

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461099

研究課題名(和文) 低出力体外衝撃波治療による抗炎症作用の機序解明：急性心筋梗塞モデルにおける検討

研究課題名(英文) Extracorporeal low-energy shock wave therapy exerts anti-inflammatory effects in a rat model of acute myocardial infarction

研究代表者

伊藤 健太 (Ito, Kenta)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50375086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、低出力の衝撃波を用いた新しい血管新生療法(「低出力体外衝撃波治療」)を開発し、重症狭心症患者などに対する有効性・安全性を報告してきた。本研究では、低出力体外衝撃波治療の抗炎症作用に着目して、急性心筋梗塞に対する効果についてラットを用いて検討した。その結果、低出力体外衝撃波治療は、心筋梗塞後の心不全増悪を抑制することを明らかにした。さらに、その効果の機序が、血管新生作用のみならず、抗炎症作用によることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It has been previously demonstrated that extracorporeal low-energy shock-wave (SW) therapy ameliorates left ventricular (LV) remodeling through enhanced angiogenesis after acute myocardial infarction (AMI) in pigs in vivo. However, it remains to be examined whether SW therapy also exerts anti-inflammatory effects on AMI.

In the present study, we have reported that low-energy shock wave therapy suppressed post-MI LV remodeling in rats in vivo, which was associated with anti-inflammatory effects in addition to its angiogenic effects.

研究分野：循環器病学

キーワード：低出力体外衝撃波治療 血管新生 急性心筋梗塞 左室リモデリング 抗炎症作用

1. 研究開始当初の背景

我が国では、高齢化や食生活の欧米化に伴い、慢性心不全患者が大幅に増加しつつあり、今後も増加が見込まれている。慢性心不全の原因として最も頻度が多い疾患は虚血性心疾患であり、その中でも重症心不全の原因として、急性心筋梗塞が最も重要である。近年、急性心筋梗塞の発症早期にはカテーテルインターベンションによる再灌流療法が行われ、発症早期の死亡率低下に貢献している。しかし再灌流療法後、十分な薬物療法を受けていたにもかかわらず、慢性期に左室リモデリング（心拡大と収縮能低下）が進行し、重篤な心不全へ進行する例も少なくない。重症心不全患者の増加は、国民の生命予後や生活の質を悪化させ、活力ある社会の実現に障害となり、医療費増加の大きな原因にもなっている。そのため、医学的・社会的に大きな問題となっており、病態解明と新たな治療法の開発が急務となっている。

我々は、低出力体外衝撃波を用いた非侵襲性血管新生療法（「低出力体外衝撃波治療」）の開発を行ってきた。尿路結石破碎治療に用いられる出力の約 10 分の 1 という低出力の衝撃波を体外から虚血組織に照射すると、血管新生が効率よく誘導され虚血が著明に改善されることを、大型動物（ブタ）慢性心筋虚血モデル（*Circulation*. 2004）、重症狭心症患者（*Coron Artery Dis.* 2006, *Circ J.* 2011）、ウサギ下肢虚血モデル（*Tohoku J Exp Med.* 2008）、下肢閉塞性動脈硬化症患者（*Circ J.* 2012）において、世界で初めて論文発表してきた。さらに、これらの基礎的・臨床的成果に基づき、東北大学病院では、重症狭心症患者（2010年7月；先進医療承認）および下肢閉塞性動脈硬化症患者を対象に、低出力体外衝撃波治療の臨床試験を行い、有効性・安全性を確認している。

急性心筋梗塞に関しては、2種類のブタ急性心筋梗塞モデル（*Coron Artery Dis.* 2007, *Coron Artery Dis.* 2011）およびラット急性心筋梗塞モデルにおいて、急性心筋梗塞の急性期に低出力体外衝撃波治療を行うと、慢性期の左室リモデリングや心不全増悪が抑制されることを世界で初めて論文報告している。しかし、その効果は血管新生のみでは説明しきれず、有効性の詳細な機序は未だ十分には解明されていない。一方、我々は、低出力体外衝撃波治療が、ラットリンパ浮腫モデルにおいてリンパ管新生を促進してリンパ浮腫を軽減すること（*Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2011）、ラット難治性皮膚潰瘍モデルにおいて創傷治癒を促進すること（*Wound Repair Regen.* 2012）も報告している。また、整形外科領域（足底筋膜炎など）では、低出力体外衝撃波治療による抗炎症効果も報告

されている。急性心筋梗塞の急性期には、炎症細胞が梗塞巣へ浸潤し、各種液性因子の発現を介して、壊死組織の処理や組織の修復が行われる。この修復プロセスにおいて、炎症細胞・免疫細胞が重要な役割を果たしていることから、低出力体外衝撃波治療が炎症細胞・免疫細胞を介して、左室リモデリングや心不全増悪を抑制している可能性が示唆される。実際、我々は、予備実験において、低出力体外衝撃波治療が梗塞周囲領域への炎症細胞浸潤を抑制することを既に確認している。

2. 研究の目的

我々は、低出力の衝撃波を用いた新しい血管新生療法（「低出力体外衝撃波治療」）を開発し、重症狭心症患者や下肢閉塞性動脈硬化症患者において有効性・安全性を報告してきた。さらに、ラット急性心筋梗塞モデルにおいて、低出力体外衝撃波治療が慢性期の左室リモデリング（心不全進行）を抑制することを明らかにした。しかし、その効果は、血管新生のみでは説明し切れず、有効性の詳細なメカニズムは未だ十分には解明されていない。そこで、本研究では、低出力体外衝撃波治療の抗炎症作用に着目して、左室リモデリング抑制効果の詳細な機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 急性心筋梗塞モデル作成

7 週齢の SD ラットに清潔操作下で人工呼吸器を装着し、左第 4 肋間より開胸して、左冠動脈を 7-0 絹糸で結紮し閉胸する。

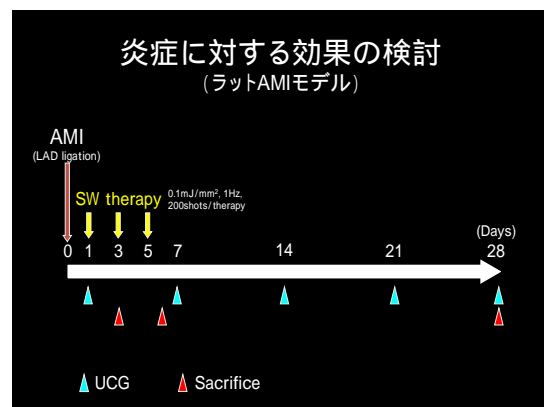


図1. 実験プロトコル

(2) 低出力体外衝撃波治療

治療群では、心筋梗塞作製翌日から隔日で3回、衝撃波治療を行う（図1）。吸入麻酔下に低出力の衝撃波（0.1 mJ/mm²）を体外から左心室全体に200発照射する。対照群では、衝撃波照射以外の操作を同様に行う。週1回心

エコーを行い、28日目には心エコーに加えて心臓カテテル検査による心機能評価を行う。その後、ラットを安楽死させて心臓・血液を摘出保存する。以前の大型動物（家畜ブタ）を用いた実験では、ブタに対する市販の抗体は種類が限られていたため、詳細な組織学的・免疫学的検討が困難であった。そのため、本研究ではラットを用いる。

(3) 組織線維化の評価

左室リモデリングにおいて重要な役割を果たす組織の線維化について、Masson-trichrome染色等を行い、衝撃波治療による線維化の違いを検討する。

(4) 炎症反応に関する組織学的検討

心筋梗塞作成 3・6・28 日後にラットを安楽死させ、摘出した心臓を用いて組織学的検討を行う。梗塞部、境界部、遠隔部のそれぞれにおいて、炎症反応に対する低出力体外衝撃波治療の影響を検討する（図 6）。HE 染色による形態的な評価に加えて、各種炎症細胞（マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞、CD4+ or CD8+ T 細胞、B 細胞、NK 細胞）の免疫染色を行い、低出力体外衝撃波治療の有無による違いを検討する。

(5) サイトカイン・ケモカインの検討

炎症細胞と組織線維化を繋ぐ要素として、各種サイトカイン・ケモカインの発現を検討する。心筋ホモジェネートおよび末梢血を用いて、PCR array や Bio-Plex で網羅的に解析した上で、差異がみられたものについて、ELISA, リアルタイム PCR により、産生動態を検討する。これらの産生細胞を組織学的に特定するために、各種炎症細胞やサイトカイン・ケモカインを蛍光抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析する。

これらの実験については、東北大学動物実験専門委員会の承認を得ている。

4. 研究成果

急性心筋梗塞後の急性期に低出力体外衝撃波治療を行うことにより、慢性期の左室拡張および収縮能低下が抑制された。つまり、左室リモデリング（心不全増悪）が抑制された（図 2）。また、衝撃波治療により、梗塞境界領域における血管新生が促進され（図 3）、左室の線維化が軽減された（図 4）。

衝撃波治療により、急性期の炎症細胞浸潤（図 5：好中球、図 6：マクロファージ）が抑制された。また、衝撃波治療により、抗炎症サイトカインの発現は亢進し、炎症促進サイトカインの発現は抑制された（図 7）。

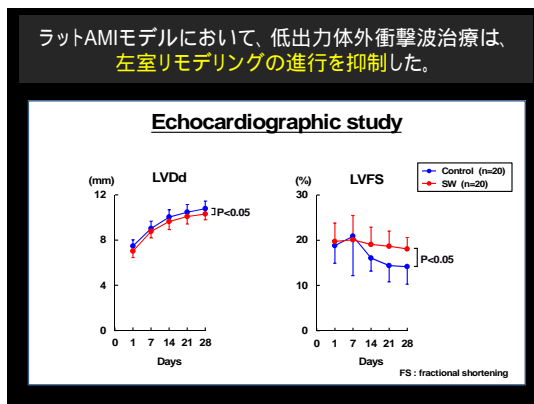


図 2. 心機能に対する効果

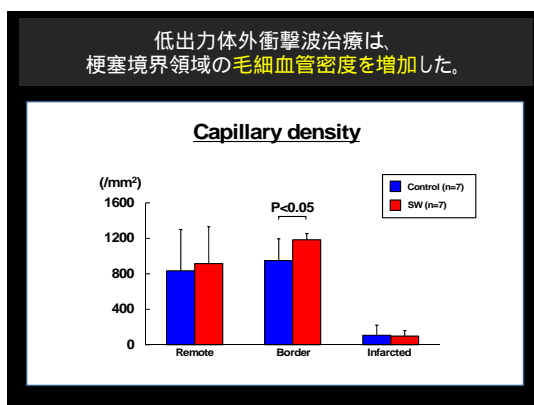


図 3. 血管新生の評価

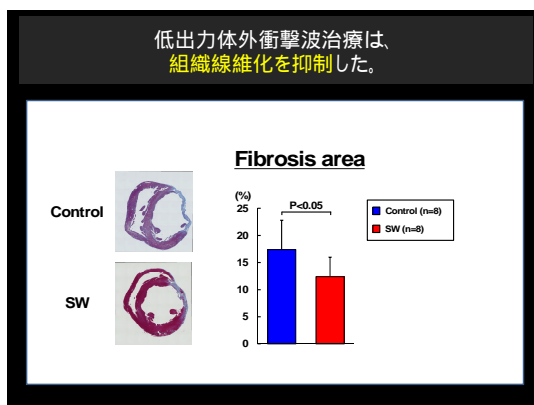


図 4. 線維化に対する効果

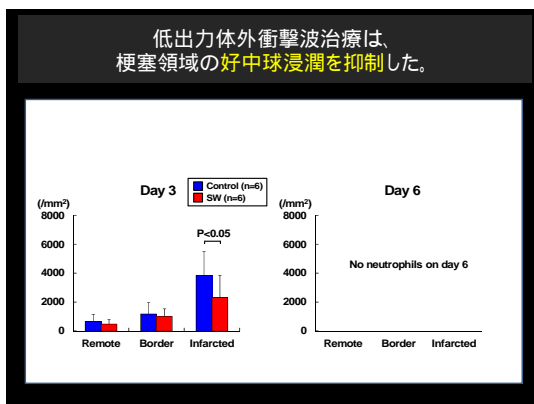


図 5. 炎症細胞浸潤に対する効果（1）

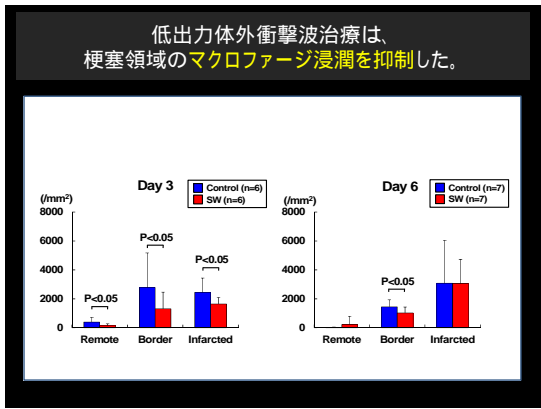


図 6 . 炎症細胞浸潤に対する効果 (2)

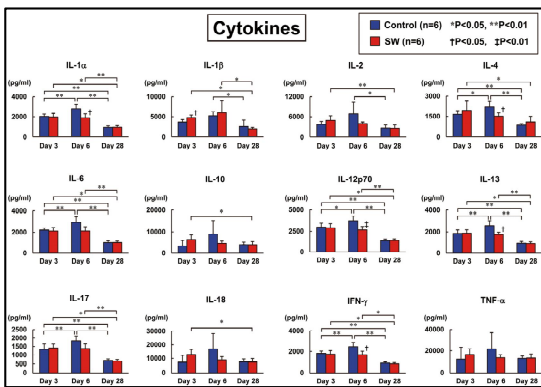


図 7 . 各種サイトカインの発現に与える効果

以上の結果から、低出力体外衝撃波治療が心筋梗塞後の左室リモデリング（心不全増悪）を抑制すること、さらに、その効果の機序が、血管新生作用のみならず、抗炎症作用によることが明らかになった。想定される機序を図 8 に示す。

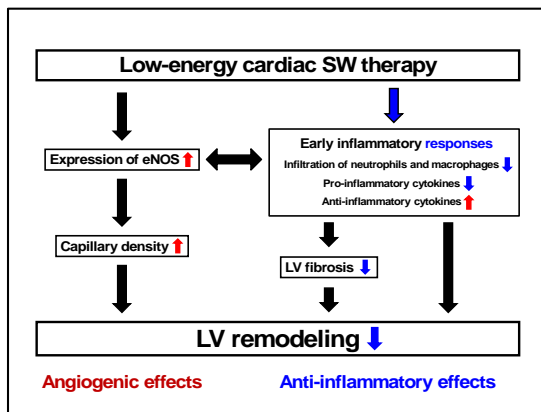


図 8 . 想定される機序

現在、急性心筋梗塞患者に対する低出力体外衝撃波治療の臨床試験は、世界で東北大学病院のみで行われている。本研究課題の成果は、急性心筋梗塞患者に対する低出力体外衝撃波治療の開発において、有効性・安全性を高める上で有用と考えられる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Abe Y, Ito K, Hao K, Shindo T, Ogata T, Kagaya Y, Kurosawa R, Nishimiya K, Satoh K, Miyata S, Kawakami K, Shimokawa H. Extracorporeal low-energy shock wave therapy exerts anti-inflammatory effects in a rat model of acute myocardial infarction. *Circ J*. 78:2915-2925, 2014. 査読有り. DOI: 10.1253/circj.CJ-14-0230

[学会発表] (計 10 件)

Ito K, Shindo T, Hatanaka K, Ogata T, Kurosawa R, Eguchi K, Kagaya Y, Nishimiya K, Tsuburaya R, Hao K, Taki H, Matsumoto Y, Takahashi J, Kanai H, Shimokawa H. Non-invasive angiogenic therapies with acoustic waves for cardiovascular diseases –Promising approaches for the future–. 第 80 回日本循環器学会学術集会 (2016 年 3 月 18 日 ~ 20 日、宮城県仙台市、仙台国際センター) .

Hatanaka K, Ito K, Shindo T, Ogata T, Kurosawa R, Kagaya Y, Eguchi K, Shimokawa H. Molecular mechanisms of angiogenic effects of low-energy shock wave therapy: Potential involvement of mechanotransduction pathways. 第 80 回日本循環器学会学術集会 (2016 年 3 月 18 日 ~ 20 日、宮城県仙台市、仙台国際センター) .

Kagaya Y, Ito K, Takahashi J, Matsumoto Y, Shiroto T, Tsuburaya R, Hao K, Nishimiya K, Shindo T, Ogata T, Kurosawa R, Eguchi K, Hatanaka K, Miyata S, Shimokawa H. Low-energy cardiac shock wave therapy ameliorates left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. 第 80 回日本循環器学会学術集会 (2016 年 3 月 18 日 ~ 20 日、宮城県仙台市、仙台国際センター) .

Ito K, Takahashi J, Matsumoto Y, Tsuburaya R, Hao K, Nishimiya K, Kagaya Y, Shindo T, Ogata T, Kurosawa R, Shimokawa H. Low-energy cardiac shock wave

therapy suppresses left ventricular remodeling after acute myocardial infarction –From bench to bedside– 第 79 回日本循環器学会学術集会 (2015 年 4 月 24 日 ~ 26 日、大阪府大阪市、大阪国際会議場)。

伊藤健太、高橋潤、松本泰治、圓谷隆治、羽尾清貴、西宮健介、二瓶太郎、下川宏明。低出力体外衝撃波治療：心血管疾患に対する新しい非侵襲性血管新生療法。第 55 回日本脈管学会総会 (2014 年 10 月 30 日 ~ 11 月 1 日、岡山県倉敷市、倉敷市芸文館)。

伊藤健太、下川宏明。低出力体外衝撃波治療と心臓リハビリテーション。第 20 回日本心臓リハビリテーション学会学術集会 (2014 年 7 月 19 日 ~ 20 日、京都府京都市、みやこめっせ)。

進藤智彦、伊藤健太、阿部謙、尾形剛、羽尾清貴、西宮健介、宮田敏、川上和義、下川宏明。低出力体外衝撃波治療は抗炎症作用を介して左室リモデリングを抑制する - ラット急性心筋梗塞モデルにおける検討 -。第 53 回日本生体医工学会大会 (2014 年 6 月 24 日 ~ 26 日、宮城県仙台市、仙台国際センター)。

伊藤健太、進藤智彦、尾形剛、畠中和明、芹澤玄、河村圭一郎、高橋潤、松本泰治、圓谷隆治、羽尾清貴、西宮健介、二瓶太郎、小鷹悠二、埴健一郎、長谷部雄飛、宇塚裕紀、平野道基、後藤均、下川宏明。心血管疾患に対する非侵襲性再生医療の開発：低出力体外衝撃波治療。第 53 回日本生体医工学会大会 (2014 年 6 月 24 日 ~ 26 日、宮城県仙台市、仙台国際センター)。

Abe Y, Ito K, Hao K, Hanawa K, Shindo T, Nishimiya K, Hasebe Y, Yamamoto H, Satoh K, Kawakami K, Shimokawa H. Extracorporeal low-energy shock wave therapy improves left ventricular remodeling and reduces inflammatory responses after acute myocardial infarction in rats. 第 78 回日本循環器学会学術集会 (2014 年 3 月 21 日 ~ 23 日、東京都千代田区、東京国際フォーラム)。

伊藤健太、下川宏明。低出力体外衝撃波治療。第 19 回日本心臓リハビリテーション学会学術集会 (2013 年 7 月 13 日 ~ 14 日、宮城県仙台市、仙台国際センター)。

〔その他〕

ホームページ

体外衝撃波治療ホームページ

<http://www.cardio.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 健太 (Ito, Kenta)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：5 0 3 7 5 0 8 6

(2) 研究分担者

下川 宏明 (Shimokawa, Hiroaki)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：0 0 2 3 5 6 8 1

川上 和義 (Kawakami, Kazuyoshi)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：1 0 2 5 3 9 7 3