◆診断・治療・技術講座◆

生体内リアルタイムイメージングによる
血栓形成過程の解析浦野 哲盟^{*1}, 鈴木 優子^{*1}, 林 忠毅^{*2}, 最上 秀夫^{*1}

浦野 哲盟

Intra vita real time imaging analysis of thrombus formation

Tetsumei URANO^{*1}, Yuko SUZUKI^{*1}, Tadataka HAYASHI^{*2},Hideo MOGAMI^{*1}**Key words:** thrombus, vascular endothelial cells, platelet, real time imaging

1981年 3月 浜松医科大学医学部医学科卒業
 1985年 3月 浜松医科大学医学部大学院医学研究科修了
 (指導教官: 第2外科阪口周吉教授, 第2生理高田明和教授)
 1985年 7月 国立天竜病院外科医師
 1986年 7月 米国ノートルダム大学留学 (Dr FJ Castellino)
 1987年 5月 浜松医科大学医学部助手(生理学第2)
 1990年 5月 スウェーデン王国ウメオ大学留学 (Dr Tor Ny)
 1991年 2月 デンマーク王国王立病院検査部留学
 (Dr Sixtus Thorsen)
 1991年 10月 浜松医科大学医学部助教授(生理学第2)
 2001年 10月 浜松医科大学医学部教授(生理学第2)
 現在に至る

はじめに

近年の光工学と蛍光タンパクの遺伝子工学の進歩は目覚しく、緑色蛍光タンパク (Green Fluorescent Protein: GFP) 発現遺伝子改変マウス等が作製されて生体における無傷な血管内血球成分及び血管壁の可視化が可能となってきた。凝固系や血小板活性化機構もこれまでは主に精製系や静止系で解析されてきたが、血栓形成過程における血流や正常内皮細胞や他の血球成分との応答の重要性が認識され、生体内での解析の報告が増加している。本稿ではニポウ式共焦点蛍光顕微鏡を用いた生体内血栓形成過程の解析について使用機器の詳細とともに実際のデータを紹介する。

1. ニポウ式共焦点蛍光顕微鏡

3次元の空間分解能を有する生物用共焦点走査型蛍光顕微鏡は、任意の細胞内機能蛋白を蛍光標識することにより、生きた細胞におけるその動態や局在分布の解析等に広く用いられてい

る。一般に、共焦点顕微鏡法はシングルビーム方式とマルチビーム方式の2通りに分けられる。前者はガルバノミラーにより1本のレーザービームで試料面をスキャンし光電子倍增管にてシグナルを取得するので、細かいステップで高精細画像の取得が可能である反面スキャンスピードに限界があり、時間分解能に問題があった。一方、ニポウ式共焦点ユニットを用いたマルチビーム方式¹⁾は、多数のピンホールを有するディスクを高速で回転させて一度に1000本のレーザービームによる試料面のスキャンができるため高速画像取得が可能となった。しかしながら、各ピンホールの前にマイクロレンズを付加して光の利用率を増加させても光量が1~2%程度に減ずるという欠点があった。最近、シグナル取得装置であるCCDカメラとして超高感度CCDカメラ、特に電子打ち込み型 (EB-CCD) あるいは光電子倍增型 CCD (EM-CCD) カメラが開発されたため S/N が良く、種々標識分子の高速動態観察が可能になった。観察領域を狭めて血流は観察できるので1秒間に200~250フレームの画像取得が可能で

^{*1} 浜松医科大学第2生理学講座 [〒431-3192 浜松市半田山1-20-1]Dept. of Physiology, Hamamatsu University School of Medicine (1-20-1, Handa-yama, Hamamatsu 431-3192, Japan)
Tel: 053-435-2248 Fax: 053-435-7020 e-mail: uranot@hama-med.ac.jp^{*2} 第2外科学講座

図1 生体内リアルタイム共焦点顕微鏡システム (横河リアルタイム 3D ワークステーション)
 ニコン TE 600 顕微鏡 (×40 NA 0.8, ×60 NA 1.0 水浸対物レンズ), 横川 CSU-21 共焦点スキャナーユニット, EB-CCD あるいは EMCCD カメラ (浜松フォトニクス), ピエゾドライバーで構成され, 33 m second で一枚の共焦点画像が得られる. GFP と Alexa Fluor 568 は Krypton Argon Ion Laser で同時に励起し, ビームスプリッターである W-view 光学系 (浜松フォトニクス) をスキャナーユニットとカメラの間に入れることにより, 2 波長の蛍光を同時測定している. ここで用いた W-view 光学系には 550 nm のダイクロイックミラーと, 510/23 nm band pass (GFP の蛍光測定) 及び 590 nm long pass (Alexa Fluor 568 の蛍光測定) の 2 種類の蛍光フィルターを使用した.

ある. 更に対物レンズをピエゾ素子で駆動することによりビデオレート (1 秒間に 33 フレーム) での 3 次元画像取得を経時的に行うことにより組織の時空間解析も可能となっている. 図 1 に我々のシステムを紹介する.

これらの特性を生かし, ニポウ式共焦点蛍光顕微鏡は細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変化, 標識特異機能蛋白動態等の解析に広く利用されている. 2003 年に Furie 等が Nature Medicine に New Technology として生体内血栓形成機構の解析例を紹介し²⁾, 血栓止血領域への応用が急速に広まった.

2. 生体内蛍光顕微鏡としての応用

開腹し露出した血管内の蛍光標識血小板の動態, 標識蛋白の集積の解析が可能であり, 拳拵筋あるいは腸間膜の血管がよく用いられる. 肝, 腎等の実質臓器でも表層であれば, 血流の

解析が可能である. より深部 (深さ 1 mm 程度) の解析は多光子レーザー顕微鏡を必要とする.

(1) 蛍光標識

標的分子または細胞の動態を観察するためには, 標的分子または細胞を蛍光色素あるいは遺伝子工学を用いて蛍光タンパクにて標識する必要がある. 種々の標識用蛍光色素及び標識キットが市販されており, 標的分子認識抗体を蛍光色素にて標識後生体内に投与すればその観察は容易である. 光源がレーザーによるため主に緑色～赤色領域 (488～660 nm) の蛍光色素が使用され, マルチカラーでの同時計測も可能になっている. Furie 等は, Alexa Fluor 488 あるいは Alexa Fluor 660 で標識した抗 CD31 抗体, 抗組織因子 (Tissue Factor : TF) 抗体, 抗フィブリン抗体を生体内に投与し, 血小板凝集, TF 集積及びフィブリン産生を可視化している.

図2 GFP血小板におけるphosphatidylserine (PS) 発現のキネティクス

GFP血小板を用いて *in vitro* で phosphatidylserine (PS) 発現のキネティクスを Alexa Fluor 568 標識 annexin A5 (ANX) を用いて解析した。[Ca²⁺]_i 指示薬である fluo4 をロードした GFP 血小板をフィブリノーゲン被覆ガラス板に静置すると振動性の [Ca²⁺]_i 変化が認められたが ANX は結合しなかった。カルシウムイオノフォアである Ionomycin 添加により薬理的に持続性の [Ca²⁺]_i 上昇に惹起させると ANX の膜表面への集積が認められ、PS が細胞内膜から外膜へ移動したものと考えられた。

文献 4) より許可を得て転載

(2) GFP 発現遺伝子改変マウスの有用性

オワンクラゲの蛍光物質である緑色蛍光タンパク遺伝子 (GFP) を組み込んだ遺伝子改変マウス (GFP mouse) は大阪大学の岡部勝教授等により作成され多くの生体イメージングに使用されている³⁾。赤血球と体毛以外は GFP を発現しており、血管内でも赤血球以外の血球成分の観察が可能である。その利点は多く、(1) 標識操作による血球傷害の心配が無く、(2) 個々の血球成分の動態が観察でき、更に、(3) 骨髄からの動員も含め血球成分の定量的な評価も可能である。血管内血栓形成時の血小板動態の観察においては (1) (2) は特に重要である。GFP 標識血小板は、コラーゲン及びトロンビン刺激による血小板凝集能において野生型マウスのそれとの間に差異は認められなかった。

GFP 血小板を用いて *ex vivo* で phosphatidylserine

(PS) 発現のキネティクスを Alexa Fluor 568 標識 annexin A5 (ANX) を用いて解析した (図 2)⁴⁾。正常マウス血小板と同様に GFP 血小板では、Ionomycin 添加により持続性の [Ca²⁺]_i 上昇に引き続き ANX の膜表面への集積が認められ、Ca²⁺ 依存性スクランブラーゼにより PS が細胞内膜から外膜へ移動したものと考えられた。この際注意すべき点は、血小板活性化に伴い GFP が血小板内から消失する点である。恐らく細胞膜の透過性の変化によるものと考えられる。

3. 生体内における血小板凝集及びフィブリン形成の可視化

傷害血管内皮部への血小板の粘着、凝集過程をリアルタイムに 3 次元画像で解析することが可能である。血管内皮の傷害方法として我々

は, 対物レンズを通したレーザー刺激と, 塩化第2鉄溶液の血管外からの局所投与, を用いている. 前者では 150 mW 534 nm レーザーの出力を調整して直径約 $10\ \mu\text{m}$ という限局した範囲の傷害が可能であり, 傷害血管内皮と正常血管内皮上での個々の血小板の動態を同一視野の中で観察できる. 後者は更に広範な傷害となり, 血管閉塞に至る血栓形成過程における個々の血小板の動態が観察できる.

蛍光標識した特異抗体や特異結合蛋白を用いることにより, 活性化に伴う血小板膜表面蛋白の変化や膜組成の変化も観察可能となる. Furie 等は血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 濃度の変化も測定可能としている⁵⁾. 我々は血小板活性化の指標であり, 凝固系活性化の足場となる PS の膜表面への発現を特異結合蛋白である annexin A5 を蛍光標識し解析した.

(1) レーザー刺激による血管内皮傷害時の血小板凝集並びに活性化のリアルタイム解析

レーザー照射直後より傷害内皮上における血小板の粘着, 凝集反応が観察できる (図3)⁴⁾. Alexa Fluor 568 で標識した annexin A5 (ANX) を尾静脈より前投与しておくことにより, 血小板表面に露出した PS への特異結合を赤色蛍光の集積として可視化できた (図4). GFP 血小板並びに ANX の集積のキネティクスは関心領域内の相対蛍光強度変化を経時的に測定することにより可能である (図4C). 60 秒前後でピークを示しながら緑色蛍光の相対蛍光強度が経時的に増加していることより血小板塊が大きくなっていることがわかる. その後の蛍光強度の減少は, 血流により凝集塊自体が小さくなったことと, 注目すべきは中央部を中心に緑色蛍光が減少し同部位に赤色蛍光の集積が認められるようになったことである. これは, 凝集塊中央部の血小板膜表面に PS が発現していることを示す. *In vitro* の実験より PS 発現には血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 濃度の持続上昇が必要であることから, 凝集塊中央の血小板のみが $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 濃度の持続

図3 レーザー照射による局所的内皮細胞傷害部への血小板凝集

A は GFP マウスでの血小板凝集を示す. B は GFP 発現血管内皮細胞のレーザー照射による傷害範囲 (B: 白矢印頭) を示す. 対物レンズを通してレーザー照射すると, 傷害部位に経時的に GFP 血小板の集積が認められる (a-A, B, C).

文献 4) より許可を得て転載

上昇を伴う強い活性化を受けていると考えられる. 血小板塊中ではいずれの血小板も同様に活性化されているという予想に反し, 活性化の度合いに局在があるという事実は大変興味深い. Furie 等も血小板血栓中において一部の血小板のみで $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 濃度が増加している事実を報告しており⁵⁾, 血小板塊中の部位により血小板の活性化程度は異なるようである. Shear stress や Glycoprotein IIb/IIIa を介した機械的刺激, ADP, セロトニン, トロンボキサン A2 等の凝集増幅物質の局所濃度, 等などの相違により, 凝集塊中央部の血小板のみが PS を発現していると考えられる. 逆に周辺部の血小板においては受容体の shedding 等により活性化されないための積極的な抑制機構⁶⁾ が機能している可能性もある. 止血血栓の迅速な形成において PS 発現は不可欠であり, 逆にその発現抑制は過剰血栓形成の抑制につながる. 安全で効率的な抗血小板療法の確立に, このような機構の詳細を明らかにすることは重要であろう.

図4 血栓形成過程における PS 発現のキネティクスと局在

a 白矢頭部位傷害時の血栓形成の水平断面像, b 白矢頭部位傷害時の血栓形成の垂直断面像, c 水平断面像より得られた GFP (緑) と ANX (赤) の蛍光強度の相対的変化, d 血栓内の PS 発現部位, 内皮細胞上から血管内腔に向かって $4\mu\text{m}$ 毎の断面を示す.

文献4) より許可を得て転載

図5 フィブリン形成のキネティクスと局在

a 白矢頭傷害時の Alexa Fluor 568 標識抗フィブリン抗体集積の経時的変化 (A-E). 血管内皮より $10\mu\text{m}$ 内腔側, D の時点での垂直方向の $5\mu\text{m}$ 毎の水平断面を d-0 (血管内皮上) - d-20 に示す, b 蛍光強度の経時的変化 (20 分後 (E) の蛍光強度に対する比率), c 抗フィブリン抗体集積後 Alexa Fluor 488 標識 annexin A5 を尾静脈より投与し, 両者の局在の一致性を検討, フィブリンと PS 発現の局在が重なることが確認された.

文献4) より許可を得て転載

(2) フィブリン産生の可視化

血小板膜に露出した PS 上で, カルシウムイオンを介して gla-domain が結合することにより, 凝固 IX, X 因子及び prothrombin が効率的に活性化される. 我々は PS 発現を血小板活性化の指標であると共に procoagulant 活性発現の指標としてとらえた. 標識抗フィブリン (B β 15-42) 抗体によりフィブリン産生を解析したところ, PS 発現に引き続き, 凝集塊中央部に一致して経時的な集積を認めた. これより微小血小板血栓中の血小板は PS を発現し, 凝固系活性化及びフィブリン産生に寄与している事実が *in vivo* の系で証明されたことになる. 一方同様に蛍光標識したフィブリノーゲンの静脈内投与では, 明らかな集積を証明することができなかった. 測定感度の問題もあるが, 微小血小板血栓中では, 血中フィブリノーゲン濃度を大きく上回る高濃度のフィブリンは集積していないようである.

4. 血栓形成過程の生体内リアルタイム解析の有用性

血小板粘着, 凝集, 放出過程, 凝固系活性化及びフィブリン産生過程, 血栓溶解過程はいずれも様々な因子により巧みに調節されている. 正常血管内皮の有する血小板活性化抑制能, 抗凝固能, 高線溶活性発現能等により血管内皮の正常部では血栓形成が抑制され, 傷害部では血栓形成能が増強されている. また傷害部位の被覆血栓は強固で線溶抵抗性を示し, 逆に血管内腔に突出した血栓表層部では過剰な血栓形成を抑制すると共に線溶を促進する機構が働くと考え

えられる. このような時空間的に異なる調節機構の解析に本法は極めて有効である. 詳細な血栓形成機構の解明と, 安全で効率的な抗血小板療法, 抗凝固療法, 線溶療法の確立に寄与できると期待する.

おわりに

我々が使用している生体内リアルタイム共焦点顕微鏡システムを紹介し, 血管内皮レーザー照射による微小血小板血栓形成過程を例に, 血小板活性化並びにフィブリン形成のデータを紹介した. 血管内皮レーザー照射による血栓モデルは, 国内外の限られた施設でしか用いられていないが, 他の血栓モデルと比較しながらこのモデルの利点と欠点を把握し限界を十分に理解すれば, 血栓止血及び線溶機構の解析に大きく貢献すると期待する.

文 献

- 1) Tanaami T, Otsuki S, Tomosada N, Kosugi Y, Shimizu M and Ishida H. High-speed 1-frame/ms scanning confocal microscope with a microlens and Nipkow disks. *Appl Opt* **41** : 4704-4708, 2002.
- 2) Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G, Furie Bc and Furie B. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med* **8** : 1175-1181, 2002.
- 3) Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T and Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* **407** : 313-319, 1997.
- 4) Hayashi T, Mogami H, Murakami Y, Nakamura T, Kanayama N, Konno H and Urano T. Real-time analysis of platelet aggregation and procoagulant activity during thrombus formation in vivo. *Pflugers Arch* **456** : 1239-1251, 2008.
- 5) Furie B and Furie Bc. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* **359** : 938-949, 2008.
- 6) Berndt Mc, Karunakaran D, Gardiner Ee and Andrews Rk. Programmed autologous cleavage of platelet receptors. *J Thromb Haemost* **5** (Suppl 1) : 212-219, 2007.