

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462750

研究課題名(和文) ラット心筋虚血による梗塞巣へのサイトカイン吸着カラムを用いた血液浄化療法の効果

研究課題名(英文) Effect of blood purification therapy with cytokines adsorption column on myocardial infarction in rat

研究代表者

岡島 正樹(okajima, masaki)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：00361999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：急性冠症候群患者において早期再灌流治療は必要不可欠だが、虚血を解除後に生じる虚血再灌流障害は未だ解決されず、その機序にはサイトカインが関与している。今回ラット心筋虚血再灌流において、サイトカイン吸着カラムで過剰サイトカインを除去し、再灌流障害が軽減するかを検討する予定であった。

虚血再灌流モデルで注意すべきは、虚血の大きさである。虚血範囲が大きすぎればそれだけでショックとなり、小さすぎれば再灌流障害の程度を過小評価してしまう。このため、適切な虚血範囲を持つ虚血再灌流モデルを構築する必要があった。しかし、期間中に適切な結紮冠動脈の選択とその部位を決定することができず、一部科研費を返却するに至った。

研究成果の概要(英文)：Myocardial reperfusion therapy is essential for salvaging ischemic myocardium in clinical situations. However, reperfusion also has been reported to damage some of the myocytes, so-called lethal ischemi-reperfusion injury. Potential cause of this injury is excessive cytokine which induces apoptosis. Our aim is to examine if blood purification with cytokine adsorption column to remove excessive cytokine after myocardial ischemia-reperfusion reduce infarct size in mice.

It was very difficult to decide the size of myocardial infarction. If infarction size is large, blood purification might be difficult. On the other hand, if infarction size is small, we might underestimate the degree of myocardial ischemia-reperfusion injury. Therefore, we need to control appropriate infarct size without deteriorative hemodynamics. I tried to decide appropriate infarct size, but I could not have enough time to do that. Therefore, I refunded this Grant-in-Aid for Scientific Research.

研究分野：循環器救急

キーワード：心筋虚血再灌流 サイトカイン 血液浄化

1. 研究開始当初の背景

近年、日本においてもライフスタイルの欧米化に伴い生活習慣病患者が増加、心血管疾患による死亡率が悪性腫瘍疾患や脳血管疾患とならば3大死因の一つとなつて久しい。そのような状況で、急性冠症候群の治療において、経皮的冠動脈インターベンションに代表される早期再灌流治療は一般的な治療となり、その登場により患者の予後や QOL は大きく改善した (N Engl J Med. 360: 2165-75, 2009)。

しかし、臨床において早期再灌流に成功したにも関わらず、広範囲な心筋障害、心機能障害を残す例をしばしば経験することも事実である。そのような現象はアポトーシスに代表される「虚血再灌流障害」と呼ばれる。つまり、治療としての再灌流自体により惹起されてしまう炎症反応プロセスの活性化が、かえって心筋に傷害を与えてしまうというジレンマは、未だ解決されぬ大きな問題である。もしそのような虚血再灌流障害を抑制できれば、再灌流治療に続発する心筋のダメージが軽減され、心機能が維持されるため、早期再灌流療法に追加されるべき重要な治療戦略となりうると考えられる。

虚血にさらされた心筋は、再灌流治療により血流が回復すると、IL-1 や IL-6、TNF- などの炎症性サイトカインの産生が増加することが、心筋梗塞後や冠動脈バイパス術患者などにおいて、臨床的に認められている。そして、心筋虚血再灌流障害に、IL-1、IL-6、TNF- などの炎症性サイトカインが関与しているという多くの報告がある (Zhang M et al. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets 8: 161-172, 2008)。過剰産生されたこれらの炎症性サイトカインが、炎症反応のプロセスを活性化し、細胞浸潤促進する。また、これらの炎症性サイトカインが、death receptor やミトコンドリアを介する経路、あるいは小胞体ストレス機構を介して、アポトーシスを生じ、梗塞巣が拡大する。以上のプロセスが、虚血再灌流後の心筋細胞の壊死巣の拡大やそれによる心機能の低下に関与していると報告されている (Pharmacol Res. 58: 88-111, 2008)。

よって、心筋虚血再灌流治療により過剰に

表. サイトカイン吸着カラムによるサイトカイン吸着率

| サイトカイン | 分子量 | 吸着率 (%) |
|--------|------------|---------|
| IL-1 | 17,000 | 98 |
| IL-4 | 19,000 | 96 |
| IL-6 | 26,000 | 80 |
| IL-8 | 8,000 × 2 | 80 |
| IL-10 | 35,000 | 84 |
| TNF- | 17,400 × 3 | 53 |

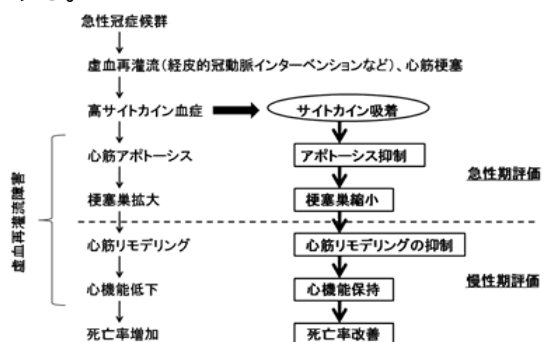
産生された炎症性サイトカインを除去できれば、虚血再灌流障害を軽減し、梗塞巣を縮小させ、心機能を維持させることができ、心筋虚血再灌流治療の効果を増強するもの可能性があると考えられる。

血液中の物質の除去といえば、血液浄化が最も確実な方法である。近年我々の研究室は、

サイトカイン吸着カラム (CTR-001, カネカ) の開発に携わり、in vitro でその除去効果を示した (前表)。

また、in vivo においても、ラットでのエンドトキシン投与による敗血症および敗血症性ショックモデルにおいて、サイトカイン吸着カラムを用いた体外循環装置が、炎症性サイトカインを有意に除去し、急性期サイトカイン除去が、生存率の改善を示したことを報告した (Taniguchi T et al. Crit Care Med 34: 800-806, 2006)。この動物実験系は、他ではやっていない独自技術であり、学会でも注目され、研究分担者である谷口巧は、その第一人者であり、著書に記載されるに至っている (Takumi Taniguchi et al. Acute Blood Purification. Contrib Nephrol. Basel, Karger 166, 130-137, 2010)。

しかし、心筋虚血再灌流モデルにおけるサイトカイン吸着カラムの有用性を検討した報告はない。上記のメカニズムを考えれば、急性冠症候群において、再灌流療法に加え、その後生じるアポトーシスのトリガーとなる炎症性サイトカインの吸着を行うことは、虚血再灌流後のアポトーシスを抑制でき、心筋障害を最小限にとどめることが可能と考えられる。もしサイトカイン吸着カラムを用いた血液浄化が虚血再灌流後に生じるアポトーシスを抑制することが可能であれば、慢性期の心機能保持に寄与し、冠動脈形成術に加えるべき新たな治療の一つとなると確信する。



心筋虚血再灌流療法は、心筋の壊死を最小限に抑えることを目標とするが、この治療におけるもっとも重要な因子は、冠動脈が閉塞してから再灌流に至るまでの時間 (door-to-balloon 時間) である (J Am Coll Cardiol 47: 289 - 295, 2006)。Door-to-balloon 時間が短ければ短いほど心筋壊死を最小限にとどめることが可能である。しかしながら、臨床の現場において、door-to-balloon 時間が golden time とされる 3 時間を超えてしまうことは少なくない。そのようなケースでは、たとえ再灌流をしたとしても、広範な心筋壊死を残してしまうこととなる。このような広範な心筋梗塞においても、炎症性サイトカインの過剰産生がさらなる梗塞巣の拡大や心筋リモデリングに関与することが報告されている。よって、心筋梗塞モデルにおけるサイトカイン吸着治療の効果を検討することも、臨床的には重要と考

える。

2. 研究の目的

以上より、我々は、(1) サイトカイン吸着カラムが、急性期のアポトーシスを抑制し、梗塞巣を縮小し、総じてラット心筋虚血再灌流障害を軽減するかどうかを *in vivo* で明らかにする。

さらに臨床において、全例速やかに再灌流を得ることができるわけではないので、臨床応用を見据えて、(2) サイトカイン吸着カラムが再灌流モデルのみでなく、心筋梗塞モデルにおいても有用かどうかを検討する。さらに、臨床的意義は生存率の改善であり、(3) 急性期のサイトカイン除去による効果が、慢性期の心機能低下を抑制し、心筋リモデリングを抑制し、心不全の程度を軽減し、生存率が改善するかどうかを検討する。

3. 研究の方法

心筋虚血再灌流モデルの作成

対象は Wistar ラット(13~15 週、オス)。麻酔後(ペントバルビタール 30mg/kg 腹腔内投与) 現有する人工呼吸器管理下開胸し、顕微鏡下に冠動脈左前下行枝(LAD)を 30 分間虚血後、再灌流させ閉胸する。血行動態評価および下記サイトカイン測定目的の採血のため大腿動脈にカニューレションする(図)。複雑な手技でありモデルの均一性を保つためには、術者を単一とすること、および何より術時間の短縮が最大の問題となる。まずは、短時間で安定した虚血再灌流モデルを作成することを目標とする。

サイトカイン吸着カラム (CTR-001, カネカ)

サイトカイン吸着カラムは、共同開発した CTR-001 を用いる。このカラムは、セルロースビーズから成り、そのサイトカイン吸着効果はこれまでに報告してきた(前項表)。コントロールカラムは同容量のカラムを使用する。虚血再灌流後、大腿静脈より 1.5ml/min の血流量にて脱血し、カラムを通して頸静脈に返血する(図)。体外循環は 180 分間行う。この方法はこれまで我々が学術誌に報告し

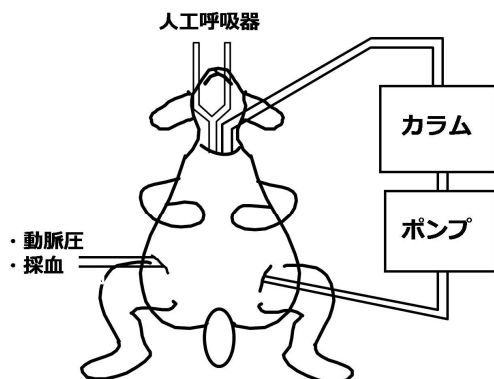


図. 体外循環装置

てきた方法と同じであり、確立されている。

心筋障害の程度の評価

心筋障害の評価は、血清学的および組織学的に行う。血清 CPK 値は一般的に梗塞範囲に比例し血清 CPK 値は一般的に梗塞範囲に比例し血清学的マーカーとして臨床の場で広く使用される。ラットにおいても同様で、虚血後 6 時間でピークとなることが報告されている。よって、我々は再還流後 6 時間に採血しサイトカイン吸着カラム群とコントロールカラム群で差があるかどうかをさらに検討していく。また、虚血後 48 時間で LAD を結さつし、Evans blue にて非虚血部位を染色した後、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色し、組織学的に梗塞範囲を同定、そのエリアを両群で比較する。

アポトーシスおよびアポトーシス関連タンパクの評価

虚血後 48 時間で心臓を取り出し、OCT コンパウンドを用いて凍結保存し、TUNEL 染色にて apoptotic cell の割合をサイトカイン吸着カラム群とコントロールカラム群を比較する。

また、48 時間後に取り出した心筋を凍結保存し、アポトーシスに關与する caspase-3、-9、-12、CHOP のタンパク量を Western blot 法で測定する。またその局在を免疫染色法にて確認する。

サイトカインプロファイルの評価

再灌流後体外循環を開始、0、30、60、120、180 分後(体外循環終了時)および 48 時間後(薬殺時)に採血、遠心血清分離し、IL-1、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- を ELISA にて測定する。

心筋梗塞モデルの作成

基本的には、上記の虚血再灌流モデルと同様である。唯一の差異は、LAD を結紮したまま再灌流させずに梗塞モデルを作成する点である。予想される問題は血圧の維持で、心筋梗塞を作成するため血圧低下が時速する可能性がある。その際は適宜カテコラミン製剤を投与し血圧を維持する。

サイトカイン吸着カラムは、虚血再灌流モデルで使用したものをを用い、心筋障害の程度 of 血清学的評価や組織学的評価、アポトーシスおよびアポトーシス関連タンパクの評価、サイトカインプロファイルの評価も虚血再灌流モデルと同じとする。

慢性期心機能評価

ペントバルビタール腹腔内投与による全身麻酔をしたうえで、人工呼吸器管理下、虚血再還流および心筋梗塞後 28 日目の心機能につき、心エコーを用いて、左室拡張末期径、左室収縮末期径、左室短絡率などを比較する。心エコー施行者は、ラットのエコーに精通した者とし、blind label 法で行う。

慢性期心不全および心筋リモデリングの評価

虚血再還流後 28 日目に心エコー施行後、心臓および肺を取り出し、それぞれ重量測定し、心重量/肺重量比を比較する。さらに、心筋肥大や梗塞巣の範囲など心筋リモデリングの程度を前記のごとく組織学的に評価する。

生存率の検討

虚血再灌流後閉胸し飼育、28 日間観察し、生存率をサイトカイン吸着カラム群とコントロールカラム群で比較する。

4. 研究成果

急性冠症候群患者において、冠動脈形成術などの早期再灌流治療は患者の予後を改善してきた。しかし、虚血を解除したのちに生じる虚血再灌流障害は未だ解決されていない問題である。虚血再灌流障害には炎症性サイトカインが大きく関与している。そのため、虚血再灌流後に生じた過剰な炎症性サイトカインをサイトカイン吸着カラムによって除去すれば、虚血再灌流障害が解決するのではないかと着想した。我々はすでに、同様に炎症性サイトカインが大きく関与する病態である敗血症モデルにおいて、そのよい結果を報告している。今回ラット心筋虚血再灌流モデルにおいて、急性期にサイトカイン吸着カラムを用いて過剰な炎症性サイトカインを除去することで、再灌流障害が軽減するかどうかを検討することとした。その結果、慢性期の心機能悪化が回避され、最終的には生存率の改善に寄与することが期待される。

虚血再灌流モデルで最も注意すべきは、虚血の大きさである。虚血範囲が大きすぎれば、それだけでショックとなり、血液浄化療法の施行が困難となる。一方、虚血範囲が小さすぎれば、再灌流障害の程度を過小評価してしまう可能性が高い。このため、大きく血行動態の破綻をきたさない程度のラット虚血再灌流モデルを構築し、結紮冠動脈の選択とその部位の決定を行った。しかし、期間中に適切な結紮冠動脈の選択とその部位を決定することができず、一部科研費を返却するに至った。ゆえに、以下の主な発表論文に記するほどの論文はない。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
岡島 正樹 (OKAJIMA MASAKI)
金沢大学・附属病院・講師
研究者番号：00361999

(2)研究分担者
谷口 巧 (TANIGUCHI TAKUMI)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：30301196

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()