

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09529

研究課題名(和文) 左心耳周囲脂肪の炎症が左房由来心房細動に与える影響

研究課題名(英文) Relationship between atrial fibrillation and periatrial adipose tissue

研究代表者

山本 平 (Yamamoto, Taira)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：70301504

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)：本研究では左心耳組織および組織周囲脂肪が心房細動(AF)とどのような関連性があるのかを究明した。心臓手術を行ったヒト組織を対象とした。術前にグラフトの評価目的として造影CTを撮影しているものについて左房容積を画像解析ソフトを用いて解析したところ、左房拡大は術後AF発生の予測因子であり、エコーでの評価よりも高精度であった。

左心耳周囲の脂肪組織の遺伝子発現の比較検討では炎症性サイトカインの発現にいずれも有意差はなくむしろ術後AFで低い傾向がみられた。組織解析では左房壁に脂肪組織が浸潤している像が高率に観察され、筋肉組織の割合が減少している症例で術後遠隔期のAF率が高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓手術後の心房細動(AF)は約20-40%に発生する術後の大きな合併症である。致命的なものではないものの、術後在院日数の増加や抗凝固薬の内服追加など負の影響は大きい。これまでも多くの研究で術後AFの解析が行われてきたが今回は術前にはAFが同定されていない症例の組織解析も行うとともに、組織への炎症の影響として脂肪組織の解析を行っている。これまでは脂肪組織は負の影響因子として知られてきたが、今回の我々の結果からはむしろ組織障害を修復する過程における浸潤である可能性が示唆されており、今後の術後AFの治療方法の開発の足が掛りなる可能性など意義の高い結果が得られたと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigate the relationship between atrial fibrillation (AF) and atrium tissue. We analyzed the patients tissue obtained during surgery. At the first, we measured left atrium volume using the enhanced computer tomography data if data was available for clinical use. Our data demonstrated that enlargement of left atrium was better predictor for post-operative AF than that of analysis by echocardiogram. The mRNA expression in inflammation-related cytokine showed that the expression has higher trend in post-operative AF group, although there was no statistical differences. Histochemical analysis in left atrium wall revealed that adipose tissue was infiltrated inside muscle tissue. Quantitative analysis demonstrated that the reduction of muscle volume was statistically associated with post-operative AF.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：心房細動 心臓手術後 左房組織 臓器周辺脂肪 炎症性サイトカイン 左房リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 心臓周囲脂肪からの炎症波及

心臓表面の脂肪組織の沈着は特に肥満患者で比較的その量が多い傾向がある。肥満患者では心房細動の発生率が高いことが報告されているが、近年臓器周囲の局所脂肪が臓器障害に及ぼす影響が注目されており、特に冠動脈疾患など動脈硬化性疾患を有する患者では脂肪からより多くの炎症性サイトカインを放出し、冠動脈周囲脂肪が冠血管内皮機能障害を引き起こしさらなる動脈硬化進展に関与していることや心外膜脂肪組織が心機能に影響を及ぼすことなどが報告されている。しかし一方で心臓周囲の脂肪量と臓器障害の程度は必ずしも相関せず、これまでの研究からは量よりもむしろその質が大きく影響していることが示唆される。

### (2) 心臓手術後の発作性心房細動

心臓手術は手術手技や周術期管理の進歩、デバイスの改良などからここ数十年で飛躍的に安全性が高まっており重篤な術後合併症も著しく減少している。しかしながら開心術後の発作性心房細動(Paf)は薬剤や周術期管理などで多くの予防策が提案されているにもかかわらず、その発生率は報告によればばつきはあるものの20-40%と大きな改善は見られていない。心房細動そのものは致死性ではないものの、術後のPaf、特に新規発症のPafは心不全や脳梗塞のリスクが高まるなど術後合併症に深く関与することが知られている。また術後リハビリテーションの遅延因子や術後在院日数延長に関与すること、さらには遠隔予後が悪化することも報告されており、術後の順調な回復において非常な重要な因子である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は心臓手術を行った患者の組織を用いて、

左心耳および周囲脂肪と心房細動の間にどのような相関が見られるか、

術前および術後心房細動の発症と関連する因子はなにか、

これらを手術前に予見し予防や治療につなげることができるか、

これらを検証することである。

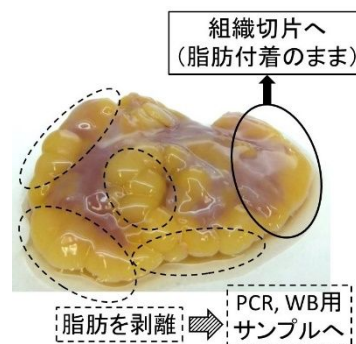
## 3. 研究の方法

(1) 対象症例：当科で施行された初回手術の成人開心術症例で術中に左心耳もしくは左房組織を切離された症例のうち、術前に研究使用への同意書が得られたものを対象とする。

### (2) 組織の保存および処理

#### 組織染色用試料の作成

左心耳組織は右図のように組織処理を行う。染色用組織は左心耳先端を脂肪組織を含むように約0.5cm幅でリング状にトリミングし、4%のパラホルムアルデヒド(4%PFA)に3時間以上浸透、次いで10%、15%、20%のスクロースで置換し脱水する。この処理ののちOCTコンパウンドに包埋してディープフリーザー内で凍結保存する。



#### 脂肪組織との分離(組織化学解析用試料の作成)

残りの組織に付着している脂肪組織を鋭なピンセットおよびメスを用いて丁寧に剥離する。剥離した脂肪組織をRNA保存液(RNAlater)内に入れ同様に-80で凍結保存する。十分量の脂肪組織が付着し、1g以上得られる場合には残りの組織をプロテアーゼインヒビター加PBSの中に入れ凍結保存を行う。次いで左心耳の筋肉組織として、内膜・外膜を丁寧に剥離したのち、同様にRNA保存液内およびプロテアーゼインヒビターに入れ凍結保存を行う。

PCRによる組織解析

RNAlater内に保存してある組織を解凍、市販のカラムキットを用いてRNAを抽出したのちcDNAを作成、GAPDHをコントロール遺伝子としてCT法にてSYBR-greenを用いた2stepのReal Time-PCRを行う。標的遺伝子は以下のものとする。

ミトコンドリア関連：因子:mtDNA 測定、ROS、ATP、PGC1、Tfam1、ND6、NDUFB8、NRF1 炎症性サイトカインおよびマクロファージ：TNF、IL-6、IL-1、IL-2、IL-17、IL-33、INF、MCP-1、MCP-2、CD68、CD11c、CD206 刺激伝導関連因子：Cx40、Cx43、Cx46 心筋ストレス関連因子(ECM含む)：MMP-2、MMP-9、BNP、HIF1 線維化関連：TGFファミリー、bFGF、Collagen-1

これらの値と心筋の肥厚とにどのような相関があるかを重回帰分析にて検討を行い、組織に影響する因子を特定する。

#### 組織学的解析

凍結切片を10μmの厚さに薄切する。Masson's Trichrome染色を行い、画像を組織全体が含まれるように取り込みを行う。取り込んだ画像を解析ソフト(ImageJ:NIH)を用いて解析する。左房壁組織は内膜から外膜まですべてのレイヤーが含まれる組織像のみをトリミングし、外膜、外膜内側脂肪、筋層、内膜内側脂肪、内膜のそれぞれの厚さを計測する。さらにカラー解析を用

いて筋層および線維組織の定量化を行う。

### (3) 画像解析

同意を得た後、術前にグラフト評価目的などの理由で臨床利用で造影 CT を撮像している症例においてそのデータを解析する。画像解析ソフト (Vincent: 富士フイルム社) の左房構築モードを用いてトリミングを行い左房容積を計測する。これを各人の体表面積で除した値を左房容積係数とする。次に、同じ患者で術前の 2D 心エコーデータのうち左房径およびその値を体表面積で除した値を左房径係数として算出、術後の心房細動の発生率と相関が見られるかを検討する

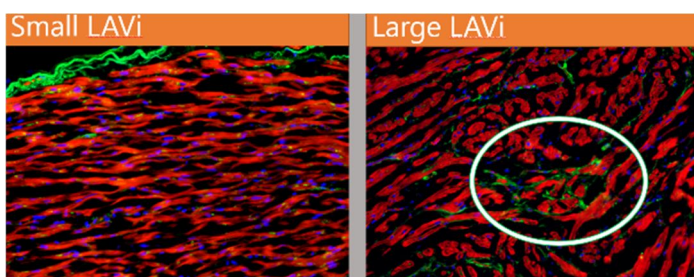
(4) 患者分類、統計学的解析: 術前の患者背景として年齢・性別・体重・体表面積に加え、内服薬、血圧・心拍数を記録する。また手術前の糖尿病・肥満の状態、心機能(心エコー)を記録するとともに、術前の血液検査所見を記録する。これらを 術前から慢性心房細動がある群(AF)、発作性心房細動がある群(PAF)、術前は洞調律であるが、術後に心房細動を発症した群(poPAF)の3群に分類しそれぞれ得られた測定結果を比較検討する。なお術後 AF は術後 5 日以内にモニターにて 5 分間以上持続する心房細動を認めたものと定義する。各群間における比較には重回帰分析を用い、術前の心房細動の状態が組織にどのように影響するのか、脂肪組織の炎症が心房筋に及んでいる際に術後の心房細動の発症にどの程度影響を及ぼすのかを比較検討を行う。

## 4. 研究成果

当院において開心術を受けた成人症例のうち、左心耳および周囲脂肪採取および解析の同意が得られた症例を対象とした。なお術前の病歴において一過性のものを含む心房細動の既往があるもの、入院時心電図にて心房細動があるものは除外した。対象症例を術後心房細動(poAF)を起こした群とそうでない群(poSR)の2群に分けた。全279例の解析を行い、そのうちpoSRは178例(63.8%)、poAFは101例(36.2%)だった。年齢は62.1 vs 70.1 [歳] ( $p < 0.001$ )とpoAFで有意に高かった。女性の割合、平均BMI: に差はなかった。また術前の合併症や透析の有無にも差は見られなかったが、eGFRはpoAF群で有意に低下していた。手術では冠動脈バイパス術、大動脈弁置換術、僧帽弁手術にも有意差はなかった。

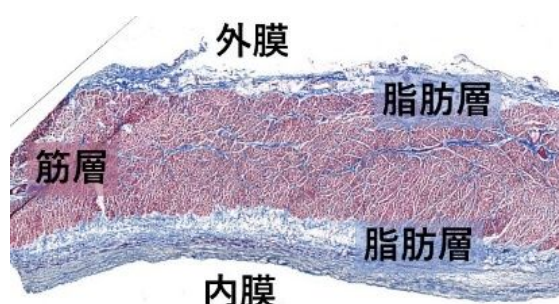
左心耳周囲の脂肪組織の遺伝子発現の比較検討において、炎症性サイトカインであるTNFの発現はAF群で高い傾向が見られたが有意差はなく(AF=1.49 vs SR=1.25,  $p=0.312$ )、IL-1 (AF=1.8 vs SR=2.1,  $p=0.806$ )、IL-6 (AF=5.7 vs SR=6.1,  $p=0.697$ )、IL-10 (AF=3.1 vs SR=3.6,  $p=0.406$ )、IL-17 (AF=4.1 vs SR=5.8,  $p=0.212$ )、IL-33 (AF=11.8 vs SR=11.0,  $p=0.620$ )と差は見られなかった。一方でIL-2はAF=158.9 vs SR=58.1,  $p < 0.01$ とAFで有意に高かった。さらにマクロファージのマーカーのうちCD11cは差がなかったがCD68およびCD206はAF群で高い傾向が見られた。ミトコンドリア関連遺伝子であるNRF1、PGC1、NDUFB8、ND6とも有意差は認めなかった(NRF1: AF=3.0 vs SR=3.0,  $p=0.969$ ; PGC1: AF=1.2 vs SR=1.3,  $p=0.724$ ; NDUFB8: AF=44.6 vs SR=44.5,  $p=0.911$ ; ND6: AF=28.0 vs SR=25.1,  $p=0.310$ )。

次に術前CTデータが利用可能な144例について解析を行った。PoAF群28例(19.4%)、PoSR群116例(80.6%)であった。なお術後AFはいずれも発作性心房細動であった。年齢はPoAF vs PoSR = 73.3 vs 65.9 [歳],  $p < 0.01$ と有意にPoAF群で高齢であった。また、女性の割合 (PoAF vs PoSR = 10.7 vs 14.7 [%],  $p=0.77$ )、BMI (25.0 vs 24.0,  $p=0.15$ )、BSA (1.7 vs 1.7 [m<sup>2</sup>],  $p=0.54$ )、BNP (87.1 vs 80.3 [pg/dL],  $p=0.81$ )、LVEF (61.0 vs 61.5 [%],  $p=0.87$ )には有意差はなかった。また手術時間はPoAF vs PoSR = 286.6 vs 261.3 ( $p < 0.05$ )と有意にPoAF群で長かった。CTによる左房容積係数LAViはPoAF vs PoSR = 62.7 vs 54.1,  $p < 0.01$ と有意にPoAF群で大きかった。一方でエコーでの左房径係数LADiはPoAF vs PoSR 21.4 vs 21.4 ( $p=0.97$ )と両群に有意差を認め術後AF発生の予測因子として



左房径よりも精度が高かった。次に左心耳組織のmRNAの発現と左房径の関係を検討したところ、LAViと型コラーゲン(COL1)は $r=0.27$ と弱い正の相関を認めた。免疫染色では、LAViの大きい症例ではCOL1の細胞外基質での増加を認めた。また組織染色では左房の拡大症例においてコラーゲンが多く発現している傾向が見られた。

次に左房壁の解析を行った。左房壁が得られた症例のうち解析可能な60例について検討を行った。Masson's Trichrome染色では、脂肪組織が左房組織内に浸潤している像が高率に観察され、また外膜側のみならず内膜層にも浸潤している像が観察された。術前に一過性もしくは慢性AFが指摘されている症例では筋肉量が有意に少なく(PoAF vs. PoSR = 21.1 vs. 13.4 [%],  $p < 0.05$ )かつ遠隔期にAFが残存する症例ではそうでない症例に比べて同様に筋



肉量は有意に少なかった (PoAF vs. PoSR = 24.4 vs. 17.5 [%],  $p < 0.01$ )。さらにメイズ手術を行ったが AF が改善しない症例でも同様に筋肉量が有意に少なかった (PoAF vs. PoSR = 23.0 vs. 17.5 [%],  $p < 0.01$ )。さらに内膜脂肪が多い症例の方がメイズの効果が高い可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Endo Daisuke, Yamamoto Taira, Kuwaki Kenji, Kajimoto Kan, Amano Atsushi	4. 巻 34
2. 論文標題 Neointima on the scar site after the left atrial appendage amputation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cardiac Surgery	6. 最初と最後の頁 855-855
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jocs.14127	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 Yamamoto Taira, Endo Daisuke, Matsushita Satoshi, Shimada Akie, Ohishi Atsumi, Dohi Shizuyuki, Asai Tohru, Amano Atsushi	4. 巻 50
2. 論文標題 Evidence and Challenges for Left Atrial Appendage Management	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 xx-xx
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4326/jjcv.50.1.xxxvi	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大山徹真, 松下訓, 山本平, 遠藤大介, 土肥静之, 嶋田晶江, 大石淳実, 中村博, 李智榮, 横山典彦, 庄司弥生, 畑博明, 浅井徹, 天野篤, 佐藤友一郎, 横山泰孝
2. 発表標題 術前CT左房容積による心拍動下冠動脈バイパス術後の心房細動発生予測の検討
3. 学会等名 第 73 回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大石淳実, 浅井徹, 山本平, 畑博明, 土肥静之, 嶋田晶江, 中村博, 李智榮, 西田浩介, 小田遼馬, 天野篤
2. 発表標題 全周性左房縫縮中期の全肺容量, 左房容量の変化
3. 学会等名 第 73 回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤大介, 山本平, 大石淳実, 嶋田晶江, 畑博明, 森田照正, 土肥静之, 松下訓, 梶本完, 西田浩介, 中村博, 李智榮, 小田遼馬, 浅井徹, 天野篤
2. 発表標題 冠動脈バイパス術の新規術後心房細動は遠隔期心房細動発症率を増加する
3. 学会等名 第 73 回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤大介, 山本平, 大石淳実, 嶋田晶江, 畑博明, 森田照正, 土肥静之, 松下訓, 梶本完, 西田浩介, 中村博, 李智榮, 小田遼馬, 浅井徹, 天野篤
2. 発表標題 18年にわたる心拍動下冠動脈バイパス術2638例の検討
3. 学会等名 第 73 回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 D. Endo, T. Yamamoto, S. Matsushita, K. Kajimoto, A. Shimada, A. Oishi, T. Asai, A. Amano.
2. 発表標題 5-year outcomes of surgical left atrial appendage amputation on stroke prevention in patients undergoing off-pump coronary artery bypass grafting.
3. 学会等名 The 33rd Annual Meeting European Association for Cardio-Thoracic Surgery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lee J, Matsushita S, Yamamoto T, Hata H, Kuwaki K, Dohi S, Kajimoto K, Shimada A, Oishi A, Nakanishi K, Endo D, Kamikawa Y, Yokoyama N, Amano A.
2. 発表標題 Non-unified rhythm enhances inflammation of cardiac tissue in patients with atrial fibrillation
3. 学会等名 The 32nd Annual Meeting European Association for Cardio-Thoracic Surgery (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遠藤大介, 山本平, 桑木賢次, 梶本完, 畑博明, 土肥静之, 森田照正, 松下訓, 嶋田晶江, 大石淳実, 李智榮, 上川祐輝, 天野篤
2. 発表標題 冠動脈バイパス術後の遠隔期心房細動が予後に及ぼす影響
3. 学会等名 第 71 回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石淳実, 山本平, 桑木賢次, 梶本完, 土肥静之, 嶋田晶江, 遠藤大介, 町田洋一郎, 松下訓, 森田照正, 畑博明, 天野篤
2. 発表標題 冠動脈バイパス術 高度肥満症例に対する分析
3. 学会等名 第 71 回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018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
研究分担者	松下 訓  (Matsushita Satoshi)  (20407315)	順天堂大学・医学部・准教授   (32620)	
研究分担者	嶋田 晶江  (Shimada Akie)  (20439326)	順天堂大学・医学部・特任准教授   (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------