

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08516

研究課題名(和文) 生体イメージングによる静脈血栓形成から器質化への時空間的制御機構の可視化

研究課題名(英文) In vivo imaging of DVT formation and organization to understand DVT pathogenesis

研究代表者

原 哲也 (Hara, Tetsuya)

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70547504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：静脈血栓(DVT)は「凝固因子、血管内皮、血流」などの因子がそれぞれ異なる部位、時間で複合的に働くことで形成される。それゆえ、単一細胞の培養系や、位置情報のない生化学的解析、死後の病理サンプルでは疾患理解は困難である。研究代表者はこれまで「生体イメージング」によって血栓の病態の可視化、解明に挑戦してきたが、最近、ヒトDVTに類似した新規のDVTイメージングモデルの開発に独自に成功した。この新規DVTモデルによって、複数の細胞(血小板や赤血球など)や分子(フィブリン、組織因子など)の動態を時間軸をもって、観察、解析し、DVTの形成から器質化に至るまでの病態を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

時空間軸で病態がダイナミックに変化する、血栓症のような循環器疾患の病態は、位置情報のない生化学的な蛋白解析や、時間軸の失われた病理サンプルでは理解が難しい。そのような中で、研究代表者が独自に開発した生体血栓モデルは既存の血栓モデルより実臨床のDVTに近い血栓を、生きたまま顕微鏡レベルで観察可能であり、DVTの理解が革新的に進むことが期待される。血栓溶解療法は経験的に新鮮血栓であれば治療効果が高く、反対に器質化が進めば治療効果が望めない。この器質化機序を解明し、血栓溶解の効果が高い状態を維持できれば、DVTの治療戦略を大きく変えることができる。

研究成果の概要(英文)：DVT forms by Virchow's triad, which includes coagulation, endothelial cells, and blood flow. Therefore, it is difficult to understand using traditional cell culture, chemical, and pathological analyses. I have been trying to understand using bioimaging method. Recently, I established novel in vivo DVT imaging model. We newly visualized and clarified several new aspects of DVT formation and organization process in vivo.

研究分野：循環器内科

キーワード：血栓

1. 研究開始当初の背景

DVTの病態解明は18世紀に提唱されたVirchow3徴から大きく進んでいない。実臨床で経験するDVTはプロテインS欠損などの凝固異常や、腫瘍圧迫などによる血流障害もない、いわゆる原因不明のDVTが圧倒的多数であり、それらに漫然とワーファリンなどの抗凝固療法が行われているのが現状である。

血栓症は「時間」や「分」の単位でおこる急性イベントである。血栓はまさに「秒」の単位で生体内に形成され、その後の血栓が器質化する際も「日」の単位で「どの」炎症細胞が、「どこで」活動するかが刻々と変化していく。このような動的な疾患概念を理解する方法として近年、「二光子顕微鏡」による生体イメージング研究が注目されており、脳神経や皮膚、免疫領域において研究が進んでいる。しかし、体内深部にあり、拍動する臓器を扱う循環器領域では生体下の顕微鏡観察が困難である。

時空間軸で病態がダイナミックに変化する、血栓症のような循環器疾患の病態は、位置情報のない生化学的な蛋白解析や、時間軸の失われた病理サンプルでは理解が難しい。そのような中で、研究代表者が独自に開発した生体血栓モデルは既存の血栓モデルより実臨床のDVTに近い血栓を、生きたまま顕微鏡レベルで観察可能であり、DVTの理解が革新的に進むことが期待される。

血栓溶解療法は経験的に新鮮血栓であれば治療効果が高く、反対に器質化が進めば治療効果が望めない。この器質化機序を解明し、血栓溶解の効果が高い状態を維持できれば、DVTの治療戦略を大きく変えることができる。

2. 研究の目的

静脈血栓(DVT)は「凝固因子、血管内皮、血流」などの因子がそれぞれ異なる部位、時間で複合的に働くことで形成される。それゆえ、単一細胞の培養系や、位置情報のない生化学的解析、死後の病理サンプルでは疾患理解は困難である。研究代表者はこれまで「生体イメージング」によって血栓の病態の可視化、解明に挑戦してきた(Hara et al.

Circulation. 2014, Hara et al, *Eur Heart J*. 2017)が、最近、ヒトDVTに類似した新規のDVTイメージングモデルの開発に独自に成功した。この新規DVTモデルによって、複数の細胞(血小板や赤血球など)や分子(フィブリン、組織因子など)の動態を時間軸をもって、観察、解析し、DVTの形成から器質化に至るまでの病態を解明したい。

3. 研究の方法

本研究開発は(1)生体イメージング可能なヒトDVTの特徴をもつ新規の血栓モデルを確立し、(2)多光子顕微鏡による時間軸を含む4次元データを駆使して、血栓形成、溶解、器質化における各キープレイヤー(血管内皮、白血球、血小板など)の時空間的ダイナミクスを分子レベルで生体下に可視化することで解明することを目指す。

4. 研究成果

(1). 新規生体血栓イメージングの確立

麻酔下にマウスの下腿を皮膚切開し、大腿静脈を露出する。外科的に静脈のみを部分結紮し、血流うっ滞を形成させ、蛍光顕微鏡下に観察する。蛍光顕微鏡での励起光の照射下に 10-20 秒程度観察するとリアルタイムで血栓形成を観察できることが前実験的に明らかとなった。形成される血栓は既存モデルと比較してヒト DVT と類似した特徴（形態、好発部位、赤白色血栓など）が多い。既存モデルのような腸間膜動静脈や精巣動静脈と異なり、大腿静脈（ヒト DVT が実際に起こる大型の静脈）で DVT の性質を併せ持つ血栓が形成される、世界初のモデルである。

(2). 静脈血栓形成から器質化の時空間的制御機構の可視化

蛍光標識した抗好中球抗体や抗血小板抗体、フィブリンをマウスに経静脈投与することによって、生体下に血栓形成時の好中球や血小板などの動態を経時的に可視化できる。さらに市販されている MMPsense 等によって炎症イメージング、各種蛍光標識抗体（抗セレクチン抗体など）で分子レベルのイメージングが可能である。すなわち、血管内皮の接着因子や各種血球と炎症反応の時空間的制御機構を同時にマルチカラーイメージングで明らかにできる。白血球と血小板は各種抗体以外にもローダミン 6G を用いて安価に蛍光イメージングが可能である。実際にローダミン 6G をマウスに静脈投与したところ、10 分後には血管表面を白血球がローリングしていく様子などをリアルタイムに観察することに成功した。

次に、通常の蛍光顕微鏡だけではなく、生体深部まで 4 次元データとして観察可能な二光子蛍光顕微鏡に応用する。我々は前実験的に、本モデルの DVT を二光子顕微鏡で生体下に観察することに成功した。これにより、一つの白血球や赤血球レベルの分解能で観察できる。実際に二光子顕微鏡での 1 細胞レベルの観察にも成功した (Okano, Hara et al. Jacc Basic Transl Sci 2020) .

(3). 血小板の血栓形成、器質化における機能の解明

抗血小板抗体を経静脈投与し、血中の血小板を除去する。前実験では血小板除去後も血栓は形成されるが、明らかに辺縁不明瞭になるなど、形態的特徴が変化しており、DVT 自体に血小板は多く存在しなくとも、何らかの間接的な役割を果たしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okano Mitsumasa, Hara Tetsuya, Nishimori Makoto, Irino Yasuhiro, Satomi-Kobayashi Seimi, Shinohara Masakazu, Toh Ryuji, Jaffer Farouc A., Ishida Tatsuro, Hirata Ken-ichi	4. 巻 5
2. 論文標題 In Vivo Imaging of Venous Thrombus and Pulmonary Embolism Using Novel Murine Venous Thromboembolism Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 344 ~ 356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jacbts.2020.01.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tetsuya Hara
2. 発表標題 In Vivo Imaging of Venous Thrombus and Pulmonary Embolism Using Novel Murine Venous Thromboembolism Model
3. 学会等名 国際血栓止血学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tetsuya Hara
2. 発表標題 Novel murine in vivo imaging model of deep venous thrombosis
3. 学会等名 日本血栓止血学会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------