

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03763

研究課題名(和文)心停止下ドナー心移植におけるドナー心評価法と虚血再灌流障害制御法の確立

研究課題名(英文) Functional assessment and cardio-protective post-conditioning strategies of the donor heart following circulatory death

研究代表者

松宮 護郎 (MATSUMIYA, GORO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20314312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：DCDと同様なラット温阻血障害心(25分間)を作り、摘出前と環流液中へのIL-11投与群と非投与群で比較した。血行力学的には環流中すべての時点でIL-11投与群で良好であった。両群で心筋アポトーシスを認めなかったが、非投与群において心筋ミトコンドリアの強い障害が観察され、これらはIL-11投与群において有意に減少を認めた。培養心筋においてIL-11投与によりSer727におけるSTAT3のリン酸化が確認された。以上から温阻血心において、IL-11のpost conditioningがcardioprotectiveに働くこと、その機序としてはSTAT3によるミトコンドリア障害の軽減が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先進諸国の中で最も脳死下臓器提供が少なくドナー不足が深刻な問題であるわが国においては、近年欧米で臨床応用されるようになってきた心停止下ドナー(Donation after Circulatory death; DCD)からの心臓移植は進めるべき重要な課題である。本研究により、心停止から再灌流までの温阻血および虚血再灌流障害によるグラフト不全に対する対策として、IL-11を用いたpost-conditioning法が有用であることが示された。DCD心移植を実現するうえで、最も大きな懸念である移植後のグラフト不全を防止するために重要な知見と考えられ、臨床応用されれば社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to determine the cardioprotective effect of interleukin-11 (IL-11) against warm ischemia-reperfusion injury, which is a key for successful donor after circulatory death heart transplantation. Rat hearts were procured, subjected to 25-minute warm ischemia, and re-perfused. IL-11 was administered before procurement and during reperfusion in the IL-11 group. Hemodynamic analyses demonstrated significantly favorable data in the IL-11 group throughout the reperfusion time. Although no apoptosis was observed in both groups, severely damaged mitochondria was observed in the control group while the mitochondrial structure was relatively preserved in the IL-11 group. Immunoblot analysis using cultured cardiomyocytes revealed phosphorylation of STAT3 at Ser727, which is known to act for mitochondrial protection. IL-11 may have a beneficial effect on the functional recovery after warm ischemia-reperfusion injury through protective effect of STAT3 against mitochondrial damage.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：虚血再灌流障害 心臓移植 心停止ドナー IL-11 post conditioning

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国においても、心血管病の終末像である心不全患者が増加しつつある。その中でも Stage D 心不全、すなわち薬物療法や通常の手術では効果のない末期重症心不全患者に対しては、心臓移植や補助人工心臓が唯一残された治療法である。中でも心臓移植は依然として最も優れた QOL を提供できる効果的で成績の優れた治療法である。免疫抑制療法の進歩などにより心臓移植の成績は向上しつつあるが、最大の問題はドナー不足であり、特にわが国では脳死ドナー数は諸外国に比べて著しく少なく、年間 100 例にも満たない状態が続いている。

移植医療は臓器提供者の状態により、脳死下臓器提供、心停止下臓器提供、生体臓器提供に大別される。移植先進国である欧米諸国においてもドナー不足は深刻な問題であり、従来温阻血に比較的強いとされる腎臓と角膜以外ではあまり行われてこなかった心停止下ドナー (Donation after Circulatory death, DCD) からの臓器提供による移植が、ドナー不足解消の一つの手段として発展・増加してきている。このような背景から、今後さらなる終末期医療の在り方についての議論が広まる必要はあるが、DCD 心臓移植は今後わが国で実現されていく方向に向かう可能性が高く、DCD 心臓移植実現に際してその基礎的研究をさらに進めておく必要性は高い。

現在行われている DCD ドナー心移植は、脈圧の消失、心停止の後、2-5 分 (国、施設によって様々な規定がある) の確認時間 (stand off period) の後、死亡宣告が行われてから臓器摘出手術が開始される。いずれの方法にしても最も大きな問題は DCD ドナー心が実際に心臓移植に使用できるかどうかの評価方法である。また、心臓移植まで進んだ症例においても術後急性期のグラフト機能不全が生じ ECMO を必要とした症例が比較的高率であり、最終的には離脱できた症例が多かったとされているが、移植成績を悪化させる可能性もある。したがって、これへの対策が必要であり、急性期の虚血再還流障害 (ischemia-reperfusion injury; IRI) を軽減する方策を加えることの意義は大きいと思われる。近年、IRI に対する様々な pre-conditioning および post-conditioning 効果の研究が行われてきたが、心停止前の薬剤投与による pre-conditioning は倫理的に困難であり、グラフトの再灌流時や体外装置による灌流時、および移植直後に post-conditioning 効果のある薬剤添加などを行うことが DCD ドナー心移植に有効であるか否か、どのような方法が最も効果的かを検討する必要がある。

### 2. 研究の目的

心停止下ドナーからの心臓移植を実際に行うための最も重要なポイントである、1) ドナー心が使用可能かどうかを判定する評価法を確立すること、2) 確立しえた評価法をもとに、至適再灌流法 (post-conditioning) を確立することを目的とした。ドナー心臓の心筋保護については様々な方法が検討されているが、その一つとして、サイトカインが注目されている。インターロイキン 11 (IL-11) はインターロイキン 6 ファミリーのサイトカインであり、動物実験において IRI を抑制することが報告されている。本研究では、IL-11 が温虚血心筋傷害に対しても保護的に作

用すると仮定し、心機能の改善および IRI の軽減に対する IL-11 の効果メカニズムを検討した。

### 3 . 研究の方法

#### (1) 研究デザインと動物実験

Sprague Dawley ラット (雄、11-13 週齢) を用い、2 つのグループを作成した。IL-11 群; human rIL-11 を投与した 15 匹のラットを含むグループ 対照群: 同量の生理食塩水を投与した 15 匹のラットを含むグループ。ヘパリン投与 (300IU/kg) 後、挿管人工呼吸器下胸骨切開を行い、下大静脈から 12  $\mu$ g/kg の IL-11、または生理食塩水を投与した。注入後 10 分でラット心臓を摘出した。冠動脈を常温 (37  $^{\circ}$ C) の Krebs-Henseleit (K-H) 緩衝液で flush 後、同じ緩衝液に 25 分間保存し、温虚血 (WIT) 傷害を誘発した。WIT の終了時、心臓は、Langendorff 装置を用いて、酸素添加された常温 K-H 緩衝液 (37  $^{\circ}$ C)、一定流速で 60 分間再環流した。IL-11 投与群では、環流液に IL-11 を添加した (12  $\mu$ g/L)。

#### (2) 血行動態解析

再環流中、機能回復を評価するため、心臓の機能を測定した。ラテックスバルーンを左心房から僧帽弁を経て左心室に挿入し、測定された左心室圧から left ventricular developed pressure, max dP/dt, min dP/dt, Tau を算出し、これらを心機能の指標とした。

#### (3) 生化学的解析

各時点でリザーバーをクランプし、1.5ml の冠動脈流出液を採取し、心筋バイオマーカー (乳酸脱水素酵素 (LDH)、クレアチンキナーゼ (CK)、CK-MB、乳酸) を測定した。

#### (4) 病理組織学的解析

60 分の再灌流後、心臓を 4 %ホルマリンで固定し、病理組織学的分析を行った。酸化ストレスを DHE 染色で、アポトーシスを TUNEL 染色で評価した。また、透過型電子顕微鏡にて、ミトコンドリア形態を観察した。

#### (5) 培養心筋細胞における STAT3 の serine 727 でのリン酸化について

IL-11 が影響を及ぼす特定のシグナル伝達経路の関与を調べるために、新生児ラット心筋細胞を無血清培地で 24 時間培養し、IL-11 (200ng/ml) で表示時間刺激した。IL-11 の投与により STAT3 が serine 727 でリン酸化されるかどうかを検討した。

### 4 . 研究の成果

#### (1) 血行動態解析

左室圧は 10 分後に IL-11 群で有意に高くなったが、30 分、60 分では有意差はなかった。心拍数はすべての時点において 2 群間で同程度であった。max dP/dt は 10 分と 60 分において IL-11 群で有意に高かった。min dP/dt は 10 分後にのみ IL-11 群で有意に低下した。Tau はすべての時点において 2 群間で同程度であった。

#### (2) 生化学的分析

どの時点でもすべての心筋バイオマーカーに有意差はなかった。

### (3) 病理組織学的解析

DHE 染色と TUNEL 染色では、両グループとも酸化ストレスやアポトーシスは見られなかった。

我々はこれまでに、4 の緩衝液で6時間保存したラット心臓に IL-11 を再灌流前および再灌流中に投与したところ、心機能が有意に回復することが示したが、ここまでの研究結果からは、温虚血心でも同様の心保護作用が確認された。当初、IL-11 によるネクロシスの緩和とアポトーシスの抑制が、IRI 後の心臓の有意な回復に寄与していると考えたが、生化学的検査では、コントロール群と治療群の間で心筋酵素に有意差はなく、病理学的検査では、両群ともアポトーシスの変化はほとんど見られなかった。これらの結果は、本研究で評価に用いた1時間の再灌流時間は、アポトーシスを誘導するには短すぎたためである可能性は否定できない。

### (4) 電子顕微鏡解析

電子顕微鏡で観察したミトコンドリアの形態を示す。コントロール群では、ほとんどのミトコンドリアが膨潤し、マトリックスの希釈とクリスタの崩壊を認めたが、IL-11 群のものは内部構造を保持し、正常な心臓ミトコンドリアと同様の形状のものが多かった。IL-11 群とコントロール群で障害を受けたミトコンドリアの割合を比較すると、ミトコンドリアの損傷の程度は対照群で有意に大きかった ( $67.6 \pm 7.5\%$  vs.  $29.8 \pm 6.3\%$ ,  $p=0.0002$ )。

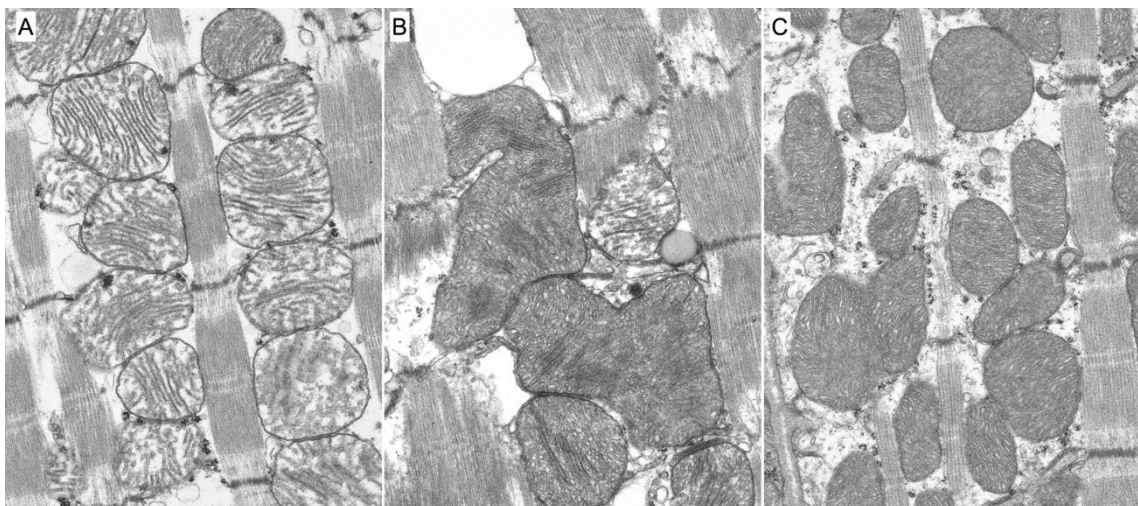


図 電子顕微鏡臓 (A) コントロール群；顕著なミトコンドリアの膨張と崩壊したクリスタを認める (B) IL-11 群；ミトコンドリアの内部構造が比較的保たれている、(C) 正常心臓の左心室サンプル 全てのサンプルで倍率  $\times 21,100$ 。

#### (5) イムノプロット解析

イムノプロット解析の結果、心筋細胞では IL-11 に応答して STAT3 が Ser727 でリン酸化されることが示された。

IL-11 は、アポトーシスを抑制することが知られている Janus kinase (JAK) と signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) 経路を活性化することが示されている。近年、STAT3 は転写制御因子として働く以外に、直接ミトコンドリアに入り込んで心保護作用を発揮することが報告されている。実際、ミトコンドリアにおける STAT3 の存在は心筋細胞で初めて発見され、ミトコンドリアを標的とした STAT3 を発現するマウスでは、IRI による細胞障害が少ないことが研究で報告されている。IL-11 が受容体に結合すると、STAT3 は Ty1705 と Ser727 でリン酸化される。特に、Ser727 のリン酸化により、STAT3 はミトコンドリアに輸送され、そこで STAT3 は電子伝達鎖における ATP や活性酸素 (ROS) 産生を調節する。また、STAT3 は、病的ストレス時の細胞内カルシウム過負荷に対する緩衝材として働く Mitochondrial permeability transition pore の開口を遅らせることによって、カルシウム放出を調節する。これらの効果と、STAT3 の ser727 でのリン酸化が促進されたことを示す免疫プロット解析の結果を考慮すると、IL-11 によって活性化された STAT3 のミトコンドリア内での関与が、IRI によって生じるミトコンドリア破壊を防ぐのに役立つと推測された。

#### (6) 結論

本研究では、IL-11 による心収縮力の明らかな改善が認められたが、バイオマーカー測定や酸化ストレスやアポトーシス評価を含む病理組織学的解析に関しては、IL 処理群と未処理群で同等の結果が得られた。ミトコンドリアの形態は処理群では比較的保たれていたのに対し、未処理群では多くが破壊されていることが示された。したがって、IL-11 は温阻血再灌流障害に対して心筋保護的に作用するが、その保護効果は、心筋細胞内のミトコンドリア損傷の緩和に起因することが示唆された。

IL-11 がさらに持続的な心保護効果をもたらすかどうか、またそれが IL-11 の回復後期におけるアポトーシス抑制と関連があるかなどはまだ明らかにされていないが、今回の結果はさらなる検討を促すだけでなく、IL-11 が DCD 心臓移植の成績向上にとって重要な役割を果たしうることを示すものであった。今後、さらにミトコンドリアに対する効果の検証や、ミトコンドリアを保護するメカニズムの解明を進めていく必要がある。

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 (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
研究分担者	黄野 皓木  (Kohno Hiroki)  (40375803)	千葉大学・医学部附属病院・講師    (12501)	
研究分担者	松浦 馨  (Matsuura Kaoru)  (50436375)	千葉大学・医学部附属病院・助教    (12501)	
研究分担者	渡邊 倫子  (Watanabe Michiko)  (20766274)	千葉大学・医学部附属病院・助教    (12501)	
研究分担者	乾 友彦  (Inui Tomohiko)  (70816503)	千葉大学・医学部附属病院・助教    (12501)	
研究分担者	上田 秀樹  (Ueda Hideki)  (50738987)	千葉大学・医学部附属病院・講師    (12501)	

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
---------	---------