

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462117

研究課題名(和文) 数値流体力学に基づく大動脈二尖弁に合併する胸部大動脈病変の遺伝子解析

研究課題名(英文) Patient-specific assessment of hemodynamics by computational fluid dynamics and gene expression profiling in patients with bicuspid aortopathy.

研究代表者

川人 宏次 (KAWAHITO, KOJI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90281740

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)：先天性大動脈弁二尖弁に合併する上行大動脈瘤の病態を解明するために、術前の3-D CTとMRIによる大動脈実形状データをもとにした数値流体計算とhigh wall shear stress(WSS)部の網羅的遺伝子発現解析を行った。正常症例では上行大動脈内に長軸方向の非回旋性の血流パターンを認めたが、二尖弁では流速の早い右回旋の血流パターンを呈し、上行大動脈の右側(大彎側)にwall shear stress(WSS)の上昇を認めた。高WSS部の内膜中膜組織のDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析では42,545遺伝子中257遺伝子(0.6%)に有意な発現変動を認めた。

研究成果の概要(英文)：Hemodynamics related to eccentric blood flow may factor into the development of bicuspid aortic valve aortopathy. We investigated wall shear stress distribution by means of magnetic resonance imaging-based computational fluid dynamics in patients with a bicuspid aortic valve. Furthermore, we aimed to identify key molecules driving bicuspid aortic valve aortopathy through gene expression profiling achieved by microarray analysis and subsequent in vitro experiments. In bicuspid aortic valve, right handed abnormal aortic helical flow was seen in the ascending aorta and transverse arch. No such flow was seen in the patients with tricuspid aortic valves. The patients with bicuspid aortic valves were likely to have jet flow/wall impingement against the greater curvature of the proximal ascending aorta, resulting in remarkably increased wall shear stress around the impingement area.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：大動脈弁二尖弁 上行大動脈瘤 数値流体計算 壁剪断応力 網羅的遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 発生頻度が全人口の 1-2% と最も多い心奇形である先天性大動脈弁二尖弁は、NOTCH1 などの遺伝子異常との関連性が報告されているが原因遺伝子は多様であるとされている。大動脈二尖弁症例では大動脈弁狭窄症 (AS) や大動脈弁閉鎖不全症 (AR) などの大動脈弁疾患が高頻度に発症し、約半数に胸部大動脈拡大を合併する。胸部大動脈拡大は解離や破裂の原因となるため、大動脈二尖弁に合併する胸部大動脈拡大の病態説明は治療成績向上のため重要である。

(2) 大動脈二尖弁に合併する胸部大動脈拡大の原因としては、先天的な大動脈壁の脆弱性 (genetic theory) と異常血流による血行力学的な影響 (hemodynamic theory) が提唱されてきた。近年の研究では、異常血流による大動脈壁に対する血行力学的な影響が大動脈壁の遺伝子発現を変化させることが示唆されている (*J Cell Sci* 2015;128:70)。動物実験では壁剪断応力 (血管壁表面の接線方向に働く力 WSS: wall shear stress) により発現が変化する遺伝子群が、網羅的遺伝子発現解析により同定され、これらが胸部大動脈拡大に関与することが示唆されている (*PLoS One* 2012;7:e5227)。しかしながらヒトにおいて二尖弁の異常血流が大動脈壁の異常遺伝子発現に及ぼす影響を解析した研究はなく、血行力学的因子が大動脈壁に及ぼす影響は、分子細胞学レベルで十分に解明されていない。

(3) 申請者はこれまで成人心臓疾患全般の手術治療に従事し、特に胸部大動脈疾患に関する研究を精力的に行ってきた (*Ann Thorac Surg* 2001;71:1239, *Ann Thorac Surg* 2003;76:1471)。また、補助人工心臓開発の領域で数値流体力学計算 (computational fluid dynamics: CFD) を導入し、CAD/CAM (computer aided design and manufacturing) を用いた人工心臓開発を推進した (*Artif Organs* 1996;20:47, *ASAIO J* 1996;42:M754)。また、共同研究者の埼玉大学中村博士は、生理流体力学および計算力学に基づく循環器系血流解析に関する研究を行い、大動脈で発達する螺旋流は大動脈のねじれと曲がり起因することを示した (*ASME J Biomech Eng* 2006;128:837)。さらに、東京大学医科学研究所中江博士と国立成育医療研究センター松本博士は、呼吸器や循環器など様々な疾患モデルの免疫応答解析で、現在、先駆的な研究成果を上げている。

(4) 従来の大動脈二尖弁の血行力学研究は、4D-MRI を使用した解析が中心であり、CFD 技術を使用した解析研究は症例報告のみであった (*Med Eng Phys* 2013;35:723)。4D-MRI の血流計測は格子定点上のため、血管壁と計測位置との距離が不均一だが、CFD では境界適応メッシュ使用により血流計測部と血管

壁との距離は均一となる。このため、CFD 解析は理論上、より正確な血流解析を患者特異的に実施できるという利点を有する。

そこで、本研究では、埼玉大学理工学研究科機械工学科(中村グループ)、東京大学医科学研究所システム疾患モデルセンター(中江グループ)、国立成育医療研究センター免疫アレルギー・感染研究部(松本グループ)と共同で、術前の MRI による大動脈実形状データをもとに CFD 計算を行い、大動脈二尖弁症例における胸部大動脈拡大を血行力学因子との関連性を分子細胞学的に解析する基盤研究システムの確立を目指した。

2. 研究の目的

(1) AS もしくは AR の診断で手術治療を受ける大動脈二尖弁症例の術前画像データ (Phase-contrast (PC) MRI, 3DCT) を基に、専用画像解析ソフトウェアを使用し、血流解析計算を実施する。これにより、CFD 技術を使用した二尖弁胸部大動脈拡大の血行力学因子の研究モデルを確立する。

(2) コンピューター解析によって得られた血行力学因子の分布に基づき、高/低 WSS 部を同定後、大動脈サンプルを摘出し、DNA マイクロアレイを用いたプロファイル評価後、bioinformatics 分析を行う。これにより、二尖弁の異常血流が大動脈壁に及ぼす影響を遺伝子発現レベルで評価する。

3. 研究の方法

(1) 予備調査として、自治医科大学さいたま医療センターで、2009 年 1 月~2014 年 9 月までに大動脈弁置換手術を施行した大動脈二尖弁症例 210 例 (男 149 女 61 例 平均 65.4 歳) を対象に、弁形態の Sievers 分類に基づき、二尖弁上行大動脈拡大に関与する因子の検討を行った。

(2) 自治医科大学臨床研究に関する倫理委員会の承認の元 (第倫 13-119) 2014 年 10 月以降、AS もしくは AR の診断で、手術治療を施行した大動脈二尖弁症例 14 例 (二尖弁群) と、上行弓部大動脈拡大がなく大動脈弁が正常な 3 例 (対照群) を研究対象として、PC-MRI により諸処の血流量を計測した。さらに、造影 CT データ (3DCT) も併せて使用し、専用画像解析ソフトウェア (SCRYU ver. 12 (Software Cradle Co. Tokyo, Japan) による CFD 血流解析を施行し、WSS を含めた血行力学因子の計測と WSS 分布マップの構築を行った。

(3) さらに、自治医科大学ヒトゲノム倫理委員会の承認の元 (第遺 12-57)、下記実験を施行した。(2) で CFD 血流解析を実施した大動脈二尖弁症例のうち、上行大動脈拡大のため、上行大動脈切除 + 人工血管置換手術が実施された 4 例を対象とし、WSS 分布マップ

に基づき、高・低 WSS 部位で層別に大動脈壁組織を採取し凍結保存した。その後、内中膜組織から RNA を抽出し、42,545 遺伝子解析が可能な Agilent SurePrint G3 を使用し、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析研究を施行した。その後、bioinformatics 解析を行い、二尖弁の上行大動脈拡大症例における WSS 発現と遺伝子発現との関連性を解析した。

4. 研究成果

(1) 二尖弁症例の胸部大動脈拡大と大動脈弁癒合形態との関連性の検討

自治医大さいたま医療センターでの大動脈二尖弁手術実施 210 症例の弁尖形態を解析した。これまでの諸家の報告に合致し、当施設での検討でも、raphe を有する Sievers type 1L-R 型が AS・AR 双方で最も頻度が高く、他には type 1R-N 型、type 0 lat 型を多く認めた。

手術術式は、単独 AVR72 例 (34%)・AVR を含めた複合手術 134 例 (64%)・基部置換術 4 例 (2%)・上行 (+ 弓部) 大動脈置換術は 83 例 (40%) であり、在院死亡率は 0.5% (1/210) であった。

体表面積で大動脈径を補正した aortic size index: ASI (最大短径 (cm) / 体表面積 (m²)) > 2.75 (cm/m²) が、遠隔期の大動脈イベント発症の予測因子として報告されている (*Ann Thorac Surg* 2006;81:169)。ASI > 2.75 を上行大動脈拡大として定義し、大動脈二尖弁手術症例を検討すると、上行大動脈拡大は 75 例 (35%) に認めた。AR 群に比べ、AS 群は上行大動脈拡大の頻度は高かった (AS 群 40% (65/164) vs. AR 群 20% (10/50), $P=0.01$)。しかしながら、AS・AR 両群ともに、大動脈拡大と Sievers 分類による弁尖癒合形態との関連性は本検討では確認できなかった。本研究成果は 2015 年度日本血管外科学会で発表した (学会発表)。

(2) CFD 解析による患者特異的な WSS 分布に関する検討

これまでの 4D-MRI を使用した血流解析研究において、二尖弁 AS 症例は三尖弁 AS 症例と異なり、特有の helical flow と WSS 分布図を呈することが報告された (*JACC Cardiovasc Imaging* 2011;4:781)。今回、我々は、埼玉大学機械工学部中村博士との共同で、大動脈二尖弁症例 12 例と陰性コントロール群 3 例の合計 15 症例において、PC-MRI 計測に基づく CFD 血流解析を行い、各症例における上行～弓部大動脈での血行力学因子の解析を行った。両群の患者基本情報、心臓エコー検査所見、CT で計測した大動脈径に関する情報を表 3 に示す。左室駆出率や左室径などは 2 群間に有意差は認めなかったが、体表面積で補正した大動脈径の比較では、腕頭動脈起始部において、大動脈二尖弁群で大動脈径の拡大を認めた。

大動脈二尖弁群 12 例の弁尖形態と大動脈形態の検討では、(1) で示された代表的な弁尖癒合形態 Sievers 分類 type 1 L-R 4 例・type 1 R-N 2 例・type 0 lat 4 例の他、type 0 ap 2 例を解析対象とした。

代表的 CFD 解析画像 (流線解析) では、正常大動脈弁群は、大動脈弁を介して、上行大動脈内では長軸方向に非回旋性の血流パターンを呈する。これに対し、二尖弁群の大多数 (12 例中 11 例) は、流速の早い右回旋の血流パターンを上行大動脈内に認めた。二尖弁症例の 1 例 (type 1 R-N) のみが、左回旋の血流パターンを呈した。

対照群も含めた全 15 症例の WSS 分布に関する CFD 解析をおこなった。尚、三尖弁 AS に関しては、二尖弁 AS 症例で、大動脈拡大のない 3 症例の大動脈形態情報を使用し、CFD simulation を行った。対象群は上行弓部大動脈で WSS の上昇は認めなかったが、三尖弁 AS 群・大動脈二尖弁群の全例で WSS 上昇を認めた。特に大動脈二尖弁群では、上行大動脈の右側 (大彎側) を中心に WSS の上昇を広範囲に認める症例が多かった。

上記 3 群の WSS 関連因子の比較では、上行大動脈内での最大 WSS、WSS 上昇 (5Pa 以上と定義) 領域双方とも、大動脈二尖弁群が最も高く、対照群と比較し有意差を認めた。

(3) 二尖弁大動脈拡大例における WSS 高・低部での大動脈壁内遺伝子発現解析

上記 (2) で確立した WSS mapping 法に基づき、上行大動脈拡大 (ASI > 2.75) を呈する二尖弁症例 4 例を対象として、WSS 高・低部で内中膜組織を採取後、RNA (RIN 値 > 5.0) を精製し、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を施行した。

全 4 例において、有意な発現変動 (> 2 fold change (FC)) を認めた遺伝子群は、42,545 遺伝子中 257 遺伝子 (0.6%) であり、内訳は高 WSS 群で発現減弱: 7 遺伝子、発現増強: 250 遺伝子であった。NextBio software による gene ontology 解析では、複数の炎症関連の ontology term が、高 WSS 群で down-regulation していた。また、blood vessel morphogenesis や extra-cellular matrix 関連遺伝子も高 WSS 群で発現減弱を認め、高 WSS 部位で MMP13 (FC:2.0)、MMP21 (FC:2.5)、MMP25 (FC:3.1) の発現上昇が確認された。

これらの研究成果は米国胸部外科学会 (AATS Aortic Symposium 2016, New York) で発表し優秀演題 (preliminary citation) に選出された (学会発表)。遺伝子解析を除く研究成果は論文 で発表した。遺伝子解析に関しては、当グループの大動脈解離に関する研究 (*EJCTS* 2017;doi:10.193/ejcts/ezx095) で使用した解離サンプルと高 WSS サンプルに正の相関を認め、発現変動する遺伝子群に高頻度の重複を認めた。今後、症例を増やして本

研究を継続し、血行力学因子が二尖弁症例の胸部大動脈に及ぼす影響を、分子細胞レベルで多角的に究明する予定である。

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

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

木村直行, 川人宏次, 中村匡徳, 沼田尚己, 岡村誉, 伊藤智, 由利康一, 松本春信, 山口敦司, 安達秀雄. 弁形態分析に基づく大動脈二尖弁に伴う上行大動脈拡大の関連因子の検討. 第43回日本血管外科学会 2015年6月4日 横浜

Kimura N, Kawahito K, Komiya K, Numata N, Yamaguchi A, Misawa Y, Nakamura N, Adachi H. Patient-specific evaluation of hemodynamics in bicuspid aortopathy by MRI-based computational fluid dynamics. AATS Aortic Symposium, New York, May 12, 2016

〔発表論文〕(計2件)

Kimura N, Nakamura M, Komiya K, Nishi S, Yamaguchi A, Tanaka O, Misawa Y, Adachi H, Kawahito K. Patient-specific assessment of hemodynamics by computational fluid dynamics in patients with bicuspid aortopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2017;153:S52-S62.

Kawahito K, Kimura N, Komiya K, Nakamura M, Misawa Y. Blood flow competition after aortic valve bypass: an evaluation using computational fluid dynamics. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2017;24:670-676.

〔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

川人 宏次 (KAWAHITO Koji)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90281740

(2) 研究分担者

木村 直行 (KIMURA Naoyuki)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20382898

中村 匡徳 (NAKAMURA Masanori)

埼玉大学理工学研究科機械工学科・准教授

研究者番号：20448046

(3) 連携研究者

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)