

**Models of thrombosis and Hemostasis**

報告者：山下 篤

2024 年 6 月 22 日、14:30-16:30

Moderators, Laura Gutiérrez (Spain), Lacramioara Ivanciu (USA), Frederik Denorme (USA),

Chair: Laura Gutiérrez (Spain)

Dr. Laura Gutiérrez

Laura から Dr. Steven P. Grover (USA)が次期 chair となることが紹介された。この SSC の取り扱う範囲として、preclinical, cellular, molecular, そして computational model を将来的に加えて全てを網羅することが示された。次に現在進行中もしくは次の 3 年間のプロジェクトとして、以下の 9 課題が示された。

1. Sepsis and immunothrombosis (Patricia),
2. Inferior vena cava stenosis thrombosis model (steven),
3. Mouse models of hemostasis (tail bleeding assays), and thrombosis (ferric chloride, laser injury-induced to cremasteric arterioles (Lacramioara),
4. Platelet depletion and transfusion models (Robert),
5. Models of arterial bleeding (Frederik),
6. Models of stroke (Frederik),
7. Models of chronic and calcified thrombus (Ahmed),
8. A shear induced platelet aggregation point-of-care assay for thrombolytic activity characterization in patients (Viviana),
9. Platelet proteomics (Laura et al.)

昨年の課題から、免疫血栓、出血モデル、慢性血栓、ずり応力誘発の血小板凝集が新たに加わった。血栓形成のコンピューターモデルが課題に含まれていなかったが、今回の発表の後半はコンピューターモデルであった。

今回の SSC は、IVC stenosis モデルのアンケート結果、敗血症と免疫血栓、血栓形成のコンピューターモデルについての企画であった。

1. Procedural and reporting variability in the murine inferior vena cava (IVC) stenosis model: Survey preliminary findings

Stevin P. Grover, PhD (USA)

Blood Research Center, University of North Carolina at Chapel Hill.

## United States

Stevin からマウス IVC 狭窄血栓モデルの現状報告がなされた。マウス IVC 狭窄血栓モデルを使用した論文数は、2002 年から 2010 年まで年間数本だったのが、2023 年では 20 本弱になるほど増加し、一般的な静脈血栓モデルとなっている。しかし、血栓を誘導する手技にバリエーションがあり、形成される血栓の大きさに大きなばらつきが見られる。手技のバリエーションは、1. 結紮に使用する糸の材料と大きさ、2. IVC と共に結紮するスパーサーの材料と大きさ、3. 分岐枝の結紮の有無、4. 神経血管クリップの有無、5. 背側枝の焼灼の有無などである。そこで、どの程度のバリエーションがあるのか、最も一般的な手技は何かを明らかにするために調査を行なった。情報伝達手段として X/ twitter、LinkedIn、Email を使用した。7 カ国、17 施設から 27 の回答を得た。アメリカ合衆国(10)、ドイツ(4)、フランス(3)、イギリス(3)、カナダ(2)、ベルギー(1)、ハンガリー(1)で日本からの回答は含まれていなかった。モデルの用途は血栓形成評価 45%、血栓形成と血栓溶解評価が 40%ほどで、残りは血栓溶解評価に利用していた。用いられているマウス系統は C57Black/6 がほとんどで、一部で BALB/c、8-12 週齢が多数を占めた。雌雄に関して、雄の単独か雌雄両方の使用で、雌単独の使用はなかった。その根拠として、側方枝の解剖の違い、女性ホルモンの影響の可能性、血栓の不均一性の可能性、卵巣壊死の回避を考慮してとの回答があった。結紮に使用する糸の素材はポリプロピレンやシルクが主体で、大きさは 7-0 が主体であった。スパーサーは 0.312mm 径の 30G 針か 0.1mm 径の 5-0 糸が主流であった。手技は側方枝を結紮、背側枝の非焼灼、神経血管クリップの不使用が主流であった。表に代表的アプローチを 2 つ示す。

表. IVC 狭窄モデルの一般的アプローチ

	アプローチ 1 (n=9)	アプローチ 2 (n=4)
マウス系統	C57black/6	C57black/6
週齢	8-12 週	8-12 週
雌雄	オス	オス
結紮素材	7-0 ポリプロピレン	5-0 ポリプロピレン
スパーサー素材	30G 針	5-0 シルク系
側方枝の結紮	結紮	結紮
背側枝の焼灼	なし	なし
神経血管クリップ	なし	なし

結果は、血栓の有無、血栓重量、血栓長、血栓重量と血栓長、組織学的評価で評価されていた。統計に関して、正規分布の評価はほとんどでなされてより、2群比較では student t-test と Mann Whitney u test がおよそ同等、他群比較では、one way ANOVA や Kruskal Wallis test が主体であった。分割表分析も使用されていた。これらを踏まえて、調査を再開 (7/19, 2024 まで)、より一般的モデルを発表する予定とのことであった。

#### 参考文献

- (1) Diaz JA, Saha P, Cooley B, Palmer OR, Grover SP, Mackman N, Wakefield TW, Henke PK, Smith A, Lal BK. Choosing a mouse model of venous thrombosis: a consensus assessment of utility and application. *J Thromb Haemost.* 2019;17:699-707.
- (2) Wang L, Wang P, Zhang F, Guo X, Chen X, Guan D, Zhao R. Mouse inferior vena cava stenosis model with all branches interrupted may help deep vein thrombosis research. *J Thromb Haemost.* 2023;21:1995-1997.

## 2. Sepsis and immunothrombosis: Multi-laboratory platform for preclinical animal studies.

Patricia Liaw, PhD (Canada)

Professor, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada

発表の趣旨は、感染関連の血栓形成機序を明らかにすること、敗血症動物モデルを一般化する利点を理解すること、糞便誘発腹膜炎による敗血症モデルを理解することである。まず、免疫血栓は、感染性因子やその断片と白血球や血小板の免疫応答により形成される微小血栓と表現した。免疫血栓は感染性因子の播種を防ぐ一方で、血栓による循環障害、全身性の内皮細胞障害や播種性血管内凝固に至る可能性がある。敗血症は高頻度で致死に至る病態であるにもかかわらず、治療に関する臨床研究では有効性が見出せておらず、現在でも治療法が確立されていない。演者らは敗血症マウスモデルが個々の施設独自のものであるという問題点や、病態生理の解明、臨床研究への橋渡しを加速させる目的で、National preclinical sepsis platform (カナダ) を立ち上げた。

敗血症モデルマウスとして、ラット糞便懸濁液を 10-12 週齢オス・メスの C57black/6 に投与した。投与サンプルを冷凍保存でき、手技が簡便、投与量により重症度の調節が可能である (図 1) などという利点がある<sup>1)</sup>。演者らはリクエストに応じて閲覧で

きる採血手技、腹水の処理、脳・骨格筋・肝臓等の摘出方法に関するビデオを提供している。懸濁液投与やサンプリング時間を詳細に示した研究の一例を紹介した。どのタイミングで治療薬（ヘパリン）を投与するのが良いのかもマウスの生存率に影響を与えた。

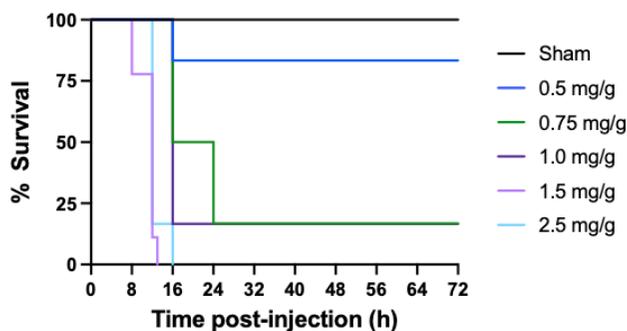


図1. ラット糞便懸濁液誘発マウス腹膜炎敗血症モデル。糞便懸濁液投与量による重症度の違い（参考文献1より）

また、マウスの週齢も生存率に大きく影響し加齢マウスの生存率は大きく低下した。興味深いことに、加齢のメスは若年のメスと比して生存率が低い傾向にあったが有意差はなかった( $p=0.08$ ) (図2)。血漿の IL-6 値や DNA 量は若年マウスと比して加齢マウスで高値であり血漿 IL-10 は加齢マウスで低値であった<sup>2)</sup>。それに関して質問があったが、メスの体重が小さく懸濁液の投与量が少ないからかもしれないとのコメントであった。

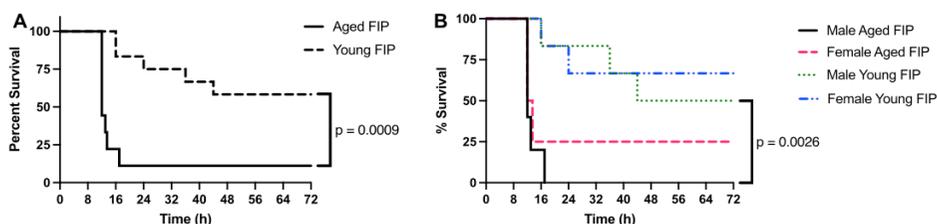


図2. ラット糞便懸濁液誘発マウス腹膜炎敗血症モデル。週齢 (A) や雌雄 (B) の違いによる重症度の差（参考文献2より）

#### 参考文献

(1) Sharma N, Chwastek D, Dwivedi DJ, Schlechte J, Yu IL, McDonald B, Arora J, Cani E, Eng M, Engelberts D, Kuhar E, Medeiros SK, Bourque SL, Cepinskas G, Gill SE, Jahandideh F, Macala KF, Panahi S, Pape C, Sontag D, Sunohara-Neilson J, Fergusson DA, Fox-Robichaud AE, Liaw PC, Lalu MM, Mendelson AA;

National Preclinical Sepsis Platform, Sepsis Canada. Development and characterization of a fecal-induced peritonitis model of murine sepsis: results from a multi-laboratory study and iterative modification of experimental conditions. *Intensive Care Med Exp.* 2023;11:45.

(2) Sharma N, Chen A, Heinen L, Liu R, Dwivedi DJ, Zhou J, Lalu MM, Mendelson AA, McDonald B, Kretz CA, Fox-Robichaud AE, Liaw PC. Impact of age on the host response to sepsis in a murine model of fecal-induced peritonitis. *Intensive Care Med Exp.* 2024;12:28.

## **2nd part of the session: コンピューターを用いた血栓止血モデルに関する内容**

3. Decoding blood: Computational and mathematical models to unravel the complexities of haemostasis and thrombosis.

Joanne Dunster, PhD (UK)

Institute for Cardiovascular and Metabolic Research, University of Reading, UK

演者は、複雑な反応である血栓形成機序を理解および予測するための *in silico* モデルの開発について発表した。血小板の凝集や血液凝固・線溶反応を考慮した血栓形成モデルの構築を目指している。これまで蓄積された生物学的理論と、データの蓄積から人工知能や機械学習により、入力すると結果を予測可能となる可能性がある。ここでは、血小板活性化シグナルのモデルやトロンビン産生能の予測に関する研究を紹介した。血小板凝集早期の細胞内シグナル伝達に関しては理解されているが、それを抑制的に調節する機序に関しては明確ではない。血小板コラーゲン受容体である GPVI の活性化シグナルにおいてホスファターゼ TULA-2 を考慮したモデルは血小板凝集曲線をうまくシミュレーションできることを示した<sup>1)</sup>。

症例間の差が大きいトロンビン産生に関して、血漿の凝固因子濃度で予測が可能かどうかを検討した。過去に報告された、急性心筋梗塞と年齢や性別が合わせられた症例の血液凝固因子濃度とトロンビン産生指標の一つである内因性トロンビンポテンシャル値を用いて、既存のトロンビン産生予測モデルの有用性を検証した。現在のところ、どの予測モデルも個人のトロンビン産生を予測できるほどの精度に到達していなかった。しかし第 XI 因子によるトロンビン産生経路は、モデル予測値のばらつきに影響する可能性が示唆された<sup>2)</sup>。そこで、凝固経路の新しい統一モデルを作成したところ、予測結果の改善が見られた（未発表データ）。

血小板機能の統合的解析は心血管イベント予測に重要であるが、標準化が難しい領

域の一つである。Platelet Phenomic Analysis (PPAnalysis)と名付けた機能解析アッセイ法を開発した。凍結乾燥したマイクロタイタープレートを用いて、血小板機能に関する生物学的情報（アゴニストに対する凝集反応、pセレクトインの発現、フィブリノゲン結合能、受容体の発現レベル、プロテオミクスデータなど）を自動解析した。階層的クラスタリング解析で健康ドナー集団における6つの血小板機能表現型が明らかとなった。PPAnalysisを用いてイベント発症リスクを階層化できる可能性が示唆された<sup>3)</sup>。

#### 参考文献

- (1) Dunster JL, Mazet F, Fry MJ, Gibbins JM, Tindall MJ. Regulation of early steps of GPVI signal transduction by phosphatases: A systems biology approach. *PLoS Comput Biol.* 2015;11:e1004589.
- (2) Owen MJ, Wright JR, Tuddenham EGD, King JR, Goodall AH, Dunster JL. Mathematical models of coagulation—are we there yet? *J Thromb Haemost.* 2024;22:1689-1703.
- (3) Dunster JL, Bye AP, Kriek N, Sage T, Mitchell JL, Kempster C, Batista J, McKinney H, Thomas P, Jones CI, Downes K, Unsworth AJ, Gibbins JM. Multiparameter phenotyping of platelet reactivity for stratification of human cohorts. *Blood Adv.* 2021;5:4017-4030.

#### 4. Computational and Biophysical Models of Coagulation

Andre Lira da Silva PhD.

Oregon Health and Science University, USA

分子生物物理学 (Molecular biophysics)は、物理学の原理を応用して生体分子の挙動を理解する学際的な分野である。血液凝固分野における利点としては、分子間相互作用や仕組みを理解でき、トロンビン産生能の予測、創薬や血液凝固異常の診断に貢献できると予想される。Computational modelingは数学、物理学、コンピューター科学を駆使して複雑なシステムを予測するモデルで、数多くの実験を瞬時に行うことができ、多くの課題を解決する可能性がある。例えば、感染症の追跡、臨床診断の補助、薬剤の副作用の予測などに利用可能と考えられる。Molecular dockingでは低分子合成化合物と標的分子の結合を予想し創薬などに有用である。Theoretical biophysicsでは分子間の相互作用にエンタルピーやエントロピーなどのエネルギー変化を考慮する。エントロピーによって、液体の血液から固体の血栓への移行を促進する分子の無秩序とエネルギー分布の変化を説明することができる。などと総論的な解説が主体で

あった。発表者は、**Computational modeling** と実験的検証の例として、グラム陰性桿菌成分であるリポポリサッカライド(LPS)による接触系因子の活性化についてデータを示した。LPSは血液凝固XII因子を活性化するが、過剰量では逆に活性化を抑制する。その詳細についてLPSの化学組成の違いに注目して検討した。細菌によってLPSの構造には相違があり、大腸菌のLPSの中でO111:B4、O26:B6、Rd2の順で糖鎖の長さは短くなり表面の陰性荷電が強くなるが、血液中での挙動は明確ではない。一方、粒子間の静電反発力の大きさの指標であるゼータ電位は塩化ナトリウム溶液中でO26:B6が最も低下していた。そのO26:B6のみがXII因子を活性化した。全てのLPSが高分子キニノゲンの存在下でプレカリクレインを活性化した。詳細はポスターセッション(PB1379, The physicochemical signature of lipopolysaccharide regulate factor XII and contact system activation)で発表するとのことであった。

関連ポスター

(1) PB1379. Andre Lira da Silva. The physicochemical signature of lipopolysaccharide regulates factor XII and contact system activation.