

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462143

研究課題名(和文) RNAシーケンスを用いた閉鎖型人工心肺装置の有用性の検討

研究課題名(英文) Efficacy of closed-circuit cardiopulmonary bypass system assessed by gene expression profiling

研究代表者

山口 敦司 (Yamaguchi, Atsushi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50265287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：循環血液が空気と接触しない閉鎖型回路は、炎症作用が少なく生体侵襲性が低いと報告されている。今回、心臓弁膜症手術実施例を対象に、閉鎖型回路と静脈血貯血槽が大気に開放された開放型回路の前向き研究を行い、臨床成績(ICU日数や術後白血球数など)を比較するとともに、人工心肺後血液検体から単球を精製・RNA抽出後、DNAマイクロアレイによる遺伝子解析を行った。振分け試験(開放:n=11, 閉鎖:n=10)では、各臨床パラメータに有意差はなかった。しかしながら、人工心肺時間の群間調整後に行った遺伝子解析研究では、閉鎖型回路群の単球内で、好中球浸潤などに関与する多くの炎症関連遺伝子の発現低下が確認された。

研究成果の概要(英文)：Cardiopulmonary bypass (CPB) is known to cause systemic inflammatory reaction following cardiac surgery that can be associated with organ failure. In a standard "open" circuit system, blood makes contact to the air in the reservoir, which can trigger inflammatory response induced by oxidant stress. In the first series, we performed a randomized controlled study to compare the outcomes of heart valve surgery between open and closed circuit system (open circuit group, n=11, closed circuit group, n=10). There were no differences in the primary endpoints (open vs. closed, length of mechanical ventilation; 9.4 hours vs. 14.0 hours, P=0.21, length of ICU stay; 2.3 days vs. 2.4 days, P=0.87). In the second series, we conducted gene expression profiling of monocytes purified from post-CPB blood using DNA-microarray. Of note, multi-inflammatory mediators, including cytokines and chemokines related to neutrophil recruitment, were down-expressed in the closed circuit monocytes.

研究分野：成人心臓血管外科

キーワード：心臓手術 閉鎖型人工心肺回路 免疫応答 網羅的遺伝子解析

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 心臓手術に使用する人工心肺装置は、1953年にジェファソン大学ギボンらによって最初の臨床応用が行われ、以後、安全性と機能性で大きな発展を遂げてきた。しかしながら、現在も国内外の95%以上の施設が、人工心肺装置内の静脈血貯血槽が大気に開放された開放型回路を採用し、この点は開発当時と同じ状況である。開放型回路の最大の利点としては、閉鎖型と比較して回路の構成が比較的単純であることがあげられるが、その一方で開放型回路では、体外循環血液が大気に開放された貯血槽を通り、血液は空気との接触で血球成分が障害され、炎症反応性物質も活性化するため、生体適合性に問題がある。現在、血液回路表面や人工肺表面に生体適合性の高い処理が行われているが、血液が大気に触れる環境での人工心肺の生体適合性には限界があり、通常の人工心肺装置は数時間しか使用できない。

(2) また、開放型回路は、脱血流量と送血流量のバランスで貯血槽に貯える血液量を調整しているが、このバランスは体外循環技士の職人的な技術と集中力で維持され、貯血槽が空になり空気が患者に送り込まれる事故が生じている(体外循環技術 2011;38:457)。一方、循環血液が空気と接触しない閉鎖型回路は、人工心肺装置としては一般には使用されていないが、急激な循環呼吸不全に対し使用される経皮的な心肺補助装置(PCPS)による肺補助装置(ECMO)は広く普及している。閉鎖型回路は、貯血槽が体外循環回路上に無いため、貯血量が安定し、脱血流量が低下しても貯血槽が空になることは無い。

(3) 当施設は、本邦での心臓手術における閉鎖型回路を使用した体外循環のパイオニアであり、早期から血液透析や補助循環で閉鎖型回路の有用性を認識し、1995年より半閉鎖型回路による体外循環システムの臨床応用を開始し、1999年より閉鎖回路を実現させ、現在全ての心臓手術の体外循環症例に閉鎖回路を用いている。申請者および、共同研究者である当センター臨床工学部百瀬技士長は、閉鎖型回路の開発・導入を主導し、2000年には、国内外を通じて初めて、閉鎖型回路による貯血レベルの自動制御を導入した(体外循環技術 2008;35:105-110, 体外循環技術 2010;37:85-91, Perfusion 2010;25:77-82.)。閉鎖型回路は、炎症性サイトカインの産生が低下し、血小板減少も軽度であり(引用文献#1)、出血量は減少し呼吸器合併症や腎障害も抑制される(引用文献#2)。しかしながら、どの免疫応答システムが、閉鎖型回路により影響を受けるのか、その結果生じる炎症反応の抑制が、どのようにして臓器保護効果をもたらすのか、閉鎖回路の利点とされる事象のメカニズムの解明はなされていない。

## 2. 研究の目的

(1) 現在当科で使用している閉鎖型回路は、

貯血槽の自動制御システムを備え、安全面で大きな有用性がある。今回、他施設で一般的に使用される開放型回路との2群間の前向き介入研究(無作為振り分け研究)を実施し、開放型回路と閉鎖型回路の臨床成績を比較検討する。

(2) 心臓手術における人工心肺使用時の閉鎖型回路・開放型回路の生体反応の相違点を、網羅的遺伝子発現解析研究から、個体・細胞・分子レベルで明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 概要と前向き振り分け研究に関して自治医科大学さいたま医療センター倫理委員会(承認番号:第倫14-53)、自治医科大学ヒトゲノム倫理委員会(承認番号:第遺13-32)の承認の元、2015年5月以降、心臓弁膜症手術を施行した患者を対象として、開放型人工心肺回路と閉鎖型人工心肺回路の2群間の前向き振り分け試験を実施した。開放型・閉鎖型の両人工心肺回路とも、日本体外循環技術医学会勧告:人工心肺における安全装置設置基準(2013年 第4版)の安全基準を満たすものであり、2群間の振り分けは第三者により行われ、患者・手術担当医師・麻酔科・術後管理担当医師に割り振り情報は開示されなかった。尚、対象患者の選定に関しては、下記除外基準を設け、これらを項目にいずれにも合致しない症例を対象とした。

[除外基準]

年齢 49歳以下、76歳以上

術前の血液データ(白血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、血小板数)が正常範囲を逸脱

肝機能障害症例 (AST > 30 IU/l or ALT > 30 IU/l)

腎機能障害症例 (Cre > 2.0 mg/dl)

自己免疫疾患症例

低心機能症例 (左室駆出率<40%以下)

認知症などによりインフォームドコンセントを受けることが困難な症例

緊急/準緊急手術

本研究に参加した症例でも、手術中、術後24時間以内に輸血治療を受けた症例は解析対象から除外した。本研究は、UMIN-CTRに開示した(UMIN 試験ID: UMIN000022227)。本前向き介入のprimary/secondary endpointsは下記内容とした(図1)。

Primary endpoints

#1. 術後人工呼吸器管理時間

#2. ICU 滞在日数

Secondary endpoints

#1. 術後 WBC 値

#2. 術後 ヘモグロビン・ヘマトクリット値

#3. 術後 クレアチニン値

#4. 術後 ASL/ALT 値 (#1-4; 術後2日間での最大値)

#5. 手術中出血量

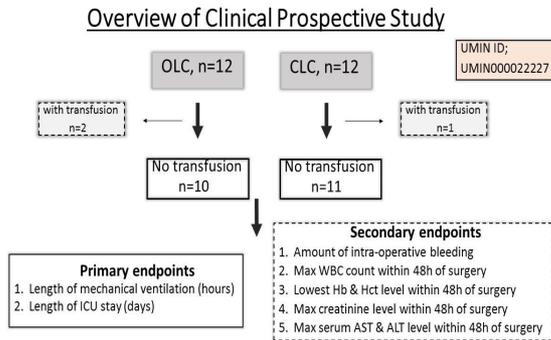


図1：開放・閉鎖回路の前方向き振り分け試験の概要  
(2) 遺伝子発現解析

上記臨床パラメーターの比較の他、人工心肺装置離脱直後に全血を採取し、核磁気分離装置を用い、好中球と単球を選択的に分離した。好中球は、EDTA管内の全血サンプルを、MACS express neutrophil kit (Miltenyi biotec, #130-104-434)を使用し分離した。単球は、BDバキュティナ採血管内の全血サンプルを遠心し血漿成分を抽出後、末梢血単核球(PBMC)を分離、CD14+ビーズ((Miltenyi biotec, #130-097-052)を使用し分離精製した。RNA抽出キット(Qiagen, #740004, #74104)を使用し、好中球と単球から総RNAを抽出した。RNAの精度はAgilent社のBioanalyzerで評価し、2群間で人工心肺時間がマッチングする症例群を抽出(閉鎖型回路 n=3, 開放型回路 n=4)した後に、DNAマイクロアレイ(Agilent, SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ 8x60K Ver. 1.0)にて、開放型回路群・閉鎖型回路群で up or down expression する遺伝子群を同定した。尚、当初はRNAシーケンズ法を予定していたが、解析方法を再検討し、DNAマイクロアレイを使用する方針となった。

#### 4. 研究成果

##### (1) 開放型回路使用群と閉鎖型回路使用群の各臨床パラメーターに関する検討

閉鎖型回路(CLC)と開放型回路(OLC)の患者背景を表1・2に示す。2群間で、年齢・性別・併存疾患・主疾患・血液データ・エコーデータに有意差は認めなかった。また、

##### Background (1)

	CLC, N=10	OLC, N=11	P
Age (years), mean ± SD	64.3 ± 7.6	68.8 ± 5.0	0.20
Male Gender	6 (60%)	8 (73%)	0.87
HTN	8 (80%)	7 (63%)	0.73
Diabetes	1 (10%)	3 (27%)	0.65
Dislipidemia	4 (40%)	3 (30%)	0.36
Atrial fibrillation	4 (40%)	3 (27%)	0.53
Primary diagnosis			
Aortic stenosis	3 (30%)	3 (27%)	1.0
Aortic regurgitation	1 (10%)	4 (36%)	0.36
Mitral stenosis	1 (10%)	1 (9%)	1.0
Mitral regurgitation	5 (50%)	3 (27%)	0.53

表1：術前因子比較(背景・併存疾患・主疾患)

手術術式と手術時間・人工心肺時間・再低温度・補液バランスを含む術中因子に関しても

両群で有意差は認めなかった(表3)。

##### Background (2)

	CLC, N=10	OLC, N=11	P
NHYA class	2.1 ± 0.3	2.0 ± 0.4	1.0
Preoperative labo data			
WBC counts (x10 <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> ), mean ± SD	65.3 ± 21.4	58.5 ± 14.3	0.39
Hemoglobin (g/dl), mean ± SD	13.4 ± 0.9	14.0 ± 1.4	0.24
Hematocrit (%), mean ± SD	40.1 ± 2.4	42.0 ± 4.4	0.24
Platelet count (x10 <sup>4</sup> /μl), mean ± SD	18.7 ± 5.6	19.8 ± 5.6	0.64
Creatinine (mg/dl), mean ± SD	0.85 ± 0.13	0.78 ± 0.22	0.41
Echocardiography data			
LVDD (mm), mean ± SD	56.7 ± 11.2	57.3 ± 8.8	0.88
LVDS (mm), mean ± SD	36.5 ± 9.5	37.3 ± 6.5	0.83
LVEF (%), mean ± SD	65.3 ± 9.0	63.0 ± 9.0	0.58

表2：術前因子比較(NHYA分類・血液・エコーデータ)

##### Surgery

	CLC, N=10	OLC, N=11	P
AVR	4 (40%)	7 (64%)	0.52
MVP + TAP	4 (40%)	3 (27%)	0.87
MVR + TAP	2 (20%)	1 (9%)	0.93
Concomitant MAZE	3 (30%)	3 (27%)	1.0
Operation time (min), mean ± SD	271 ± 89	280 ± 45	0.75
CPB time (min), mean ± SD	124.9 ± 34.8	137.6 ± 37.4	0.43
Ao clamp time (min), mean ± SD	103.2 ± 29.7	113.8 ± 31.0	0.43
Bottom temperature (°C), mean ± SD	31.0 ± 0.6	30.2 ± 1.3	0.08
Balance (ml), mean ± SD	2212 ± 804	2735 ± 769	0.15

表3：手術術式と術中因子の比較

上記2群に関して、前記 primary および secondary endpoints を比較した(表4)ものの、両群間に有意差は認めなかった。この他、

術後24時間以内の最高体温：CLC群;37.7±0.3, OLC群;37.8±0.2 (P=0.67)。

術後24時間以内の出血：CLC群;399±132ml, OLC群;338±173ml (P=0.38)、術後1週間以内の最大白血球値：CLC;163±33 x10<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup>, OLC群;141±22 x10<sup>2</sup>/mm<sup>3</sup> (P=0.09)に関しても2群間で有意差は認めなかった。

	CLC, N=10	OLC, N=11	P
<b>Primary endpoint</b>			
Length of mechanical ventilation (hours), mean ± SD	14.0 ± 9.4	9.4 ± 4.2	0.21
Length of ICU stay (days), mean ± SD	2.4 ± 0.9	2.3 ± 0.5	0.87
<b>Secondary endpoint</b>			
Operative bleeding (ml), mean ± SD	434 ± 255	317 ± 226	0.28
*WBC counts (x10 <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> ), mean ± SD	157 ± 36	135 ± 25	0.13
*Hemoglobin (g/dl), mean ± SD	10.0 ± 1.3	10.0 ± 1.2	0.97
*Hematocrit (%), mean ± SD	30.6 ± 3.6	29.7 ± 3.3	0.58
*Creatinine (mg/dl), mean ± SD	0.84 ± 0.20	0.79 ± 0.33	0.68
*AST (IU/l), mean ± SD	83 ± 33	120 ± 158	0.47
*ALT (IU/l), mean ± SD	21 ± 9	45 ± 67	0.28

表4：Primary and secondary endpoints の比較

\*: 術後2日間での最大値

両群ともに30日死亡症例・在院死亡症例は認めなかった。CLC群で1例のみ24時間以上の長期術後人工呼吸器管理となった症例が存在した(44時間)。この1例以外、長期人工呼吸器管理・呼吸不全を呈した症例はなく、再開胸止血術・脳梗塞・一過性脳虚血発作・胸骨骨髄炎・透析治療を要する急性腎不全を発症した症例も両群間に認めなかった。今回の前方向き研究で、各臨床パラメーターに有意差は認めなかったが、CLC群の非劣性は確認することができた。

(2) 心臓手術における人工心肺使用時の閉鎖型回路・開放型回路の生体反応の相違点に関する検討

人工心肺装置離脱直後に全血を採取し、核磁気分離装置を用い、好中球と単球を選択的に分離した(図2)。好中球・単球いずれにおいても純度98%以上で抽出することに成功し、本実験成果は2015年度日本人工臓器学会で発表した(学会発表)。

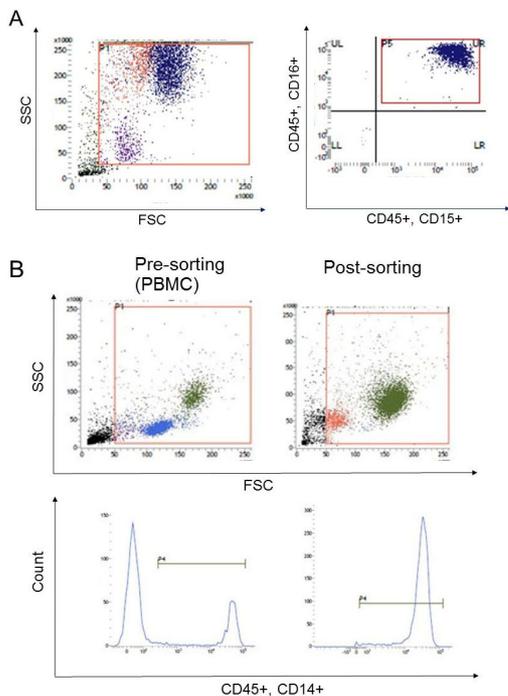


図2: MACS sorting system を使用した好中球(A)と単球(B)の抽出

心臓手術における人工心肺装置使用後、空気との接触による酸化ストレスや過吸引により、好中球とともに単球が活性化される(引用文献#3)。人工心肺使用後の炎症細胞の遺伝子発現を、網羅的に解析した研究は報告されているが、閉鎖型人工心肺装置で検証した研究はない。今回、我々は、まず単球に着目して、人工心肺装置使用後の遺伝子発現の変化を、CLC・OLC群双方で解析した。催炎症作用は、人工心肺時間に影響されるため、人工心肺時間が100分未満の症例を除外し、抽出したRNAの性状が良好であったCLC群3例(平均人工心肺時間:145±21分)、OLC群4例(平均人工心肺時間:136±48分、 $P=0.77$ )で、DNAマイクロアレイ法による遺伝子発現解析を施行した(図3)。

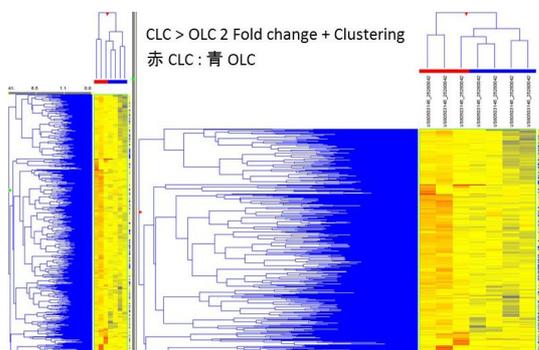


図3: DNA マイクロアレイのヒートマップイメージ

二群間で、有意な発現変動を認めた遺伝子群は、42545 遺伝子中 1911 遺伝子(4.5%) (CLC群で発現減弱:749 遺伝子・発現増強:1162 遺伝子)であった。NextBio software (NextBio, Cupertino, CA)による gene ontology 解析結果を以下に示す。OLC群と比較し、leukocyte migration/leukocyte/chemotaxis/coagulation/response to bacterium と複数の炎症関連 gene ontology term において、CLC群で有意な発現減弱を認めた。

GO term	Gene numbers in Selection	p-value
carbohydrate binding	10	0.0001
MHC protein complex	6	0.0005
antigen processing and presentation	16	0.0005
organelle subcompartment	5	0.0014
cellular response to vascular endothelial growth factor stimulus	3	0.0028
regulation of extent of cell growth	3	0.0031
cortical actin cytoskeleton	5	0.004
regulation of axonogenesis	6	0.0043
kinase inhibitor activity	5	0.0055
drug metabolic process	2	0.0056

GO term	Gene numbers in Selection	p-value
response to bacterium	40	5.5E-18
leukocyte migration	21	5E-10
regulation of cell activation	28	1.2E-09
defense response to bacterium	17	9.4E-09
coagulation	33	0.00000001
oxygen transport	5	0.000000028
fat cell differentiation	10	0.000000037
response to steroid hormone stimulus	26	0.000000041
response to mechanical stimulus	17	0.000000044
leukocyte chemotaxis	12	0.000000051

表5: CLC(閉鎖型回路)群の単球で発現増強(上)減弱(下)する top 10 gene ontology term

TLR1	CXCL1	CCRL2	CCL8
PTX3	CCL7	CXCR2	IL18RAP
IL10	IL1B	F3	CXCL2
TNFSF4	CCL2	CD40LG	CCR7
SELP	ORM2	MMP25	MMP25
TNFRSF1A	THBS1	IL27	CXCL2
TPST1	CCR1	CXCL1	ALOX5AP
TNFAIP6	CXCL3	IRAK2	HIF1A
ORM1	TRIL	VNN1	PROK2
BMP6	ADORA2A	IRGM	KL
CCRL2	CXCR1	FPR2	IL6

表6: CLC(閉鎖型回路)群の単球で発現減弱する炎症関連遺伝子

SERPINB2	SLC7A10	CD40LG	P2RY1
ITGB3	PPBP	GP1BB	EHD1
SLC7A5	SELP	RHOB	HBG1
BRPF3	TREM1	TREM1	IL6
ITGA2B	HBB	PDE5A	TBXA2R
HBD	ITGA6	TREML1	THBD
PF4	CLU	GP9	THBS1
F5	ALB	RHOB	ADORA2A
F3	GP1BB	GP6	KIF2C
ITGA6			

表7: CLC(閉鎖型回路)群の単球で発現減弱する凝固関連遺伝子

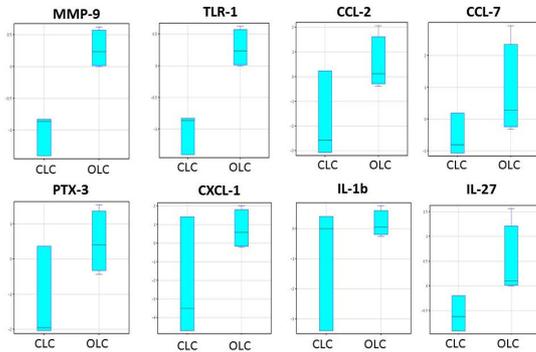


図4：CLC 群の単球で発現減弱する代表的炎症関連メディエーター

CLC 群の単球で発現減弱が確認された炎症関連遺伝子群を表6に、凝固関連遺伝子群を表7に示す。さらにCLC 群の単球で遺伝子発現が減弱する代表的な炎症関連メディエーターを図4に示す。MMP-9やTLR-1、急性期炎症サイトカインであるIL-1bやIL-6の他、好中球遊走を促すKL・CXCL1-3の発現低下が認められた。

閉鎖型回路で、IL-6を含めた炎症メディエーターの産生が減弱することは、Fromesらが報告しており(引用文献#1)、本研究結果はこれらの報告に合致するものである。本研究では単球に注目して、網羅的遺伝子発現解析を行った。閉鎖型回路群では、単球内での様々な炎症メディエーターの合成・産生が抑制され、好中球を中心とする複数の炎症経路の活性が抑制される可能性が本研究によって示唆された。また、その結果、凝固関連物質の活性化も抑制された。

これらの研究成果は2016年度日本人工臓器学会で発表予定であり、現在論文を作製している。閉鎖型 vs. 開放型の無作為振り分け研究では、症例数が少ない影響もあり、各臨床パラメーターに有意差は認めなかったものの、閉鎖型回路の非劣性は確認された。今後は、単球・好中球・血管内皮細胞を含む *in vitro* の実験系や、血液検体での遺伝子発現解析などを行い、本研究結果を多角的に検証する予定である。本邦のみならず、世界的に心臓手術件数は増加傾向にあり、より低侵襲で安全な人工心肺装置の開発が望まれている。今後、本研究を推進し、安全な心臓/大動脈手術を可能にする人工心肺装置の開発を目指す。

#### <引用文献>

#1: Fromes Y, Gaillard D, Ponzio O, Chauffert M, Gerhardt MF, Deleuze P, Bical OM. Reduction of the inflammatory response following coronary bypass grafting with total minimal extracorporeal circulation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2002;22:527-33.

#2: Biglioli P, Cannata A, Alamanni F, Naliato M, Porqueddu M, Zanobini M, Tremoli E, Parolari A. Biological effects of off-pump vs.

on-pump coronary artery surgery: focus on inflammation, hemostasis and oxidative stress. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003;24:260-9.

#3: El-Sabbagh AM, Toomasian CJ, Toomasian JM, Ulysse G, Major T, Bartlett RH. Effect of air exposure and suction on blood cell activation and hemolysis in an *in vitro* cardiomy suction model. *ASAIO J*. 2013;59:474-9.

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

藤井温子 木村直行 吉崎隆道 百瀬直樹 安達秀雄 山口敦司. MACS 自動磁気細胞分離装置を使用した人工心肺使用後の生体反応に関する解析研究. 第53回日本人工臓器学会 2015年11月19日 東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 敦司 (YAMAGUCHI Atsushi)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 50265287

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

木村直行 (KIMURA Naoyuki)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 20382898

中江 進 (NAKAE Susumu)

東京大学医科学研究所システム疾患モデル研究センター・准教授  
研究者番号: 60450409

(4) 研究協力者

松本 健治 (MATSUMOTO Kenji)  
国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー/感染研究部・部長  
研究者番号: 60181765

二村 恭子 (FUTAMURA Kyoko)

国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー/感染研究部・研究員  
研究者番号: 60596956