循環障害に関連しうる赤血球変形能の新規評価法による検討

大阪大学大学院医学系研究科　循環器内科
梶谷　憲司

赤血球は直径８μｍ程度の無核細胞で、円盤状をしている。毛細血管径は 4～8μｍであり、赤血球は変形することで毛細血管を通過する。赤血球には、細胞膜の硬さ、内部粘性、形態などによって変化する変形能（硬さ）というパラメータがあり、硬いと毛細血管通過に時間がかかると考えられている。従って、赤血球が硬いことが原因で、肺血管抵抗や末梢血管抵抗が上昇したり、冠動脈の微小循環が傷害される可能性がある。既存の赤血球変形能測定法として、スポイトで細胞膜を吸引して伸び率を測る方法などがあるが、生体内でこのような変形は起こっていないため、結果の解釈が難しいという問題点があった。そのため、より生体内での赤血球の挙動に忠実な測定系が必要とされていた。

そこで我々は、毛細血管での赤血球の挙動を再現することで変形能を評価する装置を作製することとした。具体的には、微細加工技術でシリコンを加工してマイクロ流路を作成した。流路は幅 200μｍ、深さ 3.5μｍ で、中央に毛細血管を模した幅 3～5μｍの６つのチャネルを並列に配置している。この流路に PBS で希釈した赤血球を流すと、赤血球がチャネルを通過する様子を観察できる（図 1a)。

ここで、赤血球直径 D[μｍ]、チャネル幅 W[μｍ]、チャネル内の赤血球速度 Vc[μｍ/sec]、チャネル外の赤血球速度 Vf[μｍ/sec]を測定する。さらに、赤血球変形率 ε および、Vf を１としたときの Vc の相対速度 V^を下記の計算式で算出する。

$$\varepsilon = (D-W)/D$$

$$V\hat{} = Vc/Vf$$

赤血球が大きく変形するとチャネル通過速度は遅くなるため、ε が大きくなると V^は小さくなる。複数の赤血球に関して ε と V^を算出し、横軸を ε 、縦軸を V^としたグラフにプロットして近似直線を描くと、負の直線となる。硬い赤血球ではチャネル通過速度が遅くなるため、近似直線は下方偏移する（図 1b)。従って、近似直線の位置により赤血球の硬さを判定することができる。

この測定系の妥当性を検証するために、弱い酸化剤であるジアミド 1mM で赤血球の膜骨格蛋白を架橋し、細胞膜を硬化させた赤血球を作成して測定した。コントロールと比較して、ジアミド処理赤血球のグラフは下方偏移しており、変形能が減弱したことが分かった（図 2a)。糖尿病患者の赤血球は、膜蛋白糖化や Na/K ATPase 活性低下により質的な異常をきたしている。

これらが変形能にも影響している可能性があったため、糖尿病患者の赤血球を測定した。全例ではないものの、健常者よりグラフが下方偏移する患者が存在し、糖尿病が赤血球変形能を減弱させる可能性が示唆された（図 2b)。また、循環器疾患患者（冠動脈疾患、肺高血圧、弁膜症）の赤血球についても同様の検討を行ったが、まだ測定症例数が少数であり、健常者との差は認められていない。

我々は今回、毛細血管モデルを作成し、赤血球変形能を測定する測定系を確立した。また、糖尿病患者の中に赤血球が硬くなっている症例があることを示した。今後、グラフを数値化して定量評価できるようにすること、健常赤血球のグラフ上での存在範囲を決定することなどにより、この測定系の実用化を目指していく。同時に、様々な疾患で赤血球を測定し、臨床情報と照合して新たな知見を得ることを目的に研究を続ける予定である。

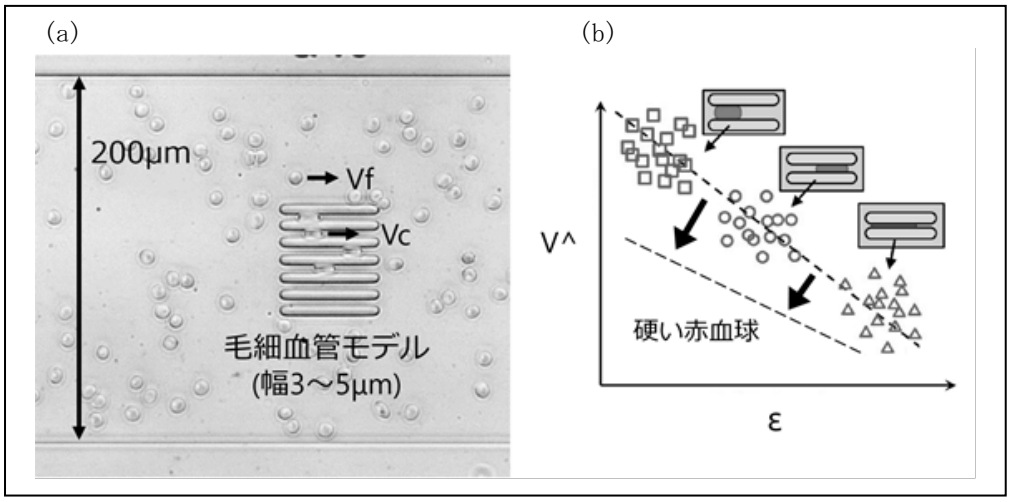


図 1

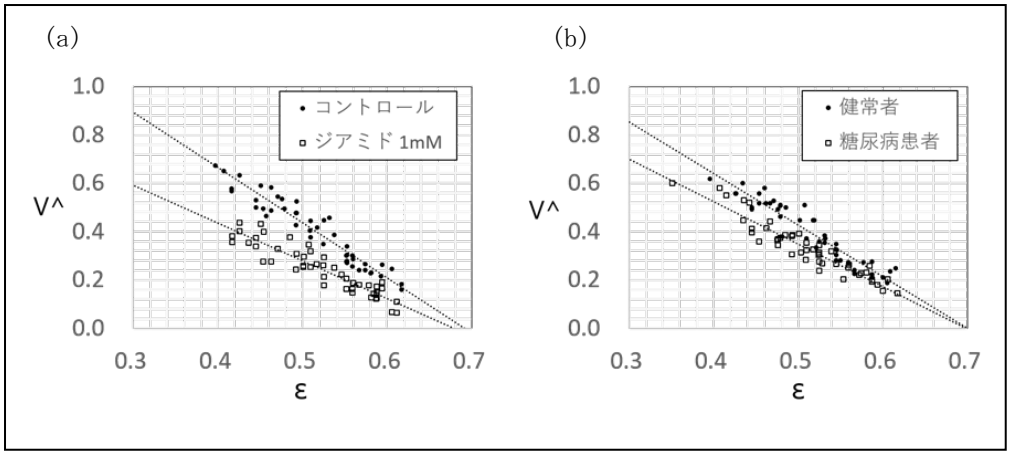


図 2

急性心不全患者における血中グレリン濃度と ブチリルコリンエステラーゼに関する横断研究

大阪急性期・総合医療センター　心臓内科

瀬尾　昌裕

【背景】

近年､心不全患者において低栄養が重要な予後不良因子であることが報告されてきており、その機序の一つしてグレリン抵抗性が注目されている。グレリンは、食欲増進ホルモンとして知られているが、その他抗炎症作用や交感神経抑制作用、心臓線維化抑制などの作用があり、多面的な心保護的作用のあるホルモンである事が報告されている。末期心不全患者や悪液質患者においては、IL-6 や TNF-α等の炎症性サイトカインの影響でグレリン抵抗性の状態に陥り、代償的に血中グレリン濃度が上昇している事が報告されている。

ブチリルコリンエステラーゼ(BChE)は、活性化グレリンを不活化する機能をもっており、グレリンカスケードを制御する機能があると考えられている。我々は以前より血中 BChE 低値が急性心不全患者の独立した予後予測因子である事を報告した。その機序の一つとして、低 BChE 血症は生体内のグレリンの代償機構を反映している可能性を想定した。さらに、BChE 阻害薬は血中グレリン濃度を増加させて食欲を増加させる作用がある事が分かっており、BChE は予後予測因子としてだけではなく、低栄養を合併した心不全患者の治療ターゲットにもつながる可能性がある。しかし、今までに心不全患者においては、BChE とグレリンを同時に測定してその関係を調べた研究はなく、今回我々は実際にその関係性を調べる事とした。

【方法】

対象は、2020 年 6 月~2021 年 4 月に当センターに急性心不全で入院し、以下の除外基準に抵触しない患者 32 例（平均年齢 76±12 才、男性 64%)。除外基準は①肝機能障害を有する患者 ②胃切除後の患者 ③リバスチグミンまたは六君子湯の内服をしている患者 ④摂食障害または高度肥満（BMI>35）をもつ患者 ⑤内分泌疾患をもつ患者 ⑥その他研究責任者が被験者として不適当と判断した患者。

退院前の心不全代償期に、血中グレリン濃度測定（total-ghrelin, acyl ghrelin, des-acyl ghrelin and acyl/des-acyl ghrelin ratio (A/D ratio))を行った。また、血液検査（BChE を含む一般的な血算生化学検査項目)、体組成検査（BIA 法)、心臓超音波検査、食欲スコア（Visual analogue scale 1~10）の計測を行った。

【結果】

◆BChE と血中グレリン濃度の関連

BChE と total-ghrelin、acyl grelin, des-acyl ghrelin に関して、有意な相関関係を認めなかった（Table 1)。また、Whole cohort においては A/D ratio と BChE の相関は有意ではなかったが、HFpEF 群においては A/D ratio と BChE 値が有意な逆相関関係を認めていた（Table 1, ρ：- 0.524, p=0.0449)。

	Whole cohort (N=32)		HFrEF (LVEF<50%) (N=17)		HFpEF (LVEF>50%), (N=15)	
	ρ	p-value	ρ	p-value	ρ	p-value
Total-ghrelin	0.036	0.847	-0.271	0.310	0.367	0.179
Acylated ghrelin	-0.012	0.737	-0.273	0.365	-0.005	0.985
Des-acyl ghrelin	0.024	0.895	-0.274	0.304	0.387	0.154
A/D ratio	-0.213	0.243	0.050	0.854	-0.524	0.0449

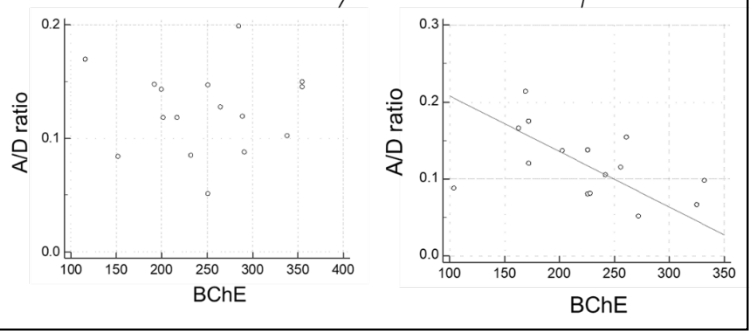


Table 1：The association between BChE and ghrelin

◆総グレリン濃度に関連するその他の因子の探索

Whole cohort においては、total-ghrelin と IGF-1・食欲スコアとの間に有意な逆相関を認めた（Table 2)。HFrEF においては BNP 濃度と総グレリンは有意な相関を認めた（ρ=0.524, p=0.037)。また、HFpEF においては、fat free mass index(FFMI)と、総グレリンは有意な相関を認めた（ρ= -0.577, p=0.039)。

	Whole cohort (N=32)		HFrEF (LVEF<50%) (N=17)		HFpEF (LVEF>50%), (N=15)	
	ρ	p-value	ρ	p-value	ρ	p-value
BNP	0.126	0.492	0.524	0.037	-0.257	0.355
GH (N=12)	0.320	0.311				
IGF-1 (N=12)	-0.709	0.010				
BMI	-0.119	0.545	-0.121	0.681	-0.137	0.655
FFMI	-0.320	0.097	-0.095	0.748	-0.577	0.039
FMI	0.116	0.557	-0.204	0.483	0.407	0.168
Appetite score	-0.369	0.041	-0.337	0.219	-0.407	0.132

Table 2：The association between ghrelin and various factors

【考察】

◆BChE と血中グレリン濃度の関連について

BChE は acyl ghrelin を des-acyl ghrelin に不活化する作用を持っており、HFpEF 患者において A/D ratio と BChE の有意な逆相関が得られたのは、予想通りの結果と言える。一方、HFrEF 患者において BChE と A/D ratio の相関関係を認めなかった理由は、本研究のデータからは不明である。下記は推察となるが、従来生理活性をもたないと考えられていた des-acyl ghrelin には、心保護作用がある事が近年複数例報告されており、心機能の低下した心不全においては、des-acyl ghrelin が代償的に上昇するような別の調節機構の存在がある可能性が考えられた。従来のグレリン受容体と異なった、des-acyl ghrelin 受容体が心筋にも発現している可能性が現在研究されており、さらなる知見の蓄積が必要と考えられる。

◆総グレリン濃度に関連するその他の因子について

IGF-1 との逆相関関係は以前より報告されている。本研究の食欲スコアとグレリンの逆相関関係も、グレリン抵抗性の病態を観察しているものと考えられた。このような因子が総グレリン濃度と逆相関している関係は、グレリンの成長ホルモン分泌促進や食欲増進作用を考えると、当然の結果と考えられる。

また、HFrEF においては BNP 濃度と、HFpEF においては FFMI と、総グレリンは有意な相関を認めた。HFrEF においては、心不全の重症度がグレリン濃度と強く関係しているものと考えられた。また、HFpEF においては、低栄養状態におけるグレリン濃度の代償的上昇が強くみられたものと考えられた。以上の結果からは、HFrEF と HFpEF ではグレリンの代償機構が異なった因子から制御を受けている可能性が考えられた。

【結論】

・急性心不全患者の HFpEF 患者において、血中 BChE 値は、血中グレリン濃度の A/D ratio と有意に逆相関していた。
・急性心不全患者の血中総グレリン濃度は成長ホルモンカスケードや食欲と関連していた。

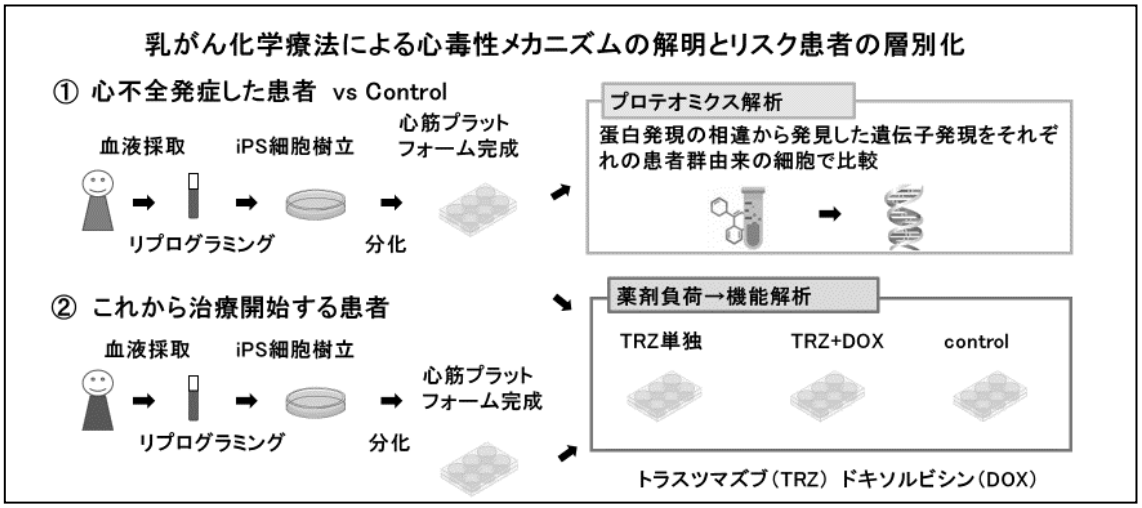
トラスツズマブによる心毒性のメカニズムの解明とリスク患者の層別化

大阪市立大学大学院医学研究科　循環器内科
北田　諒子

現在、日本では、死因の 1 位ががん、2 位が心疾患であり、またさらに高齢化社会となり、心血管疾患を合併する悪性腫瘍患者が増加している。一方で、分子標的薬などの治療法の発展に伴うがん治療の進歩により、寛解率や治癒率は向上しているが、その副作用により、心血管系の合併症を生じることが問題となっている。

乳がん患者においても同様で、アントラサイクリン系薬剤や分子標的治療薬、特に HER2 阻害薬であるトラスツズマブ(TRZ)による薬剤誘発性心筋症も多く経験されるようになった。これまでの研究から、薬物治療による心毒性の早期発見のため、スクリーニングが推奨されており、低リスク、中リスク、高リスクに応じて、フォローアップ期間などの推奨がガイドラインに記載され、心機能低下を早期発見するための取り組みがなされている。また、心機能が正常に見える人でも、ストレイン等の画像診断を使うことで、心保護薬を早めに導入し、心不全が予防できるのではないかという報告もされている。

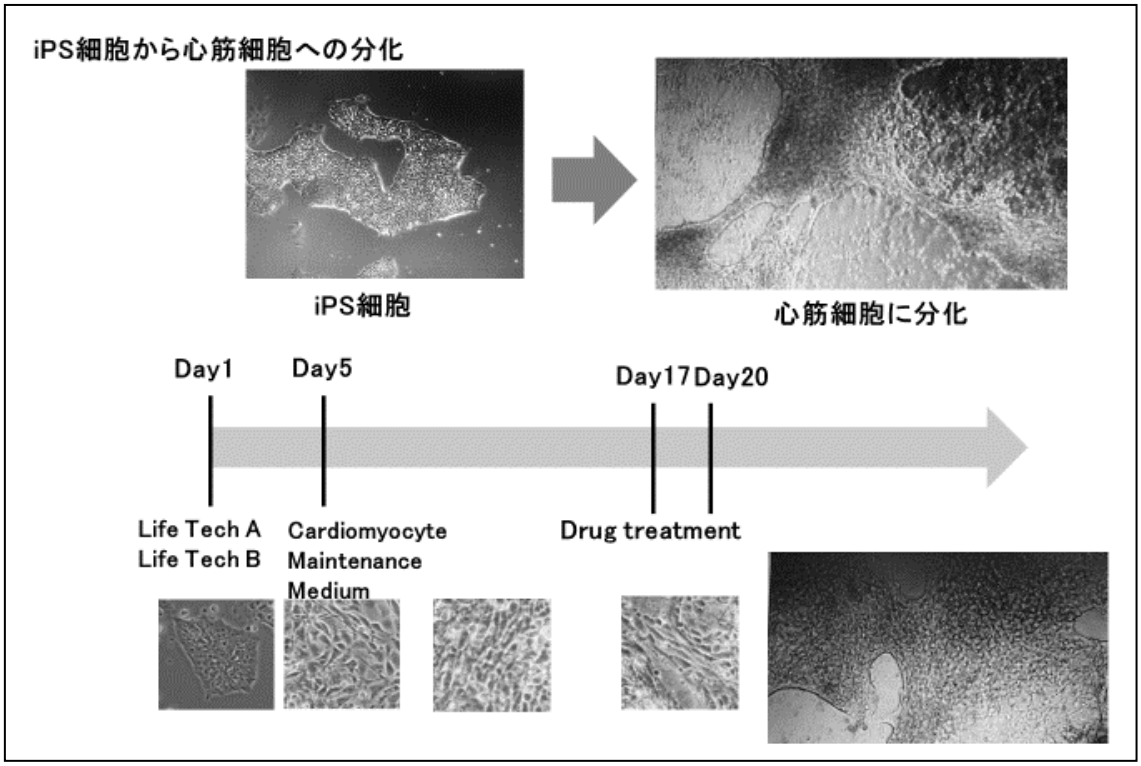
しかしながら、薬剤誘発性心筋症は、時に致死的となること、心機能低下し心不全となった場合には、癌に対する薬物治療を中断せざるを得ないことから、発症予測、治療法の確立は急務である。当院でも、乳腺外科と循環器内科との共同研究で、乳がんに対して薬物療法、手術療法が予定されている患者 42 例を検討した。平均年齢は 56 歳であり、治療経過中に心機能低下した症例は 42 例中 3 例と 7%であり、3 例中 2 例はドキソルビシンとトラスツズマブ併用症例、1 例はトラスツズマブのみ使用した症例であった。1 症例は入院加療が必要であり、2 症例は抗がん剤治療を一時中断の後に、再開することができた。



TRZ による薬剤誘発性心筋症の危険因子として、50 歳以上、基礎心疾患の存在、ドキソルビシン（DOX）の併用があげられる。また、作用機序としては、心筋細胞障害と血管内皮細胞障害の二つが考えられている。HER2 たんぱく質が心筋の恒常性維持に重要であることは動物実験により解明されているが、分子機序については不明である。

今回は、TRZ による心毒性を発症しやすい患者の特性は何か、事前に心毒性を生じやすい患者を検出できるか、予防するための薬剤はあるかなどを検討するために、本研究を計画した。山中らにより樹立されたヒト induced pluripotent stem cell(iPS 細胞)の技術で、患者の iPS 細胞を作成し、様々な細胞に分化させ、毒性の評価や、分子機序の解明が可能となった。患者特異性を持った iPS 細胞から分化させた心筋細胞を解析し、発現を制御する関連遺伝子の相違や反応の相違をみることで、心毒性の機序解明や治療法の発見を目指す。

TRZ よる治療で心不全を発症した患者から採取した血液から iPS 細胞を樹立することに成功した。今後、心筋に分化させ患者の遺伝背景を持つ心筋細胞のプラットフォームを作成し、検討を行っていく予定である。患者の遺伝背景を持つ iPS 細胞由来の心筋細胞プラットフォームを作成し、薬剤負荷し解析することで、正常と患者群との反応の相違を比較検討する。トラスツズマブとドキソルビシン併用で心不全発症リスクが高まることもわかっており、これについても同時に検討していく予定である。



アジア人における急性心筋梗塞後の虚血・出血リスク層別化のための新規指標の開発

国立循環器病研究センター　心血管集中治療科
本田 怜史

【背景】

急性心筋梗塞の虚血イベント抑制に抗血小板療法が行われるが、日本人を含む東アジア人は欧米人と比較して虚血イベントリスクが低く、出血イベントリスクは高いと報告されている。そのため、東アジア人独自の虚血・出血リスクのバランスを考慮した抗血小板薬の選択が望まれる。しかし、東アジア人の急性心筋梗塞患者における虚血・出血リスクを評価する有効な指標がないのが現状である。

【目的】

日韓の急性心筋梗塞レジストリデータの解析により、アジア人独自の虚血・出血イベントリスクに基づいた急性心筋梗塞後､抗血小板療法の確立に資するエビデンスの創出を目指す。

【方法】

Japan Acute Myocardial Infarction Registry（JAMIR）は日本全国 50 施設を対象とした多施設、前向きの急性心筋梗塞登録研究である。我々は 2015 年 12 月から 2017 年 5 月の間、日本の 50 施設において 3411 例の急性心筋梗塞例を前向きに登録した。全例において前向きに虚血イベント、出血イベント（TIMI 基準、BARC 基準）を収集した。一方、KAMIR-NIH は韓国における急性心筋梗塞患者の多施設、前向きレジストリである。2011 年 11 月以降、韓国の主要 20 施設において合計 13,577 例の心筋梗塞症例が前向き登録された。本研究では JAMIR のデータベースを KAMIR データベースと統合し､16000 例を超える大規模データベースを構築し、日韓の統合データベースの解析を行う。また、JAMIR データベースから抗血小板療法下での虚血、出血イベントに関する解析を行う。

【研究成果】

1）JAMIR-KAMIR-NIH 統合データベース作成

2020 年～2021 年にかけて KAMIR 研究代表の Myung Ho Jenog 教授らとデータベース作成についての Web 会議行い、使用可能な共通の観察項目の確認などを行なった。2021 年 12 月時点では各国のデータベース統合の倫理手続きの最終段階であり、2022 年 2 月中の統合データベース作成を目指して活動を継続している。

将来的には JAMIR/KAMIR の統合データベースを用いて出血イベントリスクスコア、虚血

イベントリスクスコアを作成する予定である。

2）プラスグレルからクロピドグレルへの De-escalation を受けた心筋梗塞患者の虚血、出血イベントについての調査。

我々は JAMIR のデータベースを用いて初期治療としてプラスグレルの投与を受けた患者(n=2719)の中でプラスグレルからクロピドグレルへの De-escalation を受けた患者の特徴と予後を調査した。全体の 4%(n=112)が入院中に De-escalation を受けていた（切替日の中央値は入院から 4 日目)。De-escalation 群はプラスグレル継続群と比較して脳血管障害既往､抗凝固薬使用､周術期大出血のあるものが多く出血リスクの高い背景を有していた。しかし、退院後は De-escalation 群とプラスグレル継続群で虚血イベント・出血イベントに差がなかった（図１)。さらに出血リスクが高い ARC-HBR 大基準を満たす患者では De-escalation を受けた群において出血が少ない傾向が見られた(図 2:大出血:0% vs. 4.1%, p=0.16)。

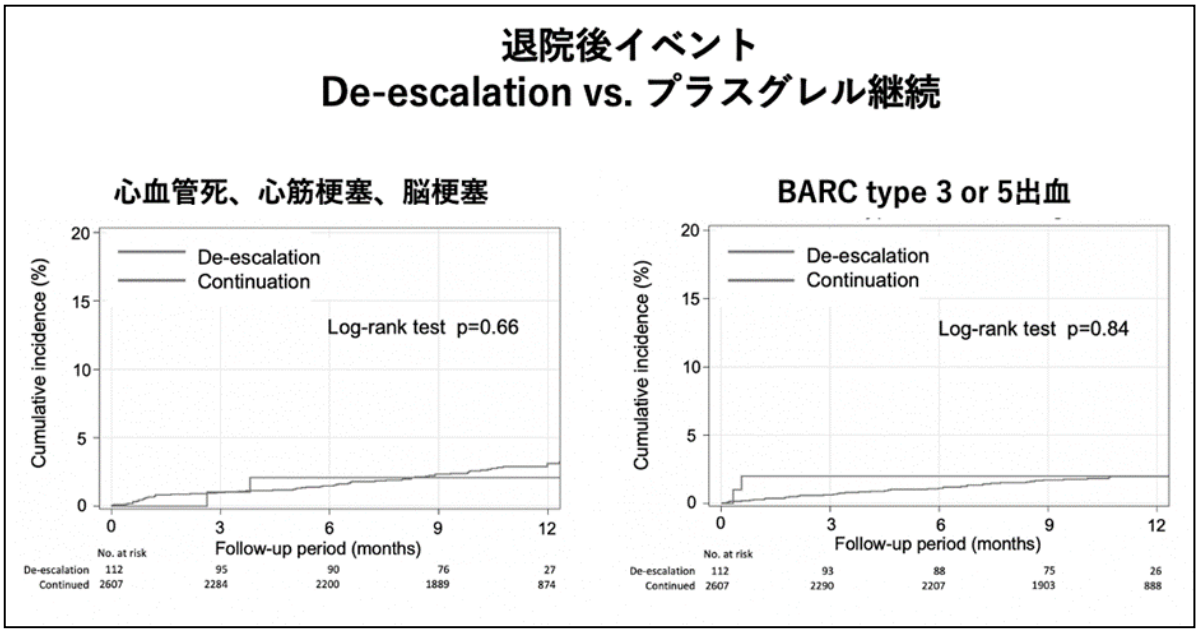


図 1

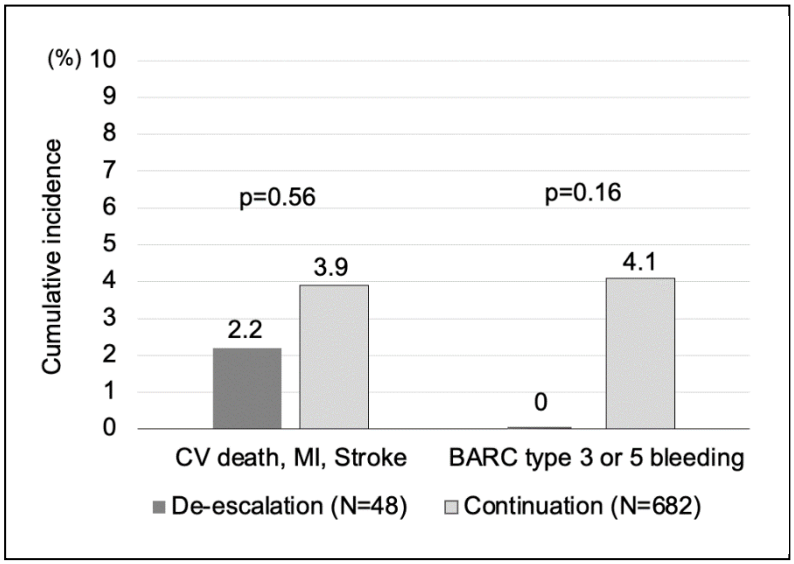


図 2