

二光子分子イメージングを用いた血栓における血管内皮障害と自然免疫関与の解明

西村 智

自治医科大学 分子病態治療研究センター 分子病態研究部

【研究の背景】

血栓症の発症には血小板だけでなく各種炎症性細胞(マクロファージ・リンパ球)や血管内皮細胞とその障害、局所の血流動態が関わっていると考えられている。血栓性疾患の原因は多岐にわたるが、個々の患者において、リスクが必ずしも同定されるとは限らず、未知の因子が発症に関わることも考えられる。本計画では、申請者が独自に開発した生体分子イメージング手法を用いて、血栓形成過程における、血管内皮障害と炎症性細胞集積の寄与を明らかにし、血栓性疾患の新たな治療標的の同定を試みた。

【目 的】

本邦の死因の上位を占める脳・心血管障害の多くは動脈硬化を基盤とした血栓性疾患であり、心血管イベントは確率的に生体内で動脈硬化巣の粥腫が破綻して起きると考えられている。従来、心血管イベント予知を目指した血小板検査については多様なデバイスが開発されてきたが、*in vitro* による限定的な検討手法に過ぎず、いずれも生体での血栓性疾患を予測するには至っていない。これらを生体内で検討する手法が、病態理解の上で求められている。その検討を可能にしたのが我々の開発した「生体分子イメージング」手法である。

我々は二光子顕微鏡によるバイオイメージングと、血栓形成を促す光操作技術を生かし、生体での血栓過程から心血管イベントにアプローチし、炎症の関与と内皮傷害の関連を明らかにした。また、脂肪組織炎症を鍵に肥満病態にも同手法でアプローチしている。

【方 法】

図1は二光子顕微鏡で観察した、末梢血管での血球動態である。単一血小板が明確に同定されている。マルチカラーイメージングでは、生体内で複数の細胞種を染め分けて同定するとともに、機能プローブを組み合わせ、形態と機能の同時観察が可能である。これらの手法を応用し、生体末梢血管による心血管イベントリスク予測が可能になると考えている。

本計画ではおもに、CAG-eGFP マウス(緑)に赤色蛍光デキストラン、核染色(ヘキスト・青)をくみあわせ画像化を行った。我々のシステムは、レゾナンススキャン、高感度ガリウムヒ素検出器、高速ピエゾ制御により生体で、XYZT(三次元+時間軸)のリアルタイムイメージングが可能である。空間解像度は水平(XY)方向には 250nm、縦方向は 350nm、一枚の画像の撮影時間が 1/30 秒、4色同時励起観察で、画像取得深度は表面から 300 ミクロン程度である。本システムでは図1のとおり、単一血小板が同定できるレベルで生体内部の画像を可視化できている。

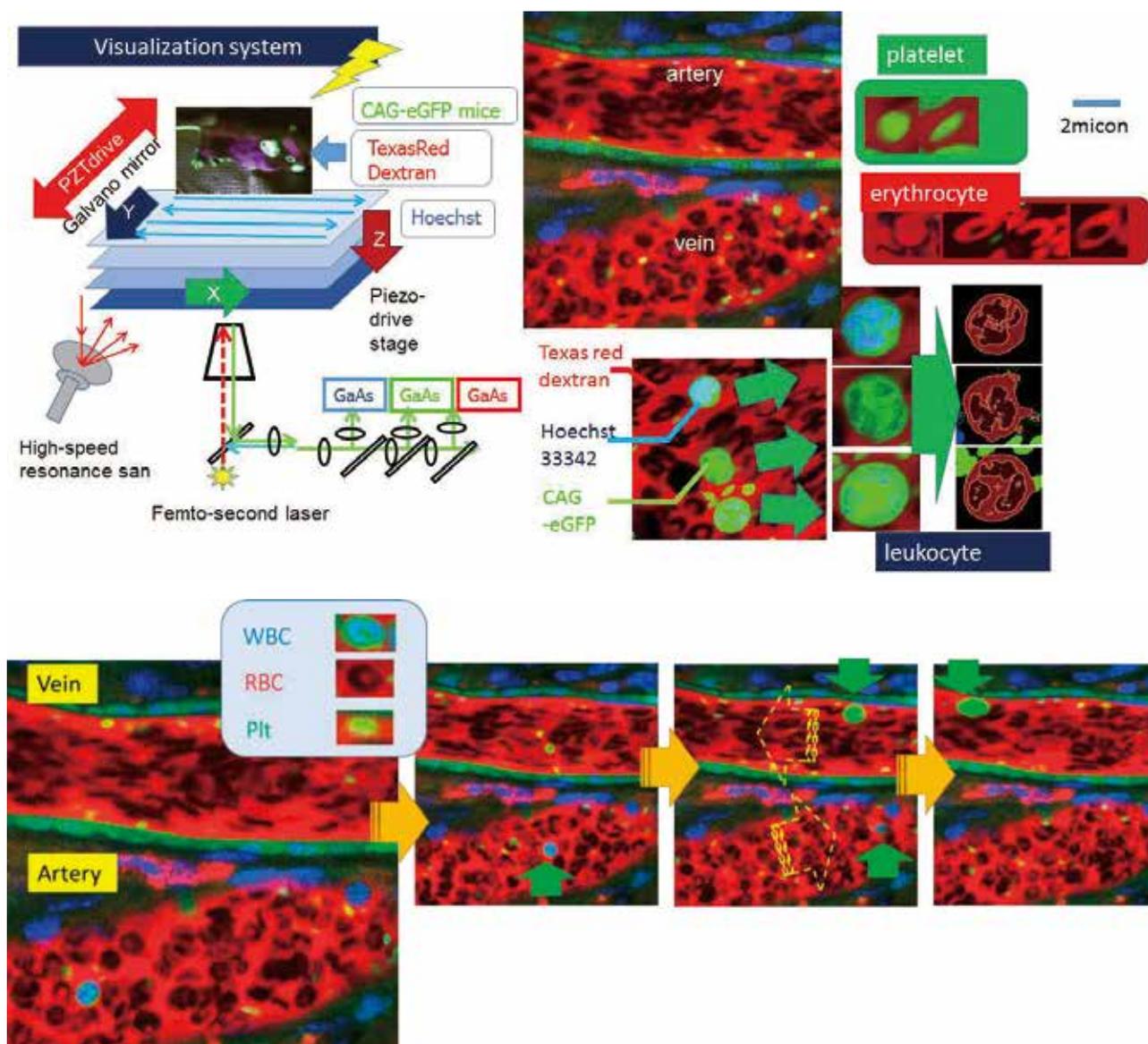


図 1 「生体イメージング」でみる代謝組織・血管

「生体イメージング」では手に取るように末梢臓器や血管における生体内の各種細胞の動きが分かる。図では、CAG-eGFP マウスに、texas Red Dextran と Hoechst を投与し、高速二光子顕微鏡で精巣表面の動静脈を観察している。緑矢印は白血球、黄矢印は血流の方向

【結 果】

以下に観察によって得られた所見を述べる。

画像解析では、確定的な定常状態の観察だけでなく、確率的な病態発現を再現できる。確率的に起きる心血管イベントを評価するために、我々はレーザー傷害による ROS 産生を伴う血栓形成モデルと生体イメージングを組み合わせ、血栓形成を高速共焦点で観察した。光化学反応を用いた ROS 刺激では、高い再現性をもって、一定確率で血管内に血栓を誘導することに成功しており、単一の血小板が同定できる解像度で、血栓が可視化されたのは初めてのことであり、生体でしか評価できない血栓止血反応の研究におけるイメージング技術の必要性が広く認識されるきっかけとなっている(図2)。

我々は、レーザー傷害による ROS 産生を伴う血栓形成モデルと、上記の生体イメージングを組み合わせ、最初に血栓形成を高速共焦点で観察しているが、従来の Rose Bengal などの色素を用いた血栓形成と近い。一方、我々のシステムでは、

「血栓形成の観察」と「光刺激による誘導」を同一の光源を用いて行っている。本手法では圧倒的に高い時間・空間解像度が得られるのが特徴である。よくみると、血小板の形はすべて楕円形である。我々の頭では、活性化血小板はすべて変形しているが実際の生体ではそのようなことは非常にまれであり、固定観念にすぎないことがわかる (Nishimura et al, 2008 JCI, Nishimura & Takizawa et al, 2010 JCI, Nishimura et al, 2012 Blood)。評価手法としても、誤差の非常に少ない方法であり、薬剤の効果判定などにも有用であると考えられた。

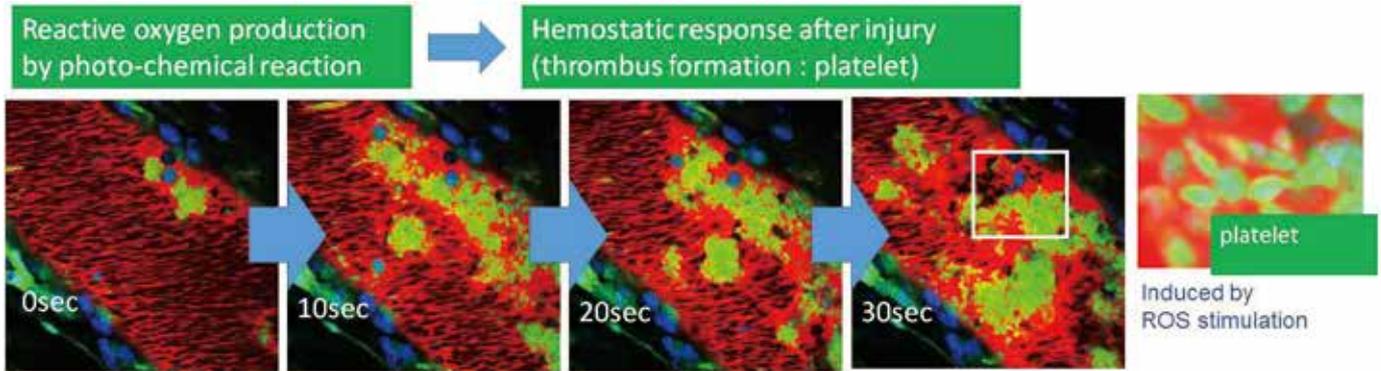


図2 生体血栓イメージング

しかし、ROS モデルはあくまでも人工的であり、内皮損傷による心血管イベント等を反映していないという批判がある。そこで、新たに内皮損傷による血栓モデルを作成した。つまり、血管内皮をレーザーにより物理的に破壊、血管外のマトリックスを露出し、血栓を誘導することも可能である(図3)。観察と同時に、高出力のレーザーを一部の関心領域 (ROI) に集光することができる。刺激と観察がやはりひとつの光源で行えるメリットは大きく、より多くの情報を引き出せる。このように、観察だけでなく、生体を刺激し反応を観察することは、「生きているならでは」である。逆に言うと、「とまっけてもいい」事象を生体で評価するのはナンセンスかもしれない。

本モデルで、レーザー傷害を用いて、内皮の境界面を破壊すると、「出血」に伴い、血小板凝集・凝固線溶因子の活性化といった「止血」反応が生じる。さらにそれだけではなく、炎症性白血球が傷害部位にすみやかに遊走し、初期の「自然免疫反応」が生じる。本手法では、さらに、相互に関連した止血、組織修復、炎症反応のリンクをひもとくことが可能である。通常分子生物学的手法でアプローチ困難な初期の応答を観察することができるのがこの手法のメリットである。短時間の観察で、本来長時間でおきる細胞生物学のプロセスを評価できるという利点もある。

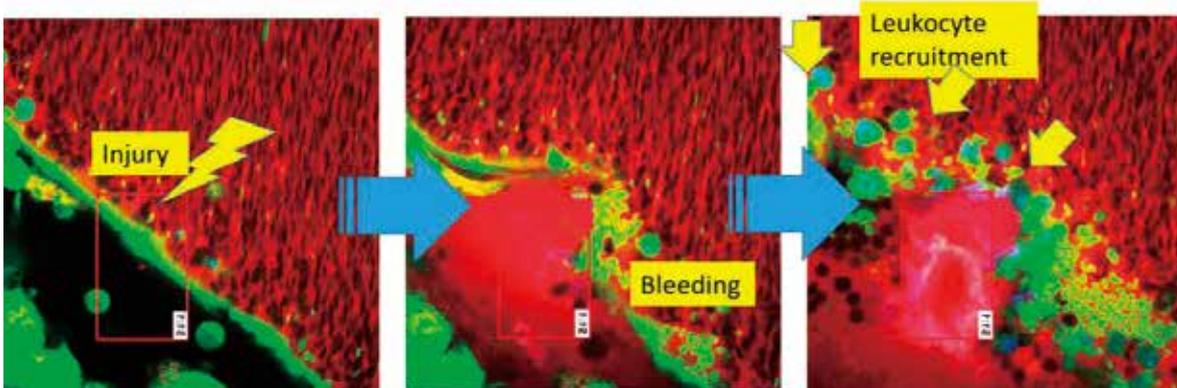


図3 血管内皮のレーザー傷害に伴う血栓形成

赤四角 (ROI) のみに高出力のレーザーを集中し、血管内皮のレイヤーを破壊させる。初期には、出血 (赤いデキスランと赤血球が血管外に漏出) とともに、血小板が凝集する。その後、血管内部から多くの白血球が遊走している。

なお、本モデルを動脈に応用すると血管平滑筋の収縮が観察され、高血圧などの循環器疾患の研究に応用できることも明らかになっている(図4)。また、本モデルは血管のみならず、骨髄イメージングによる血小板造血の可視化にも応用可能である(Nishimura et al, JCB 2015)。

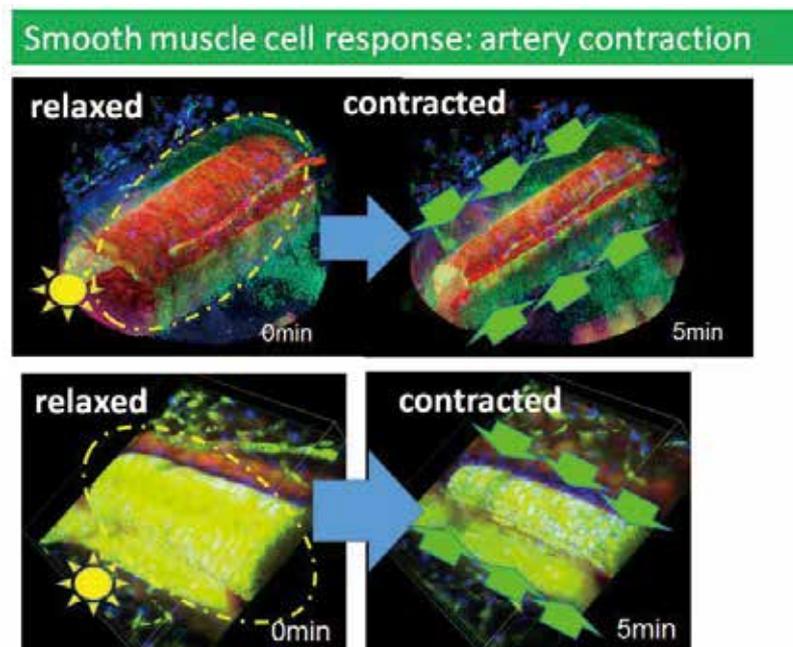


図4 動脈収縮の生体イメージング

【考 察】

一方で、観察しただけではデータに意味は無い、という批判は常にイメージングに対して向けられている。サイエンス、すなわち、科学的仮説の検証に活かすためには再現性の高い定量が必要である。定量というと、好きなところを任意に観察領域(ROI)として設定し、輝度などを評価することも多いが、このような恣意的な方法は好ましくないのは自明である。我々は、観察結果を再現性を維持しつつ定量するために自動解析ソフトを作成している。定量に際し XYZT データを扱うことは、ファイルのサイズ(しばしば 100GB を超える)からも非常にハードルが高い。アルゴリズムの作成だけでなく、計算量も膨大になり、解析技術が論文の質を決めることも多い。現在、我々のソフトは、血栓に関して、血栓体積を三次元的に定量するだけでなく、そのなかの白血球も認識・追跡している。数だけでなく、走化性・運動性も評価できる。強調したいのは、このソフトには一切パラメータ入力が存在せず、観察者の入り込む余地は無く、それでもロバスト性が維持されていることである。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究では、血栓形成メカニズムについて、生体イメージングを用いて概説を行った。本システムをさらに拡張し、生体でマクロの病態形成と、ミクロの分子生物学的機序の両方が網羅解析できれば、大きく病態に寄与すると予測する。このように、一つの細胞を中心としたネットワークを可視化手法により、マルチスケール時空間のなかで明らかにしていくことができる。得られた知見を元に、多岐の疾患に対して共通の分子基盤に基づいた治療もやはり可能になるかもしれない。

【参考・引用文献】

IL-1 α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs

Nishimura S, Nagasaki M, Kunishima S, Sawaguchi A, Sakata A, Sakaguchi H, Ohmori T, Manabe I, J Italiano, Ryu T, Takayama N, Komuro I, Kadowaki T, Eto K, Nagai R.

J Cell Biology 2015 11;209(3):453-66.

ENPP2 contributes to adipose Tissue expansion and insulin resistance in diet-induced obesity

Nishimura S, Nagasaki M, Okudaira S, Aoki J, Ohmori T, Ohkawa R, Nakamura K, Igarashi K, Yamashita H, Eto K, Uno K, Hayashi N, Kadowaki T, Komuro I, Yatomi Y, Nagai R

Diabetes, 2014 63(12):4154-64

Expandable Megakaryocyte Cell Lines Enable Clinically Applicable Generation of Platelets from Human Induced Pluripotent Stem Cells

Nakamura S, Takayama N, Hirata S, Seo H, Endo H, Ochi K, Fujita K, Koike T, Harimoto K, Dohda T, Watanabe A, Okita K, Takahashi N, Sawaguchi A, Yamanaka S, Nakauchi H, **Nishimura S**, Eto K

Cell Stem Cell, 2014 14(4):535-48

Adipose natural regulatory B cells negatively control adipose tissue inflammation

Nishimura S, Manabe I, Takaki S, Nagaskai M, Ostu M, Yamashita H, Sugita J, Yoshimura K, Eto K, Komuro I, Kadowaki T, Nagai R

Cell Metabolism. 2013, 18, 759-766.

In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling

Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, Oeohara J, Otsu M, Kamiya A, Petrich B, Urano T, Kadono T, Sato S, Aiba A, Yamashita H, Sugiura S, Kadowaki T, Nakauchi H, Eto K, Nagai R.

Blood. 2012; 119(8):e45-56.

Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells

Takayama N, **Nishimura S**, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M, Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H, Eto K.

J Exp Med, 2010; 207(13):2817-2830

Lnk/Sh2b3 regulates integrin alpha-IIb-beta3 outside-in signaling in platelets leading to stabilization of developing thrombus *in vivo*

Nishimura S*, Takizawa H*, Takayama N, Oda A, Nishikii H, Morita Y, Kakinuma S, Yamazaki S, Okamura S, Tamura N, Goto S, Sawaguchi A, Manabe I, Takatsu K, Nakauchi H, Takaki S, Eto K. (*equal contribution)

J Clin Invest., 2010, 120(1): 179-190.

CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity

Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R.

Nature Medicine, 2009, 15:8, 914-920.

In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue

Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Seo K, Yamashita H, Hosoya Y, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S.

J Clin Invest. 2008, 118(2): 710-721.

Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells and blood vessels

Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S

Diabetes. 2007, 56:1517-1526.