

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09080

研究課題名(和文) 赤血球質的異常に着目した新しい心不全病態概念の確立

研究課題名(英文) Analyzing qualitative abnormality of red blood cell for investigating pathophysiology of heart failure

研究代表者

大谷 朋仁(Ohtani, Tomohito)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30623897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年の作成可能となった毛細血管レベルを反映するマイクロ流路と高速ビジョンとを用いた測定系により心不全患者の赤血球変形能の評価した結果、健康人と比して、心不全患者では、約半数に赤血球の形態変化である扁平化を認め、質的变化と関連するマイクロ流路の通過速度低下も認めた。また、そのような症例では赤血球の量的異常である貧血と肺高血圧も認めた。一方、赤血球のメタボロミクス解析からは、心不全では解糖系の亢進により赤血球が酸素を解離しやすくなっている可能性が示された。

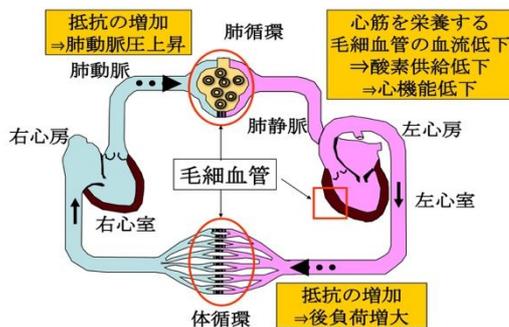
研究成果の概要(英文)：Recently, a novel method for assessing the deformability of red blood cells (RBC) has been developed with micro-channels reflecting micro-vessels. We assessed RBC deformability in patients with heart failure (HF) and healthy subjects with this micro-channel system. A flattened RBC was observed and passing speed of microchannels, which is associated with qualitative change of RBC, was decreased in about half of patients with HF compared to healthy subjects. These patients also had a decreased hemoglobin level, which is a quantitative change of RBC, and pulmonary hypertension. Metabolomics analysis of RBC showed several differences between HF patients and healthy subjects. Some metabolites indicate the activation of glycolytic system in HF patients, which will associate with easier dissociation of oxygen from hemoglobin in RBC.

研究分野：心不全

キーワード：心不全 赤血球 変形能 マイクロチャネル ヘモグロビン

1. 研究開始当初の背景

心不全は高い罹患率および死亡率を有し、高齢化社会の現代においては心不全増悪による入退院を繰り返すことも多く、その医学的、社会的な重要性は増大している。近年の薬物療法・非薬物療法の発達により、心不全患者の予後は改善の傾向がみられているが、未だに十分ではない。心不全の発症には腎臓や血管などの心臓外要素も深く関与していることは我々の報告を含め (Nishio M, Ohtani T et al. Hypertens Res.2008;31:1865.) 数多くの研究で明らかであり、心臓外の要素への研究は、心不全治療成績の向上に必要とされるのみならず、心不全発症の病態解明にも重要である。中でも、心臓外の要素の1つであり、心臓と全身臓器に直接影響を与える血液自体の異常については、十分に研究されていない。血球の約90%を占める赤血球数の減少である貧血と、死亡や心不全入院などの心血管事故との関連性 (Circulation 2005; 112: 1121、JACC 2008; 52: 818 など) は報告されているが、その機序など詳細は不明点が多い。さらに、赤血球の機能に関連する質的異常については、入手が容易な検体にも関わらず測定方法が十分に確立されていなかったこともあり、十分な研究されていなかった。赤血球の大きさは約6-8 μm であるが、約4 μm の毛細血管を通過しなくてはならず、柔軟な変形能が従来備わっている。しかし、この柔軟な変形能が損なわれた場合は、毛細血管を通りにくくなり、体循環の毛細血管網においては抵抗増加から後負荷の増大や血流低下からの酸素供給の低下をもたらす、心筋においても血流低下に伴う酸素供給の低下から心機能低下の一因となり、肺循環においても抵抗増加から肺動脈圧の上昇を引き起こす一因になる可能性などが考えられるが、これまでに研究はされていないため、全く不明であった。



赤血球変形能に関与する赤血球の“硬さ”を測定するには、細管吸引法や原子間顕微鏡を用いて測ることが可能であるが、単一赤血球の硬さを測るのに最低でも分単位の時間を要する。患者を評価するために必要なサンプル量を得ようとすると多くの時間を要するが、赤血球は採血後3時間ほどで変化が生じ

てくることより、より迅速な評価測定法が望まれていた。近年、研究協力者である金子真教授らのグループは、マイクロ・ナノテクノロジーの進展により、幅や厚さが4 μm という流路の作成を可能とし、毛細血管の状態を再現できる実験系の組み立てを可能とした (計測自動制御学会論文集 2011;47:221)。このような背景のもと、下記の研究目的で本研究を計画し検討した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、近年の作成可能となったマイクロ流路と高速ビジョンを用いた測定系により心不全患者の赤血球変形能の評価し、各種臨床データの解析から心不全の病態形成に対する寄与を検討することとした。また同時に、患者由来の変形能の低下した病的な赤血球を用いた基礎的検討から関連因子を同定し、薬物的介入の余地となりうる候補因子の探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(生体試料および臨床情報)

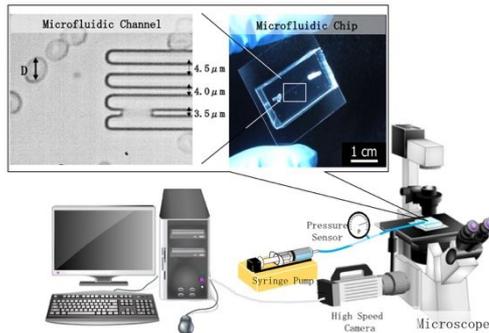
大阪大学医学部附属病院に非代償性の急性心不全により入院加療となった患者、または慢性心不全で加療中に増悪を認めた症例のうち、本研究に同意の得られた男性患者20人(心不全群)および本研究の同意が得られ、かつ問診および心電図の結果より心疾患が否定できた健康な男性20人(健康群)を対象とし、採血により赤血球を採取した。女性に関しては、月経に伴う出血とそれに伴う赤血球の新規増生による影響を考慮し、今回の検討は男性のみとした。また臨床背景として血圧などの一般身体情報の他、合併症、服薬状況、貧血に関連するヘモグロビン値、ヘマトクリット値などの指標の他に、肝機能、腎機能など血液検査データを収集した。

また、本研究は本学の倫理委員会での審査・承認を受け、研究協力の任意性と撤回の自由、予想される利益と生じうる不利益、個人情報保護(試料および診療情報の匿名化)、研究計画・方法・結果の患者本人への開示、研究成果の公表、研究から生じる知的財産権の帰属などを説明し文書で同意書を取得した。データは匿名化を含め十分に配慮し管理した。

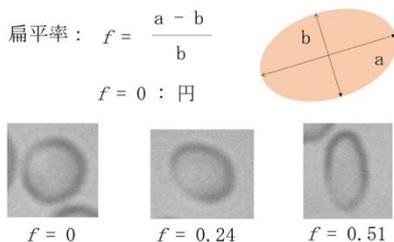
(赤血球質的評価)

研究協力者である大阪大学工学部金子真教授らのグループが開発した、マイクロ流路を用いた実験系で赤血球の質的評価を行った (計測自動制御学会論文集 2011;47:221)。この実験系は、高速カメラおよびコンピュータ処理を用い、取得映像よりマイクロ流路を実際に赤血球が通過する時間や赤血球の状

態を測定し、質的評価となるデータを取得した。
 研究機期間内における研究協力者の金子らの検討により、より有効な測定が可能となった測定系を用い、具体的には、マイクロ流路幅が 3.5、4.0、4.5 μm のマイクロチャンネルを並列に配置したチップを用い、健康人または、心不全患者由来の赤血球を流して評価した。



チャンネルを通過する赤血球の直径 ($D_{3.5}$, $D_{4.0}$, $D_{4.5}$)、チャンネルと通過する赤血球の速度 ($V_{3.5}$, $V_{4.0}$, $V_{4.5}$) とチャンネル外を通過する赤血球の速度 V_0 を測定し、 V_0 で除することで補正した速度 ($V_{ch3.5}$, $V_{ch4.0}$, $V_{ch4.5}$ 、単位: arbitrary unit) を算出した。また、赤血球の形態を観察し、扁平率 f を測定し、平均値を算出した。



(Na-K-ATPase 活性評価)

ヒト赤血球を採取後、すみやかに浸透圧破壊したのちに洗浄および遠心分離により膜分画を収集した。膜蛋白 200 μg に ATP を加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ 60min の反応で $\text{ADP} + \text{P}_i$ に分解された P_i を測定する ATPase activity kit を用いて Na-K-ATPase 活性を評価した。

(赤血球メタボローム解析)

早朝に EDTA-2K 採血管で採取した赤血球を 120g 15 分で遠心後上清を除き、赤血球層より 200 μL を 1.8mL の -40°C の 55% メタノールと混合し、 -80°C で保存し、検体が 10 例となったところで CE-TOFMS のカチオンモード、アニオンモードによるメタボローム測定を HMT で行った (HMT: ヒューマン・メタボローム・テクノロジー)。測定は、2,000 μL のクロロホルム及び 800 μL の Milli-Q 水を加えて攪拌し、遠心分離 (2,300 $\times g$, 4、5 分) を行い、遠心分離後、水層を限外ろ過チューブ(ウ

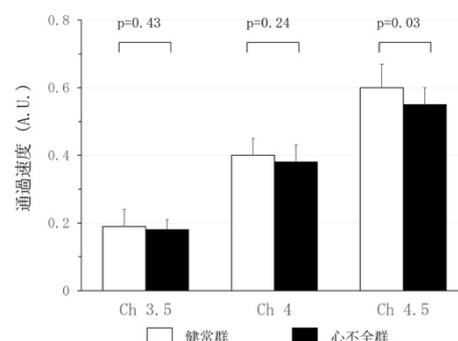
ルトラフリー MC PLHCC, HMT, 遠心式フィルターユニット 5kDa) に 400 \times 4 μL 移し取り、遠心 (9,100 $\times g$, 4、120 分) し、限外ろ過処理後、ろ液を乾固させ、再び 50 μL の Milli-Q 水に溶解して測定に供した。HMT 代謝物質ライブラリ及び Known-Unknown ピークライブラリに登録された物質を対象として解析を行った。

4. 研究成果

1) 心不全患者における赤血球質的評価

研究対象とした心不全群 ($n=20$) の臨床背景は、健常群に比べて、高齢 (年齢 57 ± 14 歳 vs. 39 ± 9 歳 $p < 0.05$) であり、心不全の etiology は、心筋症 12 例、心筋梗塞後 2 例、肺高血圧症など関連したその他の心疾患 6 例であった。心不全群では、高血圧症 2 例、脂質異常症 2 例、糖尿病 4 例を認め、心エコー図指標である左室駆出率 (LVEF) は $37 \pm 21\%$ と低下し、三尖弁圧較差 (TR-PG) は $31 \pm 18\text{mmHg}$ と上昇しており、心不全を有する患者として矛盾しない臨床背景を示した。血液検査では、心不全群のヘモグロビン値とヘマトクリット値は低下していた (13 ± 2 vs. 16 ± 1 g/dL, $p < 0.05$, 38 ± 6 vs. $47 \pm 2\%$, $p < 0.05$)。心不全群の腎機能は比較的保たれていたが、健常群に比べて血清クレアチニン値は軽度低下傾向を認めた (1.1 ± 0.5 vs. 0.8 ± 0.1 mg/dL, $p=0.07$)。

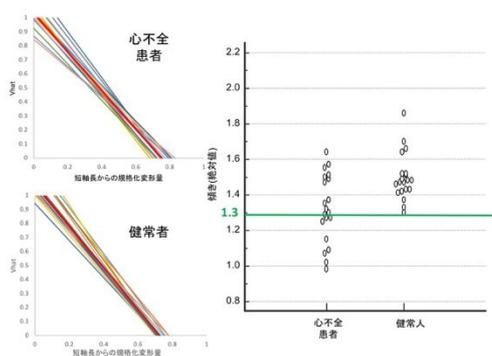
このような臨床背景をもつ心不全患者での赤血球の通過速度は、心不全群において、4.5 μm のチャンネルを通過する速度 $V_{ch4.5}$ で有意に低下しており (0.60 ± 0.07 vs. 0.55 ± 0.05)、3.5 μm と 4.0 μm のチャンネルの通過の速度 $V_{ch3.5}$ (0.19 ± 0.05 vs. 0.18 ± 0.03)、 $V_{ch4.0}$ (0.40 ± 0.05 vs. 0.38 ± 0.05) は低下傾向を認めた。



また、3.5、4.0、4.5 μm のそれぞれのチャンネルを通過する赤血球の短径は、健常群と心不全群でそれぞれ 6.7 ± 0.3 vs. 6.8 ± 0.4 μm , $p=0.32$, 6.7 ± 0.3 vs. 6.8 ± 0.3 μm , $p=0.27$, 6.7 ± 0.3 vs. 6.8 ± 0.3 μm , $p=0.27$ で、両群間およびチャンネル間に差を認めなかったが、

長軸では、 6.8 ± 0.3 vs. $7.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$, $p=0.01$, 6.8 ± 0.3 vs. $7.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$, $p=0.01$, 6.8 ± 0.3 vs. $7.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$, $p<0.01$ で、心不全群が大きく、扁平率 f では、心不全群が健常群に比して有意な扁平化を認めた (0.10 ± 0.02 vs. 0.14 ± 0.05 , $p<0.01$)。

これらのことから、心不全群では健常群に比して赤血球が大きく扁平化しており、チャンネル幅が狭く赤血球が大きく変形を必要とする状況では、通過速度が大きく低下して通過時間が延長する傾向であるが、変形の程度が軽度な状況では、赤血球の通過速度の低下割合が有意に現れる可能性が考えられた。そこで、つぎに、横軸に赤血球の変形量（短軸径とチャンネル幅から算出）、縦軸に通過速度（対比）で関係性を評価した。



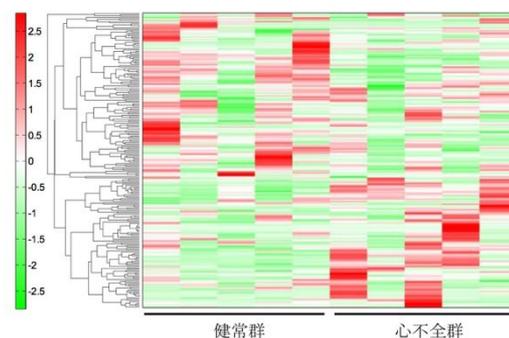
結果、赤血球変形量と通過速度は直線相関を示したが、心不全の約半数で健常人と異なる傾きの関係を示すことが明らかとなった。傾きがゆるく同じ変形量で通過速度が低いと考えられる症例を傾き <1.3 とすると、傾き <1.3 群 ($n=9$) は、残りの心不全患者と比して、心不全の重症度とも関連性のある血清 BNP 値や左室駆出率 EF、および血清クレアチニン値などに差を認めなかったが、有意に三尖弁逆流圧較差は高く、(20.7 ± 10.6 vs. $43.1 \pm 17.5 \text{mmHg}$, $p<0.01$) 肺高血圧を認めた。量的異常に関連するヘモグロビン値 (13.2 ± 1.3 vs. $11.8 \pm 2.9 \text{g/dL}$, $p=0.15$) とヘマトクリット値 (40.2 ± 3.6 vs. $36.3 \pm 7.4\%$, $p=0.14$) は低下傾向を認め、赤血球の異常を来す可能性が報告されている糖尿病の有病率も高い傾向 (9% vs. 44% , $p=0.08$) であった。また、扁平率も (0.18 ± 0.04 vs. 0.11 ± 0.02 , $p<0.01$) 大きかった。このことから、心不全患者で貧血を有し、肺高血圧を呈している症例においては、赤血球の量的変化のみならず、赤血球は扁平化の変化を生じ、毛細血管レベルのチャンネルを通過する時間が延長するような質的な変化が生じている可能性が明らかとなった。

2) 心不全患者における赤血球の基礎的評価

はじめに、赤血球膜の Na-K-ATPase 活性を心不全群と健常群で比較検討した。結果、心不

全群 ($n=10$) は、健常群 ($n=10$) と比して赤血球膜 Na-K-ATPase 活性に差は認められなかった ($40.3 \pm 21.7 \text{nmol}$ vs. $49.3 \pm 23.5 \text{nmol}$, $p=0.38$)。また、Ouabain により阻害される Ouabain 感受性 Na-K-ATPase 活性においても健常人群と心不全群に差異を認めなかった ($16.1 \pm 18.3 \text{nmol}$ vs. $18.3 \pm 13.2 \text{nmol}$, $p=0.73$)。これらのことから赤血球の変形に関わる Na の移動や ATP の動態に影響を与える Na-K-ATPase 活性が、心不全状態においては少なくとも大きな変化が生じていない可能性が示された。

そこで、次に保存赤血球内での変化が報告されている解糖系を含めた赤血球内の代謝変化をメタボローム解析により網羅的検討を行った。主成分分析には、心不全群と健常群と異なる分布を示し、健常群と心不全群とは複数の代謝産物に差異を認めた。



ATP (225.7 ± 56.3 vs. $386.5 \pm 88.5 \mu\text{M}$, $p<0.001$) は心不全群で増加し、ADP (49.5 ± 9.3 vs. $65.0 \pm 15.9 \mu\text{M}$, $p=0.09$) も増加傾向を認め、解糖系の Glucose 6-phosphate、Fructose 6-phosphate に明確な差は認めなかったが、その下流にあたる代謝物の、Fructose 1,6-diphosphate、Glyceraldehyde 3-phosphate、3-Phosphoglyceric acid、2-Phosphoglyceric acid は増加傾向を認めた。ヘモグロビンの調節分子でもある、2-3-DPG も増加しており、心不全では、解糖系が亢進し、ヘモグロビンの酸素解離曲線の右方移動により、酸素を解離しやすくなっている可能性が示唆された。

一方、分岐鎖アミノ酸代謝やピリミジン代謝系には差を認めなかったが、プリン代謝系では、Hypoxanthine の増加 (4.2 ± 1.2 vs. $21.1 \pm 8.0 \mu\text{M}$, $p<0.001$) と Xanthine の増加傾向が認められた。これらの差異と赤血球の質的異常との関係は今後、さらに研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

An On-Chip RBC Deformability Checker Significantly Improves Velocity -

Deformation Correlation. CH Tsai, J Tanaka, M Kaneko, M Horade, H Ito, T Taniguchi, T Ohtani, Y Sakata
Micromachines 2016, 7(10), 176; doi: 10.3390/mi7100176

〔学会発表〕(計5件)

千村美里、大谷朋仁、谷口達典、石田拓人、田中淳一、伊藤弘明、塚本泰正、金子真、坂田泰史. 心不全患者における赤血球変形能に関する検討. 第21回日本心不全学会学術集会. 2017年10月12日. 秋田市にぎわい交流館AU(秋田県・秋田市)

大谷 朋仁. 中心静脈圧上昇と臓器うっ血. 第21回日本心不全学会学術集会. 2017年10月14日 秋田キャッスルホテル(秋田県・秋田市)

M Kaneko, T Ishida, CH Tsai, H Ito, M Chimura, T Taniguchi, T Ohtani, Y Sakata
On-chip RBC deformability checker embedded with vision analyzer. 2017 IEEE International Conference on Mechatronics and Automation. 2017年8月9日. かがわ国際会議場(香川県・高松市)

石田拓人, 田中淳一, Chia-Hung Dylan TSAI, 洞出光洋, 伊藤弘明, 金子真, 坂田泰史, 大谷朋仁, 千村美里, 谷口達典.
On-Chip 並列型赤血球変形能抽出トラックー. ロボティクス・メカトロニクス 2017 講演会. 2017年5月12日. ビッグパレットふくしま(福島県・郡山市)

大谷朋仁、坂田泰史. 心不全診療における最新のトピックス. 第63回日本心臓病学会学術集会. 2015年9月20日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大谷 朋仁 (OHTANI Tomohito)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 30623897

(2) 研究分担者

木岡 秀隆 (KIOKA Hidetaka)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 70642099

塚本 泰正 (TSUKAMOTO Yasumasa)
大阪大学・医学部附属病院・特任助教(常勤)

研究者番号: 80747072

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

金子 真 (KANEKO Makoto)
大阪大学・工学研究科・教授

谷口 達典 (TANIGUCHI Tatsunori)
大阪大学・医学系研究科・特任研究員

千村 美里 (CHIMURA Misato)
大阪大学・医学系研究科・大学院生