

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10636

研究課題名(和文) 低侵襲心臓手術治療成績向上に向けた術後炎症反応の病態解明

研究課題名(英文) Suppressed immune response following minimally invasive cardiac surgery

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：70歳以上の大動脈弁狭窄症症例を対象に、大動脈弁置換術群(S群, n=11)と経カテーテル大動脈弁移植術群(TAVI; T群, n=12)に分類し、網羅的サイトカイン濃度の計測実験を行った。術後24時間以内に、合計71サイトカイン中23が有意な発現変動を認めた。発現変動パターンから以下3群に分類した。A群：術直後S群で発現増加するが、24時間後に両群とも発現低下(CCL2・他3)。B群：術直後・24時間後、S群で発現増加するが、T群で発現増加は緩徐(IL-6・他8)。C群：その他(IL-5・他9)。pathway解析の結果、IL-1やTNFに関連した炎症経路がTAVI後発現変動していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低侵襲心臓手術と通常の心臓手術における術後炎症反応の相違を、網羅的に解析した報告はごく稀であった。今回、国内外の他研究機関に先駆け、71個のサイトカイン濃度を、手術前・術直後・24時間後の3時相で計測し、TAVI手術の低侵襲性を炎症反応という視点から解析した。本研究でもIL-6などの炎症性サイトカイン濃度の発現抑制をTAVI群で確認した。さらに、TAVI群で発現減弱する炎症経路として、IL-1・TNFなどが同定された。本研究成果は、TAVI手術の低侵襲性を分子レベルで明らかにするだけでなく、心臓手術の治療成績向上に向けた新規治療法開発の基盤となりうるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed cytokine profiling in a surgical aortic valve replacement (SAVR) group (n=11) and transcatheter aortic valve implantation (TAVI) group (n=12). By measuring normalized concentrations of 71 cytokines at 3 time points, we found a significant difference (defined as fold change >1.7 and p <0.05) in 23 cytokines. The differentially expressed cytokines fell into 3 clusters: cluster A (high increase following SAVR and suppressed increase following TAVI only immediately after surgery [CCL2, 3 others]), cluster B (high increase following SAVR and suppressed increase following TAVI at 2 time points [IL-1Ra, IL-6, 7 others]), and cluster C (various patterns [IL-5, 10 others]). Gene enrichment analysis identified multiple pathways associated with the inflammatory responses in SAVR and altered responses in TAVI, including cellular responses to TNF (p = 0.0035) and IL-1 (p = 0.0062). A robust inflammatory response follows SAVR, and a comparatively attenuated response follows TAVI.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：大動脈弁狭窄症 大動脈弁置換術 経カテーテル大動脈移植術 炎症反応 サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 急速に進行する日本人人口の高齢化に伴い、大動脈弁狭窄症例を含めた心臓弁膜疾患罹患症例は近年増加傾向である。高齢で手術リスクが高い症例に対しても実施可能な低侵襲心臓弁膜症手術は、欧米を中心に目覚ましい技術発展と急速な普及拡大を認め、本邦においても、手術実施件数は増加している。低侵襲心臓手術の大きな利点の1つが、体外循環や surgical trauma により誘発される開心術後の炎症反応の抑制である。これまでも、低侵襲心臓手術術後の血液中サイトカイン濃度減少の報告はあったものの、低侵襲心臓手術と通常的心臓手術における術後炎症反応の相違を、網羅的に解析した報告はごく稀である。

(2) 当診療グループは、低侵襲心臓弁膜症手術として、右開胸僧帽弁手術(MICS 僧帽弁手術)や経カテーテル的大動脈弁移植術(transcatheter aortic valve implantation; TAVI)を導入し、近年積極的に施行してきた。

2. 研究の目的

(1) 大動脈弁狭窄症例のうち、経大腿動脈アプローチ TAVI (transfemoral TAVI; TF-TAVI)と胸骨正中切開の外科的大動脈弁置換術(surgical aortic valve replacement; SAVR)を施行した症例を対象として、両群の治療成績を比較検討するとともに、周術期の血液データの相違を、白血球数を中心に解析した。

(2) 大動脈弁狭窄症例のうち、経大腿動脈アプローチ TAVI (TF-TAVI)と胸骨正中切開の外科的大動脈弁置換術(SAVR)を施行した症例を対象として、周術期のサイトカイン濃度を網羅的サイトカインパネル実験で比較し、TAVI 治療の低侵襲性を分子レベルで解析することを目的とした。

3. 研究の方法

以下の研究は自治医科大学附属さいたま医療センターの単施設研究であり、同研究倫理委員会の承認の元、施行した(承認番号:S18-165)。

(1) 大動脈弁狭窄症例に対する TAVI 治療を当施設では 2014 年から開始した。経心尖部アプローチ TAVI (transapical TAVI) 症例・透析症例・免疫抑制剤内服症例・血液疾患罹患症例・周術期補助循環装置使用症例は研究対象から除外した。2009 年 1 月~2018 年 12 月までに重症大動脈弁狭窄症の診断で待機的手術治療を行った年齢 80 歳以上の高齢患者 230 症例を対象として、SAVR 群 (n=128) と TF-TAVI 群 (n=102) の 2 群に分類し、早期治療成績(在院死亡率・合併症率など)と周術期の血液データを比較検討した。又、年齢・性別・併存疾患・術前内服薬を傾向スコア法により 104 症例 52 ペアでマッチングさせリスク調整した後に、周術期の血液データを 2 群間で比較検討した。

(2) 2018 年 4 月~2019 年 1 月までに重症大動脈弁狭窄症の診断で待機的手術治療を行った年齢 70 歳以上の高齢患者 24 症例 (SAVR 群・TF-TAVI 群各 12 例) を対象とした。本研究は、治療方法の無作為振り分け試験ではなく、(1) と同じ除外基準を設け、手術術式が決定してから研究参加の依頼を行なった。尚、SAVR 群 1 例は術後早期に輸血治療を行ったため、解析対象から除外した。最終的に周術期に輸血治療を施行しなかった 23 例 (SAVR 群 n=11・TF-TAVI 群 n=12) を対象として、早期治療成績(在院死亡率・合併症率など)と周術期の血液データを比較検討した。血液サンプル実験に関しては、術前・手術直後・手術 24 時間後の 3 時相で採血後血漿成分を抽

出した後に凍結保存した。その後、凍結した血漿サンプルは解凍させて実験を行なった。Milliplex MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panels I・II・III(HCYTMAG-60K-PX38, HCP2MAG-62K-PX23, HCYP3MAG-63K-11, Merck Millipore, Billerica, MA) を使用し、各時相における 71 種類のサイトカイン・ケモカイン濃度を計測した。術後の計測データは術前計測データで normalization した後に、fold changes >1.7 と Mann-Whitney U-test での $p < 0.05$ を満たす場合を発現格差ありと判定し、Subio Platform (<https://www.subioplatform.com>) を使用して有意差を認めたサイトカイン・ケモカイン群の階層別クラスタリング解析を行なった。さらに、DAVID functional annotation tool (<https://david.ncifcrf.gov/>) を使用して pathway 解析を行ない、TAVI 手術により影響を受ける免疫応答経路の同定を行なった。

4 . 研究成果

(1) 現在、我が国では TAVI 手術は、80 歳を超えるような高齢患者を中心に施行されている。そこで、これまで当科で手術治療を行なった 80 歳以上の大動脈弁狭窄症例を対象とし、後方視的に SAVR 群 ($n=128$) と TF-TAVI 群 ($n=102$) の治療成績と術後血液データの比較を行なった。SAVR 群と比較し、TF-TAVI 群は高齢で (中央値 [4 分位範囲]) 82 [80, 83] 歳 vs. 86 [83, 88] 歳, $p < 0.001$) であったが、術前の STS スコアは同等であった (SVAR vs. TF-TAVI; 6.8 [5.0, 8.5] vs. 6.8 [4.2, 8.3])。手術因子の比較では、手術時間 (289 [255, 348] 分 vs. 127 [111, 149] 分, $p < 0.001$) ・出血量 (350 [236, 550] mL vs. 15 [0, 50] mL, $p < 0.001$) が TF-TAVI 群で有意に減少していた。治療成績は、在院死亡率が SAVR 群 3% ・ TF-TAVI 群 0% と有意差は認めなかったが、長期人工呼吸器管理 (>48 時間) は TF-TAVI 群で減少 (13% vs. 0%, $p < 0.001$) し、完全房室ブロック発生率は TF-TAVI 群で上昇していた (0.8% vs. 8%, $p < 0.001$)。両群間の周術期の血液データの推移を図 1

に示す。SAVR 群・TF-TAVI 群両群ともに、術後 0-48 時間後の白血球数の増加とヘモグロビン濃度・血小板数の減少を認めたが、TF-TAVI 群の方が同変化は緩徐であった。AST・ALT・CK 値に関しても、両群ともに術前値より術後濃度増加を認めたが、TF-TAVI 群で増加が緩徐であった。傾向スコアマッチングによる 52 ペアの血液データ解析でも同様の結果が確認された。以上、手術時間・出血量の減少、術後呼吸器合併症発生率の低下、白血球数・肝 / 筋逸脱酵素濃度の減少が TAVI 群で認められた。

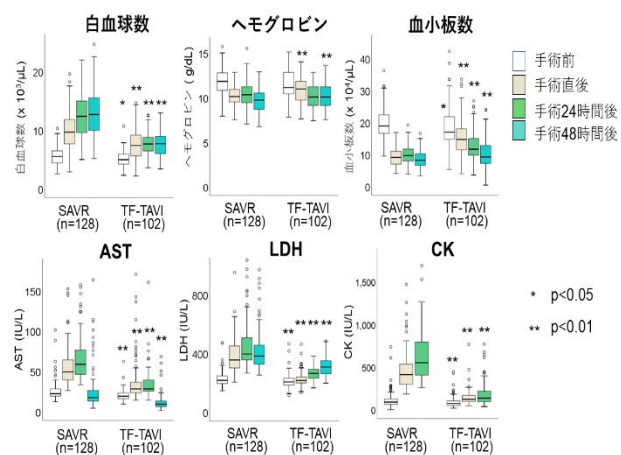


図 1 周術期血液データの推移

(2) 70 歳以上の SAVR 群 ($n=11$) と TF-TAVI 群 ($n=12$) を対象として、周術期サイトカイン・ケモカイン濃度の計測実験を実施した。SAVR 群と比較し、TF-TAVI 群は高齢で (77 [74, 81] 歳 vs. 84 [81, 85] 歳, $p=0.002$) であったが、他性別・身長 / 体重・併存疾患・術前内服薬・心臓超音波検査所見 (大動脈弁圧格差・左室駆出率など) に有意差は認めなかった。手術因子の比較では、手術時間 (270 [244, 289] 分 vs. 126 [108, 144] 分, $p < 0.001$) ・出血量 (409 [370, 475] mL vs. 20 [5, 50] mL, $p < 0.001$) が TF-TAVI 群で有意に減少していた。両群とも全例生存退院し、合併症頻度に差はなかったものの、ICU 滞在期間 (5 [4, 6] 日 vs. 2 [2, 2] 日, $p < 0.001$) ・術後在院期間 (15 [13, 20] 日 vs. 8 [7, 9] 日, $p < 0.001$) は TF-TAVI 群で減少していた。術前血液データは両群間で有意差は

なかった。術直後の白血球数 (x 103/ μ L) は (8.1 [7.5, 12.7] vs. 6.9 [5.3, 10.0], p=0.056) と TF-TAVI 群で減少傾向であり、術後 24 時間後の白血球数 (x 103/ μ L) は (11.4 [10.9, 16.0] vs. 8.1 [5.7, 9.2], p<0.001) と TF-TAVI 群で減少していた。

サイトカイン・ケモカイン濃度の計測実験では、71 サイトカイン/ケモカインのうち 11% (CCL2, CCL8, CCL22, FGF-2, IL-5, LIF, TGF- α , TPO) が術前血中濃度の有意差 (p<0.05) を認められた。normalization前の計測値の比較においては、全サイトカイン/ケモカインのうち42% (30/71) が、術直後・24時間後の両方もしくはどちらかにおいて、計測値に有意差 (p<0.05) を認めた。代表的サイトカインの血中濃度の推移を図2に示す。G-CSF, IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-10 濃度は両群ともに術後上昇していたが、TF-TAVI群の上昇が緩徐であった。TRAIL濃度は両群ともに術直後上昇していたが、TF-TAVI群では24時間後に術前値より低下していた。術後のIFN- γ , IL-17A濃度は両群間に有意差はなかった。TNF- α 濃度はSAVR群で術直後増加していたが、有意差は認めなかった (p=0.056)。

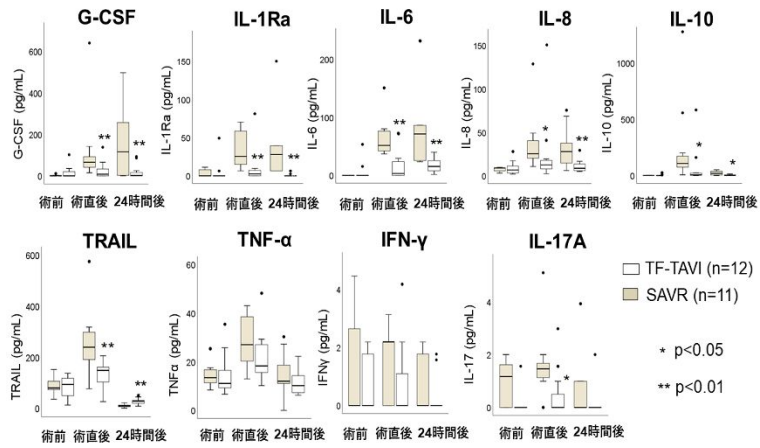


図2 代表的サイトカイン・ケモカイン濃度の推移

(3) 術前値によるnormalization後、32%にあたる23サイトカイン/ケモカインで、術直後・24時間後の1もしくは2時相において、発現格差 (fold change>1.7かつp<0.05) を認めた。階層型クラスタリングでは、発現変動のパターンから以下の3群に分類された。

Cluster A: 術直後SAVR群で有意に上昇するが、24時間後に両群ともに発現低下 (CCL2, CCL4, IL-12p40, IL12p70)

Cluster B: 術直後・24時間後の両時相でSAVR群の発現増加を認めるが、TF-TAVI群で発現増加は減弱 (CCL20, IL-6, IL-8, IL-28A, GCSF, IL-1Ra, IL-11, IL-10, CCL26)

Cluster C: その他の発現パターン (CCL8, XCL1, IL-5, TSLP, CCL17, CXCL1, CCL11, TRAIL, CCL19, LIF)

この結果に基づき、バイオインフォマティクス解析を実施したところ、cellular response to tumor necrosis factor (p=0.0035), cellular response to interleukin-1 (p=0.0062), monocyte chemotaxis (p=0.0101) などの炎症経路がTAVI手術で発現変動することが明らかになった (表1)。

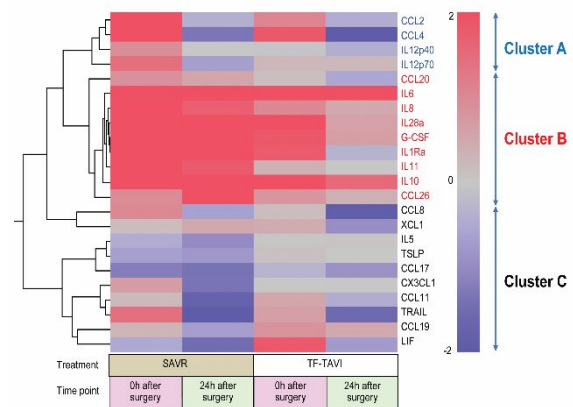


図3 発現格差を認めたサイトカイン・ケモカインの階層別クラスタリング

Pathway	p Value
Cellular response to tumor necrosis factor	0.0035
Cellular response to interleukin-1	0.0062
Monocyte chemotaxis	0.0101
Cellular response to interferon-gamma	0.0101
Positive regulation of extracellular signal-regulated kinase 1 and extracellular signal-regulated kinase 2 cascade	0.0393
CC chemokine, conserved site	0.0492
Cellular response to lipopolysaccharide	0.0509
Cytokine-cytokine receptor interaction	0.0510
Neutrophil chemotaxis	0.0589
CCR chemokine receptor binding	0.0697

表1 TF-TAVI で発現変動する Top10 炎症 pathway

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kimura N, Nomura Y, Aomatsu A, Matsuda A, Imamura Y, Taniguchi Y, Hori D, Morishita Y, Fujita H, Yuri K, Matsumoto K, Yamaguchi A	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of transcatheter aortic valve implantation on the immune response associated with surgical aortic valve replacement	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.amjcard.2020.04.037	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山口敦司
2. 発表標題 安全性を重視した簡便な右開胸MICS手術マニュアル
3. 学会等名 第3回Japan MICS summit
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口敦司, 由利康一, 木村直行, 堀大治郎, 板垣 翔, 佐藤哲也, 野村陽平, 今村有佑, 草処 翔
2. 発表標題 ランチオンセミナー講演；安全性を重視した簡便な右開胸MICS手術マニュアル
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 山口敦司
2. 発表標題 シンポジウム講演．安全な心臓外科手術手技
3. 学会等名 第80回日本臨床外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口敦司
2. 発表標題 最新の心臓血管外科診療 患者さんにやさしい心臓手術
3. 学会等名 大宮医師会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村有佑、由利康一、木村直行、松永渉、板垣翔、堀大治郎、松本春信、讃井将満、山口敦司
2. 発表標題 超高齢者の大動脈弁狭窄症に対するTAVRとSAVRの治療成績
3. 学会等名 第70回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 野村陽平、木村直行、青松昭徳、松田明生、今村有佑、谷口陽介、堀大治郎、白石 学、坂倉建一、和田 浩、藤田英雄、由利康一、松本健治、山口敦司
2. 発表標題 TAVRによる術後免疫応答抑制に関する研究
3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Nomura Y, Kimura N, Aomatsu A, Matsuda A, Imamura Y, Taniguchi Y, Hori D, Shiraishi M, Sakakura K, Wada H, Fujita H, Morishita Y, Yuri K, Matsumoto K, Yamaguchi A
2. 発表標題 Transcatheter aortic valve replacement suppresses postoperative immune responses
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020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	木村 直行 (KIMURA NAOYUKI) (20382898)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	
研究 分担者	吉崎 隆道 (Yoshizaki Takamichi) (20743115)	自治医科大学・医学部・臨床助教 (32202)	2019年4月～施設異動のため、研究チームから離脱
研究 協力者	松本 健治 (Matsumoto Kenji) (60181765)	国立成育医療研究センター・免疫アレルギー・感染研究部・部長	