

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16899

研究課題名（和文）グリコカリックス・赤血球による血栓制御に着目した溶血性尿毒症症候群治療法の創出

研究課題名（英文）Development of a treatment for haemolytic uraemic syndrome focusing on glycoocalyx-erythrocyte-mediated thrombus control.

研究代表者

坂田 飛鳥（Sakata, Asuka）

奈良県立医科大学・医学部・助教（共同研究講座）

研究者番号：90528457

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：生体内で形成される血栓の観察手法と生体外に構築した障害血管を模倣したマイクロ流路系で形成される血栓のリアルタイム観察手法を構築した。これら観察手法を用いて溶血性尿毒症症候群における血栓形成の極初期には血栓形成に凝固が関与する可能性があることを見出した。また赤血球には血小板血栓、凝固血栓双方のサイズを抑制的に調整する役割があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した生体内および障害血管のモデル流路における血栓形成の評価方法は種々の血栓性あるいは止血異常病態の基礎的研究に応用が可能である。

溶血性尿毒症症候群は血小板を主体とした血栓が形成される疾患であることが知られているが、本研究ではその初期に凝固によるフィブリン形成が起きている可能性が示唆された。本疾患においてどのように血栓が形成されるかを明らかとすることができれば新たな治療標的を見出すことが可能となり、患者予後改善につながる可能性がある。赤血球による血栓制御機構は溶血性尿毒症症候群の血栓形成と溶血病態だけでなく、多血症での血栓傾向など他の疾患の解析・治療法開発にも応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We developed a method for observing thrombus formation in vivo and a real-time observation method for thrombus formation in a microfluidic system mimicking an injured blood vessel in vitro. Using these observation methods, we found that coagulation may be involved in thrombus formation in the very early stages of thrombus formation in haemolytic uraemic syndrome. We also found that erythrocytes play an inhibitory role in regulating the size of both platelet thrombi and coagulation thrombi.

研究分野：血栓止血

キーワード：溶血性尿毒症症候群 インビボイメージング エクスビボイメージング 血栓 病態モデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

溶血性尿毒症症候群は小児に腎不全をきたすことのある重篤な血栓症である。腎機能障害・血小板減少・溶血性貧血を主症状とする。志賀毒素が血小板と結合した状態で血中を流れ、特に腎臓の内皮細胞に多く発現する受容体と結合して同部位で血栓形成と炎症、細胞死を惹起すると言われている。しかしながらこの理解のみでは何故形成される血栓が血小板主体であって凝固産物が殆ど確認されないのか、何故溶血が起こるのか、といった疑問が解決されない。

### 2. 研究の目的

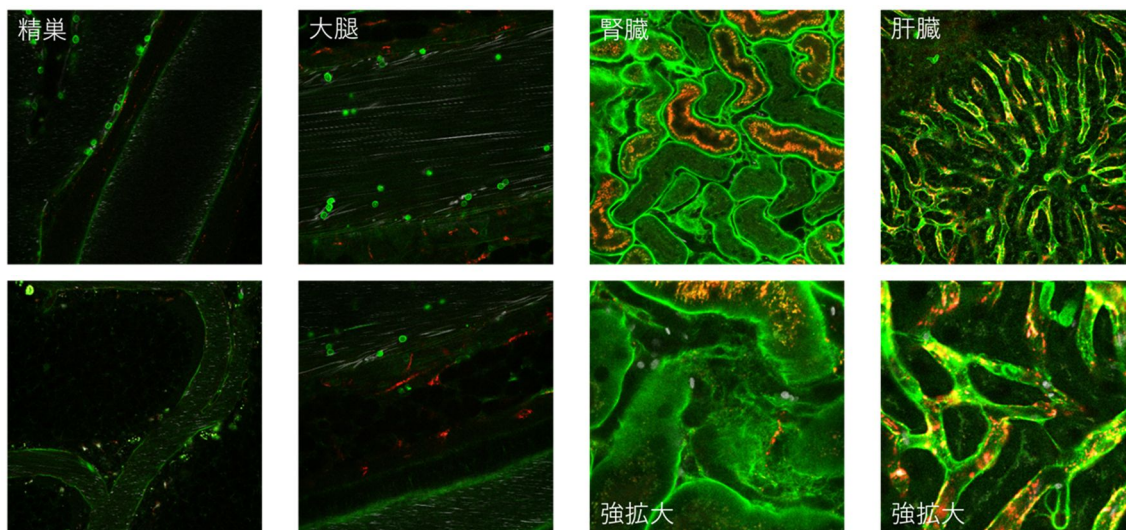
溶血性尿毒症症候群における血栓形成と溶血のメカニズム解明を通じて溶血性尿毒症症候群治療の可能性を探る。特に血栓の制御機構としてグリコカリックスと赤血球の役割を明らかにすることを目指す。

### 3. 研究の方法

- (1) グリコカリックスのインビボイメージング  
蛍光標識したアグルチニンを生体内に投与し、生きている動物体内でのグリコカリックスの様子を観察する手法を構築する。
- (2) 血栓形成要素、血球のインビボイメージング  
溶血性尿毒症症候群が分類される血栓性微小血管症で病態に重要な関わりを持つ、フォンビルブランド因子とフィブリン、血小板の同時イメージング手法を確立する。
- (3) 血栓、血球のインビトロイメージング  
これまで報告の多い血小板血栓を中心とした血栓のインビトロイメージング系とは異なる、フィブリンと血小板血栓を同時観察可能なイメージング系を構築する。また、赤血球濃度を変更しイメージングを行うことで赤血球が血栓に与える影響を確認する。
- (4) 溶血性尿毒症症候群モデルの血栓イメージング  
志賀毒素とリポポリサッカライドの腹腔内注射で溶血性尿毒症症候群モデルマウスを作成し、2)で構築した手法を用いて生体内で形成される血栓のイメージングを行う。
- (5) 血栓性血小板減少性紫斑病モデルの血栓イメージング  
フォンビルブランド因子の切断酵素であるADAMTS13を遺伝的に欠損するマウスの腹腔内にリポポリサッカライドを注射して血栓性血小板減少性紫斑病モデルマウスを作成し、2)で構築した手法を用いて生体内で形成される血栓のイメージングを行う。

### 4. 研究成果

- (1) グリコカリックスのインビボイメージング  
小麦胚芽アグルチニンとトマトレクチンを用いて血管内のグリコカリックスの可視化を試みた。結果トマトレクチンを用いることで生体内のグリコカリックスを効率よく観察できることが判明した。下画像は生体内のグリコカリックスを緑色に染めて観察したものである。

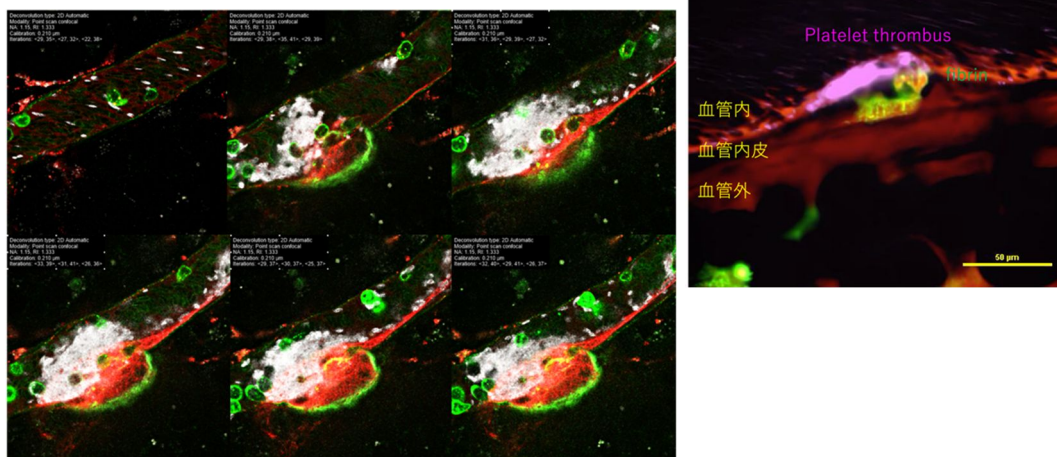




緑色蛍光をつけたトマトレクチンが顕微鏡の検出器等との条件が良く最も観察が良好であった。一方、肺や脾臓など緑色の自家蛍光を発する臓器もあり、こうした臓器では赤色蛍光をつけたトマトレクチンが有用であった。アグルチニンを用いたグリコカリックスの評価は最も一般的ではあるものの課題も見つかった。アグルチニンは血球を凝集させる能力を持つ凝集素であるため、強いシグナルを得ようとするとき血栓傾向が惹起された。染色強度が強く、蛍光強度が強いアグルチニンを用いて観察を行ったものの、血栓傾向を起こさないレベルに変更すると顕微鏡のレーザー出力を上げざるを得ず、褪色および組織障害が問題となった。グリコカリックスを構成する物質に対する抗体では良好な観察をすることができず、グリコカリックスと血栓のリアルタイムイメージングではアグルチニンの影響を考慮する、あるいは血栓とグリコカリックスの評価を別個に行う必要性が考えられた。

(2) 血栓形成要素、血球のインビボイメージング

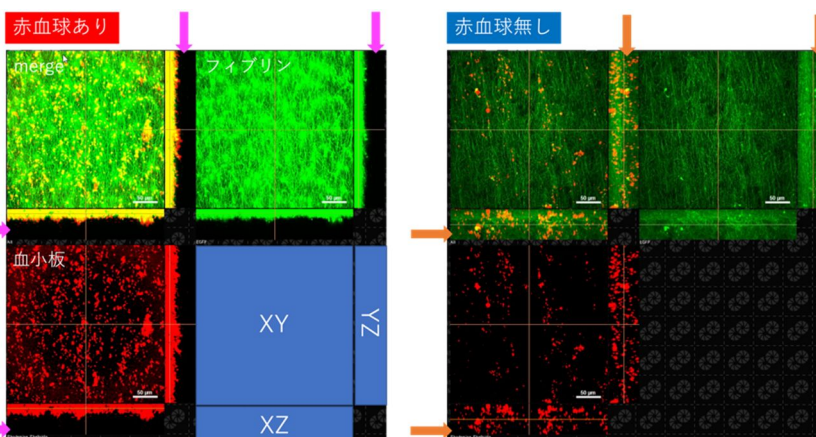
蛍光色素をつけたヒト血液由来のフィブリノゲン、マウス血小板用のインビボイメージング用抗体、蛍光色素をつけたデキストランを用いることで右下図に示すように血小板とフィブリン、赤血球の同時イメージングを行うことが出来た。この図ではピンク色が血小板、緑がフィブリン、赤い血液中の黒いシルエットが赤血球である。



一方、血管傷害をかけるモデルでグリコカリックスと血栓の同時イメージングを試みたところ、血管内での過剰なフィブリン形成が観察された。上図では赤がフィブリン、白が血小板を示す。傷害部位から血管内に続く、血管内皮に沿ったフィブリン形成は通常の血管傷害モデルでは観察されない。アグルチニンは血管内皮のグリコカリックスと結合するため、アグルチニンの結合によりグリコカリックス機能が阻害され、フィブリン形成に至った可能性がある。

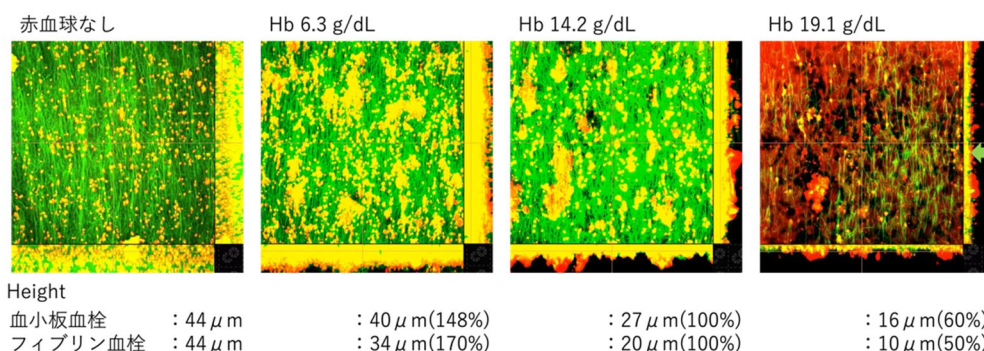
(3) 血栓、血球のインビトロイメージング

従来、傷害血管を模した流路を生体外に作成して形成される血栓を観察する系は血小板血栓を中心に観察する系、あるいは抗凝固物質を添加した上で凝固を抑えて観察する系が多かった。本課題で構築した観察系は流路をコラーゲンと組織因子、リン脂質



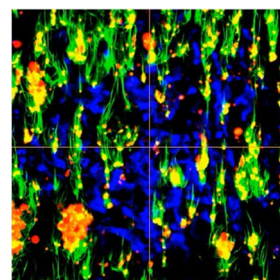
でコーティングすることにより、血小板血栓とフィブリン血栓の双方を観察可能とした。さらに流路に流す血液はクエン酸ナトリウムを用いて採血し、試験直前にカルシウムを添加することにより従来モデルよりも生体内に近い凝固が起こる条件での観察を可能とした。本モデルでまず初期検討として採血した全血から赤血球のみをなくしたものとそのままのもので血栓の形成に差があるかを確認した。フィブリンのシグナルに強弱が出てしまっているが、右上図のように赤血球がある条件ではピンクの矢印で示すよう高さ方向への血小板血栓、フィブリン血栓双方の成長が抑制されている一方で、赤血球がない条件ではオレンジの矢印で示すよう高さ方向への血栓成長が著しかった。他方、血小板血栓の密度は低くなっていた。次に赤血球が無いというような極端な条件だけでなく、実際にヒトの生体

内でも見られるような多血・貧血の状態が血栓形成に影響を及ぼしうるかを確認するため、採血した血液を多血小板血漿、赤血球浮遊血漿、乏血小板血漿に分けた後、再構築することで赤血球無し、貧血、正常血、多血の4条件を作成し、検討を行った。



その結果、上図で示すよう(緑: フィブリン、赤: 血小板)、ヒトで確認されるような貧血の状態であっても血小板・フィブリン血栓の高さ方向への成長が亢進し、他方、多血の状態では血小板・フィブリン血栓の高さ方向への成長は阻害されることがわかった。

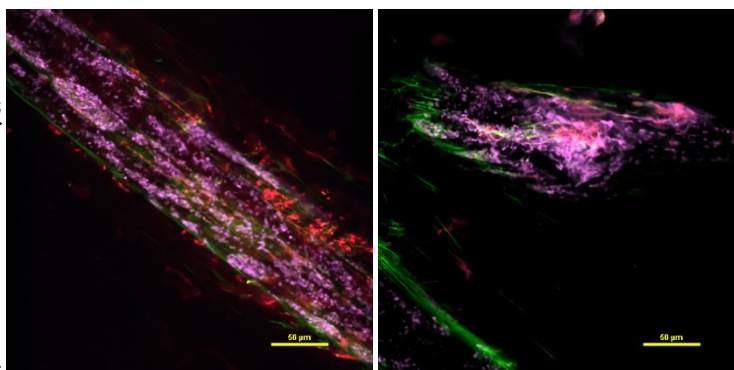
血栓の高さ方向の上端付近では赤血球を青く染色すると右図のように赤血球が流れていることがわかった。ベルヌーイの定理からサイズの大きい赤血球は血管の中心部分を流れるが、血栓は赤血球の流れている領域には成長ができていなかった。これまで赤血球は血栓の形成を促進するという報告が多数あるが、同時に物理的な作用により血栓の大きさを抑制的に制御している可能性が示唆された。



#### (4) 溶血性尿毒症症候群モデルの血栓イメージング

野生型マウスに志賀毒素とリポポリサッカライドを腹腔内注射し溶血性尿毒症症候群モデルマウスを作成した。

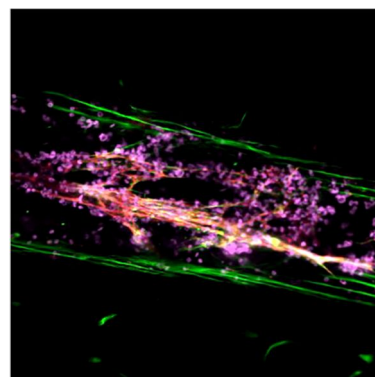
2)で作成した手法を応用し、フォンビルブランド因子とフィブリン、血小板の同時イメージングを行うと右図に示すよう、血管の走行方向に長く伸びる繊維状の血栓が観察され、血管の分岐部や蛇行部には成長した大型血栓が観察された。



また、安楽殺後に確認した腎臓では血小板とフォンビルブランド因子の集簇した血栓が観察された。一方、上画像では緑がフォンビルブランド因子、赤がフィブリン、ピンクが血小板を示すが、繊維状の血栓の小さいものでは血小板のシグナルのみ陽性の構造、成長したものではフィブリンとフォンビルブランド因子で形成された繊維で血小板が数珠つなぎとなっているような構造体として観察された。溶血性尿毒症症候群などの血栓性微小血管症では血小板主体の血栓ができることが知られているが、本観察から病態初期では凝固反応も病態形成に重要である可能性が示唆された。

#### (5) 血栓性血小板減少性紫斑病モデルの血栓イメージング

溶血性尿毒症症候群モデルマウスは志賀毒素とリポポリサッカライドの腹腔内注射で作成した。しかしながら、毒素の取り扱いに注意が必要な点、実験に用いる毒素がCOVID-19および円安の影響で確保しにくくなる可能性があり、溶血性尿毒症症候群と相似の血栓形成を来たす同じ血栓性微小血管症である血栓性血小板減少性紫斑病モデルマウスを用いて観察も行うこととした。また、この検討で4)で確認されたような血栓が溶血性尿毒症症候群モデルマウス特異的なものであるか、血栓性微小血管症で共通で見られる血栓かを確認することができると考えた。本モデルはフォンビルブランド因子切断酵素であるADAMTS13の欠損マウスにリポポリサッカライドを腹腔内注射することで作成した。まずADAMTS13欠損マウスに光増感剤



であるヘマトポルフィリンを投与し、レーザー照射を行うことで、フォンビルブランド因子を放出させ、4)で確認されたような血栓が確認されるかを観察した。この検討では血小板主体の血栓が血管内に形成されたものの、それらは血流によって崩され流され、4)で確認されるような血栓に成長することは無かった。一方この検討にトマトレクチンを追加するとわずかではあるものの繊維状血栓が形成された。リポポリサッカライドの腹腔内注射では前頁図のように溶血性尿毒症症候群モデルマウスで観察されたのと同様のフィブリン(赤)とフォンビルブランド因子(緑)の繊維状の血栓とそこに付着する血小板(ピンク)が確認された。これら観察結果から血小板血栓主体で形成される溶血性尿毒症症候群を含む血栓性微小血管症の血栓形成初期には凝固の関与が示唆された。またグリコカリックスの機能を阻害することで凝固反応が亢進し、繊維状血栓が形成される可能性があった。

溶血性尿毒症症候群でフィブリンとフォンビルブランド因子による繊維状血栓が形成されることを確認した。また赤血球の血栓形成に対する抑制的な制御とグリコカリックスの凝固阻害効果を示唆するデータをイメージングで確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂田飛鳥、辰巳公平、嶋緑倫
2. 発表標題 凝固・血小板血栓形成における赤血球による負の制御機構
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------