

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09579

研究課題名(和文) 虚血再灌流心筋障害の原因となる生理活性脂質メディエーターの解明と治療的介入

研究課題名(英文) Elucidation of bioactive lipid mediators related to ischemia-reperfusion injury and development of novel treatment strategy

研究代表者

篠原 正和 (Shinohara, Masakazu)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80437483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：虚血再灌流傷害は、血行再建手法が進歩した今日においても、特異的な予防法・治療法が存在しない未解決の重要課題である。本研究では、申請者がこれまで取り組んできた生理活性脂質代謝物(脂質メディエーター)解析を通して、虚血再灌流傷害の原因となりうる全身ならびに局所の生理活性脂質メディエーター変化の評価を行うことで、病態に関わる新たなメカニズムの端緒を解き明かすことができた。

今後のさらなる研究の展開によって、虚血再灌流傷害の新たな病態メカニズムの解明・治療戦略の発見が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血再灌流傷害は、現在の医学では特異的な予防法・治療法が存在せず、臨床現場における重要な課題である。動脈硬化性疾患に由来する心筋梗塞や脳梗塞、さらには臓器移植におけるドナー臓器等では、虚血再灌流に陥った臓器そのものの傷害が生じる。また大血管手術・整形外科手術ならびに災害によって四肢末梢の広範な虚血が生じた場合、再灌流によって肺・腎臓・脳・肝臓等の遠隔臓器に深刻な臓器傷害を生じることが知られている。虚血再灌流傷害を新たな視点から見直し、新しい病態メカニズムを理解したうえで、新規の特異的予防法・治療法を確立することが強く求められている。

研究成果の概要(英文)：Ischemia-reperfusion injury remains unsolved critical issue which lacks any specific prevention and treatment under the era of development in revascularization. Here, we found novel disease mechanisms of ischemia-reperfusion injury by comprehensively analyzing bioactive lipid metabolites (lipid mediators), which we have developed as LC/MS/MS system-based metabololipidomics. These findings unveil a detailed pathological mechanism of ischemia-reperfusion organ injury and suggest a novel therapeutic approach.

研究分野：脂質生化学

キーワード：虚血再灌流傷害 脂質メディエーター

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

虚血再灌流傷害は、現在の医学では特異的な予防法・治療法が存在せず、臨床現場における重要な課題である。動脈硬化性疾患に由来する心筋梗塞や脳梗塞、さらには臓器移植におけるドナー臓器等では、虚血再灌流に陥った臓器そのものの傷害が生じる。また大血管手術・整形外科手術ならびに災害によって四肢末梢の広範な虚血が生じた場合、再灌流によって肺・腎臓・脳・肝臓等の遠隔臓器に深刻な臓器傷害を生じることが知られている。

特に循環器内科領域においては、冠動脈血行再建術後に生じる虚血再灌流心筋傷害が未解決の課題である。ST 上昇型心筋梗塞患者に対する経皮的冠動脈インターベンションの直前に、免疫抑制剤であるシクロスポリンを投与するという臨床研究が報告されたが (CIRCUS 研究、N Engl J Med 2015;373:1021-1031) その有効性は確認されなかった。したがって、虚血再灌流傷害を新たな視点から見直し、新しい病態メカニズムを理解したうえで、新規の特異的予防法・治療法を確立することが強く求められている。

申請者は循環器内科医としての背景を持ちながら、2008 年より神戸大学大学院医学研究科質量分析総合センターにて質量分析技術の医学研究応用に取り組み、包括的代謝物解析 (メタボロミクス研究) すなわち、血液中の水溶性代謝物プロファイルに着目した疾患関連バイオマーカー研究を行ってきた。2011 年-2014 年には、脂質由来生理活性代謝物 (脂質メディエーター研究) を行うため、ハーバード大学ブリガムウィミズ病院 Charles N. Serhan 研究室において、液体クロマトグラフ質量分析を応用した包括的脂質メディエーター解析手法を習得し、現在、様々な病態に関連する生理活性脂質メディエーターの研究を実施している。申請者は脂質メディエーターの中でも、多価不飽和脂肪酸より産生され、炎症の収束・制御に関わる炎症収束性脂質メディエーター (レゾルビン群・プロテクチン群・マレイシン群) の研究に取り組んでいる。

### 2. 研究の目的

虚血再灌流傷害において、生理活性脂質メディエーターが病態に深く関与していることが示唆されてはいるが、心筋虚血再灌流傷害に関する検討はいまだ世界的にもほとんど報告されていない。本研究では、以下の点について解き明かすことを目標とする。

#### (1) 小動物モデルを用いた虚血再灌流病態メカニズムの解明

マウス心筋虚血再灌流モデルを用いて、虚血再灌流傷害における全身 (血中) ならびに局所 (心臓) での生理活性脂質メディエーター変動を包括的に評価し、病態における役割を解明する。

#### (2) ヒト虚血再灌流における生理活性脂質メディエーター変動の解明

ST 上昇型心筋梗塞患者に対する経皮的冠動脈インターベンション前後の採血サンプルを用いて、心筋虚血再灌流傷害における全身 (血中) 生理活性脂質メディエーターを解析し、ヒト病態における変動を評価する。

#### (3) 培養細胞系虚血再灌流モデルを用いた病態機序の解明

無酸素チャンバーを用いることで、培養細胞系 (心筋細胞・心臓線維芽細胞・内皮細胞・好中球・単球・血小板等) に低酸素/再酸素化刺激を加え、産生される生理活性脂質メディエーターを包括的に評価し、おのおのの細胞系が虚血再灌流傷害時にどのような応答を示すか検討する。

#### (4) 脂質メディエーターに介入する新しい治療手段の検討

上記 1-3 の検討により、見出される虚血再灌流病態にて変動する脂質メディエーターに対して治療的介入を試みる。増加する脂質メディエーターに対しては、産生酵素阻害薬・受容体阻害薬を用いた治療効果を検討し、減少する脂質メディエーターに対しては外部から補充した際の治療効果を検討する。申請者は、主に $\omega$ 3系多価不飽和脂肪酸から産生される炎症収束性脂質メディエーターを用いることで、急性炎症に対する治療効果を証明してきた。小動物モデルを用いた心筋虚血再灌流モデルを用いて、レゾルビン群・プロテクチン群・マレイシン群等の治療効果ならびにその作用機序を検討し、循環器内科臨床現場での応用の可能性について検討を進める。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス心筋虚血再灌流モデルを用いた包括的脂質メディエーター解析

ガス麻酔 (ハロセン) を維持麻酔に用い、気管内挿管下にマウス用レスピレーターにて呼吸管理を行う。冠動脈前下行枝に対し、血管用クリップを用いて虚血 (30 分間) 再灌流 (2 時間) 傷害を作製する。2 時間の再灌流後に、EDTA 採血による血液検体ならびに心臓を解析サンプルとして回収する。虚血再灌流心筋障害の確認には、心臓組織の薄切標本作成後、TTC 染色ならびにミトコンドリア膜電位依存性の蛍光色素にて染色し、ミトコンドリア傷害を指標として心筋傷害を定量的に評価する。

血漿 (100 $\mu$ l) を用いて血漿包括的脂質メディエーター解析を実施する。申請者がこれまでに確立した解析手法に基づき、既知濃度の内部標準物質を添加したのちにメタノールにて総脂質を抽出し、固相抽出法によって脂質メディエーター含有分画を分取する。本分画を濃縮後、神戸大学質量分析総合センターにて運用されている液体クロマトグラフ質量分析によって分析を実施する。sham 手術群と比較することで、虚血再灌流傷害がどのような影響を全身性に及ぼしているか解明する。

また心臓サンプルもメタノール中でホモジネートした後に、上記と同じプロトコールにて包括的脂質メディエーター分析を行い、虚血再灌流傷害による変動を評価する計画である。炎症性細胞浸潤ならびに炎症性サイトカインプロファイルに関しても、心臓サンプルを用いて定量的解析を実施する。

#### (2) ヒト虚血再灌流過程における血中脂質メディエーター変動の解析

適切なインフォームドコンセントが取得された ST 上昇型心筋梗塞症例において、経皮的冠動脈インターベンション治療直前ならびに治療完了後の末梢血採血を行う。血漿 (100 $\mu$ l) を用いて血漿包括的脂質メディエーター解析を実施し、治療前後すなわち虚血再灌流によって変動する血中生理活性代謝物を評価する。

#### (3) 培養細胞系を用いた虚血再灌流モデルでの検討

虚血再灌流病態に関わる可能性のある細胞群として、心臓には心筋細胞・繊維芽細胞・血管系細胞が含まれており、さらに循環血液には好中球・単球・血小板が含まれている。これら各細胞群の培養細胞系を用い、無酸素チャンバーを用いて虚血再灌流モデルを構築する。具体的には、心臓を構成する細胞群として、心筋細胞 (H9c2 細胞)・心筋線維芽細胞・冠動脈内皮細胞・冠動脈平滑筋細胞、循環血液由来の細胞群としてヒト末梢血から遠心操作にて分離した好中球・単球・血小板を用い、当循環器内科で運用されている無酸素チャンバーを使用することで虚血再灌流モデルを作製する。これまでの予備実験の結果、 $1 \times 10^6$  個前後の細胞数があれば、微量のものも含め包括的脂質メディエーター解析が可能であった。本細胞モデルを用いることで、個別の細胞種における虚血再灌流時の脂質メディエータープロファイル変動を評価し、プロファイル変動に関連する酵素発現の変動を mRNA・蛋白レベルにて検討する。

#### (4) 脂質メディエーターに介入する新しい治療手段の検討

上記 1-3 の検討により、虚血再灌流病態にて変動する脂質メディエーターが明らかとなれば、その経路に介入する新しい治療手段を検討する。増加する脂質メディエーターに対しては、産生酵素阻害薬・受容体阻害薬の治療効果を検討し、減少する脂質メディエーターに対しては、外部からの補充を実施し、その効果を検討する。心筋傷害の定量的評価にはミトコンドリア傷害を反映する TTC 染色ならびにミトコンドリア膜電位依存性色素を用いる。

また申請者は、主に  $\omega 3$  系多価不飽和脂肪酸から産生される炎症収束性脂質メディエーター研究に取り組んできた。小動物モデルを用いた心筋虚血再灌流モデルを用いて、炎症収束性脂質メディエーター静脈内投与の治療効果ならびにその作用機序を検討し、循環器内科臨床現場での応用の可能性について検討を進める。

## 4. 研究成果

(1) 小動物虚血再灌流モデルを用いた包括的脂質メディエーター解析：当初、マウス・ラットを用いた心筋虚血再灌流モデルを計画したが、再現性のよい実験モデル作成が困難であったため、学内脳神経外科学分野の協力のもと、ラットを用いた脳虚血再灌流傷害サンプルを用いて、虚血再灌流傷害において変動するさまざまな脂質メディエーターの解析を進めた。また、虚血再灌流傷害が全身に与える影響を検討するために、マウスを用いた両下肢虚血再灌流傷害モデルを作成し、血中・遠隔臓器中における脂質メディエーター変動の解析を進めた。いずれの虚血再灌流モデルにおいても、炎症惹起性ならびに炎症収束性脂質メディエーターの経時的な変動が確認され、病態形成において重要な働きを担うことが示唆された。特に虚血再灌流時に、循環血液中で活性化された血小板-好中球の凝集が生じ、さらにそれぞれの血球細胞が持つ酵素活性が組み合わせられて産生される脂質メディエーターが見出された。虚血再灌流病変における本脂質メディエーターの関与はこれまで報告がなく、さらなる病態メカニズムの解明を進めることで、今後、虚血再灌流傷害の新たな治療ターゲットとなる可能性が示された。

(2) ヒト心筋虚血再灌流過程における血中脂質メディエーター変動の解析：共同研究施設においてサンプリングされた心筋梗塞例での検体を用いて、血中脂質メディエーターの包括的解析を進めた。

(3) 培養細胞系を用いた虚血再灌流モデルでの検討：培養細胞を一定時間、無酸素チャンバーで培養し、その後通常培養条件に戻すことで虚血再灌流モデルを作成した。包括的な脂質解析によって、いくつかの脂質メディエーターが虚血再灌流によって大きく変動することを見だし、現在その病態における意義の検討を進めている。

(4) 脂質メディエーターに介入する新しい治療手段の検討：マウスを用いた両下肢虚血再灌流傷害モデルに対して、炎症収束作用が期待される  $\omega 3$  多価不飽和脂肪酸由来脂質メディエーターを投与し、その治療効果・治療メカニズムの検討を進めた。

虚血再灌流傷害は、血行再建手法が進歩した今日においても、特異的な予防法・治療法が存在しない未解決の重要課題である。本研究では、申請者がこれまで取り組んできた生理活性脂質代謝物 (脂質メディエーター) 解析を通して、虚血再灌流傷害の原因となりうる全身ならびに局所の生理活性脂質メディエーター変化の評価を行うことで、病態に関わる新たなメカニズムの端緒を解き明かすことができた。今後のさらなる研究の展開によって、虚血再灌流傷害の新たな病態メカニズムの解明・治療戦略の発見が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10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 Okano Mitsumasa, Hara Tetsuya, Nishimori Makoto, Irino Yasuhiro, Satomi-Kobayashi Seimi, Shinohara Masakazu, Toh Ryuji, Jaffer Farouc A., Ishida Tatsuro, Hirata Ken-ichi	4. 巻 5
2. 論文標題 In Vivo Imaging of Venous Thrombus and Pulmonary Embolism Using Novel Murine Venous Thromboembolism Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 344 ~ 356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2020.01.010	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 -
1. 著者名 Nagao Manabu, Miyashita Kazuya, Mori Kenta, Irino Yasuhiro, Toh Ryuji, Hara Tetsuya, Hirata Ken-ichi, Shinohara Masakazu, Nakajima Katsuyuki, Ishida Tatsuro	4. 巻 13
2. 論文標題 Serum concentration of full-length- and carboxy-terminal fragments of endothelial lipase predicts future cardiovascular risks in patients with coronary artery disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Lipidology	6. 最初と最後の頁 839 ~ 846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacl.2019.07.007	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 -
1. 著者名 Kuroda Koji, Otake Hiromasa, Shinohara Masakazu, Kuroda Masaru, Tsuda Shigeyasu, Toba Takayoshi, Nagano Yuichiro, Toh Ryuji, Ishida Tatsuro, Shinke Toshiro, Hirata Ken-ichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Effect of rosuvastatin and eicosapentaenoic acid on neoatherosclerosis: the LINK-IT Trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EuroIntervention	6. 最初と最後の頁 e1099 ~ e1106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4244/EIJ-D-18-01073	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 -
1. 著者名 Shiomi Masashi, Takeda Hiroaki, Irino Yasuhiro, Kimura Norie, Yamada Satoshi, Kuniyoshi Nobue, Kikumori Akio, Koike Yu, Koike Tomonari, Yoshida Masaru, Izumi Yoshihiro, Shinohara Masakazu, Bamba Takeshi, Ishida Tatsuro	4. 巻 284
2. 論文標題 Identification of novel serum markers for the progression of coronary atherosclerosis in WHHLMI rabbits, an animal model of familial hypercholesterolemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 18 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.atherosclerosis.2019.02.020	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 -

1. 著者名 Oshita Toshihiko, Toh Ryuji, Shinohara Masakazu, Mori Kenta, Irino Yasuhiro, Nagao Manabu, Hara Tetsuya, Otake Hiromasa, Ishida Tatsuro, Hirata Ken-ichi	4. 巻 83
2. 論文標題 Elevated Serum Elaidic Acid Predicts Risk of Repeat Revascularization After Percutaneous Coronary Intervention in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1032 ~ 1038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-18-1175	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 -

1. 著者名 Oshita Toshihiko, Toh Ryuji, Shinohara Masakazu, Mori Kenta, Irino Yasuhiro, Nagao Manabu, Hara Tetsuya, Otake Hiromasa, Ishida Tatsuro, Hirata Ken-ichi	4. 巻 83
2. 論文標題 Elevated Serum Elaidic Acid Predicts Risk of Repeat Revascularization After Percutaneous Coronary Intervention in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1032 ~ 1038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-18-1175">http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-18-1175</a>	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 -

1. 著者名 Shiomi Masashi, Takeda Hiroaki, Irino Yasuhiro, Kimura Norie, Yamada Satoshi, Kuniyoshi Nobue, Kikumori Akio, Koike Yu, Koike Tomonari, Yoshida Masaru, Izumi Yoshihiro, Shinohara Masakazu, Bamba Takeshi, Ishida Tatsuro	4. 巻 284
2. 論文標題 Identification of novel serum markers for the progression of coronary atherosclerosis in WHHLM rabbits, an animal model of familial hypercholesterolemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 18 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.02.020">http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.02.020</a>	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 -

1. 著者名 Hayashi Tomohiro, Yamashita Tomoya, Watanabe Hikaru, Kami Kenjiro, Yoshida Naofumi, Tabata Tokiko, Emoto Takuo, Sasaki Naoto, Mizoguchi Taiji, Irino Yasuhiro, Toh Ryuji, Shinohara Masakazu, Okada Yuko, Ogawa Wataru, Yamada Takuji, Hirata Ken-ichi	4. 巻 83
2. 論文標題 Gut Microbiome and Plasma Microbiome-Related Metabolites in Patients With Decompensated and Compensated Heart Failure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 182 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-18-0468">http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-18-0468</a>	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 -

1. 著者名 Okada Kumiko, Hosooka Tetsuya, Shinohara Masakazu, Ogawa Wataru	4. 巻 505
2. 論文標題 Modulation of lipid mediator profile may contribute to amelioration of chronic inflammation in adipose tissue of obese mice by pioglitazone	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 29 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.081">http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.081</a>	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 -

1. 著者名 Yamamoto Yusuke, Hosoda Kohkichi, Imahori Taichiro, Tanaka Jun, Matsuo Kazuya, Nakai Tomoaki, Irino Yasuhiro, Shinohara Masakazu, Sato Naoko, Sasayama Takashi, Tanaka Kazuhiro, Nagashima Hiroaki, Kohta Masaaki, Kohmura Eiji	4. 巻 1687
2. 論文標題 Pentose phosphate pathway activation via HSP27 phosphorylation by ATM kinase: A putative endogenous antioxidant defense mechanism during cerebral ischemia-reperfusion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 82 ~ 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.001">http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.001</a>	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
研究協力者	新家 俊郎 (Shinke Toshiro)	昭和大学・循環器内科・教授  (32622)	
研究協力者	杜 隆嗣 (Toh Ryuji)	神戸大学大学院医学研究科・立証検査医学・特命准教授  (14501)	
連携研究者	平田 健一 (Hirata Ken-ichi) (20283880)	神戸大学大学院医学研究科・循環器内科学分野・教授  (14501)	