

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10745

研究課題名(和文) 血小板・血管内皮機能から見たVAD装着後の後天性VW病の病態解明に関する研究

研究課題名(英文) Platelet and vascular endothelial function in the pathogenesis of acquired VW disease after VAD therapy

研究代表者

水野 敏秀 (MIZUNO, Toshihide)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：40426515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、植込み型補助人工心臓(VAD)は、連続流血液ポンプの使用が主流となり重症心不全患者の治療に大きく貢献している。しかし一方では、VADの安定的な長期治療が可能になることにより、新しいデバイス由来の出血性合併症が注目されるようになってきている。この易出血性の患者には、血液学的にVWFの活性低下およびVWF高分子量マルチマーの減少が高頻度に認められ、後天性VW病を発症していることが明らかにされている。本研究では、連続流血液ポンプ使用時のVWF高分子量マルチマー動態が血小板の存在の有無により異なること示し、血小板や、血管内皮細胞によるVWFの切断と再供給が本病対に大きく関わっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VAD装着後の後天性VW病は、術後遠隔期の出血性素因として注目されているが、その病理学的機序は明らかになっていない。現在までの研究では、この後天性VW病におけるVWF高分子量マルチマーの切断現象に関してポンプ内の物理的要因による機序に注目が集まっているが、その病態の多様性を考慮すると、生体内からのVWFの再供給が本病態に大きく関わっていることが新たに予想された。しかしながら、このような観点での研究は、現時点ではほとんどされておらず、本研究によりVAD装着後の出血性合併症の本態が解明され、成果が患者へ還元されれば、VAD装着後の出血性合併症の診断、治療に大きく寄与できるものと考えた。

研究成果の概要(英文)：In this study, A simple mock circulation test (5L/min, 100 mmHg) was performed to investigate with both whole-blood samples and platelet-poor plasma (PPP) using fresh bovine blood. High-molecular-weight multimers (HMWMs) in VWF are reduced immediately after the initiation of blood circulation using the axial flow pump, and it had plateaued 60 minutes later. In the study using a centrifugal pump, cleavage of the HMWMs compared to that in the case of using a centrifugal pump was very slight. Moreover, in the whole-blood sample study, HMWMs reduced once, and it had been observed to recover after 60 minutes. However, HMWMs in the PPP sample was observed to reduce continuously during a circulation test. The dynamics of VWF within the blood pump was shown to depend on the type of the blood pump, and this study demonstrated that re-supply of VWF due to platelet activation and cleavage of VWF due to shear stress in the pump occurred at the same time by circulating within the blood pump.

研究分野：人工臓器学

キーワード：補助人工心臓 後天性フォンビルブランド病 血小板機能 血管内皮機能 血液凝固能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、植込み型補助人工心臓 (Ventricular assist device, VAD) は、連続流血液ポンプの使用が主流となり、血液ポンプの小型化や耐久性などの性能が向上したことで、重症心不全患者の治療に大きく貢献している。しかし一方では、VAD の臨床成績が向上し、安定した長期治療が可能になることで、デバイスに起因する新たな出血性合併症が注目されるようになってきている。この遠隔期における易出血性の患者には、血液学的に von Willebrand factor (VWF) の活性低下および VWF 高分子量マルチマーの減少が高頻度に認められる後天性 von Willebrand (VW) 病を発症していることが明らかにされ、VAD による機械的循環補助との関連性やその病理学的機序について多くの議論がなされている。

VWF は、血管傷害時の初期的な血小板凝集に関連し、血液凝固第 8 因子のキャリアーとして第 8 因子を血液中で安定化させる働きを持つ高分子糖タンパクの一つである。VWF は主に血管内皮細胞や血小板内で産生され、20,000 kDa 程度の巨大分子として血中に放出されるが、メタロプロテアーゼの 1 種である ADAMTS13 により切断、低分子量化され、血管内での凝固や凝集作用が調節されている。この凝固調節過程には血管内での生理的な Shear stress が大きく関与し、VWF 分子へ Shear stress が負荷された時に分子構造が unfold することにより、ADAMTS13 の標的部位が露出し、VWF 分子が切断されやすくなることが過去の研究により示されている。

現在、VAD で主流となっているのは、いずれも連続流血液ポンプであり、VAD 装着患者では、VWF が血液ポンプ内で発生する非生理的な Shear Stress に常に暴露されていることから、ADAMTS13 による VWF の低分子量化が常態化し、後天性 VW 病に陥る可能性が高く、この物理的な機序が術後慢性期の出血性素因の一つと考えられている。

これら VAD 装着後の後天性 VW 病は、当初、最も使用数の多かった HeartMate2 や小型軸流ポンプである Jarvik2000 の使用例で頻繁に報告されていた。しかし、近年では、Birschman らが遠心ポンプである HeartWareHVAD 使用例での発生を報告し、また、Kang らが VAD の駆動時に回転数を下げ、ポンプ流量を減らしたとしても、VWF 高分子量マルチマーの減少には効果が無いことを挙げ、現状ではポンプ内で発生する非生理的な Shear stress による本現象を防ぐことは難しいと考察している。

しかし一方で、同じ遠心ポンプである DuraHeart や EVAHEART を使用した症例では、ほとんど発生が認められていないか、あるいは軽度の症状が認められる程度であり、使用する機器により発生頻度が異なっているとも考えられる。さらに、本邦においては、VAD 装着患者には海外報告と同様の割合で後天性 VW 病の発症が認められたものの、消化管等の出血性合併症の発症がきわめて少ないことなど、海外の状況と異なるが報告がなされ、本病態の全容が一筋縄ではいかないことを想起させている。

現時点で、我々の基礎的な研究では、この連続流血液ポンプ使用中の VWF 高分子量マルチマーの動態について、VWF の切断現象の他に、ポンプ内で招来される血小板活性化に伴う VWF の再供給現象が病態に少なからず影響していることを見いだしている。また、Muthiah らが、HeartWareHVAD を装着した患者 28 名の 1 年間について調査したところ、大動脈弁の開閉が認められる患者、つまり pulsatility が維持されている患者については、術後の VWF の状態について改善傾向を示しており、出血傾向も少ないことも報告している。

かかる観点から、我々は、本病態には血小板や血管内皮細胞から放出される新鮮な VWF の供給能が大きく影響し、それら供給元細胞 (血小板や血液内皮細胞など) の量的低下や機能的低下が、この出血性合併症の発症を左右する一因であると予想している。

従って、本研究は、VAD 装着患者の後天性 VW 病の原因が単に血液ポンプの Shear stress による物理的な要因に起因するのみだけでは無く、VAD を装着した生体側の要因、特に VWF 供給に係わる血管内皮細胞や血小板の影響が大きく関与しているとする新しい機序を実証することを目的とした。本計画で実施される出血性病態の研究には、過去に議論されてきた血液ポンプ内の Shear stress による VWF の切断現象以外にも、VAD 装着後に同時に発生する血小板活性化や血管内皮細胞の量的・機能的変化についても検討を加えていく必要があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では以下の点を研究目的とした。

1) 大型実験動物における血液の凝固特性の違いについて

現在、人工心臓などの医療機器の安全性や有効性の評価には、数種類の家畜動物が使用されることがある。しかしながら、家畜を使用した実験モデルの結果がヒトの結果にどのように反映しているかは、未だ不明な点が多い。本研究では、家畜を使用した実験モデルについて、血液凝固に関する各パラメータについてヒトとどのように異なるかを比較し、動物試験時の結果の評価を適切に行うことを目的とした。

2) 連続流血液ポンプ使用時における von Willebrand factor (VWF) の動態

連続流血液ポンプでの血液還流時に招来する VWF 高分子量マルチマーの切断現象について、市販されている各種ポンプでの切断量を一定条件で比較することにより、ポンプ種別および形状別ごとの VWF 高分子量マルチマーの切断の特性について解析した。また、各ポンプにより活性化された血小板から放出される VWF の量的、質的变化についても検討した。

3. 研究の方法

1) 大型実験動物における血液の凝固特性の違いについて

本研究では、ヒト (n=13), ウシ (n=18), ヤギ (n=56), およびブタ (n=8) より採取した新鮮血を使用し、各動物における凝固パラメータについて比較を実施した。血液凝固の特性については、トロンボエラストメトリー法 (ROTEM, Tem international GmbH, Germany) を用い、外因系凝固系 (EXTEM) および内因系凝固系 (INTEM) の各凝固パラメータを測定した。また、各健康動物より得られたクエン酸加新鮮血を用い、各家畜動物のフィブリンの自己重合時の堅牢性 (FIBTEM-MCF) について、トロンボエラストメトリー法 (ROTEM, Tem international GmbH, Germany) による解析を実施した (ウシ 6 例, ヤギ 5 例, ヒト 5 例, ブタ 6 例) また、同様に外因系および内因系血液凝固後のフィブリン線溶系特性 (Lysis Index 60, LI60) についても検討した (ウシ 22 例, ヤギ 35 例, ヒト 12 例, ブタ 11 例)。

2) 連続流血液ポンプ使用時における von Willebrand factor (VWF) の動態

本研究では、動圧浮上軸流型ポンプおよび軸シール型遠心ポンプの 2 種類の植え込み型補助人工心臓を対象とし、新鮮ウシ血液を用いた in vitro 試験により、血液還流後の von Willebrand factor multimer の変化について検討を実施した。血液ポンプによる VWF 高分子量マルチマーの切断現象を解析するために、現在、国内で市販されている植え込み型 VAD4 機種 (HeartMate2, DuraHeart, EvaHeart, Jarvik2000) を用いて、還流試験を実施した。実験には小型リザーババックが付属した実験用回路 (充填量 200 mL) を使用し、仔ウシより採取した新鮮血液 (クエン酸加) および血漿を充填し、試験検体とする。還流条件は、5 L/min, 100 mmHg とし、試験前、還流開始後 5 分, 60 分の採血を実施した。測定項目は、VWF 抗原量、および VWF 活性 (検査会社に外注)、VWF 高分子量マルチマー解析, ADAMTS-13 活性量 (国立循環器病研究センター研究所分子病態部で実施)、血小板数 (国立循環器病研究センター研究所人工臓器部で実施) をそれぞれ計測した。

4. 研究成果

1) 大型実験動物における血液の凝固特性の違いについて

各動物の血液凝固の特性は、ウシにおいて、外因系凝固および内因系凝固の血液凝固開始時間 (CT, 249.9 ± 91.3 sec, 376.4 ± 124.4 sec) がヒトの CT に比較し明らかに延長していることが示された (63.5 ± 11.8 sec, 192.5 ± 29.0 sec, $p < 0.01$)。また、血液凝固後のクロットの最大の堅さを示す MCF では、家畜動物 (EXTEM: 77-87 mm, INTEM: 66-78 mm) ではいずれもヒトの MCF よりも高値を示し (EXTEM: 59.1 ± 6.0 mm, INTEM: 58.8 ± 1.5 mm, $p < 0.01$)、その最大の堅さになるまでの時間 (MCFt) は、ウシとヤギがヒトやブタと比較し延長する傾向にあった ($p < 0.01$)。また、血栓形成過程におけるフィブリン重合においては、FIBTEM-MCF が、ヒト、ブタでは 16.4 ± 1.1 mm, 19.5 ± 4.2 mm であったが、一方で、ウシ、ヤギではより強いフィブリン自己重合が認められた (35.0 ± 3.6 mm, 32.8 ± 6.4 mm, $p < 0.01$)。また、各動物の外因系および内因系凝固後の線溶傾向は、ヒトおよびブタにおいては、60 分後の血餅の堅さを示す LI60 が、ヒトで血栓形成後最大値 (MCF) の 90.5 ± 4.6 % (EXTEM), 89.8 ± 1.0 % (INTEM)、ブタで

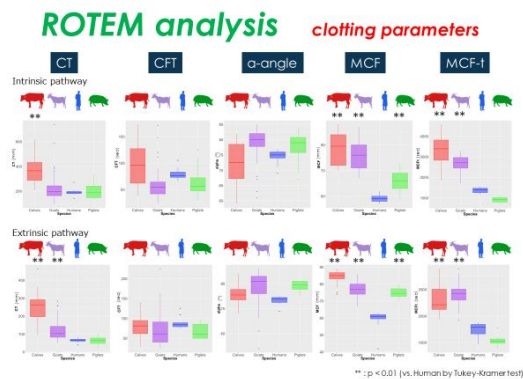


図1 各動物種における凝固パラメータの違い

ROTEM analysis Fibrinolytic function

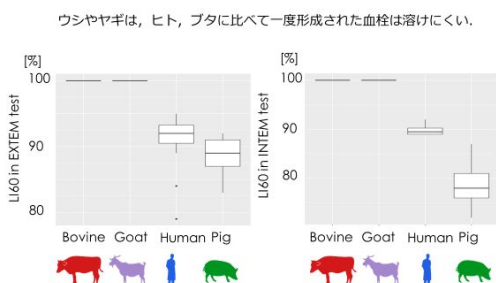


図2 各動物種における線溶系パラメータの違い

ROTEM analysis Fibrin polymerization

ウシやヤギは、ヒト、ブタに比べて強いフィブリンポリマーを形成する

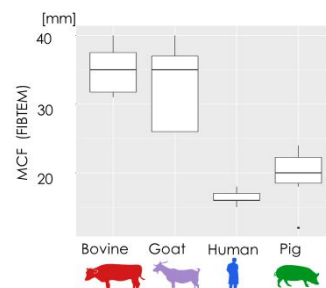


図3 各動物種におけるフィブリン重合能の違い

88.5 ± 2.7 % (EXTEM), 78.9 ± 4.5 % (INTEM)に減少しているのに対し,ウシ,ヤギでは 60分後でも線溶傾向は認められず,形成された血餅はもっとも堅い状態を維持していたことが示された (p < 0.01).

これらの結果より,これらの結果より,トロンボエラストメトリー法による血液凝固特性は,ヒトと比較し,家畜ではCT, MCF, MCFtが高値を示し,血液凝固の特性には動物種間において異なることが明らかにされた. これら種間の差は特に外因系凝固について顕著であり,家畜動物を用いた動物実験では,組織因子など外因系因子の影響が試験の結果に大きな影響を及ぼすと考えられた. ウシ,ヤギなどの反芻類では,他のヒト,ブタに比較し,血小板活性を介さないフィブリン重合による血餅が生成されやすく,堅い血餅となることが示され,一度生成された血餅は長時間線溶せずに残存し,その堅牢性を維持することが示された.

Summary

Clotting parameters

CT (clotting time)

time from start of the measurement until initiation of clotting

MCF (max clot firmness)

firmness of the clot

MCFt (MCF time)

time until the firmest clot is detected

Fibrin metabolism

Fibrin polymerization

MCF in FIBTEM

Fibrinolytic function

Lysis index, LI60

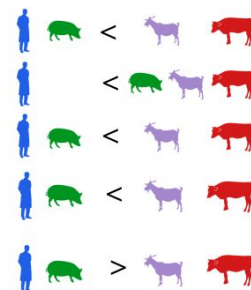


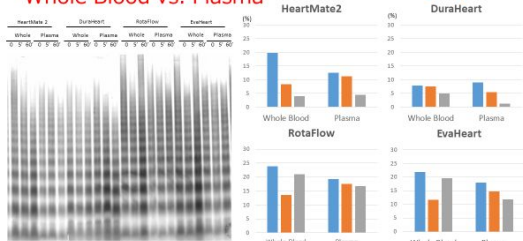
図4 各動物種とヒトとの凝固系特性のまとめ

2) 連続流血液ポンプ使用時における von Willebrand factor (VWF)の動態

本研究では,動圧浮上軸流型ポンプおよび軸シール型遠心ポンプの2種類の植え込み型補助人工心臓を対象とし,新鮮ウシ血液を用いた in vitro 試験により,血液還流後の von Willebrand factor multimer の変化について検討を実施した. SDS-Agarose ゲル電気泳動による解析では,軸流ポンプでは血液還流開始 (2 L/min, 100mmHg) 直後より経時的な高分子量 multimer の減少が認められ,一時間後にプラトーとなっていた. この結果は,後天性 von Willebrand 病が術後遠隔期の合併症であるという従来の見解と異なり,術直後の出血合併症にも関与している可能性を示唆していた. 一方で,遠心ポンプを使用した検討では,血液還流後 (5 L/min, 100 mmHg) の高分子量 multimer の減少は,軸流ポンプに比較し非常に軽度であり,ポンプ形式により血液中 von Willebrand factor への影響が異なることも示された. また, von Willebrand factor の特異的切断酵素である ADAMTS13 の働きを阻害した同様の実験では,軸流ポンプにおいても高分子量 multimer の減少は認められず,本病態には ADAMTS13 の働きが強く関与している可能性が示唆された.

血液ポンプ還流時におけるVWF高分子量マルチマーの減少

Whole Blood vs. Plasma



VWFマルチマー解析:国立循環器病研究センター分子病態部 樋口由佳,小島浩市

図5 血液ポンプ灌流時における VWF 高分子マルチマーの減少

血中VWF値の変化

Whole Blood vs. Plasma



図6 血液ポンプ灌流時における血中 VWF 値の変化

VWFと補助人工心臓

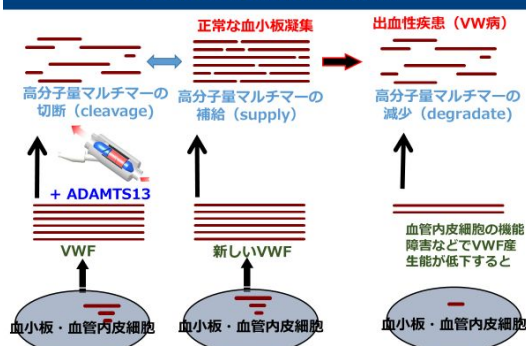


図7 VWFと補助人工心臓

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mizuno T., Eura Y., Kokame K., Tsukiya T., Takewa Y., Tatsumi E.	4. 巻 38
2. 論文標題 Cleavage and Re-Supply of von Willebrand Factor in Continuous Flow Blood Pump	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Heart and Lung Transplantation	6. 最初と最後の頁 S428 ~ S429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.healun.2019.01.1093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seguchi O., Fujita T., Kumai Y., Kuroda K., Nakajima S., Watanabe T., Yanase M., Matsumoto Y., Fukushima S., Tsukiya T., Mizuno T., Katagiri N., Kakuta Y., Takewa Y., Hamasaki T., Yamamoto H., Tatsumi E., Kobayashi J., Fukushima N.	4. 巻 38
2. 論文標題 Novel Extracorporeal Continuous-Flow Ventricular Assist System for Patients with Advanced Heart Failure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Heart and Lung Transplantation	6. 最初と最後の頁 S344 ~ S344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.healun.2019.01.871	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizuno Toshihide, Tsukiya Tomonori, Takewa Yoshiaki, Tatsumi Eisuke	4. 巻 21
2. 論文標題 Differences in clotting parameters between species for preclinical large animal studies of cardiovascular devices	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 138 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10047-017-1003-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toshihide Mizuno, Tomonori Tsukiya, Toshiaki Takewa, Eisuke Tatsumi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Differences in clotting parameters between species for preclinical large animal studies of cardiovascular devices	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Artif Organs	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10047-017-1003-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Mizuno T., Eura Y., Kokame K., Tsukiya T., Takewa Y., Tatsumi E.
2. 発表標題 Cleavage and Re-Supply of von Willebrand Factor in Continuous Flow Blood Pump
3. 学会等名 39th Annual Meeting and Scientific Sessions of the International-Society-for-Heart-and-Lung-Transplantation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野, 敏秀 築谷, 朋典 武輪, 能明 巽, 英介
2. 発表標題 大型実験動物における血液の凝固特性の違いについて
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水野, 敏秀 築谷, 朋典 武輪, 能明 巽, 英介
2. 発表標題 人工臓器開発における非臨床試験 動物種間における血液凝固特性の違いについて
3. 学会等名 第56回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshihide Mizuno, Tomonori Tsukiya, Toshiaki Takewa, Eisuke Tatsumi
2. 発表標題 Differences in fibrin metabolism among the species for preclinical large animal models for cardiovascular device
3. 学会等名 38th Annual Meeting and Scientific Sessions of the International-Society-for-Heart-and-Lung-Transplantation (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshihide Mizuno, Tomonori Tsukiya, Toshiaki Takewa, Eisuke Tatsumi
2. 発表標題 Comparisons in Clotting Parameters Between Species for Preclinical Animal Studies
3. 学会等名 37th Annual Meeting and Scientific Sessions of the International-Society-for-Heart-and-Lung-Transplantation (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshihide Mizuno, Tomonori Tsukiya, Toshiaki Takewa, Eisuke Tatsumi
2. 発表標題 The effect of storage or anticoagulation condition of bovine blood for evaluating blood damage in blood pump testing
3. 学会等名 1st International Society for Mechanical Circulatory Support (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水野敏秀, 築谷朋典, 武輪能明, 巽英介
2. 発表標題 溶血試験における新鮮血と市販保存血使用時の差異に関する研究
3. 学会等名 第55回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水野敏秀, 築谷朋典, 武輪能明, 巽英介
2. 発表標題 大型実験動物における血液の凝固特性の違いについて
3. 学会等名 第57回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水野敏秀, 築谷朋典, 武輪能明, 巽英介
2. 発表標題 連続流血液ポンプ使用時におけるvon Willebrand factorの動態
3. 学会等名 第45回人工心臓と補助循環懇話会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	小亀 浩市 (KOKAME KOUICHI) (40270730)	国立循環器病研究センター・研究所・部長 (84404)	
連携研究者	築谷 朋典 (TSUKIYA TOMONORI) (00311449)	国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404)	
連携研究者	武輪 能明 (TAKEWA YOSHIAKI) (20332405)	国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404)	
連携研究者	巽 英介 (TATSUMI EISUKE) (00216996)	国立循環器病研究センター・研究所・部長 (84404)	