

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15884

研究課題名（和文）メタボローム解析によるフォンタン術後単心室患者の代謝特性の解明

研究課題名（英文）A comprehensive analysis of plasma metabolites in patients with single ventricular physiology after Fontan operation

研究代表者

元木 倫子 (Motoki, Noriko)

信州大学・医学部・講師（特定雇用）

研究者番号：70750701

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：代謝産物を網羅的に解析するメタボローム解析を行い、単心室であるフォンタン術後患者特有の指標や予後を規定する物質を探索した。

31の血漿サンプルのメタボローム解析結果を最終解析対象とした。18歳以上のフォンタン術後患者14人（F群）の血漿代謝物を、二心室修復術後患者9人（B群）と健康対照群8人（N群）と比較し、関連の有無を解析した。解糖系、TCA回路、尿素回路の代謝物濃度に有意な差を示した。2-オキソグルタル酸、イソクエン酸、cis-アコニット酸、アルギニンは2つの対照群と比較してF群で有意に高値であった。多変量解析では、2-オキソグルタル酸とcis-アコニット酸がフォンタン患者と関連していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フォンタン手術の進歩により、単心室患者の長期生存例が増加している。しかし、フォンタン術後特有の血行動態（高い中心静脈圧、低心拍出、低酸素血症など）により、心不全や不整脈などの心臓合併症だけでなく多臓器に渡る多種多様な合併症を認め、長期予後を左右する。

本研究では、メタボローム解析で得られたTCA回路に関連する有機酸の濃度（2-オキソグルタル酸とcis-アコニット酸）は、フォンタン患者を特徴付ける独立した因子であることがわかった。本研究の結果が、フォンタン術後患者の無症候性で長期予後と関連する合併症（フォンタン関連肝障害など）の新しい診断方法や治療法などの開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to comprehensively evaluate the metabolomic profile of adult Fontan patients and characterize its pathophysiology in relation to 2 control groups.

We performed metabolomic analysis of 31 plasma samples using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. This observational cross-sectional study compared plasma metabolites in 14 heterogeneous adult Fontan patients with those in age-and sex-matched controls including 9 patients with congenital heart disease after biventricular repair and 8 normal healthy controls.

Fontan patients exhibited significant differences in some intermediate metabolite concentrations in the tricarboxylic acid cycle, and the urea cycle. Plasma level of 2-oxoglutaric acid, isocitric acid, cis-aconitic acid, and arginine were significantly increased in Fontan group compared with 2 control groups. After multiple logistic regression analysis, 2-oxoglutaric acid and cis-aconitic acid were independently associated with Fontan patients.

研究分野：小児循環器

キーワード：メタボローム フォンタン術後 単心室血行動態 フォンタン関連肝障害

## 1. 研究開始当初の背景

### 背景 1：成人期を迎えたフォンタン術後の単心室血行動態患者

複雑心奇形の一つである単心室血行動態をもつ患者の成人期以降の合併症や長期予後に注目が集まっているが、未だ不明な点が多い。一つの心室を動脈血を駆出するための体心室として使用するため、体静脈系を肺動脈に直接あるいは導管を用いて吻合するフォンタン手術が 1970 年代より行われるようになった。この術式や周術期管理の進歩により、成人期まで生存できなかった疾患が長期生存可能となった。

しかし、フォンタン術後とはいえ、様々な合併症のリスクがある。申請者らは、単心室血行動態の成人期の合併症（心不全、不整脈、血栓症、蛋白漏出性胃腸症など）や医療介入などがフォンタン手術の有無によらず多いことを報告した<sup>1</sup>。中心静脈圧や心房圧が高く、低心拍出量であることが問題であり、そのため心不全や不整脈、運動耐容量や呼吸機能の低下を来しやすい。また、フォンタン術後という特殊な血行動態から、うっ血や微小循環障害、血管内皮障害などによる心臓以外の臓器の異常の報告も多く、腎機能異常、肝機能障害、耐糖能異常、不妊や月経異常など問題点は多岐に渡る。最近では、フォンタン術後患者は、他の二心室修復術後の患者と比較し、糖代謝、脂質代謝に違いがあると指摘されており<sup>2</sup>、フォンタン術後患者特有の代謝特性が注目されているが、そのメカニズムは未だ解明されていない。

### 背景 2：新しい代謝解析ツール：メタボロミクス

ここ数年で生体内の細胞の働きを網羅的、包括的に解析する試みが話題である。DNA 配列を網羅的に解析するゲノム解析、タンパク質を網羅的に解析するプロテオーム解析、それに加え代謝産物の網羅的解析であるメタボローム解析がある。生体内には核酸やタンパク質の他に、糖、有機酸、アミノ酸などの低分子物質が存在し、これらは生物の代謝によって生産された多様な有機化合物（代謝物質）である。メタボロミクスとは、これら約 3000 種類の代謝物質の種類や濃度を網羅的に分析、解析する手法である<sup>3</sup>。メタボロミクスは、遺伝的、環境的影響を含めた『現在』の状態を表しているため、生体の代謝プロファイルを明らかにするのみならず、疾患におけるマーカー物質の探索や、薬物による影響を調べることで創薬の開発など、様々な分野での応用が期待されている<sup>4-6</sup>。

## 2. 研究の目的

本研究では、未だ不明な点が多いフォンタン術後症例の代謝物質を血液のメタボローム解析を用いて網羅的に解析し、特有の代謝特性について明らかにする。また、予後予測指標として有用なバイオマーカーについて探索する。

## 3. 研究の方法

**対象：**フォンタン術後の単心室血行動態を有する 18 歳以上の患者（フォンタン群）対照群として、登録済みのフォンタン群と年齢、性別が適合する二心室修復術後の患者（二心室群）、正常心臓構造の健常者（正常群）をそれぞれ選定した。

**メタボローム解析による代謝産物の網羅的解析：**本研究では 18 歳以上のフォンタン術後患者 20 名を対象とした。空腹時採血を施行後直ちに血漿に遠心分離し-80 度で凍結保存した。

対照群として、二心室群 10 名、健康対照群 10 名も同様に血液サンプルを採取・保存した。キャピラリー電気泳動-質量分析装置を用いたメタボローム解析を施行し、イオン性代謝物質を解析した（外部委託）。登録時情報として、診断、術式、BMI、心拍数、血圧、経皮的酸素飽和度、血液検査（腎、肝機能、血糖、脂質、BNP など）、胸部レントゲン、心電図、心臓超音波検査、心臓カテーテル検査、合併症の有無、内服薬についての情報を診療録から収集した。登録時のメタボローム解析で得られた代謝物質の血中濃度について、フォンタン群と他対照群と比較し、3 群間に有意な差を認められたものを抽出。うち、いずれの物質がフォンタン群とその他の対照群とを区別する特有の指標となりうるか多変量解析を実施した。

**合併症の追跡調査：**初回評価から 2 年間の BNP 上昇、不整脈、心不全イベントを主要評価項目、血栓症、肝機能異常、腎機能異常、蛋白漏出性胃腸症、血糖値異常、脂質異常を副次評価項目とし、追跡した。

**統計解析：**登録時の血漿サンプルのメタボローム解析で得られた代謝物質濃度について、フォンタン群と他対照群と比較し、3 群間の年齢、BMI、代謝物濃度の比較は Kruskal-Wallis 検定を行い、性別については Fisher の正確確率検定を施行した。3 群間に有意な差を認められた物質のうち、いずれの物質がフォンタン群とその他の対照群とを区別する特有の指標となりうるか二項ロジスティック回帰分析を施行した。有意確率は 0.05 未満とした。統計解析は SPSS Statistics ver.27（IBM 社）を用いた。

#### 4. 研究成果

最終的に空腹時血漿サンプルが得られ、追跡可能であった 31 例を解析対象とした（フォンタン術後患者 14 人[F 群]、二心室修復術後患者 9 人[B 群]、健康対照群 8 人[N 群]）。メタボローム解析結果をもとに、3 群間で比較したところ、解糖系、TCA 回路、尿素回路内のいくつかの代謝物濃度に有意な差を示した。2-オキソグルタル酸、イソクエン酸、*cis*-アコニット酸、アルギニンは 2 つの対照群と比較して F 群で有意に高値であった（図 1）。



図 1、代謝回路図（解糖系、TCA 回路、尿素回路、グルタミン代謝）

フォンタン術後群（F）、二心室修復術後群（B）、健康対照群（N）の 3 群間について血漿代謝物

質濃度 (  $\mu\text{M}$  ) を比較。 \* フォンタン術後群に対して有意な差を認めた ( 有意確率 0.05 未満 )。

多変量解析では、2-オキソグルタル酸 ( 調整済みオッズ比 [OR] 1.98, 95% 信頼区間 [CI] 1.05-3.76) と *cis*-アコニット酸 ( OR 2.69, 95% CI 1.04-6.99 ) がフォンタン患者と有意に関連しており、フォンタン術後患者特有の動態を示す可能性が示唆された。

2年間の追跡期間では主要評価項目、副次評価項目ともに指摘できなかったため、診療録による追跡を継続し合併症発症の予測因子について解析する。

#### < 引用文献 >

- 1) Motoki N, Ohuchi H, Miyazaki A, et al. Clinical profiles of adult patients with single ventricular physiology. *Circ J*. 2009;73:1711-1716.
- 2) Ohuchi H, Yasuda K, Miyazaki A, et al. Comparison of prognostic variables in children and adults with Fontan circulation. *Int J Cardiol*. 2014;173:277-283.
- 3) Lewis GD, Asnari A, Gerszten RE. Application of metabolomics to cardiovascular biomarker and pathway and discovery. *J Am Cardiol*. 2008;52:117-123.
- 4) Mayr M. Metabolomics: ready for the prime time? *Circ Cardiovasc Genet*. 2008;1(1):58-65.
- 5) Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphate promotes cardiovascular disease. *Nature* 2011;472:57-63.
- 6) Wishart DS. Emerging applicants of metabolomics in drug discovery and precision medicine. 2016;15:473-84.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|