリウム溶液を 10% (v/v) になるよう充填したプラスチックシリンジを用い

てジエチルエーテル麻酔下にて腹部大動脈より採血した。第2章、第2節、2-3-2と同様の方法にて多血小板血漿 (Platelet rich plasma: PRP) を調整し、コラーゲンを 0.5 µg/ml の濃度になるように添加することで血小板凝集を惹起した。コラーゲン添加後 10 分間における最大凝集率を指標とし、各群の評価を行った。

2-4 ASP6537 における抗血小板作用の可逆性検討

一晩絶食したモルモットに溶媒、ASP6537 30 mg/kg またはアスピリン 100 mg/kg を 5 ml/kg となるように経口投与し、1 時間後に 2-3 と同様の方法で腹部大動脈より採血し、モルモット PRP を調製した。調整した PRP の一部を用いて、コラーゲンを終濃度 0.5 µg/ml になるように添加し、洗浄前の血小板凝集率を測定した。残った PRP の pH を 10 mM のクエン酸及び 50 mM の EDTA を用いて pH6.7 に調整し、625×g、15 分間遠心分離することで洗浄血小板を得た。沈殿した血小板ペレットを 0.35% BSA 含有 HEPES-Tyrode's buffer (3.8 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2.9 mM NaH₂PO₄, 5.6 mM dextrose, pH 6.7) に再懸濁し転倒混和にて優しく洗浄した後、50 mM の EDTA を添加して再度遠心分離した。沈殿した血小板を溶媒投与群の血漿に懸濁し、血小板数が 3×10⁵ /µl になるよう調製した。コラーゲンを終濃度 1 µg/ml になるように添加し、洗浄後の血小板凝集率を測定した。

2-5 モルモット胃粘膜に対する ASP6537 の潰瘍形成作用

36 時間絶食及び 2 時間絶水したモルモットに、ASP6537、アスピリンまたはクロピドグレルを 5 ml/kg となるように経口投与した。薬物の経口投与 3 時間後に炭酸ガスを用いて安楽死させ、胃を摘出した。摘出した胃に 4%ホルマリン 15 ml を注入して膨らませた後、そのまま 4%ホルマリン中に 1 時間浸漬して胃組織を固定した。長い方の curvature に沿って切り開き、肉眼で確認できる粘膜病

変の長さ (mm) を盲検下にて測定した。全病変の長さの総和 (mm) を Ulcer Index として用いた。

2-6. 統計解析

実験成績は、平均値±SEM で示し、統計学的有意性に関しては、Student's paired *t*-test もしくは Dunnett's multiple comparison test より最適な手法を選択して行った。いずれも、*P* 値<0.05 を有意水準とした。

第3節 実験成績

3-1 ASP6537 とイブプロフェンとの薬力学的相互作用検討

ASP6537 とアスピリンの血小板凝集阻害作用に及ぼすイブプロフェンの前投与の影響を Figure 19 に示した。ASP6537 はイブプロフェン前投与群、非投与群共に血小板凝集をほぼ完全に阻害した。一方、アスピリンはイブプロフェン非投与群では血小板凝集をほぼ完全に阻害したが、イブプロフェン前投与をした群では、アスピリンの抗血小板作用は消失していた。

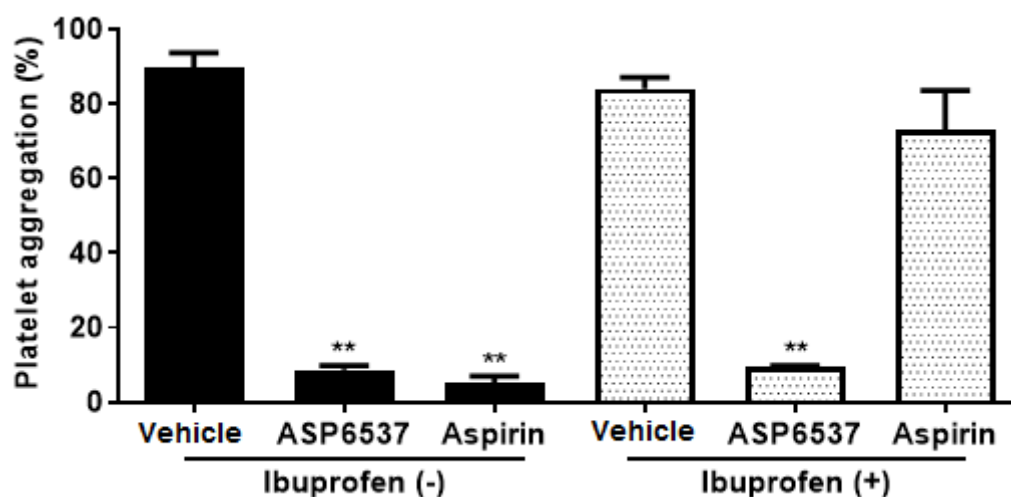


Figure 19. Effect of pretreatment with ibuprofen on the antiplatelet effects of ASP6537 and aspirin in guinea pigs.

ASP6537, aspirin and ibuprofen were administered orally at 30 mg/kg, 100 mg/kg and 30 mg/kg, respectively. Data represent mean \pm SEM. of 5 animals. Student's *t*-test, ***P* < 0.01 vs. vehicle-treated group.

3-2 ASP6537 における抗血小板作用の可逆性検討

ASP6537 とアスピリンの抗血小板作用に対する血小板洗浄の作用を Figure 20 に示した。洗浄前の血小板では、ASP6537、アスピリン共にコラーゲン誘発血小板凝集をほぼ完全に阻害したが、洗浄後の血小板では、ASP6537 の血小板凝集阻害作用は完全に消失していた。一方、アスピリンは、洗浄後の血小板においても血小板凝集を強力に阻害した。

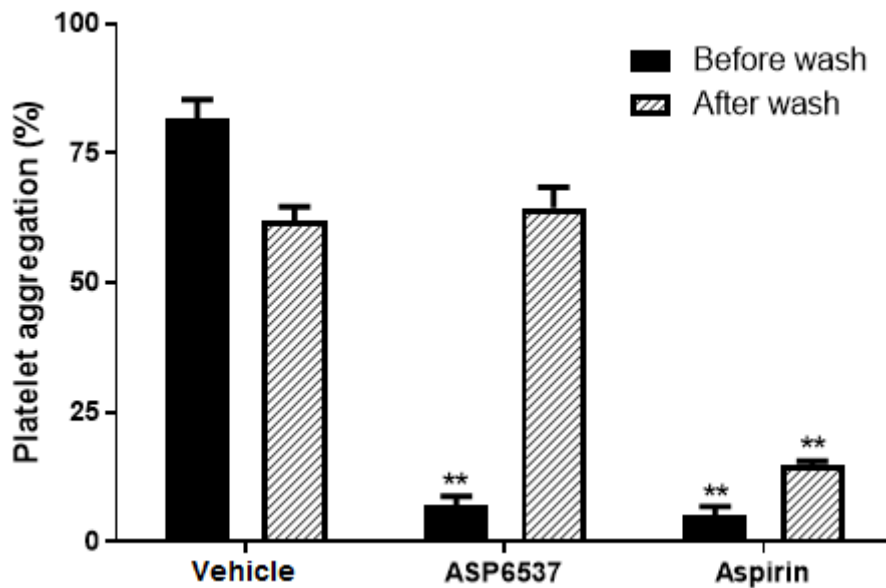


Figure 20. Effect of platelet washing on the inhibitory effects of ASP6537 and aspirin on collagen-induced platelet aggregation after oral administration in guinea pigs.

ASP6537 and aspirin were administered orally at 30 mg/kg and 100 mg/kg, respectively. Data represent the mean \pm SEM. of 4 animals. Student's *t*-test, ***P* < 0.01 vs. vehicle-treated group.

3-3 モルモット胃粘膜に対する ASP6537 の潰瘍形成作用

各群の Ulcer Index を Figure 21 に示した。ASP6537 及びクロピドグレルでは、100 mg/kg, p.o.投与群において Ulcer index の増加は認められなかった。一方、アスピリンは用量依存的に Ulcer index を増加させ、300 mg/kg, p.o.投与群において有意な増加を示した[90.0 ± 15.5 (アスピリン 300 mg/kg, p.o.) vs. 0.5 ± 0.5 mm (Vehicle)]。

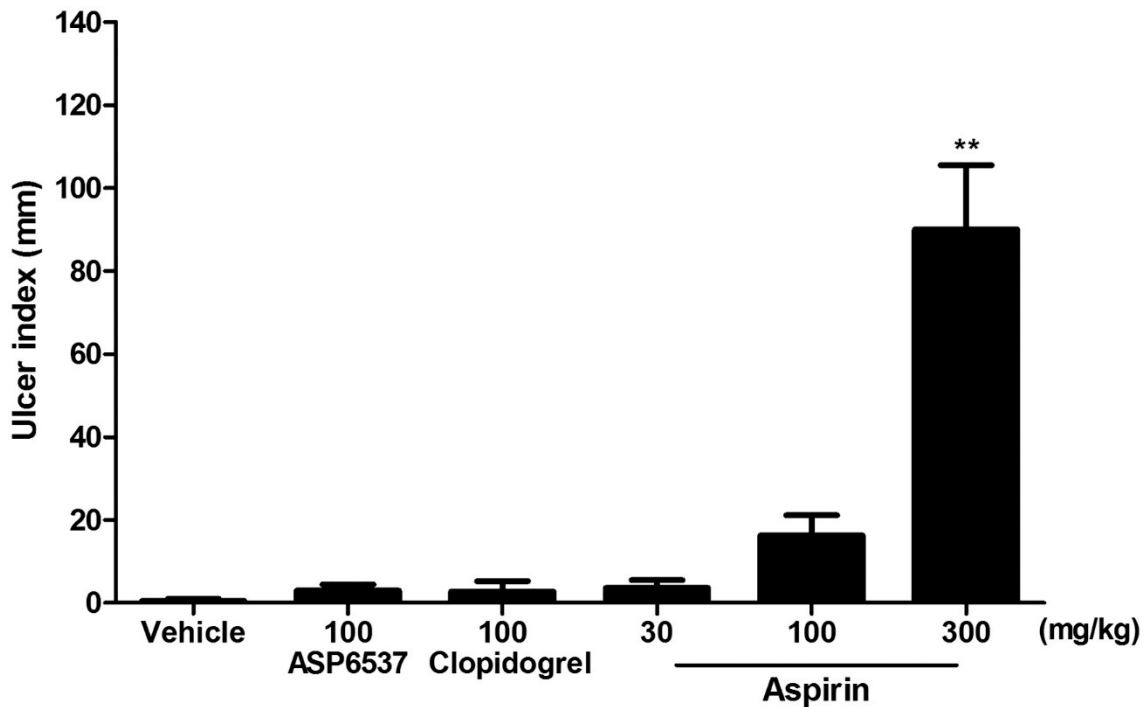


Figure 21. Gastric ulcerogenic response induced by ASP6537 and aspirin in guinea pigs.

The two test compounds were orally administered at the indicated doses (mg/kg) to guinea pigs. The animals were sacrificed 3 h after drug administration, and the total length of mucosal lesions in each stomach was used to create an ulcer index. Data are presented as the mean ± SEM of 8 animals. ** $P < 0.01$ by Dunnett's multiple comparison test vs. the control group.

第4節 考察

本章では、ASP6537 のイブプロフェンとの薬力学的相互作用、抗血小板作用の可逆性及び胃粘膜障害促進作用について検討した。

イブプロフェンとの薬力学的相互作用において、アスピリンの抗血小板作用は、イブプロフェンの前投与により著しく減弱した。一方、ASP6537 は、イブプロフェンの前投与の影響を受けることなく、抗血小板作用を示した。このことから、ASP6537 はアスピリンと異なり、イブプロフェンとの薬力学的相互作用は有していないと考えられる。アスピリンは多くの NSAID との相互作用が報告されている(Livio et al., 1982; Rao et al., 1983; Capone et al., 2005; MacDonald and Wei, 2006; Mackenzie et al., 2010; Anzellotti et al., 2011)。臨床においてこれらの NSAID がアスピリンの抗血小板作用に対しどの程度の影響を及ぼすのかは不明であるが、このような相互作用がアスピリンの心血管イベント抑制作用を低下させる可能性は否定できない。

アスピリンは COX-1 の触媒部位に近い 529 番目のセリン残基を不可逆的にアセチル化することによって、シクロオキシゲナーゼ活性を阻害する(Roth and Majerus, 1975; Catella-Lawson et al., 2001; Mackenzie et al., 2010)。この触媒部位が他の NSAID によって占有されてしまうことにより、アスピリンはこのセリン残基をアセチル化することが出来ず、結果として抗血小板作用が減弱してしまうと考えられる。ASP6537 もアスピリンと同じく COX-1 の触媒部位に結合すると考えられているが、イブプロフェン前投与による抗血小板作用の減弱は認められなかった。これは、イブプロフェンよりも ASP6537 の方が COX-1 触媒部位への親和性が高いことに起因すると考えられる。以上、ASP6537 は臨床において NSAID と相互作用をしないで抗血小板作用を発現する可能性が考えられる。

抗血小板作用の可逆性試験において、ASP6537 のコラーゲン誘発血小板凝集に対する阻害作用は、血小板洗浄により、完全に消失した。これは、ASP6537 の

抗血小板作用が可逆的であることを示唆している。アスピリンの抗血小板作用は、循環血中の血小板のターンオーバーに依存して消失するため、一度血小板のCOX-1に結合すると血小板の寿命である7日間程度作用が残存すると考えられている。そのため、手術を予定している患者では出血リスクを低減するため、アスピリンを4または5日間休薬する必要がある(Cattaneo, 2006)。一方、ACS患者においてアスピリンを休薬することは、血栓症の発症リスクを上昇させることにつながる(Collet et al., 2004; Ferrari et al., 2005)。そのため、医療現場においては出血リスクを低減するため、アスピリンによる抗血小板療法を中止するか、それとも血栓症の発症リスク上昇を防ぐため抗血小板療法を継続するかのどちらかを選択せざるをえない(Ferrandis et al., 2009)。ASP6537の抗血小板作用は可逆的であるため、手術直前まで投与し続けることが可能であり、休薬による血栓症の発症リスク上昇は最小限となる。そのため、上述のような手術を控えた状況においては、ASP6537のように可逆的な抗血小板薬の方が、非可逆的な抗血小板よりも有用であると考えられる。

モルモット胃粘膜潰瘍形成試験において、ASP6537は100 mg/kg 経口投与群においても胃粘膜障害を示さなかった。第2章で述べた通り、モルモットにおけるASP6537の抗血栓作用は3 mg/kg, p.o.以上で発現するため、胃粘膜障害発現用量と抗血栓作用発現用量の間に33倍以上の乖離がある。一方、アスピリンは300 mg/kg, p.o.で顕著な胃粘膜障害を示しており、モルモット塩化鉄誘発血栓モデル最小有効用量である100 mg/kg, p.o.とわずか3倍の乖離である。

ラットを用いた胃粘膜障害モデルにおいても同様に、ASP6537は非選択的NSAIDと比較して胃粘膜障害を起こしにくい(Imanishi et al., 2011)。COX-1とCOX-2両方を阻害することが胃粘膜障害の発現に必要なとの仮説に基づくと(Wallace, 1999; Tanaka et al., 2002)、このASP6537とアスピリンの胃粘膜障害に対する作用の違いは、COX-1選択性の違いによると推察される。

総括及び結論

血小板の接着及び凝集は、血栓症の発症に非常に重要な役割を果たしており、ACS 患者における心血管イベント抑制や脳梗塞予防を目的として、アスピリンなどの抗血小板薬が広く使用されている。

シクロオキシゲナーゼ (COX) は、膜リン脂質由来のアラキドン酸を種々の生理活性物質に変換するアラキドン酸カスケードに関与する酵素である。COX-1 はユビキタスに発現する常在型酵素で、生体の恒常性維持に関与しており、COX-2 は様々な刺激によって発現誘導される誘導型酵素で、炎症性疾患などへの関与が示唆されている。

アスピリンは抗血小板療法の標準治療薬と位置付けられており、血小板に発現している COX-1 を阻害することで血小板凝集促進因子である Thromboxane A₂ (TXA₂) の産生を抑制し、抗血小板作用を発現する。しかしながら、アスピリンは高用量にて COX-1 だけでなく COX-2 も阻害するため、血小板の接着及び凝集を阻害する因子である Prostaglandin I₂ (PGI₂) の産生も抑制してしまい、結果として、COX-1 阻害に基づく抗血小板作用が相殺されてしまう現象 (アスピリンジレンマ) が起こると考えられている。

本研究では、COX-1 選択的阻害薬 ASP6537 の動脈血栓予防薬としての有用性を検討することを目的として、ASP6537 の抗血栓作用、アスピリンジレンマの有無及び抗血小板薬としての利便性 (血管再狭窄への作用、NSAIDs との相互作用、抗血小板作用の可逆性) を検討した。

第 1 章では、ASP6537 の COX-1 選択性を検討するとともに、*in vitro* 及び *in vivo* TXA₂/PGI₂ 阻害作用をモルモット及びラットを用いて検討し、アスピリンと比較して TXA₂/PGI₂ バランスをより正常化できるか否かを検討した。

1) ASP6537 はリコンビナント COX-1/2 酵素を用いたアッセイにおいて、アスピ

リンに比べて 87,100 倍以上の COX-1 選択性を有していた。

- 2) モルモット *in vitro* TXA₂/PGI₂ 産生試験において、ASP6537 の TXA₂ 産生阻害作用は、アスピリンのそれと比較して約 28 倍選択的であった。
- 3) アスピリンはラット尿中 PGI₂ 代謝物排泄抑制作用とラット血小板凝集阻害作用を示す用量が同等であるのに対し、ASP6537 はラット尿中 PGI₂ 代謝物排泄抑制作用を示す用量がラット血小板凝集阻害作用を示す用量の約 33 倍高い用量であった。
- 4) 老齢ラット試験においては、TXA₂ 及び PGI₂ 代謝物の血漿中濃度は、加齢に伴った増加が認められ、ASP6537 は老齢ラットにおいてもアスピリンに比べてより選択的に TXA₂ の産生を抑制した。

第 2 章では、ASP6537 の *in vitro* 及び *ex vivo* 血小板凝集阻害作用を検討するとともに、諸種の血栓モデルで抗血栓作用を評価し、抗血小板薬としての有用性を検討した。また、ASP6537 と P2Y₁₂ 阻害薬クロピドグレルの併用効果について、モルモット塩化鉄誘発動脈血栓モデルを用いて検討した。

- 1) ヒト血小板を用いた *in vitro* 血小板凝集試験において、ASP6537 はアラキドン酸及びコラーゲン誘導血小板凝集を濃度依存的に阻害したが、ADP 惹起血小板凝集は阻害しなかった。
- 2) ASP6537 は、モルモット及びラットにおいて、*in vitro* 及び *ex vivo* コラーゲン誘発血小板凝集を阻害した。
- 3) モルモット電気刺激誘発血栓モデル、ラット A-V シヤントモデル、モルモット塩化鉄誘発血栓モデルにおいて ASP6537 は単剤で用量依存的な抗血栓作用を示し、いずれのモデルにおいても 3 mg/kg, p.o.以上の用量で有意であった。
- 4) モルモット塩化鉄誘発血栓モデルにおいて、ASP6537 はクロピドグレル 1 mg/kg, p.o.との併用下で、クロピドグレル単独投与群と比較して、用量依存的に

血栓形成を抑制し、1 mg/kg, p.o.以上の用量で有意な相加作用を示した。

第3章では、ASP6537が血管損傷後の再狭窄における有効性について検討するため、ラット頸動脈バルーン障害誘発内膜肥厚モデルを用いて、新生内膜形成に対するASP6537の作用を検討した。ASP6537は新生内膜面積、I/M比及び狭窄率を低下させた。

第4章では、ASP6537について1) NSAIDとの相互作用、2) 抗血小板作用の非可逆性及び3) 胃粘膜障害作用の観点から、アスピリンとの比較検討を行った。

1) イブプロフェンとの薬力学的相互作用試験において、アスピリンの抗血小板作用はイブプロフェンの前投与により著しく減弱したが、ASP6537はイブプロフェンの前投与の影響を受けることなく、抗血小板作用を有していた。

2) 抗血小板作用の可逆性試験において、ASP6537の血小板凝集阻害作用は、血小板洗浄により完全に消失し、ASP6537の抗血小板作用が可逆的であることが示された。一方、アスピリンでは血小板洗浄による抗血小板作用の消失は認められなかった。

3) モルモット胃粘膜潰瘍形成試験において、ASP6537は抗血栓用量の30倍以上の用量(100 mg/kg, p.o.)においても胃粘膜障害を示さなかった。一方、アスピリンは抗血栓用量の3倍高い用量(300 mg/kg, p.o.)で胃粘膜障害を示した。

本研究において、ASP6537が高いCOX-1選択性を有していること並びに定常状態及びCOX-2誘導下のいずれにおいてもTXA₂及びPGI₂産生をよりTXA₂選択的に抑制することを明らかにした。この結果から、ASP6537は、アスピリンの臨床上の課題の1つであるアスピリンジレンマに基づく高用量での薬効減弱の可能性は低いことが示唆された。

ASP6537 は諸種の血栓モデルにおいて抗血栓作用を示したことから、臨床においても様々な病態生理学的状態において血栓形成を阻害すること並びに ACS 患者の血栓性イベント予防に有用であることが期待される。また、クロピドグレルに対して相加的な抗血栓作用を示したことから、P2Y₁₂ 阻害薬との併用療法の可能性も示唆された。

ASP6537 は新生内膜形成阻害作用を示したことから、臨床においても PCI 後の急性閉塞性血栓のみならず、再狭窄予防に有用である可能性が考えられる。

ASP6537 は NSAID との相互作用がなく、可逆的に血小板凝集を阻害することから、抗血小板薬としての利便性は、アスピリン勝ることが期待される。また、ASP6537 は抗血栓作用を示す用量より 33 倍高い用量においても、モルモットにおいて胃粘膜障害を誘発しなかったことから、臨床でも胃粘膜障害発症するリスクは低いと考えられる。

以上、本研究において、ASP6537 はアスピリンに代わりうる動脈血栓症に対する抗血小板薬として有用であることが示唆された。

謝 辞

本論文の作成及び発表にあたり、終始御懇篤なる御指導、ご鞭撻を賜りました恩師岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授 原英彰博士に謹んで感謝の意を表します。

さらに、本研究の機会を与えていただくとともに、過分のご配慮を賜りましたアステラス製薬株式会社研究本部前本部長 内田渡博士、研究企画部部长 齋藤みのり博士、日本医療研究開発機構 基盤研究事業部 笹又理央博士に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行及び論文の作成に暖かいご指導とご支援を賜りましたアステラス製薬株式会社開発本部プロジェクト推進部 川崎富久博士及び研究本部 リサーチポートフォリオ部 鈴木健一博士に深く感謝申し上げます。

引用文献

Angiolillo, D.J., Rollini, F., Storey, R.F., Bhatt, D.L., James, S., Schneider, D.J., Sibbing, D., So, D.Y.F., Trenk, D., Alexopoulos, D., Gurbel, P.A., Hochholzer, W., De Luca, L., Bonello, L., Aradi, D., Cuisset, T., Tantry, U.S., Wang, T.Y., Valgimigli, M., Waksman, R., Mehran, R., Montalescot, G., Franchi, F., Price, M.J., 2017. International Expert Consensus on Switching Platelet P2Y₁₂ Receptor-Inhibiting Therapies. *Circulation* 136, 1955-1975.

Antithrombotic Trialists, C., 2002. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Bmj* 324, 71-86.

Anzellotti, P., Capone, M.L., Jeyam, A., Tacconelli, S., Bruno, A., Tontodonati, P., Di Francesco, L., Grossi, L., Renda, G., Merciaro, G., Di Gregorio, P., Price, T.S., Garcia Rodriguez, L.A., Patrignani, P., 2011. Low-dose naproxen interferes with the antiplatelet effects of aspirin in healthy subjects: recommendations to minimize the functional consequences. *Arthritis Rheum.* 63, 850-859.

Awtry, E.H., Loscalzo, J., 2000. Aspirin. *Circulation.* 101, 1206-1218.

Baron, J.A., Sandler, R.S., Bresalier, R.S., Lanas, A., Morton, D.G., Riddell, R., Iverson, E.R., Demets, D.L., 2008. Cardiovascular events associated with rofecoxib: final analysis of the APPROVe trial. *Lancet* 372, 1756-1764.

Belton, O., Byrne, D., Kearney, D., Leahy, A., Fitzgerald, D.J., 2000. Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 102, 840-845.

Benjamin, E.J., Blaha, M.J., Chiuve, S.E., Cushman, M., Das, S.R., Deo, R., de Ferranti, S.D., Floyd, J., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C.R., Jimenez, M.C., Jordan, L.C., Judd, S.E., Lackland, D., Lichtman, J.H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C.T., Mackey, R.H., Matsushita, K., Mozaffarian, D., Mussolino, M.E., Nasir, K., Neumar, R.W., Palaniappan, L., Pandey, D.K., Thiagarajan, R.R., Reeves, M.J., Ritchey, M., Rodriguez, C.J., Roth, G.A., Rosamond, W.D., Sasson, C., Towfighi, A., Tsao, C.W., Turner, M.B., Virani, S.S., Voeks, J.H., Willey, J.Z., Wilkins, J.T., Wu, J.H., Alger, H.M., Wong, S.S., Muntner, P., 2017. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 135, e146-e603.

Berger, J.S., 2013. Aspirin, clopidogrel, and ticagrelor in acute coronary syndromes. *The*

American journal of cardiology 112, 737-745.

Bhatt, D.L., Flather, M.D., Hacke, W., Berger, P.B., Black, H.R., Boden, W.E., Cacoub, P., Cohen, E.A., Creager, M.A., Easton, J.D., Hamm, C.W., Hankey, G.J., Johnston, S.C., Mak, K.H., Mas, J.L., Montalescot, G., Pearson, T.A., Steg, P.G., Steinhubl, S.R., Weber, M.A., Fabry-Ribaudou, L., Hu, T., Topol, E.J., Fox, K.A., 2007. Patients with prior myocardial infarction, stroke, or symptomatic peripheral arterial disease in the CHARISMA trial. *J Am Coll Cardiol* 49, 1982-1988.

Bolego, C., Buccellati, C., Prada, A., Gaion, R.M., Folco, G., Sala, A., 2009. Critical role of COX-1 in prostacyclin production by human endothelial cells under modification of hydroperoxide tone. *Faseb J.* 23, 605-612.

Braden, G.A., Knapp, H.R., FitzGerald, G.A., 1991. Suppression of eicosanoid biosynthesis during coronary angioplasty by fish oil and aspirin. *Circulation* 84, 679-685.

Bresalier, R.S., Sandler, R.S., Quan, H., Bolognese, J.A., Oxenius, B., Horgan, K., Lines, C., Riddell, R., Morton, D., Lanasa, A., Konstam, M.A., Baron, J.A., Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx Trial, I., 2005. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *The New England journal of medicine* 352, 1092-1102.

Brown, A.J.M., Austin, D., 2017. Antiplatelet therapy in acute coronary syndrome. *Continuing Cardiology Education* 3, 11-21.

Buntaine, A.J., Shah, B., Lorin, J.D., Sedlis, S.P., 2016. Revascularization Strategies in Patients with Diabetes Mellitus and Acute Coronary Syndrome. *Curr Cardiol Rep* 18, 79.

Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health, Ottawa (ON), 2017. CADTH Rapid Response Reports, Dual Antiplatelet Therapy Acetylsalicylic Acid Dosing: A Review of the Clinical Effectiveness and Harms.

Capone, M.L., Sciulli, M.G., Tacconelli, S., Grana, M., Ricciotti, E., Renda, G., Di Gregorio, P., Merciaro, G., Patrignani, P., 2005. Pharmacodynamic interaction of naproxen with low-dose aspirin in healthy subjects. *J Am Coll Cardiol.* 45, 1295-1301.

Carmeliet, P., Moons, L., Stassen, J.M., De Mol, M., Bouche, A., van den Oord, J.J., Kockx, M., Collen, D., 1997. Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice. *The American journal of pathology* 150, 761-776.

- Catella-Lawson, F., McAdam, B., Morrison, B.W., Kapoor, S., Kujubu, D., Antes, L., Lasseter, K.C., Quan, H., Gertz, B.J., FitzGerald, G.A., 1999. Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther.* 289, 735-741.
- Catella-Lawson, F., Reilly, M.P., Kapoor, S.C., Cucchiara, A.J., DeMarco, S., Tournier, B., Vyas, S.N., FitzGerald, G.A., 2001. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *The New England journal of medicine* 345, 1809-1817.
- Cattaneo, M., 2006. P2Y₁₂ receptor antagonists: a rapidly expanding group of antiplatelet agents. *Eur Heart J.* 27, 1010-1012.
- Caughey, G.E., Cleland, L.G., Penglis, P.S., Gamble, J.R., James, M.J., 2001. Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *Journal of immunology* 167, 2831-2838.
- Chandrasekharan, N.V., Simmons, D.L., 2004. The cyclooxygenases. *Genome biology* 5, 241.
- Cheng, Y., Wang, M., Yu, Y., Lawson, J., Funk, C.D., Fitzgerald, G.A., 2006. Cyclooxygenases, microsomal prostaglandin E synthase-1, and cardiovascular function. *J Clin Invest.* 116, 1391-1399.
- Clapp, L.H., Finney, P., Turcato, S., Tran, S., Rubin, L.J., Tinker, A., 2002. Differential effects of stable prostacyclin analogs on smooth muscle proliferation and cyclic AMP generation in human pulmonary artery. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26, 194-201.
- Clowes, A.W., Reidy, M.A., 1991. Prevention of stenosis after vascular reconstruction: pharmacologic control of intimal hyperplasia--a review. *J Vasc Surg* 13, 885-891.
- Collaboration, A.T., 2002. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Bmj* 324, 71-86.
- Collet, J.P., Montalescot, G., Blanchet, B., Tanguy, M.L., Golmard, J.L., Choussat, R., Beygui, F., Payot, L., Vignolles, N., Metzger, J.P., Thomas, D., 2004. Impact of prior use or recent withdrawal of oral antiplatelet agents on acute coronary syndromes. *Circulation.* 110, 2361-2367.

Connolly, E., Bouchier-Hayes, D.J., Kaye, E., Leahy, A., Fitzgerald, D., Belton, O., 2002. Cyclooxygenase isozyme expression and intimal hyperplasia in a rat model of balloon angioplasty. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 393-398.

Connolly, S.J., Pogue, J., Hart, R.G., Hohnloser, S.H., Pfeffer, M., Chrolavicius, S., Yusuf, S., 2009. Effect of clopidogrel added to aspirin in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine* 360, 2066-2078.

Craven, P.A., Studer, R.K., DeRubertis, F.R., 1996. Thromboxane/prostaglandin endoperoxide-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells is signaled by protein kinase C-dependent increases in transforming growth factor-beta. *Hypertension* 28, 169-176.

Degrauwe, S., Pilgrim, T., Aminian, A., Noble, S., Meier, P., Iglesias, J.F., 2017. Dual antiplatelet therapy for secondary prevention of coronary artery disease. *Open heart* 4, e000651.

Diener, H.C., Bogousslavsky, J., Brass, L.M., Cimminiello, C., Csiba, L., Kaste, M., Leys, D., Matias-Guiu, J., Rupprecht, H.J., 2004. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 364, 331-337.

Doenst, T., Struning, C., Moschovas, A., Gonzalez-Lopez, D., Essa, Y., Kirov, H., Diab, M., Faerber, G., 2016. Cardiac surgery 2015 reviewed. *Clin Res Cardiol.* 105, 801–804.

Eckly, A., Hechler, B., Freund, M., Zerr, M., Cazenave, J.P., Lanza, F., Mangin, P.H., Gachet, C., 2011. Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 9, 779-789.

Feletou, M., Huang, Y., Vanhoutte, P.M., 2010. Vasoconstrictor prostanoids. *Pflugers Arch.* 459, 941-950.

Feng, X., Liu, P., Zhou, X., Li, M.T., Li, F.L., Wang, Z., Meng, Z., Sun, Y.P., Yu, Y., Xiong, Y., Yuan, H.X., Guan, K.L., 2016. Thromboxane A₂ Activates YAP/TAZ Protein to Induce Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration. *The Journal of biological chemistry* 291, 18947-18958.

Ferrandis, R., Llau, J.V., Mugarra, A., 2009. Perioperative management of antiplatelet drugs in cardiac surgery. *Curr Cardiol Rev.* 5, 125-132.

Ferrari, E., Benhamou, M., Cerboni, P., Marcel, B., 2005. Coronary syndromes following aspirin withdrawal: a special risk for late stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol.* 45, 456-459.

Fujino, T., Yuhki, K., Yamada, T., Hara, A., Takahata, O., Okada, Y., Xiao, C.Y., Ma, H., Karibe, H., Iwashima, Y., Fukuzawa, J., Hasebe, N., Kikuchi, K., Narumiya, S., Ushikubi, F., 2002. Effects of the prostanoids on the proliferation or hypertrophy of cultured murine aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 136, 530-539.

Fujitani, B., Watanabe, M., Kuwashima, J., Tsuboi, T., Kadokawa, T., Kitagawa, T., 1986. Effect of a prostaglandin E1 derivative (OP-1206) and acetylsalicylic acid on electrically induced thrombosis in guinea-pig mesenteric artery and its modification by an inhibitor of prostaglandin I2 synthetase, tranilcypromine. *Jpn J Pharmacol* 40, 31-35.

Gabriel, S.A., Beteli, C.B., Tanighuchi, R.S., Tristao, C.K., Gabriel, E.A., Job, J.R., 2007. Aspirin resistance and atherothrombosis. *Revista brasileira de cirurgia cardiovascular : orgao oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* 22, 96-103.

Gaddam, V., Li, D.Y., Mehta, J.L., 2002. Anti-thrombotic effects of atorvastatin--an effect unrelated to lipid lowering. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 7, 247-253.

Garcia Rodriguez, L.A., Hernandez-Diaz, S., 2004. Risk of uncomplicated peptic ulcer among users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am J Epidemiol.* 159, 23-31.

Gaziano, J.M., Gibson, C.M., 2006. Potential for drug-drug interactions in patients taking analgesics for mild-to-moderate pain and low-dose aspirin for cardioprotection. *The American journal of cardiology* 97, 23-29.

Gillette, M., Morneau, K., Hoang, V., Virani, S., Jneid, H., 2016. Antiplatelet Management for Coronary Heart Disease: Advances and Challenges. *Curr Atheroscler Rep* 18, 35.

Grosser, T., Fries, S., FitzGerald, G.A., 2006. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest* 116, 4-15.

Heymes, C., Habib, A., Yang, D., Mathieu, E., Marotte, F., Samuel, J., Boulanger, C.M., 2000. Cyclo-oxygenase-1 and -2 contribution to endothelial dysfunction in ageing. *Br J Pharmacol.* 131, 804-810.

Imai, H., Numaguchi, Y., Ishii, M., Kubota, R., Yokouchi, K., Ogawa, Y., Kondo, T., Okumura, K., Murohara, T., 2007. Prostacyclin synthase gene transfer inhibits neointimal formation by suppressing PPAR delta expression. *Atherosclerosis* 195, 322-332.

Imanishi, J., Morita, Y., Yoshimi, E., Kuroda, K., Masunaga, T., Yamagami, K., Kuno, M., Hamachi, E., Aoki, S., Takahashi, F., Nakamura, K., Miyata, S., Ohkubo, Y., Mutoh, S., 2011. Pharmacological profile of FK881(ASP6537), a novel potent and selective cyclooxygenase-1 inhibitor. *Biochemical pharmacology* 82, 746-754.

Indolfi, C., Esposito, G., Di Lorenzo, E., Rapacciuolo, A., Feliciello, A., Porcellini, A., Avvedimento, V.E., Condorelli, M., Chiariello, M., 1995. Smooth muscle cell proliferation is proportional to the degree of balloon injury in a rat model of angioplasty. *Circulation* 92, 1230-1235.

Ishizuka, T., Matsui, T., Okamoto, Y., Ohta, A., Shichijo, M., 2004. Ramatroban (BAY u 3405): a novel dual antagonist of TXA2 receptor and CRTh2, a newly identified prostaglandin D2 receptor. *Cardiovascular drug reviews* 22, 71-90.

Iwatsuki, Y., Sato, T., Moritani, Y., Shigenaga, T., Suzuki, M., Kawasaki, T., Funatsu, T., Kaku, S., 2011. Biochemical and pharmacological profile of darexaban, an oral direct factor Xa inhibitor. *Eur J Pharmacol* 673, 49-55.

Jimenez, A.H., Stubbs, M.E., Tofler, G.H., Winther, K., Williams, G.H., Muller, J.E., 1992. Rapidity and duration of platelet suppression by enteric-coated aspirin in healthy young men. *Am J Cardiol.* 69, 258-262.

Johnson, J.L., Wimsatt, J., Buckel, S.D., Dyer, R.D., Maddipati, K.R., 1995. Purification and characterization of prostaglandin H synthase-2 from sheep placental cotyledons. *Arch Biochem Biophys.* 324, 26-34.

Juni, P., Nartey, L., Reichenbach, S., Sterchi, R., Dieppe, P.A., Egger, M., 2004. Risk of cardiovascular events and rofecoxib: cumulative meta-analysis. *Lancet* 364, 2021-2029.

Kakuta, H., Zheng, X., Oda, H., Harada, S., Sugimoto, Y., Sasaki, K., Tai, A., 2008. Cyclooxygenase-1-selective inhibitors are attractive candidates for analgesics that do not cause gastric damage. design and in vitro/in vivo evaluation of a benzamide-type cyclooxygenase-1 selective inhibitor. *J Med Chem.* 51, 2400-2411.

Kargman, S., Charleson, S., Cartwright, M., Frank, J., Riendeau, D., Mancini, J., Evans, J., O'Neill, G., 1996. Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog,

monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology*. 111, 445-454.

Kawasaki, T., Kawamura, S., Katoh, S., Takenaka, T., 1993. Experimental model of carotid artery thrombosis in rats and the thrombolytic activity of YM866, a novel modified tissue-type plasminogen activator. *Jpn J Pharmacol* 63, 135-142.

Kawasaki, T., Sato, K., Sakai, Y., Hirayama, F., Koshio, H., Taniuchi, Y., Matsumoto, Y., 1998. Comparative studies of an orally-active factor Xa inhibitor, YM-60828, with other antithrombotic agents in a rat model of arterial thrombosis. *Thromb Haemost.* 79, 410-416.

Kearney, D., Byrne, A., Crean, P., Cox, D., Fitzgerald, D.J., 2004. Optimal suppression of thromboxane A(2) formation by aspirin during percutaneous transluminal coronary angioplasty: no additional effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *J Am Coll Cardiol* 43, 526-531.

Kis, B., Snipes, J.A., Isse, T., Nagy, K., Busija, D.W., 2003. Putative cyclooxygenase-3 expression in rat brain cells. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23, 1287-1292.

Kurz, K.D., Main, B.W., Sandusky, G.E., 1990. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res.* 60, 269-280.

Livio, M., Del Maschio, A., Cerletti, C., de Gaetano, G., 1982. Indomethacin prevents the long-lasting inhibitory effect of aspirin on human platelet cyclo-oxygenase activity. *Prostaglandins.* 23, 787-796.

Lopes, R.D., 2011. Antiplatelet agents in cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis.* 31, 306-309.

Lorrain, J., Lechaire, I., Gauffeny, C., Masson, R., Roome, N., Herault, J.P., O'Connor, S.E., Schaeffer, P., Herbert, J.M., 2004. Effects of SanOrg123781A, a synthetic hexadecasaccharide, in a mouse model of electrically induced carotid artery injury: synergism with the antiplatelet agent clopidogrel. *J Pharmacol Exp Ther.* 309, 235-240. Epub 2004 Jan 2012.

Luscher, T.F., Steffel, J., Eberli, F.R., Joner, M., Nakazawa, G., Tanner, F.C., Virmani, R., 2007. Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications. *Circulation* 115, 1051-1058.

MacDonald, T.M., Wei, L., 2006. Is there an interaction between the cardiovascular protective effects of low-dose aspirin and ibuprofen? *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 98, 275-280.

Mackenzie, I.S., Coughtrie, M.W., MacDonald, T.M., Wei, L., 2010. Antiplatelet drug interactions. *J Intern Med.* 268, 516-529.

Markus, H.S., Droste, D.W., Kaps, M., Larrue, V., Lees, K.R., Siebler, M., Ringelstein, E.B., 2005. Dual antiplatelet therapy with clopidogrel and aspirin in symptomatic carotid stenosis evaluated using doppler embolic signal detection: the Clopidogrel and Aspirin for Reduction of Emboli in Symptomatic Carotid Stenosis (CARESS) trial. *Circulation* 111, 2233-2240.

Matz, R.L., de Sotomayor, M.A., Schott, C., Stoclet, J.C., Andriantsitohaina, R., 2000. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. *Br J Pharmacol.* 131, 303-311.

Meadows, T.A., Bhatt, D.L., 2007. Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. *Circulation research* 100, 1261-1275.

Mehran, R., Baber, U., Steg, P.G., Ariti, C., Weisz, G., Witzenbichler, B., Henry, T.D., Kini, A.S., Stuckey, T., Cohen, D.J., Berger, P.B., Iakovou, I., Dangas, G., Waksman, R., Antoniucci, D., Sartori, S., Krucoff, M.W., Hermiller, J.B., Shawl, F., Gibson, C.M., Chieffo, A., Alu, M., Moliterno, D.J., Colombo, A., Pocock, S., 2013. Cessation of dual antiplatelet treatment and cardiac events after percutaneous coronary intervention (PARIS): 2 year results from a prospective observational study. *Lancet* 382, 1714-1722.

Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., Vane, J.R., 1976. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263, 663-665.

Mousa, S.A., Kapil, R., Mu, D.X., 1999. Intravenous and oral antithrombotic efficacy of the novel platelet GPIIb/IIIa antagonist roxifiban (DMP754) and its free acid form, XV459. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19, 2535-2541.

Ochi, T., Motoyama, Y., Goto, T., 2000. The analgesic effect profile of FR122047, a selective cyclooxygenase-1 inhibitor, in chemical nociceptive models. *Eur J Pharmacol.* 391, 49-54.

Ohman, E.M., Bhatt, D.L., Steg, P.G., Goto, S., Hirsch, A.T., Liao, C.S., Mas, J.L.,

- Richard, A.J., Rother, J., Wilson, P.W., Investigators, R.R., 2006. The REduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry: an international, prospective, observational investigation in subjects at risk for atherothrombotic events-study design. *American heart journal* 151, 786 e781-710.
- Patrono, C., Garcia Rodriguez, L.A., Landolfi, R., Baigent, C., 2005. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *The New England journal of medicine* 353, 2373-2383.
- Perzborn, E., Heitmeier, S., Laux, V., 2015. Effects of Rivaroxaban on Platelet Activation and Platelet-Coagulation Pathway Interaction: In Vitro and In Vivo Studies. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 20, 554-562.
- Peters, R.F., Lees, C.M., Mitchell, K.A., Tweed, M.F., Talbot, M.D., Wallis, R.B., 1991. The characterisation of thrombus development in an improved model of arterio-venous shunt thrombosis in the rat and the effects of recombinant desulphatohirudin (CGP 39393), heparin, and iloprost. *Thromb Haemost* 65, 268-274.
- Pratico, D., Tillmann, C., Zhang, Z.B., Li, H., FitzGerald, G.A., 2001. Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3358-3363.
- Qiu, J., Zheng, Y., Hu, J., Liao, D., Gregersen, H., Deng, X., Fan, Y., Wang, G., 2014. Biomechanical regulation of vascular smooth muscle cell functions: from in vitro to in vivo understanding. *J R Soc Interface* 11, 20130852.
- Rao, G.H., Johnson, G.G., Reddy, K.R., White, J.G., 1983. Ibuprofen protects platelet cyclooxygenase from irreversible inhibition by aspirin. *Arteriosclerosis*. 3, 383-388.
- Reejhsinghani, R., Lotfi, A.S., 2015. Prevention of stent thrombosis: challenges and solutions. *Vasc Health Risk Manag* 11, 93-106.
- Riutta, A., Nurmi, E., Weber, C., Hansson, G., Vapaatalo, H., Mucha, I., 1994. Selective solid-phase extraction of urinary 2,3-dinor-6-ketoprostaglandin F1 alpha for determination with radioimmunoassay. *Analytical biochemistry* 220, 351-359.
- Ross, R., 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801-809.
- Roth, G.J., Majerus, P.W., 1975. The mechanism of the effect of aspirin on human

platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest.* 56, 624-632.

Ruan, C.H., So, S.P., Ruan, K.H., 2011. Inducible COX-2 dominates over COX-1 in prostacyclin biosynthesis: Mechanisms of COX-2 inhibitor risk to heart disease. *Life Sci.* 88, 24-30.

Sakata, C., Kawasaki, T., Kato, Y., Abe, M., Suzuki, K., Ohmiya, M., Funatsu, T., Morita, Y., Okada, M., 2013. ASP6537, a novel highly selective cyclooxygenase-1 inhibitor, exerts potent antithrombotic effect without "aspirin dilemma". *Thromb Res* 132, 56-62.

Singh, D., 2004. Merck withdraws arthritis drug worldwide. *Bmj* 329, 816.

Smith, C.J., Zhang, Y., Koboldt, C.M., Muhammad, J., Zweifel, B.S., Shaffer, A., Talley, J.J., Masferrer, J.L., Seibert, K., Isakson, P.C., 1998. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 13313-13318.

Smyth, E.M., 2010. Thromboxane and the thromboxane receptor in cardiovascular disease. *Clinical lipidology* 5, 209-219.

Sommer, P., Armstrong, E.J., 2015. Stent thrombosis: current management and outcomes. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 17(3), 365.

Squizzato, A., Bellesini, M., Takeda, A., Middeldorp, S., Donadini, M.P., 2017. Clopidogrel plus aspirin versus aspirin alone for preventing cardiovascular events. *The Cochrane database of systematic reviews* 12, Cd005158.

Sugidachi, A., Ohno, K., Ogawa, T., Jakubowski, J., Hashimoto, M., Tomizawa, A., 2013. A comparison of the pharmacological profiles of prasugrel and ticagrelor assessed by platelet aggregation, thrombus formation and haemostasis in rats. *Br J Pharmacol* 169, 82-89.

Tanaka, A., Araki, H., Hase, S., Komoike, Y., Takeuchi, K., 2002. Up-regulation of COX-2 by inhibition of COX-1 in the rat: a key to NSAID-induced gastric injury. *Aliment Pharmacol Ther.* 16, 90-101.

Thomson, R.M., Anderson, D.C., 2013. Aspirin and clopidogrel for prevention of ischemic stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 13, 327.

Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Hwang, H.J., Mio, M., Tsuchiya, T., Mizushima, T., 2004. Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions. *Biochem Pharmacol.* 67, 575-585.

- Vane, J.R., 2002. Biomedicine. Back to an aspirin a day? *Science* 296, 474-475.
- Vane, J.R., Bakhle, Y.S., Botting, R.M., 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 38, 97-120.
- Vericel, E., Croset, M., Sedivy, P., Courpron, P., Dechavanne, M., Lagarde, M., 1988. Platelets and aging. I--Aggregation, arachidonate metabolism and antioxidant status. *Thromb Res.* 49, 331-342.
- Viles-Gonzalez, J.F., Fuster, V., Badimon, J.J., 2004. Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *European heart journal* 25, 1197-1207.
- Vogel, G.M., Meuleman, D.G., Bourgondien, F.G., Hobbelen, P.M., 1989. Comparison of two experimental thrombosis models in rats effects of four glycosaminoglycans. *Thromb Res* 54, 399-410.
- Wallace, J.L., 1999. Distribution and expression of cyclooxygenase (COX) isoenzymes, their physiological roles, and the categorization of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Am J Med.* 107, 11S-16S; discussion 16S-17S.
- Wong, P.C., Crain, E.J., Watson, C.A., Hua, J., Schumacher, W.A., Rehfuss, R., 2009. Clopidogrel versus prasugrel in rabbits. Effects on thrombosis, haemostasis, platelet function and response variability. *Thromb Haemost.* 101, 108-115.
- Yahagi, K., Kolodgie, F.D., Otsuka, F., Finn, A.V., Davis, H.R., Joner, M., Virmani, R., 2016. Pathophysiology of native coronary, vein graft, and in-stent atherosclerosis. *Nature reviews. Cardiology* 13, 79-98.
- Yao, J.C., Duan, W.G., Yun, Y., Liu, D.Q., Yan, M., Jiang, Z.Z., Zhang, L.Y., 2007. Screening method for nonsteroidal antiinflammatory drugs based on the cyclooxygenase 2 pathway activated by serum-free stimulation in A549 cells. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 127, 527-532.
- Yu, Y., Ricciotti, E., Grosser, T., Fitzgerald, G.A., 2009. The translational therapeutics of prostaglandin inhibition in atherothrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7 Suppl 1, 222-226.
- Zhou, Y.H., Wei, X., Lu, J., Ye, X.F., Wu, M.J., Xu, J.F., Qin, Y.Y., He, J., 2012. Effects of combined aspirin and clopidogrel therapy on cardiovascular outcomes: a systematic

review and meta-analysis. PloS one 7, e31642.

Zucker, T.P., Bonisch, D., Muck, S., Weber, A.A., Bretschneider, E., Glusa, E., Schror, K., 1998. Thrombin-induced mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells is potentiated by thromboxane A2 and involves upregulation of thromboxane receptor mRNA. *Circulation* 97, 589-595.

略語一覽表

ACS	Acute coronary syndrome
ADP	Adenosine diphosphate
A-V shunt model	Arterio-venous shunt model
COX	Cyclooxygenase
DABT	Dual antiplatelet therapy
I/M ratio	Intima/Media ratio
MC	Methylcellulose
PCI	Percutaneous coronary intervention
PG	Prostaglandin
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PPP	Platelet poor plasma
PRP	Platelet rich plasma
TTO	Time to occlusion
TXA ₂	Thromboxane A ₂
VSMC	Vascular smooth muscle cells
vWF	von Willebrand factor