

令和 5 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15640

研究課題名(和文)革新的血小板凝集塊解析による血栓性疾患の病態解明

研究課題名(英文)Analysis of platelet aggregates in thrombotic diseases

研究代表者

西川 真子(Nishikawa, Masako)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30779369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血小板の活性化と凝集は、血栓症の発症プロセスにおいて重要な役割を担っており、その詳細な解析は血栓症の早期診断や重症化リスクの予測に繋がる可能性がある。我々の研究グループは血液中の血小板凝集塊を正確に測定する技術開発を行い、血液中の血小板および血小板凝集塊を高速・高感度光学撮像装置で一つずつ迅速かつ大量に撮像し、その形態学的特徴を解析する技術を開発した。この解析系を用いて、当院の血栓性疾患患者の血液中の血小板凝集塊の解析を行った。さらに血管狭窄を模倣したマイクロ流路を用いて解析を行い、アテローム性血管狭窄によって形成される血小板凝集塊と循環因子の相乗効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内の血栓症には、アテローム血栓性脳梗塞や急性冠症候群などの動脈血栓と、深部静脈血栓症や肺塞栓症などの静脈血栓がある。動脈血栓症の主な原因は、血管狭窄部におけるシアストレスや動脈硬化等で傷ついた血管内皮が起点となり活性化された血小板であり、アテローム血栓症を発症した患者には、再発リスクを低減するために抗血小板薬が広く臨床利用されている。また静脈血栓症の発症にも血小板活性化が関係するとの報告もある。血小板の活性化と凝集は、血栓症の発症プロセスにおいて重要な役割を担っており、その詳細な解析は血栓症の早期診断や重症化リスクの予測に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Platelet activation and aggregation play an important role in the pathogenesis of thrombosis, and their detailed analysis may lead to early diagnosis of thrombosis and prediction of the risk of severe disease.

Our research group has been developing a technique to accurately measure platelet aggregates in blood. We have developed a technique to rapidly and massively image platelets and platelet aggregates in blood one by one with a high-speed, high-sensitivity optical imaging system and analyze their morphological characteristics. Using this analysis system, we analyzed platelet aggregates in the blood of patients with thrombophilia at our hospital.

We further analyzed the platelet aggregates using microfluidic channels that mimic vascular stenosis, and confirmed the synergistic effect of platelet aggregates and circulating factors formed by atherothrombotic vascular stenosis.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：血小板凝集塊 血栓症 AI解析 医工連携

1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞や脳梗塞などのアテローム血栓症や、下肢静脈血栓症や肺塞栓症などの静脈血栓症に代表される血栓性疾患は、高い罹患率と死亡率をきたす病態である。アテローム血栓症の主な原因は、シアストレスや動脈硬化等で傷ついた血管内皮が起点になり活性化された血小板であり、アテローム血栓症を発症した患者には、再発リスクを低減するためにアスピリンやクロピドグレルなどの抗血小板薬が広く臨床利用されている。また静脈血栓症の発症にも血小板活性化が関係するとの報告もある。

血小板の活性化と凝集は、血栓性疾患の発症プロセスにおいて重要な役割を担っており、その詳細な解析は血栓性疾患の病態解明に繋がる可能性がある。血栓性疾患の病態解明や適切な治療モニタリングが進まない原因として、生体内の血小板凝集塊の構造、組成、及び統計に関する情報を同時に解析することができない、すなわち、血栓の質が診断できない、という臨床検査の限界がある。広く臨床応用され、COVID-19 関連血栓症との様々な関連が報告されている、Dダイマーなどの血液検査マーカーは血栓形成の定量評価であり、血栓の質についての診断ツールは世界的に存在しない。

2018年に研究協力者である合田、矢富らは、細胞の特徴を迅速に高感度光学撮影装置で捉え、深層学習等の情報処理技術で画像分析し、目的とする細胞を選別する技術(iLACS)を開発し、血液中の血小板凝集塊の識別に成功した(Cell, 2018)。さらに2020年に、高感度光学撮影装置で捉えた血小板凝集塊の時空間的特徴(大きさ、形状、複雑さ、血中濃度、経時変化など)に人工知能解析を加え、血小板凝集塊の形態から刺激物質の種類を同定する手法(intelligent Platelet Aggregate Classifier: iPAC)の開発に成功した(eLife, 2020)。長年区別がつかないと考えられていた血小板凝集塊を、活性化を誘導する刺激物質の種類により分類する世界初の技術であり、多分野の技術を集結したAI血小板凝集塊識別法(iPAC)は、世界的にも類を見ない新しい着眼点の血小板凝集塊解析技術である。

2. 研究の目的

本研究では、前述の基盤技術 iPAC を用いて、血栓性疾患患者の血液中に存在する血小板凝集塊をプロファイリングして解析し、血栓症の病態を明らかにする。また、治療前後の時系列データを解析することで、抗血栓療法の薬効評価法、治療モニタリング法の確立を目指す。

3. 研究の方法

血栓性疾患の発症機序は多彩かつ複雑であり、その解析を行うために以下のように臨床研究、基礎研究を統合して研究を進めた。

(1) 血小板凝集塊解析プロトコルの検討

健常人の血液を用いて解析装置のバリデーションを行うとともに、サンプル作成プロトコルの検討を行い、プロトコルを最適化した。

(2) 血栓性疾患患者の大規模血小板凝集塊解析

東京大学医学部附属病院検査部の解析装置を用いて、東京大学医学部附属病院の血栓性疾患患者(血球増多性疾患、動脈血栓性疾患、静脈血栓性疾患、COVID-19 症例およびDダイマー高値症例)の臨床サンプルを取得した。血液サンプルから血小板凝集塊の明視野画像データの取得、臨床情報、Dダイマーなど検査値データを取得した。得られた血小板凝集塊の構造、組成、濃度、経時変化等の様々な情報を総合的に深層学習を用いて解析した。

(3) 血管狭窄を模倣したマイクロ流体チップ、血小板アゴニストを用いた血小板凝集塊解析

冠動脈疾患において、血管壁に形成されるアテローム性プラークによる血管狭窄と、狭窄部で生じるシアストレス等による血小板の過剰な活性化により生じた血中の血小板凝集塊の関連が報告されているが、従来の in vivo 及び in vitro の血管モデルでは、生理的な血管狭窄部による血小板活性化メカニズムの詳細は解明されていなかった。血管狭窄を模倣したマイクロ流体チップ(stenosis chip)と血小板アゴニスト、iPAC を用いて、アテローム性血管狭窄部によって引き起こされる血小板凝集を解析した。

4. 研究成果

(1) 血小板凝集塊解析プロトコルの検討

採血後の時間経過に伴い、血小板凝集塊が減少するため、採血後4時間以内にサンプル作成を行うこととした。サンプル作成は、クエン酸血を用いて、密度勾配法で赤血球を除去し、蛍光標

識抗血小板抗体で血小板を標識，単一血小板または血小板を含む細胞塊を選択的に撮像した．時間経過に伴い抗体の蛍光強度が減弱するため，サンプル作成当日に画像取得を行うこととした．

(2) 血栓性疾患患者の大規模血小板凝集塊解析

2020年から大流行した COVID-19 において脳梗塞，心筋梗塞，肺血栓塞栓症，深部静脈血栓症などの多彩かつ複雑な血栓症の発症が認められ，血栓症の発症が COVID-19 の予後増悪因子であることが明らかになった．これを受け，東京大学医学部附属病院に入院した COVID-19 患者の大規模血小板凝集塊解析を実施した．その結果，全患者の約 9 割において，過剰な数の循環血小板凝集塊が存在することが見いだされ，また，循環血小板凝集塊の出現頻度と COVID-19 患者の呼吸状態に基づく重症度，死亡率，血管内皮機能障害の程度に強い相関があることを発見した．

また，COVID-19 ワクチンが血小板に与える長期的な影響を調べる目的で，健常人が COVID-19 ワクチンを接種する前後での血小板凝集塊を長期にわたって解析した．ワクチン接種後に免疫応答に伴い一過性の単球およびリンパ球の減少を認めたが，血小板凝集塊の比率は，ワクチン投与後に有意または持続的な傾向を示さなかった．

動脈血栓症，静脈血栓症，播種性血管内凝固の患者においても血小板凝集塊比率の増加を認めた．

COVID-19 患者と血栓性疾患患者を対象に，血液中の単一血小板及び血小板凝集塊の明視野画像を大規模に取得し，それらの画像群を用いて畳み込みニューラルネットワーク (CNN) を学習させることで，画像群を血小板，血小板のみの血小板凝集塊，白血球を含んだ血小板凝集塊にそれぞれ分類した．その後，各集団から得られた複数の細胞特徴量に基づいて，機械学習アルゴリズムの一つであるランダムフォレストを学習させ，血小板凝集塊の形態的特徴をもとに血栓性疾患患者と COVID-19 患者の分類を試みた．分類モデルの検証を行うと，病態の分類精度は 75% であった．検証結果は，COVID-19 関連血栓症と非 COVID-19 血栓症における血小板凝集塊の形成過程の違いを反映している可能性があると考えられた．

血小板を活性化する刺激は受容体アゴニスト，血漿高分子，ずり応力などの物理的刺激等と様々であるが，その結果形成される血小板凝集塊を形態学的に分類することはこれまで不可能であった．これを解決するために，深層学習を用いて，アゴニストごとの血小板凝集塊の分類を試みた．健常人から採取した血液に，4 種のアゴニストを別々に加えた計 16 サンプルを用意し，これらのアゴニスト刺激によって血小板凝集が惹起されることを確認した．大量の血小板及びその凝集塊の画像を取得し，深層学習による分類モデルを構築した．さらに東京大学医学部附属病院の患者血液中の血小板凝集塊に対する各アゴニストタイプの寄与を予測した．構築したモデルによって，健常人サンプル中の血小板凝集塊の形態から活性化に寄与したアゴニストの種類を同定することができた．また，独立したデータセットでモデルの再現性を確認した．

(3) 血管狭窄を模倣したマイクロ流体チップを用いた血小板凝集塊解析

血管狭窄を模倣したマイクロ流体チップを作製し，流路内で血液サンプルを循環させ，アゴニストとずり応力によって引き起こされる血小板凝集の *in vitro* モデルを作製した．血小板アゴニストを加え，マイクロ流体チップを含んだ流路内で血液サンプルを循環させると，血小板の凝集が顕著に促進されることが明らかになり，血小板の活性化にはアテローム形成の血流障害と循環因子が相乗的に作用することが示唆された．特にトロンピン受容体アゴニストペプチド (TRAP) -6 により活性化された血小板は明らかに大きな凝集塊を形成し，サイズも広範囲に分布することがわかった．

本解析系で抗血小板薬の薬効評価が可能かを評価するため，3 種の抗血小板薬 (アスピリン，P2Y₁₂ 阻害薬，GP b/ a 阻害薬) を添加し，同様の実験を行った．抗血小板薬の添加濃度に依存して血小板凝集塊のサイズと濃度の縮小を認め，抗血小板薬の薬効評価法としての有用な解析結果を得た．

本研究成果から，循環血液中の血小板凝集塊の解析が血栓症発症機序の解明や重症化リスクの予測，薬効評価などに資すると期待された．さらに従来困難とされていた体内の血小板活性化計測が，臨床応用が可能な精度で実行可能であることが示された．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 1件）

1. 著者名 Nishikawa Masako, Kanno Hiroshi, Zhou Yuqi, Xiao Ting-Hui, Suzuki Takuma, Ibayashi Yuma, Harmon Jeffrey, Takizawa Shigekazu, Hiramatsu Kotaro, Nitta Nao, Kameyama Risako, Peterson Walker, Takiguchi Jun, Deng Yunjie, Zhang Hongqian, Miyata Shigeki, Rohde Gustavo K, Iwasaki Wataru, Yatomi Yutaka, Goda Keisuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Massive image-based single-cell profiling reveals high levels of circulating platelet aggregates in patients with COVID-19	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7135 ~ 7146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27378-2	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 該当する
1. 著者名 Zhou Yuqi, Nishikawa Masako, Kanno Hiroshi, Yang Ruoxi, Ibayashi Yuma, Xiao Ting Hui, Peterson Walker, Herbig Maik, Nitta Nao, Miyata Shigeki, Kanthi Yogendra, Rohde Gustavo K., Moriya Kyoji, Yatomi Yutaka, Goda Keisuke	4. 巻 103
2. 論文標題 Long term effects of Pfizer BioNTech COVID 19 vaccinations on platelets	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cytometry Part A	6. 最初と最後の頁 162 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cyto.a.24677	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 -
1. 著者名 Zhang Chenqi, Herbig Maik, Zhou Yuqi, Nishikawa Masako, Shifat E Rabbi Mohammad, Kanno Hiroshi, Yang Ruoxi, Ibayashi Yuma, Xiao Ting Hui, Rohde Gustavo K., Sato Masataka, Kodera Satoshi, Daimon Masao, Yatomi Yutaka, Goda Keisuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Real time intelligent classification of COVID 19 and thrombosis via massive image based analysis of platelet aggregates	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cytometry Part A	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cyto.a.24721	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 -
1. 著者名 Deng Yunjie, Duque Jaime Alvarez, Su Chengxun, Zhou Yuqi, Nishikawa Masako, Xiao Ting-Hui, Yatomi Yutaka, Hou Han Wei, Goda Keisuke	4. 巻 356
2. 論文標題 Understanding stenosis-induced platelet aggregation on a chip by high-speed optical imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical	6. 最初と最後の頁 131318 ~ 131318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.snb.2021.131318	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 -

1. 著者名 Deng Yunjie, Tay Hui Min, Zhou Yuqi, Fei Xueer, Tang Xuke, Nishikawa Masako, Yatomi Yutaka, Hou Han Wei, Xiao Ting-Hui, Goda Keisuke	4. 巻 23
2. 論文標題 Studying the efficacy of antiplatelet drugs on atherosclerosis by optofluidic imaging on a chip	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 410 ~ 420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2LC00895E	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7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西川真子
2. 発表標題 COVID-19 における循環血小板凝集塊の大規模イメージング解析
3. 学会等名 日本臨床検査医学会 第77回関東甲信越支部例会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西川真子、菅野寛志、Yuqi Zhou, Ting-Hui Xiao、新田尚、矢富裕、合田圭介
2. 発表標題 COVID-19における血小板凝集塊の大規模イメージング解析
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 周 雨奇、登 祐哉、西川 真子、肖 廷輝、安樂 真樹、矢富 裕、合田 圭介
2. 発表標題 アゴニストの種類による血小板凝集塊の分類：深層学習を用いた解析
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 西川真子、Yuqi Zhou、菅野寛志、Ruoxi Yang、小野香織、Ting-Hui Xiao、新田尚、矢富裕、合田圭介
2. 発表標題 播種性血管内凝固における循環血小板凝集塊の解析
3. 学会等名 第23回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅野寛志、Chenqi Zhang、Maik Herbig、Yuqi Zhou、西川真子、Ruoxi Yang、伊林侑真、Ting-Hui Xiao、矢富裕、合田圭介
2. 発表標題 血小板凝集塊の大規模画像解析による血栓症とCOVID-19関連血栓症のアルゴリズム分類
3. 学会等名 第23回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuqi Zhou、西川真子、菅野寛志、Ruoxi Yang、Ting-Hui Xiao、矢富裕、合田圭介
2. 発表標題 mRNA COVID-19ワクチン接種の血小板への長期的影響
3. 学会等名 第23回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西川真子
2. 発表標題 新型コロナウイルス感染症における循環血小板凝集塊解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学医学部附属病院検査部ホームページ
http://lab-tky.umin.jp/achievements/index.html

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
研究協力者	矢富 裕 (Yatomi Yutaka)		
研究協力者	合田 圭介 (Goda Keisuke)		

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		
米国	University of Virginia	University of California	
中国	Wuhan University		