

論文の内容の要旨

論文題目 補助人工心臓患者における脳卒中合併症の解析
氏名 恩田 泰光

《背景》

重症心不全の唯一の治療法は心臓移植である。しかし国内では適応するドナー心臓が現れるまでに長い待機時間を要する。長期間の待機に耐えられない重症心不全患者にとって補助人工心臓 (Ventricular assist device; VAD) は必須な治療法である。補助人工心臓には体外設置型と植込型がありそれぞれ適応が異なる。体外設置型 VAD の適応は自己心機能回復を目指した補助、両心補助、小児例や小柄な体格の症例、多臓器不全合併例、植込型 VAD 準備中の急性憎悪例で、その一方で植込型 VAD の適応は心臓移植登録後の末期的重症心不全である。原因疾患の大半は拡張型心筋症でその他には拡張相肥大大型心筋症や虚血性心筋疾患、弁膜症、先天性心疾患などがある。また補助人工心臓装着中の主な合併症に感染症、脳卒中、静脈血栓症などが挙げられ、その中でも脳卒中合併症は致死的合併症の一つに挙げられる。

補助人工心臓治療を行っている東京大学病院では補助人工心臓患者の脳卒中合併症を時折経験するため、補助人工心臓患者において脳卒中合併症のリスク評価を行うことは臨床上有益である。一般的な脳卒中のリスク評価法として磁気共鳴映像法 (magnetic resonance imaging : MRI) や単一光子放射断層撮影 (Single photon emission computed tomography : SPECT)、造影コンピューター断層撮影 (Computed Tomography: CT) が挙げられる。MRI は補助人工心臓患者には施行できない。また SPECT は長時間臥位を取る必要性や物理的制限、造影 CT では腎機能障害などが懸念され脳卒中のリスク評価のために SPECT、造影 CT を行うことは現実的ではなく従来での脳卒中合併症のリスク評価には限界を感じざるを得ない。そこで我々は脳卒中のリスク評価法として血中エクソソームに注目した。

エクソソームは大きさが 40~100nm 程度の脂質二重膜構造の微小胞で、補助人工心臓患者でも昨今注目されている物質である。エクソソームの膜上には CD9、CD63、CD81、CD82 といった四回膜貫通タンパク質 (テトラスパニン) が存在し、血小板、心筋細胞、内皮細胞などから分泌される。エクソソームはその内部に microRNA などの核酸やタンパク質を内包しており、それらを介して細胞間コミュニケーションを行い免疫調整などに関与している。

《目的》

東京大学病院における補助人工心臓患者に関する脳卒中合併症の後方視的解析を行い、補助人工心臓患者の脳卒中合併症の特徴やリスク因子を解析することを第一目的とした。第二に補助人工心臓患者のエクソソーム精製と測定を行い血中エクソソーム数が病的状態を反映しているのかを検討することを目的とした。さらにエクソソーム内のタンパク質に注目し、質量分析法を用いて健常者と補助人工心臓患者間の違いを比較検討しバイオマーカーの候補を探索した。

《方法》

1) 東京大学病院における補助人工心臓患者に関する脳卒中合併症の後方視的解析

対象は2002年1月から2013年5月までに東京大学病院で左室補助人工心臓を装着した患者を対象とした。脳卒中と虚血性心疾患との関連性は報告されており、虚血因子を排除するために対象疾患を拡張型心筋症に限定した。本解析における脳卒中合併症の定義は臨床上神経学的異常所見を認め、頭部CTにて確認できた脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血とし、一過性脳虚血発作や無症候性脳梗塞・脳出血は除外した。観察期間は2002年1月から2013年9月までとし、エンドポイントを脳卒中合併症発症までか、もしくは観察期間終了までとした。観察期間は 466 ± 340 日間で対象症例は男性36例、女性16例の52例で年齢は 38.3 ± 13.5 歳であった。

統計解析は脳卒中合併症発生率と観察期間をKaplan-Meier解析し、Log-rank検定を用いて群間比較を行った。脳卒中のリスク因子をCox-Hazard modelを用いた単変量回帰にて検定を行った。解析にはJMP Pro version 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC)を用いてP値 <0.05 を統計学的有意とした。

2) 補助人工心臓患者のエクソソーム精製と測定

2014年12月から2015年10月までに研究の趣旨に賛同し、同意を得られた健常者ボランティア13例(男性11例、女性2例、年齢 36.3 ± 4.81 歳)、補助人工心臓設置手術予定の重症心不全患者10例(男性6例、女性4例、年齢 36.8 ± 12.1 歳)、脳神経外科外来通院患者9名(男性5名、女性4名、年齢 56 ± 16.2 歳)を対象とした。重症心不全患者の基礎疾患は拡張型心筋症7例で、急性心筋梗塞、アドリマイシン心筋症、拡張相肥大型心筋症はそれぞれ1例ずつで、脳神経外科外来通院患者の基礎疾患は未破裂動脈瘤3例、脳髄膜腫2例、中大脳動脈狭窄症2例、脳海綿状血管腫2例であった。

健常者ボランティア、補助人工心臓設置手術予定の重症心不全患者、脳神経外科外来通院患者に対して採血を行い、補助人工心臓を設置した補助人工心臓患者に関しては全身状態が安定しリハビリテーションが始まる術後14日に再度採血を行った。血液サンプルを超遠心法にて精製し、精製物をウェ

スタンブロット法にて CD9,CD81 の存在の有無を確認した。精製物をナノ粒子追跡解析と質量分析法を用いて解析した。ナノ粒子追跡解析では総粒子濃度とエクソソーム濃度を測定し、一方質量分析法では健常者と補助人工心臓患者のエクソソーム内のタンパク質を網羅的に解析した。

統計解析は健常者と補助人工心臓患者間ではノンパラメトリック解析の Mann-Whitney の U 検定にて検定を行った。補助人工心臓設置術前後の解析では Wilcoxon の符号付順位和検定を行った。健常者、補助人工心臓患者、脳神経外科外来通院患者での検定は健常者を基準とし Steel 検定を行った。解析には JMP Pro version 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC) を用いて行い、P 値<0.05 を統計学的有意とした。

《結果》

1) 東京大学病院における補助人工心臓患者に関する脳卒中合併症の解析

補助人工心臓患者における脳卒中合併症は観察期間中 11 例認め、脳卒中合併症率は 21.1%であった。脳卒中合併症の内訳として出血性脳卒中合併症が 5 例（くも膜下出血 3 例、脳出血 2 例）であった。また虚血性脳卒中合併症は 6 例（全例脳梗塞）であった。Kaplan-Meier 解析により一年脳卒中発生率は 21.6%で、術後敗血症の合併例で有意に脳卒中合併症率が増加した。(log-rank test, p=0.0035) Cox Hazard model を用いて単変量回帰にて脳卒中のリスク因子を検討したところ、術後敗血症がリスク因子であった。(p=0.013, Cox-Hazard)

2) 補助人工心臓患者のエクソソーム精製と測定

ウェスタンブロット法にて CD9,CD81 の存在を確認し、精製物がエクソソームであることを確認しナノ粒子追跡解析を行った結果、健常者の総粒子濃度 1.63 ± 1.22 ($\times 10^8$ Particles/ml)、エクソソーム濃度 0.234 ± 0.225 ($\times 10^8$ Particles/ml) であるのに対して補助人工心臓患者では総粒子濃度 4.18 ± 2.34 ($\times 10^8$ Particles/ml)、エクソソーム濃度 0.76 ± 0.22 ($\times 10^8$ Particles/ml)、そして脳神経外科外来通院患者では総粒子濃度 2.47 ± 0.67 ($\times 10^8$ Particles/ml)、エクソソーム濃度 0.44 ± 0.18 ($\times 10^8$ Particles/ml) であり、補助人工心臓患者や脳神経外科外来通院患者の総粒子濃度、エクソソーム濃度は健常者のそれらより有意に増加していた。(Steel 検定, p<0.05) また補助人工心臓設置手術前後を比較検討したところ、総粒子濃度は術前 2.03 ± 1.33 ($\times 10^8$ Particles/ml) に対し術後 4.18 ± 2.34 ($\times 10^8$ Particles/ml) で、エクソソーム濃度は術前 0.33 ± 0.16 ($\times 10^8$ Particles/ml) に対し術後 0.76 ± 0.39 ($\times 10^8$ Particles/ml) であり、それぞれ術後に有意に増加していた。(Wilcoxon の符号付順位和検定, p<0.05)

質量分析法を行い健常者と補助人工心臓患者間を比較検討したところ、Mucin-2 というタンパク質が補助人工心臓患者のみに高頻度に検出されていた。

《結論》

東京大学病院における補助人工心臓患者の脳卒中合併症に関して解析したところ脳卒中合併症率は21.1%で術後敗血症の合併が脳卒中合併症のリスク因子であった。そのため補助人工心臓患者の脳卒中合併症の予防として術後感染症コントロールが重要であると考えられる。

補助人工心臓患者と脳神経外科外来通院患者の血中エクソソームを解析したところ、健常者に比べ有意に増加しており血中エクソソーム数は病的状態を反映している可能性が示唆された。また質量分析の結果、Mucin-2が補助人工心臓患者において何らかのバイオマーカーになりうるという新たな知見を得た。