

■受領No.1461

新規の生体イメージングモデルを駆使した血栓器質化機構の解明

代表研究者

原 哲也

神戸薬科大学 准教授



Novel in vivo imaging model assessing DVT organization mechanism

Principal Researcher

Tetsuya Hara,

Kobe Pharmaceutical University, Associate Professor

蛍光顕微鏡での励起光の照射下に 10-20 秒程度観察すると秒単位でリアルタイムで血栓形成がおこることが再現性をもって確認できた。血栓形成は血流速度が低いほど、おこりやすく、血栓面積が増加することがあきらかになった。次に、マルチカラーイメージングによる、血管内皮の接着因子、各種血球成分と実際の血栓形成の生体下での時空間的制御機構を明らかにするため、フィブリン、白血球、血小板などの複数分子、血球を同時に生体下にイメージングすることに成功した。さらに、我々は本モデルで形成された血栓を二光子顕微鏡で観察することにも挑戦し、より詳細に 4 次元データとして血栓の基質化反応が観察可能であった。

We established new in vivo murine DVT imaging model using conventional fluorescence microscopy. After 10-20 seconds of irradiation of excitation light, we reproducibly observed DVT formation in murine femoral/saphenous vein. Thrombus formation is flow velocity-dependent as seen in clinical situation. We next tried to image multi-color imaging to explore the mechanism of endothelial cell and several hematological cells using in vivo imaging. We could image fibrin, leukocyte, and platelets simultaneously in vivo. We also succeeded in imaging DVT using two-photon microscopy in vivo.

1. 研究内容

1-1. 静脈速度と血栓形成の定常状態での関連性

ex vivo でラベルした赤血球を用いて血流を測定し、静脈結紮後の血流にどの程度の個体差があるのかを明らかにする。そして静脈速度と血栓形成までの時間の相関を数値化する。これまでの前実験では静脈血流速度が遅いほど、血栓形成は早く、血流依存性であることがわかっている。この関連性を数値化した。

結果、血栓形成は血流速度が低いほど、おこりやすく、血栓面積が増加することがあきらかに

なった。すなわち、本血栓モデルは実臨床と同様に血流速度依存性であることが証明できた。

1-2. マルチカラー生体分子イメージングによる血栓制御機構の解明

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、生体下に好中球や血小板と血栓形成時の挙動が可視化できる。マルチカラーイメージングによる、血管内皮の接着因子、各種血球成分と実際の血栓形成の生体下での時空間的制御機構を明らかにすることが可能である。具体的には白血球と血小板

は各種抗体以外にもローダミン 6 G を用いて安価に標識可能である。実際にフィブリン、白血球、血小板などの複数分子、血球を同時に生体下にイメージング可能であることを確認した。

1-3. 赤血球ラベルによる血栓形成における赤血球の役割の解明

これまでの前実験的な観察により、血栓形成時には赤血球の大きさとほぼ等しい円形の構造物が凝集し、それが徐々に血管内皮に接着し、血栓形成が開始されることがわかりつつある。この FITC-dextran により黒く抜ける円形構造物が赤血球であることを明らかにするために、赤血球を蛍光ラベルして、生体イメージングを行った。しかし、FITC ラベルした赤血球は血栓形成後にすみやかに FITC シグナルが減衰するため、また、実際の赤血球の中でのラベルされた赤血球の割合が低いために、当初の目的である、黒い円形構造物が赤血球であることを直接的に視覚的に証明することは不可能であった。

1-4. 二光子顕微鏡への応用

本モデルをこの二光子顕微鏡に応用して観察できれば、より高い精度で深部まで観察可能となる。そこで、我々は本モデルで形成された血栓を二光子顕微鏡で観察した。結果、より詳細に 4 次元データとして血栓の基質化反応が観察可能であった。引き続き、二光子顕微鏡を用いた血栓器質化機構を可視化、解明を進めていく。

1-5. 血管老化マウスにおける血栓器質化反応の解析

「高齢者では血栓の器質化反応 (炎症細胞浸潤や線維化) が早いために、血栓溶解が不完全となり、器質化血栓として肺動脈に残存して CTEPH となる」という仮説に基づき、血管のみが老化した遺伝子改変マウス (TRF-2DN マウス: 血管老化マウス) に静脈血栓を形成し、炎症細胞浸潤や線維化形成を経時的に観察し、野生型 (WT) マウスと比較する。これまでの研究結果では、血管

老化マウスでは予想に反して、小型の血栓が形成されることが想定される。また、器質化が進んだ白色血栓が形成されることが明らかになりつつある。これらを総合すると、現時点では器質化のスピード亢進が起こっているものと思われる。これはすなわち CTEPH 病変の形成にも影響を及ぼしている可能性が高く、今後も解析をすすめていく。

2. 発表 (研究成果の発表)

2-1 原 哲也、日本血栓止血学会学術推進委員会 (SPC) シンポジウム「包括的血栓止血モデルの実践と応用」 Novel murine in vivo imaging model of deep venous thrombosis 第 4 3 回日本血栓止血学会学術集会 (オンライン 2021 年)

2-2 原 哲也、In Vivo Imaging of Venous Thrombus and Pulmonary Embolism Using Novel Murine Venous Thromboembolism Model 国際血栓止血学会 2021 (オンライン 2021 年)

2-3 Takami M, Hara T, Okimoto T, Suga M, Fukuzawa K, Kiuchi K, Suehiro H, Akita T, Takemoto M, Nakamura T, Sakai J, Yatomi A, Nakasone K, Sonoda Y, Yamamoto K, Takahara H, Hirata KI. Electrophysiological and Pathological Impact of Medium-Dose External Carbon Ion and Proton Beam Radiation on the Left Ventricle in an Animal Model. J Am Heart Assoc. 2021;10:e019687.

2-4 Suzuki M, Tanaka H, Yokota S, Hara T, Ueda Y, Hirata KI. Multiple cardiac complications associated with collagen disease. J Echocardiogr. 2020;10.1007/s12574-020-00504-7.

2-5 Yoshikawa S, Hara T, Suzuki M, Fujioka M, Taniguchi Y, Hirata KI. Imatinib Dramatically Improved Pulmonary Hypertension Caused by Pulmonary Tumor Thrombotic Microangiopathy

(PTTM) Associated with Metastatic Breast Cancer. *Int Heart J.* 2020;61:624-628.

2-6 Hisamatsu E, Nagao M, Toh R, Irino Y, Iino T, Hara T, Tanaka H, Satomi-Kobayashi S, Ishida T, Hirata KI. Fibronectin-containing High-Density Lipoprotein is Associated with Cancer Cell Adhesion and Proliferation. *Kobe J Med Sci.* 2020;66(1):E40-E48.