

奨励金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

原 哲也

神戸薬科大学 准教授

## Novel in vivo imaging model assessing DVT organization mechanism

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。この二光子顕微鏡による血栓器質化機構の可視化技術を用いることで、静脈血栓器質化に重要な白血球や血小板の血栓内への浸潤が、一方を除去することで他方が著明に現象することが明らかとなった。

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. Using two-photon in vivo DVT imaging system, we observed that invasion of leukocyte and platelet are required in each other. Depleting neutrophils in mice decreased platelet invasion into DVT, and depleting platelets decreased leukocyte invasion.

### 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6G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。

### 1-6. 好中球－血小板相互作用

野生型マウスに好中球除去抗体を腹腔内投与し、その一日後に血栓を形成させて二光子顕微鏡で観察し、ローダミンで蛍光標識した白血球や血小板の血栓内への浸潤を検討したところ、好中球除去によって、血小板の血栓内への浸潤が著明に抑制された。遊走能を持たない血小板であるため、これは好中球が血小板の血栓内への浸潤に重要であることが示唆される。すなわちNETs依存性に好中球－血小板複合体の形成が重要であることが示唆された。今後はDNase投与によって同様の現象が再現できるか否かを検討していく。

逆に抗血小板抗体の投与による血小板除去で同様の検討をしたところ、ローダミンで標識した白血球の血栓内への浸潤が抑制された。すなわち、血小板や白血球の浸潤は互いの存在が必須であることが示唆された。

## 2. 発表（研究成果の発表）

- 2-1 Ryanto GRT, Musthafa A, Hara T, Emoto N. Inactivating the Uninhibited: The Tale of Activins and Inhibins in Pulmonary Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci.* 2023; 24: 3332.
- 2-2 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43回日

本血栓止血学会学術集会（オンライン 2021年）

- 2-3 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）
- 2-4 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.
- 2-5 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.
- 2-6 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.
- 2-7 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.