

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 6 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590160

研究課題名（和文）：血小板減少症治療薬インターロイキン-11 を用いた有効な
心不全発症予防療法の確立

研究課題名（英文）：The study for the effects of Interleukin-11 on cardiac remodeling
following recanalization therapy against myocardial infarction.

研究代表者：前田 真貴子（MAEDA MAKIKO）

兵庫医療大学・薬学部・講師

研究者番号：70461168

研究成果の概要（和文）：血小板減少症治療薬インターロイキン-11（IL-11）の傷害心筋に対するポストコンディショニング効果について心筋梗塞モデル動物を用いて検討した結果、IL-11 は STAT3 を介し、心筋梗塞後の傷害心筋組織に対するポストコンディショニング効果を示し、IL-11 の心筋保護・修復・再生促進作用を有する可能性を示唆した。更に、心筋梗塞時における PCI 処置（percutaneous coronary intervention、経皮的冠動脈形成術）前後の患者血液サンプルを回収し、血中 IL-11 濃度を測定し、IL-11 血中動態について解析した。本研究により、心不全発症予防薬としての IL-11 の臨床応用に向けた基盤的研究成果を提示することができた。

研究成果の概要（英文）：Activation of cardiac STAT3 by IL-6 cytokine family contributes to cardioprotection. Previously, we demonstrated that IL-11, an IL-6 cytokine family, has the therapeutic potential to prevent adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. In this study we investigated the postconditioning effects of Interleukin-11 (IL-11) on ischemia/reperfusion (I/R) injury to address the possibility that IL-11 treatment improves clinical outcome of recanalization therapy against acute myocardial infarction. In addition, we clinically determined that the serum concentration of IL-11 before and after percutaneous coronary intervention against myocardial infarction. As a result, IL-11 administration exhibits the postconditioning effects through cardiac STAT3 activation, and the serum concentration of IL-11 was undetectable before and after recanalization therapy against myocardial infarction. The results of this study will propose the possibility of IL-11 as a novel cytokine therapy to prevent heart failure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：心筋細胞、サイトカイン、心筋梗塞、シグナル、虚血再灌流、臨床研究

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化、社会の高齢化に伴い、虚

血性心疾患の患者数は急増している。心筋梗塞の急性期死亡率は減少しているものの、慢性期心筋リモデリングにより心不全へと移

行した患者の予後は不良である。その理由は、心筋細胞は出生直後に分裂能が著しく低下することから、心筋組織の恒常性の維持は心筋保護機構と修復・再生機構に依存していると考えられるが、心筋梗塞などによる心筋傷害時の心筋保護・修復・再生に有効な治療が確立されていないことが一因として挙げられる。

Interleukin (IL)-6 関連サイトカインは心筋組織傷害後の修復・再生において重要な役割を演じていることが知られているが、IL-6 関連サイトカインの多くは全身性に炎症反応を誘発することが知られており、臨床応用するには難しいとも考えられている。そのような中、IL-6 関連サイトカインである IL-11 は、米国において血小板減少症治療薬として使用されている（商品名：Neumega[®], Wyeth 社）。このような背景から、申請者らは、IL-11 に注目し、心不全発症予防薬としての IL-11 の臨床応用に向け、心筋保護・修復・再生における有効性について検討することとした。

2. 研究の目的

本研究は、心筋における内因性の保護・修復・再生機構を賦活化することによる、新たな心不全発症予防戦略の確立を目的とし、心筋虚血時に臨床現場で実際に用いられることを前提に、IL-11 のポストコンディショニング効果を検討した。更に、IL-11 を実際に投与する際の有効血中濃度推移を把握することとした。

3. 研究の方法

(1) IL-11 の虚血/再灌流傷害時の心保護効果（ポストコンディショニング効果）の機序解明：虚血/再灌流傷害時の IL-11 投与による JAK/STAT シグナル関与の確認：

JAK/STAT3 シグナルを介する IL-11 のポストコンディショニング効果を確認するため、心筋特異的タモキシフェン誘導型 STAT3 遺伝子改変マウスを用いた。

本遺伝子改変マウスを用い、虚血/再灌流傷害時（30 分虚血/24 時間再灌流）時の IL-11 の効果を検討した。ポストコンディショニング効果を検討するため、再灌流時に IL-11 投与（3, 8, 20 and 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ）を行った。

再灌流後、心臓摘出、組織切片を作成し、TTC 染色を行った。

また、摘出した心臓から蛋白を抽出し、Western blotting 法にて STAT3 活性を解析した。

(2) イヌ心筋における IL-11 の虚血/再灌流傷害時の心保護効果（ポストコンディショニング効果）

臨床応用・実用化に向け、げっ歯類以外の大型動物（イヌ）の心筋梗塞モデルを用い IL-11 効果を検討した。動物実験は共同研究先で実施し、虚血/再灌流処置後のイヌ心筋細胞を用いて、遺伝子発現解析および免疫学的組織染色を実施した。

(3) 生体内における IL-11 発現量の解析：患者検体を用いた臨床的解析：

申請者らはこれまでの研究で、梗塞マウスにおいて IL-11 の発現量が梗塞後 1 日目に顕著に上昇し、徐々に減少することを確認した。本研究では、心筋梗塞後 PCI 処置を行った患者を対象に処置前後の血漿サンプルを回収し、血中 IL-11 濃度を ELISA 法にて測定し、処置後の病態並びに経過と血中 IL-11 濃度の関連を解析した。

また、臨床応用することを念頭に置き、薬物濃度推移を予測するためのシミュレーション解析を実施し、臨床研究の際の投与量・投与方法を決定した。

4. 研究成果

(1) IL-11 による心筋虚血/再灌流後の心保護効果；ポストコンディショニング効果

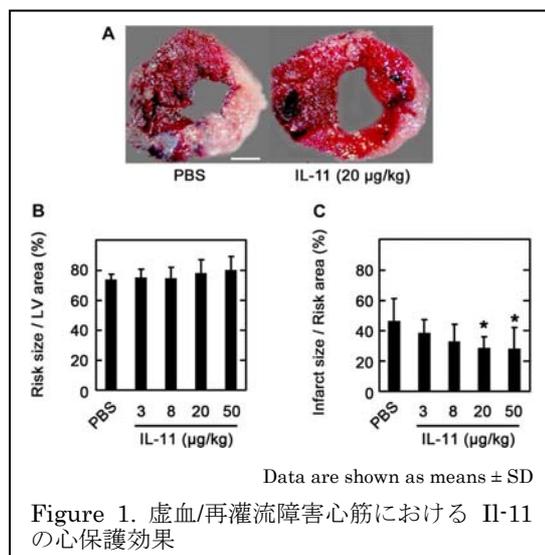


Figure 1. 虚血/再灌流障害心筋における IL-11 の心保護効果

心筋特異的 STAT3 遺伝子改変マウスモデル動物を用い IL-11 の STAT3 を介した心筋保護効果について検討した。

その結果、投与 24 時間後、IL-11 を 20 μ g/Kg および 50 μ g/Kg 投与した群では、PBS 投与群 (コントロール) と比べ有意に心筋傷害領域を抑制した (Figure 1)。

更に、経時的に心臓摘出し、STAT3 活性化を確認したところ、虚血後から徐々に STAT3 が活性化され、再灌流後 1 時間経過した時点では、無処置群と比較して有意に STAT3 が活性化されていた (Figure 2-A)。

次に、再灌流時に IL-11 投与し、15 分後の STAT3 活性化について確認した。その結果、コントロール群 (PBS 投与群) と比較して、有意に STAT3 が活性化されていた (Figure 2-B)。

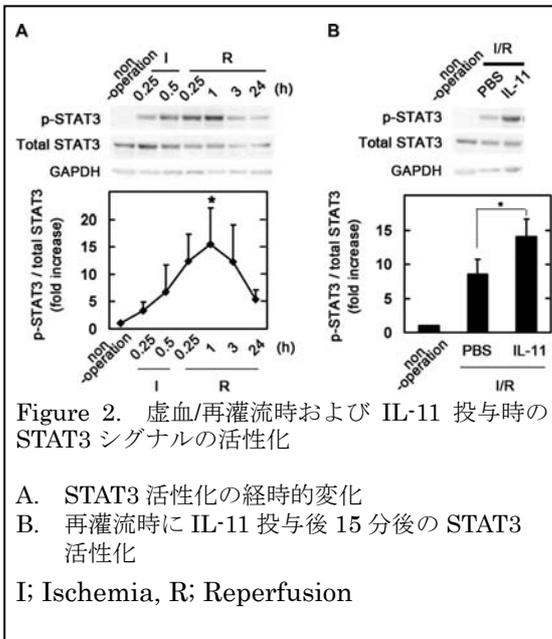


Figure 2. 虚血/再灌流時および IL-11 投与時の STAT3 シグナルの活性化

- A. STAT3 活性化の経時変化
 - B. 再灌流時に IL-11 投与後 15 分後の STAT3 活性化
- I; Ischemia, R; Reperfusion

また、再灌流時に IL-11 投与または PBS 投与後 3 時間経過した後、摘出心臓から mRNA を抽出し、活性酸素種 (ROS) による心筋傷害に対し心筋保護効果を示す metallothionein (MT) 1 および 2 の発現量を検討したところ、いずれもコントロール群と比較して IL-11 処置により MT が有意に発現誘導していることが確認された (Figure 3)。

尚、IL-11 が虚血/再灌流時に発現上昇される ROS による心筋傷害を抑制することは確認されていることより (data not shown)、虚血/再灌流によって惹起される心筋傷害に

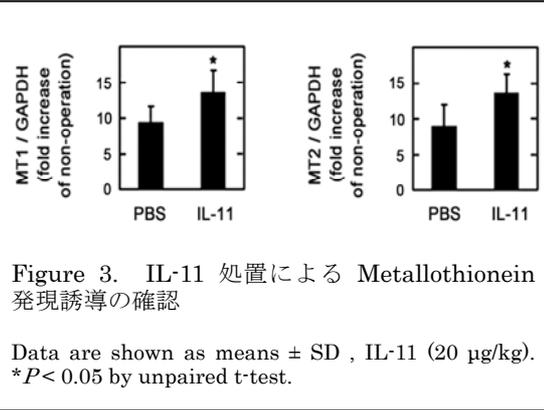


Figure 3. IL-11 処置による Metallothionein 発現誘導の確認

Data are shown as means \pm SD, IL-11 (20 μ g/kg). * P < 0.05 by unpaired t-test.

対する IL-11 のポストコンディショニング効果は、IL-11 によって STAT3 が活性化され、下流の MT が発現誘導し ROS Scavenge 効果を介し心筋保護効果を示すことを確認することができた。

(2) イヌ心筋における IL-11 の虚血/再灌流傷害時の心筋保護効果 (ポストコンディショニング効果)

虚血/再灌流障害に対する IL-11 の効果を確認するため、90 分間虚血後再灌流直前に IL-11 または PBS を静脈内投与し、24 時間後に心臓摘出し、心筋組織の TUNEL 染色、bcl-2 発現定量を行った。

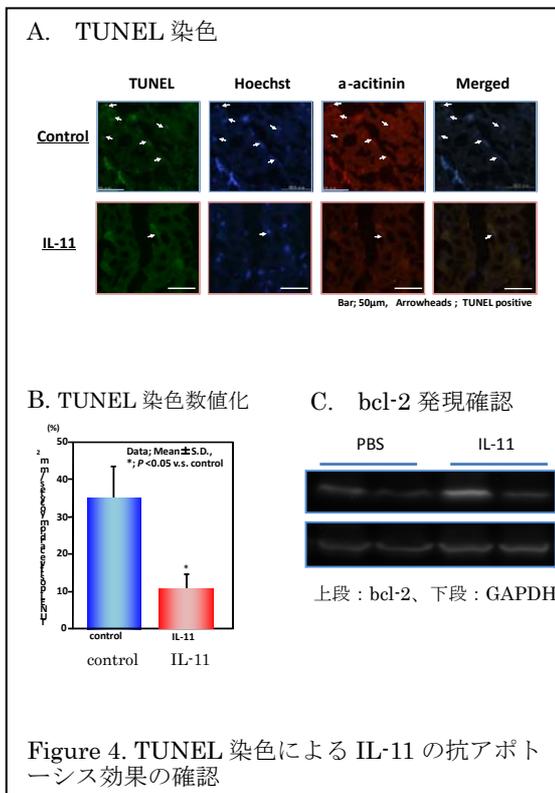


Figure 4. TUNEL 染色による IL-11 の抗アポトーシス効果の確認

その結果、IL-11 投与群では死細胞数が顕著に減少しており (Figure B. $10.9 \pm 3.8 \%$ for IL-11 v.s. $35 \pm 8.3 \%$ for control)、その効果は非虚血部の IL-11 処置による bcl-2 発現誘導による可能性が示唆された。

(3) 生体内における IL-11 発現量の解析 : 患者検体を用いた臨床的解析

急性心筋梗塞患者の PCI 処置前後の IL-11 の血中濃度測定を ELISA 法にて行った。その結果、血中 IL-11 濃度はいずれの場合においても検出限界以下であり、動物モデルにおいて認められた心筋における IL-11 の発現上昇は、局所的なものであり、IL-11 を投与した際の体内動態に影響を与えるものではないと考えられた。

また、IL-11 の投与方法、投与計画についてシミュレーション解析を実施した結果、3 時間かけて静脈内に IL-11 を点滴することで有効血中濃度に達することが予測できたので、その結果に基づき臨床研究のためプロトコル作成を行った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Obana M, Miyamoto K, Murasawa S, Iwakura T, Hayama A, Yamashita T, Shiragaki M, Kumagai S, Miyawaki A, Takewaki K, Matsumiya G, Maeda M, Yoshiyama M, Nakayama H, Fujio Y. Therapeutic administration of IL-11 exhibits the postconditioning effects against ischemia-reperfusion injury via STAT3 in the heart. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol* (2012) 303(5): H569-77. (査読有) (DOI) 10.1152/ajpheart.00060.2012
- ② Fujio Y, Maeda M, Mohri T, Obana M, Iwakura T, Hayama A, Yamashita T, Nakayama H, Azuma J. Gp130 cytokine signal as a therapeutic target against cardiovascular diseases. *Journal of Pharmacological Sciences* (2011) 117(4):213-22. (査読有)
- ③ Yamashita T, Iwakura T, Matsui K, Kawaguchi H, Obana M, Hayama A,

Maeda M, Izumi Y, Komuro I, Ohsugi Y, Fujimoto M, Naka T, Kishimoto T, Nakayama H, Fujio Y. IL-6-mediated Th17 differentiation through ROR γ t is essential for the initiation of experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Res.* (2011) 91(4):640-8. (査読有)

- ④ 尾花理徳、前田真貴子、藤尾 慈. 循環器内科 ; IL-11 の心血管系における作用. 循環器内科 (科学評論社). (2010) 67(2): 156-162. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 第85回日本薬理学会年会 2012年3月14 ~16日 国立京都国際会館 (京都)
Interleukin-11 Attenuates Infarct Size And Improves Ventricular Function In a Canine Heart Model Of Ischemia/Reperfusion Injury. Makiko Maeda, Koji Takeda, Goro Matsumiya, Junichi Azuma, Yasushi Fujio
- ② 第85回日本薬理学会年会 2012年3月14 ~16日 国立京都国際会館 (京都)
Interleukin-11 exhibits the Post-conditioning Effects against Ischemia Reperfusion injury via Cardiac Signal Transducer and Activator of Transcription 3. Kaori Miyamoto, Masanori Obana, Makiko Maeda, Hiroyuki Nakayama, Yasushi Fujio
- ③ 第118回 日本薬理学会近畿部会 2010年11月19日 千里ライフサイエンスセンター (大阪) 虚血再灌流傷害における IL-11のpost-conditioning効果について. 宮本香織、尾花理徳、前田真貴子、東 純二、中山博之、藤尾 慈

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 真貴子 (MAEDA MAKIKO)
兵庫医療大学・薬学部・講師
研究者番号 : 70461168

(2)研究分担者

東 純一 (AZUMA JUNICHI)
兵庫医療大学・薬学部・教授
研究者番号：30144463

藤尾 慈 (FUJIO YASUSHI)
大阪大学大学院・薬学研究科・教授
研究者番号：20359839