

令和元年5月28日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09070

研究課題名(和文)心房細動がもたらす凝固異常の病態解析と血液診断法の開発

研究課題名(英文) Mechanism of blood coagulation disorder in atrial fibrillation

研究代表者

加藤 武史 (Kato, Takeshi)

金沢大学・先進予防医学研究科・特任准教授

研究者番号：90456418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：心房細動はありふれた不整脈の1種であるが、心臓の左心房に血栓を生じやすくし、脳梗塞の原因となる。その血栓形成の機序として、これまで心房内の血流のうっ滞、心房内の表面を覆っている内皮細胞の機能障害、また血液の凝固異常が考えられている。しかし、心房細動によって血液の凝固異常が起こるメカニズムは不明であった。我々は、心房細動がある患者とない患者の間で、凝固因子の産生臓器である肝臓の遺伝子発現プロファイルが異なることを見出した。また、心臓と肝臓を結びつけるものを検索したところ、血液中の単核球の関与が明らかとなった。このように、心房細動において心肝連関が存在し、血栓形成を促進していることを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心房細動は高齢者の少なくとも5-10%に存在する不整脈で、その重大な合併症として脳梗塞がある。この心原性脳梗塞は大変重篤で、ひとたび発症すると、約半数が死亡または麻痺により介助が必要な状態となることが報告されている。したがって、塞栓症のリスクを有する心房細動患者には抗凝固療法が行われるが、現在の抗凝固薬には出血という副作用が存在する。本研究は心房細動患者において血液が固まりやすくなる機序を、より根本的なレベルで解明した。これらの新しい知見は、より有効で安全性の高い脳梗塞予防法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Most strokes in patients with atrial fibrillation (AF) are believed to be cardioembolic, caused by the embolism of left atrial thrombi. As shown by the well-known Virchow triad, thrombus formation in the left atrium (LA) can result from decreased blood flow, increased endocardial dysfunction in the LA, and enhanced blood coagulability. We examined whether AF affects gene expression remotely in the liver, which is a major source of prothrombotic molecules. DNA microarray analysis revealed marked changes in the gene expression profile of human liver of patients with AF. The extrinsic prothrombin activation pathway showed the most prominent change. Twelve hours of rapid atrial pacing also markedly altered the gene expression profile of rat liver, which was eliminated by IL-6 neutralizing antibody. These findings suggest the presence of cardiohepatic interaction mediated by the IL-6/STAT3 signaling pathway in AF and AF-related thromboembolism.

研究分野：心臓不整脈

キーワード：心房細動 塞栓症

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心房細動は脳梗塞の発生率を約5倍に増加させることが知られている。心房細動患者における脳梗塞の多くは、左房に形成された血栓による心原性塞栓である。心原性脳塞栓症の原因となる左房内血栓形成の機序として、(1) 左房内血流速度低下、(2) 左房内皮障害、(3) 血液凝固能亢進の3要素 (Virchowの三徴) が知られている。左房内のいわゆる「もやもやエコー」は血流速度の低下によって見られ、左心耳内の血栓形成と塞栓症発症に関連していることが知られている。また、心房細動によって心房内の von Willebrand 因子、nitric oxide, plasminogen activator inhibitor-1 の発現が増加する。興味深いことに、ラットにおけるわずか8時間の高頻度心房ペーシングでさえ、心房内皮における tissue factor pathway inhibitor, thrombomodulin といった抗血栓分子の発現を低下させることが報告されている。これらの知見は心房細動における左房内血流速度低下と左房内皮障害を示唆するものであるが、Virchowの三徴における3番目の要素である血液の過凝固がどのように生じるかはこれまで不明であった。

2. 研究の目的

肝臓は凝固因子および凝固関連分子の主要産生臓器である。そこで我々は心房細動における血栓形成において心肝連関が存在するとの仮説をたて、これを検討した。

3. 研究の方法

(1) 心房細動患者の肝臓における遺伝子発現解析：肝生検を行った非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の連続465症例から心房細動3例を抽出した。これらと年齢・性別・肝臓の組織学的ステージ (Brunt分類) をマッチさせた洞調律の3例をコントロール群として、cDNA マイクロアレイ法を用いて肝臓の遺伝子発現プロファイルと比較検討した。

(2) 心房細動モデルラットの検討：全身麻酔下にSDラット (10週齢) の右房内へ内頸静脈から電極を挿入し、1,200回/分の高頻度心房ペーシング (RAP) を12時間行い心房細動疑似モデルを作成した。対照 (sham) として右房に電極を挿入するが電気刺激を行わないSDラットを用いた。これら心房細動モデルラットの肝臓・末梢血球・左房・脾臓について遺伝子発現を比較検討し、肝臓については組織学的検討を併せて行った。

4. 研究成果

(1) ヒト肝生検サンプルの解析結果：アレイに含まれる54674のヒト遺伝子のうち、フィルターをかけた4322遺伝子が、洞調律群と心房細動群とで明確なクラスターを形成した。すなわち、ヒトにおいて心房細動群と洞調律群で肝臓の遺伝子発現プロファイルが異なることが明らかとなった。さらにパスウェイ解析を行ったところ、BioCartaで定義されている354のパスウェイのうち外因系凝固経路が心房細動患者の肝臓において最も著明に変化していた。

(2) 心房細動モデルラットの血行動態：RAPモデルにおいて1200回/分の心房刺激は2:1から3:1の心室応答をもたらし、結果としてRAP群の心拍数はsham群と比較して有意差を認めなかった。また、肝臓重量や動脈血液ガス、血中の肝酵素な

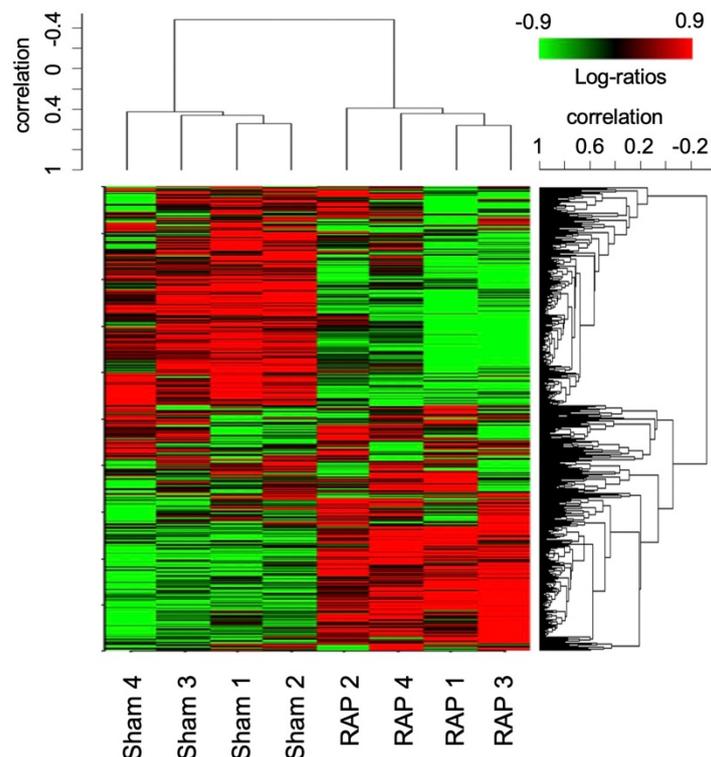


図1

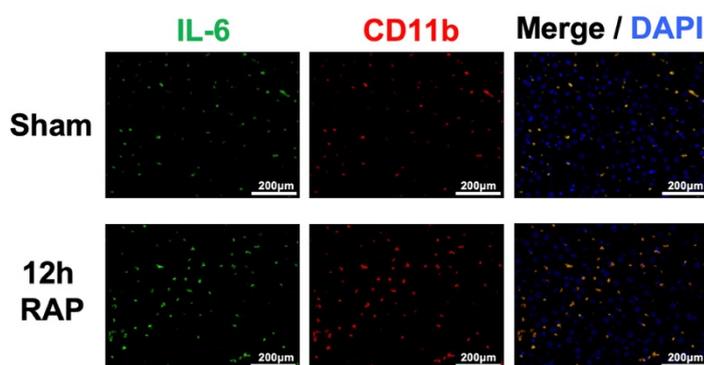


図2

どの値についても、RAP 群と sham 群は同等であった。

(3) RAP ラットの肝臓における遺伝子発現プロファイルの検討: DNA マイクロアレイによる肝臓の遺伝子発現解析では、フィルターで抽出された 3737 遺伝子において、sham 群と 12 時間 RAP 群は明確にクラスタリングされた (図 1)。すなわち、12 時間の RAP が肝臓における遺伝子発現プロファイルを有意に変化させることが示された。RT-PCR 法では RAP により肝臓における fibrinogen α , β , γ 鎖 mRNA 発現が有意に亢進していた、かつ Western blot 法にて fibrinogen 蛋白発現も有意に亢進していることを確認した。Prothrombin, 凝固第 X 因子, antithrombin III (ATIII) についても同様に 12 時間の RAP により mRNA および蛋白発現が亢進していた。

(4) 心房高頻度興奮が肝臓の遺伝子発現を変化させる機序の検討: 高頻度心房興奮による肝臓での fibrinogen 産生亢進のメカニズムを明らかにするため、fibrinogen 産生調節に上流で関与しうる分子の発現を左房、脾臓、末梢血において検討した。その結果、12 時間 RAP ラットにおいて interleukin 6 (IL-6) と tumor necrosis factor α (TNF- α) の mRNA 発現亢進を末梢血球で認めたが、左房や脾臓ではこれらの発現は変化しなかった。また RAP ラットの肝臓内では monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 発現が増加するとともに cluster of differentiation 11b (CD11b) 陽性細胞が増加した。免疫蛍光多重染色 (図 2) を行ったところ、CD11b 陽性細胞は IL-6 を共発現しており、活性化された単球/マクロファージが肝臓に浸潤していることが示唆された。そして、肝細胞核内において signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) のリン酸化が亢進していることが確認された。

RAP による肝臓での fibrinogen 産生における IL-6 の役割をさらに詳細に検討するため、RAP ラットに IL-6 中和抗体を事前投与する実験を行った。IL-6 中和抗体の投与により、RAP による肝臓の MCP-1 と CD11b の増加は若干抑制されたが、統計学的には有意ではなかった。RAP で生じる肝臓での STAT3 のリン酸化は IL-6 中和抗体により抑制され、その結果として fibrinogen 産生も抑制された。実際に、ヒトの心房細動においても末梢血で IL-6 と TNF- α の mRNA 発現亢進が報告されており、我々のラットモデルにおける知見と一致する。急性に生じた心房細動は数分以内に血小板を活性化し、血小板-単核球の相互作用が生じるとされる。この現象が、末梢血単核球の IL-6 や TNF- α 産生に関与している可能性が想定される。

本研究において、IL-6 中和抗体はさらに RAP による肝臓での凝固第 X 因子の増加を抑制したが、ATIII の発現は抑制しなかった。凝固第 X 因子は凝固カスケードの中心的な役割を担う分子である。これは肝臓で生成され、そのプロモーター活性は GATA binding protein-4 (GATA-4) の発現により著しく増加する。IL-6 刺激は GATA-4 と hepcidin antimicrobial peptide (HAMP) プロモーターとの結合を促進する。我々の研究では、RAP によって促進する凝固第 X 因子の産生は、IL-6 中和抗体によって抑制されており、fibrinogen のみならず凝固第 X 因子の産生にも IL-6 が関与していることが示唆される。

興味深いことに、血清の IL-6 レベルは心房細動の発生と関連していることが複数の研究で報告されている。さらに、抗凝固療法が行われている心房細動患者を対象とした大規模なコホート研究において、血清の IL-6 レベルは心血管イベントや死亡の独立した予測因子であり、CHA₂DS₂-VASc スコアに IL-6 の項目を加えることにより予測能が改善した。これらの臨床的な知見は、IL-6 が心房細動やこれに関連する塞栓症の病態形成に寄与するという考え方を、強く支持するものといえよう。

(5) 結論: 心房細動患者、ならびに心房細動疑似モデルである高頻度心房刺激ラットモデルにおいて、肝臓の遺伝子発現プロファイルは有意に変化し、特に凝固因子の発現亢進を認めた。高頻度心房刺激による肝臓の Fibrinogen 産生亢進機序の一部は、末梢血および肝臓内での IL-6/STAT3 経路の活性化を介していた。これらの知見は、心房細動及びこれに関連した塞栓症

の病態において、心肝連関が存在することを強く示唆する。これらの新しい知見は、心房細動患者におけるより有効で安全性の高い塞栓症予防を開発する上で、非常に重要な役割を果たすとも考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計2件）

1. 加藤 武史, 八重樫 貴紀. 心原性塞栓症の第3の機序:心房細動における心肝連関. 心電図 2018;38:257-268. 査読あり.
<https://doi.org/10.5105/jse.38.257>
2. Takanori Yaegashi, Takeshi Kato, Soichiro Usui, Naomi Kanamori, Hiroshi Furusho, Shin-ichiro Takashima, Hisayoshi Murai, Shuichi Kaneko, Masayuki Takamura. Short-term rapid atrial pacing alters the gene expression profile of rat liver: Cardiohepatic interaction in atrial fibrillation. Heart Rhythm 2016;13:2368-2376. 査読あり.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.hrthm.2016.08.036>

〔学会発表〕（計2件）

1. Takeshi Kato. Short-term rapid atrial pacing alters the gene expression profile of rat liver: Cardio-hepatic interaction in atrial fibrillation. 日本不整脈心電学会 2017.
2. Naomi Kanamori, Takeshi Kato, Takanori Yaegashi, Soichiro Usui, Hiroshi Furusho, Shin-ichiro Takashima, Hisayoshi Murai, Shuichi Kaneko, Masayuki Takamura. Short-term Rapid Atrial Pacing Augmented Gene Expression of Proinflammatory Molecules in the Rat Liver. American Heart Association 2016.

6. 研究組織

(1) 研究分担者：なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：八重樫 貴紀

ローマ字氏名：YAEGASHI, Takanori

研究協力者氏名：金森 尚美

ローマ字氏名：KANAMORI, Naomi

研究協力者氏名：薄井 莊一郎

ローマ字氏名：USUI, Soichiro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。