

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08577

研究課題名(和文)適切な抗血栓療法の実現に向けた血栓形成-溶解連関の時空間的制御機構の解明

研究課題名(英文) Understanding in spatio-temporal regulation mechanism of thrombus formation and dissolution for realization of appropriate antithrombotic therapy

研究代表者

鈴木 優子 (Suzuki, Yuko)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：20345812

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)：血液凝固反応は、出血部位では十分に活性化されて止血血栓の形成を促進し、一方、血管内では活性化されず血栓を形成しないように精巧に調節されている。生活習慣病や加齢に伴う種々病態では血管内で血栓形成がおこりやすくなっている。これを予防するための抗血栓薬や血栓症治療薬では、止血血栓形成も抑制され出血リスクが問題となる。本研究では、血栓形成能に関わる一連の反応系を可視化解析することにより、出血リスクを抑えた血栓症治療の可能性を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋梗塞や脳梗塞をはじめとした従来の血栓性疾患のみならず、近年では新型コロナウイルス感染症の重症化ならびにワクチン接種における血栓症リスクがクローズアップされた。本研究では血小板の活性化、凝固反応の活性化、生じた血栓を溶かす線維素溶解(線溶)の各反応系を一連の時空間的に制御される反応系として解析した。これをさらに各病態に応じた反応系として捉えることで、より適切な血栓症の治療・予防法の確立につながる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The blood coagulation system is precisely regulated by either facilitating the activation of its cascade, resulting in prompt hemostatic thrombus formation at the vascular injury site, or preventing thrombus formation by inhibiting their activation in the vessels. It is well known that intravascular thrombus forms easily in various pathological conditions such as atherosclerosis, lifestyle-related disease, and aging, including atrium fibrillation. Antithrombotic drugs, either used for prophylactic or treatment in thrombotic patients, suppress hemostatic thrombus formation but increase the risk of bleeding. Therefore, the formation and dissolution of a thrombus should be clearly explained to deal with such a problem. This study investigated the formation and dissolution of a thrombus by directly visualizing the process using fluorescence microscopy. As a result, we expect the possibility of an effective treatment for thrombosis that reduces the risk of bleeding.

研究分野：血栓止血学 生理学

キーワード：線維素溶解(線溶) 可視化解析 血小板 血栓形成 トロンピン生成 トロンボモジュリン トロンピン活性化線溶抑制因子 蛍光顕微鏡

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化を基盤とした虚血性心疾患や脳血管障害の薬物療法では、強力な抗血栓療法によりイベント発生が抑制できる一方で、出血リスクの上昇のみならず生命予後も悪化させることが判明してきた。その是非が世界的にも問われるようになり抗血栓療法のスリム化が模索され始めた。2018年には欧州と米国で心房細動合併経皮的冠動脈インターベンション(PCI)患者に対する抗血栓療法の基本アルゴリズムとして「3剤はPCI周術期のみ、抗凝固1剤・抗血小板1剤の2剤併用は最長12か月とし以降は抗凝固単剤」が提唱された。本邦でも追随する形でエビデンス発信のための臨床試験が進められた。

このように大きな転換期を迎えた「適切な抗血栓療法」の実現のためには、ランダム化比較試験によるエビデンス創出に加えて、その基盤となる血栓形成溶解制御機構に対する十分な理解が必須である。血小板活性化・凝固反応開始増幅・線溶系活性化の各過程は独立した反応系ではなく互いにクロストークした時空間的な増幅制御系であるという『血栓形成-溶解連関』として捉え、抗凝固薬が血小板・線溶系の活性化を、また抗血小板薬が凝固線溶系を修飾するというものである。

これまでに我々は、リアルタイムイメージング手法を用いて時空間的な血栓形成-溶解制御機構の解明を *in vivo* から *in vitro* まで精力的に進めてきた。生体顕微鏡を用いたマウス細静脈におけるレーザー惹起微小血栓モデルでは、微小血栓中心部にて活性化血小板による凝固反応開始機転が生じフィブリン形成が増幅される。一方で、その辺縁部の血小板は最大活性化状態(phosphatidylserine; PSが細胞膜外層に表出し凝固反応を促進できる状態)には至らないこと(Pflugers Arch 2008)、血栓形成早期より中心部のフィブリン形成部位に線溶酵素であるプラスミノゲンが集積し、プラスミン活性によりその集積が増強すること(PLOS ONE 2015)を示した。ヒト血小板血漿を用いた系では、同血漿に組織因子/リン脂質を添加して凝固カスケードを惹起しフィブリン網を形成させると、血小板へのフィブリン結合に伴う力学的作用により血小板活性化-凝固反応のクロストーク増幅が生じること(PLOS ONE 2013)、PS表出活性化血小板膜はフィブリン網形成開始点になり、かつ同部位は組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)とプラスミノゲン集積が局在化し、線溶反応を開始点となり同反応を促進すること、さらに可溶性トロンボモジュリンに結合したトロンピンが線溶抑制因子(thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor: TAFI)を活性化し、プラスミノゲンのフィブリンへの結合に必要なC末端リジン除去して線溶反応を強力に抑制するという血栓形成-溶解反応の直接的なクロストーク機構(Thromb Haemost 2017)を報告してきた。また血管内皮細胞は活性型酵素としてtPAを分泌し、線溶系を活性化して内皮上の不要血栓を速やかに溶解することを可視化解析してきた(Blood 2009/2011, Thromb Res 2013, FEBS Open Biol 2016)。一方で、内皮表面(あるいは血漿中可溶性)トロンボモジュリンはトロンピンとの複合体により効率良くTAFIを活性化して血栓溶解を阻害し止血血栓の安定化に寄与すると考える(Review in J Thromb Haemost 2018)が、TAFI活性化による線溶抑制・血管内皮細胞による線溶活性促進/抑制の時空間的制御機構は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では『時空間的な血栓形成-溶解連関制御機構』を解析し、抗血栓薬による血栓形成-溶解に関わる各反応系への修飾作用を明らかにすることを目的とする。これにより止血血栓形成・維持能を損なわない抗血栓効果(血管内病的血栓形成抑制・不要血栓溶解促進)の発揮されるような方策の提言につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト血小板血漿を用いたトロンボモジュリン/TAFI系による線溶修飾の検討

TAFIの活性化による線溶活性への影響を以下検討した。

- ・濁度法によるクロット溶解時間
- ・共焦点レーザー走査顕微鏡による蛍光標識プラスミノゲンの集積と溶解反応の進行拡大・蛍光標識TAFIの局在性

(2) 全血の流速存在下におけるTAFI活性化の影響を血栓形成能解析システム(T-TAS)にて検討した。

(3) マウス微小血栓溶解モデルにおけるTAFI活性化の関与を生体顕微鏡にて検討した。

(4) 抗血栓薬がTAFI活性化に及ぼす影響を血小板血漿にて検討した。

4. 研究成果

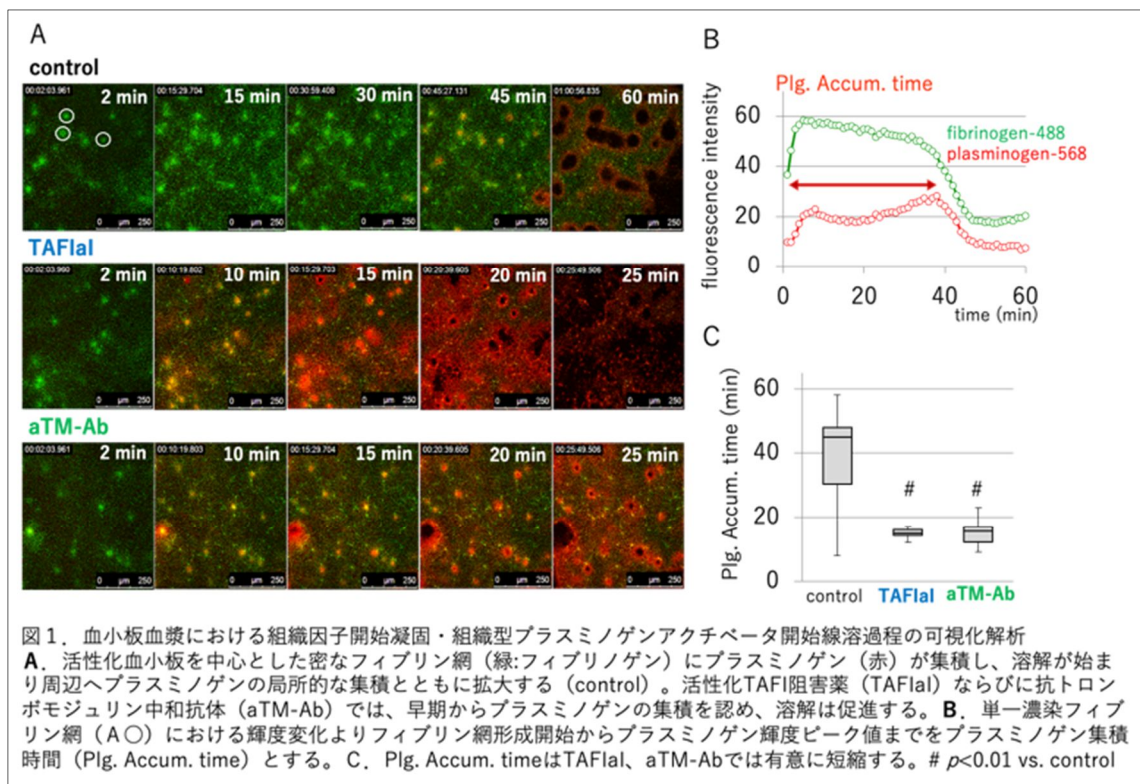
(1) ヒト血小板血漿を用いたトロンボモジュリン/TAFI系による線溶修飾の検討

血小板血漿に組織因子(外因系凝固反応の開始因子)を添加して凝固反応を惹起し、添加しておいたtissue-type plasminogen activator(tPA)により線溶反応が開始される系を用いた。

クロット溶解時間は活性化TAFI阻害薬(TAFIaI)、抗トロンボモジュリン中和抗体にて短縮した。血小板の存在下で認めるクロット溶解時間の延長はほぼTAFIの活性化によるもので、血漿

中の可溶性トロンボモジュリンが、血漿 TAFI を血小板存在下に効率よく活性化することが明らかとなった。

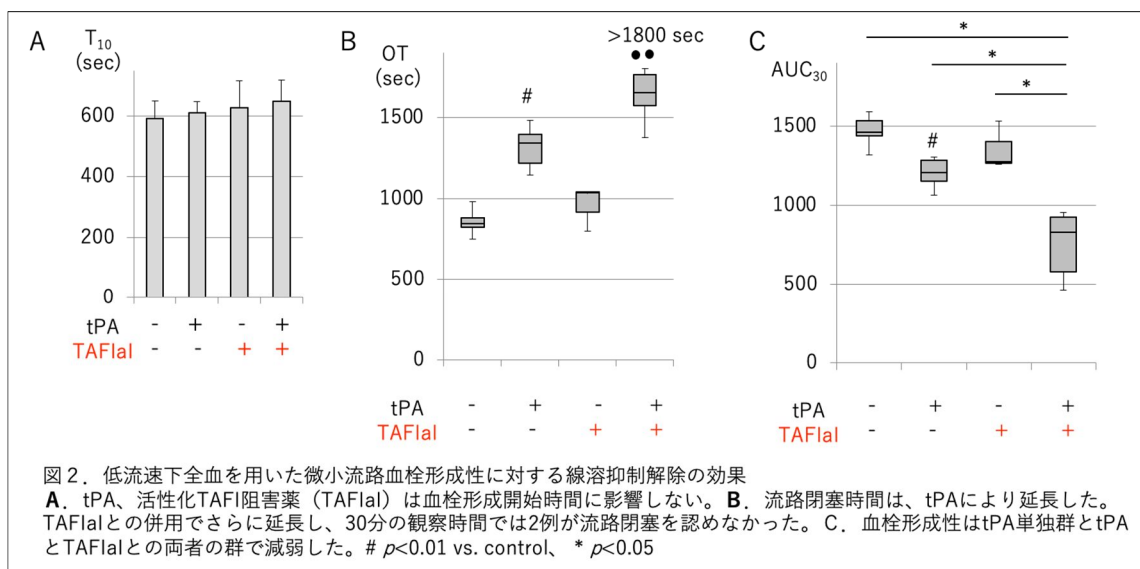
可視化解析では、密なフィブリン網に対して早期からプラスミノゲンの集積増強を認め、溶解が促進していることが確認できた (図 1)。



また蛍光標識 TAFI は、プラスミノゲンの局在と一致する C 末端リジンへの集積と C 末端リジンに依存しない血小板膜表面への集積の 2 つの異なる集積性を示した。

(2) 流速存在下における TAFI 活性化の検討

血小板の存在下における TAFI 活性化による線溶抑制は、全血流速存在下でも生じることが TAFIa による線溶促進として検出することに成功した (図 2)。



以上の知見を論文にまとめ報告した (Suzuki et al. Blood Adv 2020)。

(3) マウス微小血栓モデルにおける TAFI 活性化の検討

多光子励起顕微鏡を用いて、GFP マウスの腸間膜静脈の単一血管内皮細胞レベルでレーザー焼灼をし、微小血栓を作成した (図 3 左)。レーザー傷害を与えた 30 分後にリコンビナント tPA (rt-PA) を静脈投与し、5 分後より血栓を観察した。血栓中に集積した標識プラスミノゲンの最大輝度値にいたるまでの時間ならびにほぼ完全に血栓が溶解するまでの時間は、rt-PA 単独投与に比し、

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Suzuki Yuko, Sano Hideto, Mochizuki Liina, Honkura Naoki, Urano Tetsumei	4. 巻 4
2. 論文標題 Activated platelet-based inhibition of fibrinolysis via thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor activation system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 5501 ~ 5511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020002923	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Yuko, Tanaka Hiroki, Horinouchi Takahiro, Sano Hideto, Honkura Naoki, Unno Naoki, Miwa Soichi, Urano Tetsumei	4. 巻 10
2. 論文標題 Fibrinolysis-resistant carbonylated fibrin detected in thrombi attached to the vascular wall of abdominal aortic aneurysms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-77582-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 鈴木 優子、浦野 哲盟	4. 巻 61
2. 論文標題 血栓形成溶解の時空間的制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1349 ~ 1357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.61.1349	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 -
1. 著者名 Urano Tetsumei, Suzuki Yuko	4. 巻 4
2. 論文標題 Assessing plasminogen activation potential with global fibrinolytic assays	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 13 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rth2.12293	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 -

1. 著者名 Urano Tetsumei, Suzuki Yuko, Iwaki Takayuki, Sano Hideto, Honkura Naoki, Castellino Francis J.	4. 巻 20
2. 論文標題 Recognition of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 as the Primary Regulator of Fibrinolysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Drug Targets	6. 最初と最後の頁 1695 ~ 1701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1389450120666190715102510	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 -

1. 著者名 Hashimoto Takuya, Mogami Hideo, Tsuruya Daisuke, Morita Hiroshi, Sasaki Shigekazu, Kumada Tatsuro, Suzuki Yuko, Urano Tetsumei, Oki Yutaka, Suda Takafumi	4. 巻 14
2. 論文標題 G-protein-coupled receptor 40 agonist GW9508 potentiates glucose-stimulated insulin secretion through activation of protein kinase C and in INS-1 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0222179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0222179	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 -

1. 著者名 Tanaka Hiroki, Zaima Nobuhiro, Kugo Hirona, Yata Tatsuro, Iida Yasunori, Hashimoto Keisuke, Miyamoto Chie, Sasaki Takeshi, Sano Hideto, Suzuki Yuko, Moriyama Tatsuya, Shimizu Hideyuki, Inuzuka Kazunori, Urano Tetsumei, Unno Naoki	4. 巻 63
2. 論文標題 The Role of Animal Models in Elucidating the Etiology and Pathology of Abdominal Aortic Aneurysms: Development of a Novel Rupture Mechanism Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Vascular Surgery	6. 最初と最後の頁 382 ~ 390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.avsg.2019.08.082	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 -

1. 著者名 Mathews Nitty Skariah, Suzuki Yuko, Honkura Naoki, Sano Hideto, Iwashita Toshihide, Urano Tetsumei	4. 巻 210
2. 論文標題 Pre-administration of a carboxypeptidase inhibitor enhances tPA-induced thrombolysis in mouse microthrombi: Evidence from intravital imaging analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 78 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2021.12.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito Tae, Suzuki Yuko, Sano Hideto, Honkura Naoki, Castellino Francis J., Urano Tetsumei	4. 巻 122
2. 論文標題 Demonstration of Three Distinct High-Molecular-Weight Complexes between Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 and Tissue-Type Plasminogen Activator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 336 ~ 343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-1508-7919	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 -

1. 著者名 SUZUKI Yuko	4. 巻 32
2. 論文標題 Real-time imaging techniques illuminate spatiotemporal regulation of fibrinolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis	6. 最初と最後の頁 495 ~ 503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2491/jjsth.32.495	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 鈴木 優子
2. 発表標題 「教育講演」血栓形成溶解の時空間的制御
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 優子
2. 発表標題 特別企画シンポジウム「次世代リーダーからのメッセージ」血栓形成-溶解機構の時空間的解析
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Suzuki Y, Sano H, Honkura N, Urano T
2. 発表標題 Modulation of thrombin generation or thrombin activity on activated platelets surface largely affected TAFI-dependent regulation of fibrinolysis.
3. 学会等名 The XXVII Congress of the International Society on Thrombosis and Hemostasis (ISTH), (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 優子, 佐野 秀人, 本藏 直樹, 浦野 哲盟
2. 発表標題 トロンピンによるTAFIの活性化を介した線溶阻害作用のリアルタイムイメージング解析
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuko Suzuki
2. 発表標題 Platelet-dependent activation of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)
3. 学会等名 The XXVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuko Suzuki
2. 発表標題 Spatiotemporal regulation of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) activation on activated platelets
3. 学会等名 Gordon Research Conference; Plasminogen Activation and Extracellular Proteolysis (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木優子
2. 発表標題 thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor/活性化機構の時空間的解析
3. 学会等名 第41回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木優子
2. 発表標題 活性化血小板に基づく線溶反応の時空間的解析
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木優子
2. 発表標題 血栓形成と溶解反応におけるクロストークの時空間的解析
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuko Suzuki, Tetsumei Uranno
2. 発表標題 Imaging analysis of cell-based regulation of fibrinolysis
3. 学会等名 The 3rd Joint Meeting of the International Society of Fibrinolysis and Proteolysis and the Plasminogen Activation Workshop （招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuko Suzuki
2. 発表標題 Spatiotemporal regulation of TAFI activation, plasminogen activation, and fibrinolysis by thrombin
3. 学会等名 2022 Gordon Research Conference (GRC) on Plasminogen Activation and Extracellular Proteolysis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木優子、Nitty Mathws、佐野秀人、本藏直樹、浦野哲盟
2. 発表標題 生体顕微鏡を用いたレーザー惹起微小血栓溶解におけるcarboxypeptidase inhibitorの効果
3. 学会等名 第44回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木優子
2. 発表標題 Real time imaging techniques illuminate spatiotemporal regulation of fibrinolysis
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuko Suzuki, Hideto Sano, Naoki Honkura, Tetsumei Urano
2. 発表標題 Spatiotemporal regulation of fibrinolysis via thrombomodulin/thrombin/ TAFI system.
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木優子、望月里衣奈、佐野秀人、本藏直樹、浦野哲盟
2. 発表標題 活性化血小板による線維素溶解（線溶）抑制機構
3. 学会等名 第68回中部日本生理学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 血漿中線溶抵抗活性の評価方法	発明者 鈴木優子、浦野哲盟	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-177098	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	浦野 哲盟 (Urano Tetsumei) (50193967)	浜松医科大学・医学部・特命研究教授 (13802)	
研究分担者	佐野 秀人 (Sano Hideto) (80623842)	浜松医科大学・医学部・助教 (13802)	
研究分担者	本藏 直樹 (Honkura Naoki) (40518081)	浜松医科大学・医学部・准教授 (13802)	

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
---------	---------