

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 5 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08082

研究課題名(和文) ミトコンドリア膜透過性遷移孔(MPTP)に着目した再灌流障害予防療法の開発

研究課題名(英文) Development of reperfusion injury prevention therapy focusing on mitochondrial membrane permeability transition pore (MPTP)

研究代表者

北端 宏規 (KITABATA, Hironori)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80438275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：当院で2018年4月1日から2019年3月31日の1年間に、185件の急性心筋梗塞(ST上昇型120件、非ST上昇型65件)に対してカテーテル治療を行った。再灌流障害は、全体の約8%に認められた。総死亡、非致死性心筋梗塞、心不全による入院、標的血管再血行再建を複合エンドポイントとした場合、1年時点で再灌流障害(+)群は有意にイベント発生率が高かった。新型コロナウイルス感染流行により研究の制限を受け、十分な動物実験を行うことができなかった。しかし、本研究の一環として再灌流障害の一つであるno-reflow現象について我々の研究チームから血管内イメージングに関する論文を発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当院における急性心筋梗塞患者の解析結果から、再灌流障害の有無で短期予後(院内と30日)に差は認められなかった。これは、カテーテル治療や抗血小板薬、スタチンなどの各種薬物療法の最近の進歩によるところが大きい。しかし、長期予後は再灌流障害群で明らかに不良であり、いったん再灌流障害を起こすとこれまでの標準的な治療では予後改善が難しいと考えられ、再灌流障害を予防できる可能性のある本研究の重要性が再認識された。そのため、科学研究費助成による研究期間は終了するが、本研究自体は継続して行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：At our institution, between April 2018 and March 2019, 185 patients with acute myocardial infarction (120 ST-segment elevation patients and 65 non-ST-segment elevation patients) underwent primary percutaneous coronary intervention. Reperfusion injury was observed in approximately 8% of patients. The composite one-year endpoint of all-cause death, non-fatal myocardial infarction, hospitalization for heart failure, and target vessel revascularization was significantly higher in the reperfusion injury (+) group. Due to research restrictions by the COVID-19 pandemic, it was not possible to conduct sufficient animal experiments. However, as part of this research, our research team published a paper on intravascular imaging in terms of the no-reflow phenomenon, which is one type of reperfusion injury.

研究分野：虚血性心疾患

キーワード：虚血再灌流障害 ミトコンドリア膜透過性遷移孔 グルカゴン様ペプチド-1 遠隔虚血プレコンディショニング

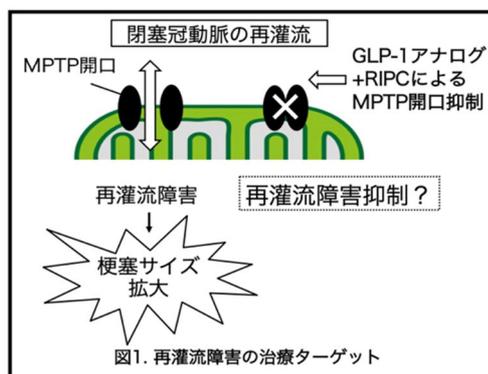
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞は、我が国の主要な死因の一つである。急性心筋梗塞に対する primary 経皮的冠動脈インターベンション (percutaneous coronary intervention: PCI) は確立された再灌流療法で、虚血心筋を救済し予後を改善する。一方、急速な閉塞冠動脈の再灌流は心筋細胞壊死を誘発する事がある。この現象は再灌流障害と呼ばれ、いったん生じると梗塞サイズが拡大し、結果的に予後悪化を招く(文献)。そのため primary PCI の効果を最大化するためには、如何に再灌流障害を抑制するかがポイントになる。

再灌流障害治療法として再灌流前の遠隔虚血プレコンディショニング (remote ischemic preconditioning: RIPC) は、心臓以外の部位に短時間の虚血を誘発することにより再灌流障害を軽減する治療法である(文献)。例えば上腕に血圧カフを巻き付け膨張と解除を繰り返す。簡便かつ安全性が高い治療法であるが、複数の大規模臨床試験の結果、RIPC の効果は限定的もしくは否定的であった(文献)。そのため、RIPC には何らかの併用療法が必要と考えられている。また、これまでの研究成果から、再灌流時のミトコンドリア膜透過性遷移孔 (mitochondrial permeability transition pore: MPTP) 開口が再灌流障害発生のメインスイッチである事が判明している(図1)。MPTP の開口は、再灌流直後数分間以内に起きるため、再灌流前から如何に MPTP の開口を抑制するかが、再灌流障害抑制治療戦略の鍵となる。例えば直接的 MPTP 開口阻害薬である免疫抑制薬サイクロスポリン A を用いた大規模臨床試験が行われたが有効性を示すことができなかった(文献)。

グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) は血糖値が高い場合にのみインスリンを分泌させる特徴をもつインクレチンで、そのアナログは糖尿病治療薬として広く利用されている。最新の基礎研究から GLP-1 アナログは、糖尿病臨床の使用用量で MPTP 開口抑制作用を有することが明らかとなった(文献)。そのため、GLP-1 アナログを MPTP 開口抑制のエンハンサーとして利用すれば、治療効果および安全性の高い RIPC 療法が可能となり、急性心筋梗塞に対する primary PCI 施行時の再灌流障害が軽減し、梗塞サイズ縮小や予後改善が期待できると仮説を立てた。



2. 研究の目的

ブタ虚血再灌流モデルを用い MPTP 開口抑制効果を持つ GLP-1 アナログをエンハンサーとした再灌流前の RIPC 併用療法が再灌流障害を抑制することを明らかにし、人を対象とした前向き臨床試験により再灌流障害に対する実現可能な新規治療戦略を確立することである。

3. 研究の方法

本研究課題は大きく以下の2つに分かれる。

- (1) ブタを用いた動物実験において、急性心筋梗塞時の虚血再灌流障害発症予防に対する GLP-1 アナログと RIPC 併用療法の梗塞サイズ縮小効果の確認
- (2) 動物実験で確認された有効性を前向き臨床研究で評価し、予後改善効果の確認

(1) 【ブタ虚血再灌流心筋梗塞モデル実験】

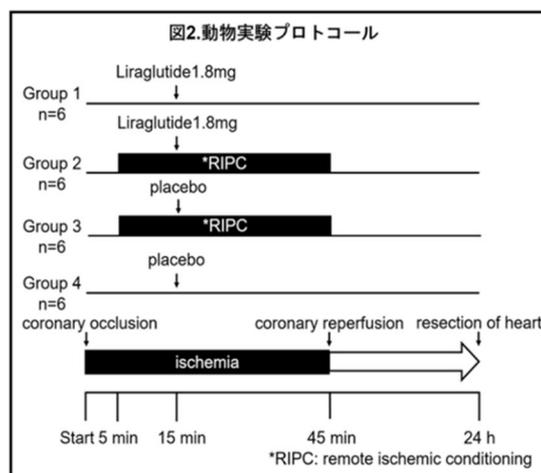
対象: ミニブタ 24 頭 (30-40kg)

実験プロトコル(図2 参照)

左冠動脈前下行枝をバルーンカテーテルにより 45 分間閉塞し急性心筋梗塞を作成し、その後バルーンを収縮し再灌流することで、虚血再灌流心筋梗塞モデルを作成する(図3)。

Group 1 (GLP-1 アナログ群): モデル作成時、liraglutide 1.8mg (0.3ml) を再灌流 30 分前に皮下投与する。

Group 2 (GLP-1 アナログ+RIPC 群): モデル作成時、liraglutide 1.8mg (0.3ml) を再灌流 30 分前に皮下投与する。再灌流 40 分前から再灌流まで RIPC を施行する。RIPC は露出した大腿動脈周囲に留置した弾性スナアを用いて、5 分間の虚血と 5 分間の再灌流を 1 サイクルとし 4 サイクル行う。



Group 3 (プラセボ+RIPC 群): モデル作成時、生理食塩水(0.3ml)を再灌流 30 分前に皮下投与し、再灌流 40 分前から再灌流まで RIPC を施行。

Group 4 (sham 群): モデル作成時、生理食塩水(0.3ml)を再灌流 30 分前に皮下投与。

採血条件、項目:全実験グループで虚血前と再灌流 5 分後に血糖測定を行う。酸化ストレスマーカーとして MDA、高感度 CRP と IL-6、抗炎症性サイトカイン IL-10、および eNOS と NO を、虚血前、再灌流 1 時間後と 24 時間後に末梢血を採取し測定する。

MPTP 開口の評価:24 時間後にペントバルビタール過麻酔(100mg/kg)により安楽死させ心臓を取り出す。梗塞部心筋組織の一部を用いて、fluorometric assay により MPTP 開口を評価する(文献)。

心筋の組織学評価:心筋の組織標本を作製する。Evans Blue と TTC により心筋を染色後、左室を短軸面で 10mm 毎にカットし、スキャナーを用いてデジタルデータ化し、リスク領域、梗塞領域を評価する。

結果の統合:上記結果を統合し、それぞれの単独療法や sham 群と比較し、GLP-1 アナログ liraglutide+RIPC の併用療法が、酸化ストレスや炎症反応などを抑制し、より梗塞サイズを縮小することを明らかにする。

(2)【前向き臨床研究】

対象:研究参加の同意が得られた急性心筋梗塞患者 50 例(心原性ショック症例は除外)

プロトコル

救急外来で、liraglutide1.8mg(0.3ml)を皮下投与し、同時に RIPC(上腕で血圧計カフにより 200mmHg までの加圧と減圧を各 5 分間, 3 サイクル)を開始する。

採血: PCI 前と、再灌流後 24 時間後まで 3 時間毎に、血糖、CK、CK-MB の測定を行う。

再灌流療法後 7 日目に心臓 MRI 検査を施行し、T2 強調画像と遅延造影からリスク領域、梗塞サイズを評価する。

主要心血管イベント(死亡、再梗塞、心不全による入院の複合エンドポイント)を一年間追跡調査する。

プロペンシティスコア・マッチング法を用いて日本循環器学会急性心筋梗塞ガイドラインを遵守した標準的治療を行ってきたこれまでの患者群と比較し、liraglutide+RIPC の併用療法の梗塞サイズおよび患者予後に及ぼす影響について明らかにする。

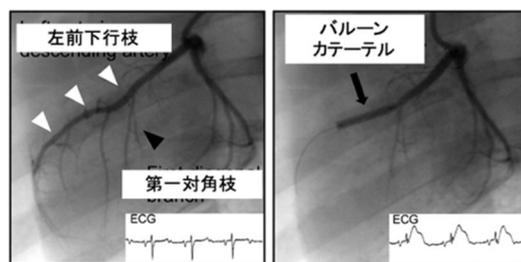
4. 研究成果

当研究を開始するにあたり、まず当院における急性心筋梗塞に対する標準的な再灌流療法時の虚血再灌流障害の頻度と院内及び退院後 30 日までの予後について調査し、以下の結果を得た。2018 年 4 月 1 日から 2019 年 3 月 31 日までの 1 年間に、当院で 247 件の PCI を施行し、内 185 件が急性心筋梗塞(ST 上昇型急性心筋梗塞 120 件、非 ST 上昇型急性心筋梗塞 65 件)に対する PCI であった。再灌流障害は、急性心筋梗塞 185 症例の約 8%に認められたが、院内及び退院後 30 日までの死亡や心筋梗塞再発などの心血管イベント発症率には再灌流障害の有無で違いは認められなかった。また、全症例に心臓 MRI での梗塞サイズの評価を行えておらず、再灌流障害の有無による梗塞サイズなどの比較を行うことはできなかった。その後、1 年までイベントの追加調査を行った。総死亡、非致死性心筋梗塞、心不全による入院、標的血管再血行再建を複合エンドポイントとした場合、再灌流障害(+)群は有意にイベント発症率が高く(46.7% 対 12.4%, $p=0.002$)、この差は、総死亡の差によるものであった(20% 対 4.1%, $p=0.037$)。非致死性心筋梗塞、心不全による入院、標的血管再血行再建それぞれのイベントに関しては、両群間で有意な差は認められなかった。上記のように、PCI 技術の進歩や抗血小板薬やスタチンなどの各種薬物療法の最近の進歩により短期予後に再灌流障害の有無で有意差は認められなかったが、長期予後の観点から再灌流障害を予防できる可能性のある本研究の重要性が再認識された。

2019 年 3 月に Cardiovascular Research Technologies2019 の学会参加に合わせ動物実験の専門施設であり、留学先であった米国 Medstar Washington Hospital Center を訪問する機会を得た。その際、ブタ虚血再灌流心筋梗塞モデル作成などの見学を行い、有意義な情報を得ることができた。帰国後、動物実験の準備を進めていたが、2019 年 4 月に他病院への異動となり動物実験のための時間の確保が困難となった。また、新型コロナウイルス感染症の流行による院内クラスター発生、有熱者外来やワクチン接種実務により研究の制限を受けた。最終年度に新型コロナウイルス感染症が第 5 類感染症となり、遂行状況は改善されたが、十分な動物実験を行うことができなかった。

現在、本研究の一環として再灌流障害の一つである no-reflow 現象に関する多施設共同前向き観察研究(和歌山県立医科大学、和歌山ろうさい病院、新宮市立医療センター、大阪公立大学の 4 施設)を開始し、症例のエントリーを進めている。急性冠症候群における no-reflow 現象の予測因子を明らかにする予定である。また、この多施設共同前向き観察研究に先立ち我々の研究チームから PCI 中の no-reflow 現象を予測する近赤外線分光法(near-infrared spectroscopy:

図3. ブタ心筋梗塞モデル



NIRS)と血管内超音波(intravascular ultrasound: IVUS) を組み合わせた NIRS-IVUS の可能性に関する論文を発表した。

引用文献

Yellon DM, Hausenloy DJ, Myocardial reperfusion injury, *N Engl J Med*, 357, 2007, 1121-35

Herrmann JL, Remote ischemic preconditioning reduces myocardial ischemia/reperfusion injury, *J Surg Res*, 159, 2010, 660-2

Bøtker HE, et al, Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial, *Lancet*, 375, 2010, 727-34

McLeod SL, et al, Remote Ischemic Preconditioning to Reduce Reperfusion Injury During Acute ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis, *J Am Heart Assoc*, 6, 2017, e005522

Cung TT, et al, Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction, *N Engl J Med*, 373, 2015, 1021-31

Ottani F, et al, Cyclosporine A in Reperfused Myocardial Infarction: The Multicenter, Controlled, Open-Label CYCLE Trial, *J Am Coll Cardiol*, 67, 2016, 365-374

Giblett JP, Glucagon-Like Peptide-1: A Promising Agent for Cardioprotection During Myocardial Ischemia, *JACC Basic Transl Sci*, 1, 2016, 267-276

Marcu R, et al, Multi-parameter measurement of the permeability transition pore opening in isolated mouse heart mitochondria, *J Vis Exp*, 67, 2012, 4131

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 Ozaki Yuichi, Kitabata Hironori, Takahata Masahiro, Katayama Yosuke, Wada Teruaki, Hikida Ryo, Taruya Akira, Shiono Yasutsugu, Kuroi Akio, Yamano Takashi, Tanimoto Takashi, Tanaka Atsushi	4. 巻 219
2. 論文標題 Intracoronary Near-Infrared Spectroscopy to Predict No-Reflow Phenomenon During Percutaneous Coronary Intervention in Acute Coronary Syndrome	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The American Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 17~24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.amjcard.2024.03.009	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾崎 雄一, 北端 宏規, 高畑 昌弘, 樽谷 玲, 和田 輝明, 太田 慎吾, 柏木 学, 塩野 泰紹, 黒井 章央, 山野 貴司, 谷本 貴志 田中 篤
2. 発表標題 Intracoronary Near-Infrared Spectroscopy to Predict No-Reflow Phenomenon during Percutaneous Coronary Intervention in Acute Coronary Syndrome
3. 学会等名 第88回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2024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
研究協力者	田中 篤 (Tanaka Atsushi) (50458072)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	
研究協力者	樽谷 玲 (Taruya Akira) (60612942)	和歌山県立医科大学・医学部・助教 (24701)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	片山 陽介 (Katayama Yosuke) (10714214)	和歌山県立医科大学・医学部・助教 (24701)	

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