

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790975

研究課題名 (和文) 24 時間心保存における Rho-kinase inhibitor の心保護作用

研究課題名 (英文) The efficacy of Rho-kinase inhibitor on 24-hour heart preservation

研究代表者 江藤 政尚 (ETO MASATAKA)

産業医科大学・大学病院・助教

研究番号：20419526

研究成果の概要：Rho kinase inhibitor (RKI) は近年虚血再灌流障害に対する有用性が報告され、注目されている。心筋保護液に投与した RKI が虚血再灌流障害を軽減し、心機能が改善されるか否かを検討した。家兎摘出心臓を UW 液中に 24 時間保存後、血液交差灌流にて再灌流し、RKI 投与群と非投与群間で心機能の比較を行った結果、RKI 投与群において良好な心機能を有する傾向がみられ、長時間心保存後の虚血再灌流障害を軽減する可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	0	2,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科・心臓大血管外科

キーワード：心筋保護液，心移植

1. 研究開始当初の背景

(1) 生活習慣の欧米化に伴い、虚血性心疾患患者は増加傾向にあり、今後、治療困難な重症心不全患者数も増加することが予測される。そのため、有効な治療法である心移植が適応となる患者の増加数が見込まれる。

(2) 心移植時の摘出心臓の長時間心筋虚血は、再灌流後の心機能回復や生存率の危険因子

と報告されており、長時間虚血耐性の心筋保護液の開発は、移植後心不全の回避と遠隔予後の改善に寄与すると考える。

(3) 心移植後急性期の心機能低下の原因の 1 つに、虚血再灌流障害がある。近年、Rho 及び Rho-kinase を介する経路が虚血再灌流障害に関与しており、RKI の投与による臓器保護効果が報告されている。

2. 研究の目的

Rho-kinase は Rho の標的蛋白で蛋白リン酸化酵素である。アンギオテンシン、エンドセリン I などのアゴニストが細胞膜受容体の結合し、GTP 蛋白を介して RhoA が活性化し Rho-kinase がミオシンのリン酸化を促し、ミオシンアクチン結合が強化される。この一連の作用は血管平滑筋で生じ、その結果細胞発現として、Hypercontraction, Hypertrophy, 炎症細胞の Migration を促し、サイトカイン発生や endothelial nitric oxide synthase (eNOS) を低下させるという報告されており、その結果、高血圧、血管攣縮、動脈硬化、虚血再灌流障害が生じると報告されている。

本実験では、RKI を含む心筋保護液投与後に心摘出を行い、24 時間保存後に血液交差灌流回路を用いて心機能評価を行い、虚血再灌流障害に対する RKI の有用性を検討した。

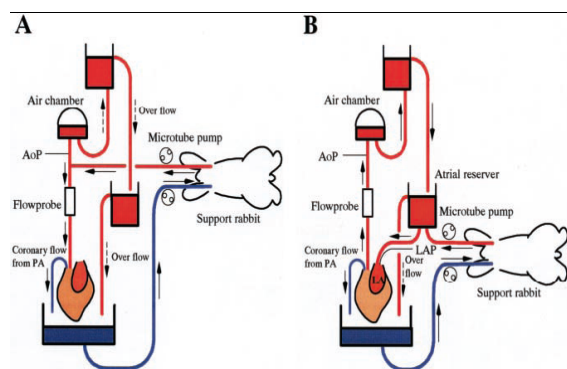
3. 研究の方法

(1) 体重 3.1 ± 0.1 kg, 日本白色種家兎 40 羽使用。Thyiamylal sodium (Isozol[®]) 25mg/ml, 2~3ml を静注し, 3.5mm の挿管チューブを挿入後, Fentanyl citrate (Fentanest[®]) 50μ g, Vecuronium bromide (Musculax[®]) 2mg を静注した。人工呼吸器管理下で開胸し、頸動脈より上行大動脈内に 16G 針外筒を挿入し、大動脈遮断後、九州大学式心筋保護液 (KU) を投与して心停止とし、ウィスコンシス大学臓器保存液 (UW) を投与し、心臓を摘出し、24 時間 1°C で UW 中に保存した。

(2) RKI 群 (n=8) では、RKI (Eri1[®]) を KU に 0.1mg/kg, UW に 0.1mg/kg, 24 時間保存の UW に 0.5mg/kg 投与し、RKI 非投与群を C 群 (n=8) とした。

(3) 24 時間後、Donor 心臓は血液充填した

Langendorff 回路 (貯血家兎 n=8) に装着し、Support 家兎 (n=16) を用いて血液交差灌流し、120 分間再灌流を行った。再灌流時は逆行性に冠動脈を灌流する Langendorff mode で行い (下記図 A)、心機能評価は Working mode (下記図 B) で行った。Working mode では、Donor 心臓の左房にカニューレを挿入し、Atrial reserver からの血液を前負荷とし、後負荷は 60mmHg で一定とし、HR はペースメーカーで 250bpm/分 で固定し、フロープローブにて大動脈流速を測定した。



(4) 再灌流後 60 分と 120 分で、左房圧を変化させた時の大動脈流量を用いて Frank-Starling 曲線を描き、得られた曲線より代表曲線を求め心機能の比較検討をおこなった。

(5) 還流後の 10 分、60 分、120 分時に Langendorff mode で冠動脈流量 (CBF)、摘出心臓の心拍数 (HR)、血清 CK-MB 値を測定し、2 群間の比較検討を行った。

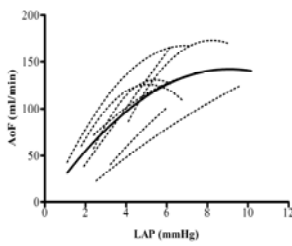
(6) 120 分灌流後の Donor 心臓の心筋は -80°C で凍結保存し、RKI の心筋での作用を Western blotting により phosphorylated myosin light chain (pMLC) を測定することにより評価し、心機能改善に eNOS の保持が関与したことを証明するために、Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction

(RT-PCR)にて eNOS の定量を行った。また Donor 心臓の心筋の一部は、心筋障害を評価するために、ホルマリン固定とし、HE 染色と TUNEL 染色を行った。

4. 研究成果

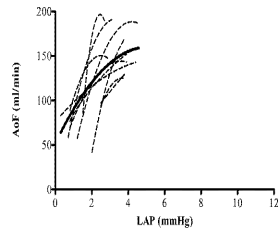
(1) Frank-Starling 曲線

C 群 60 分



$$y = -2.012x^2 + 36.748x - 19.850$$

RKI 群 60 分



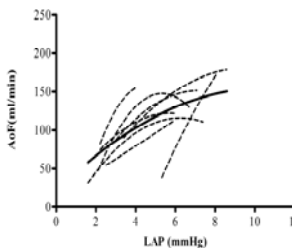
$$y = -5.912x^2 + 62.082x + 18.130$$

Frank-Starling 曲線の傾きと X 切片 (60 分)

Group	x-intercept	Slope at x-intercept
Control	-0.587 ± 0.768	34.387 ± 3.090
RKI	-0.279 ± 0.295	65.380 ± 3.492
P value	0.017	<0.0001

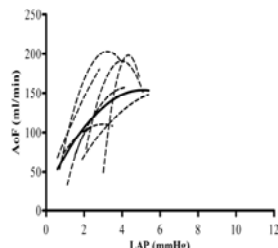
Mean ± SD

C 群 120 分



$$y = -0.156x^2 + 19.050x + 27.244$$

RKI 群 120 分



$$y = -5.492x^2 + 63.436x - 3.739$$

Frank-Starling 曲線の傾きと X 切片 (120 分)

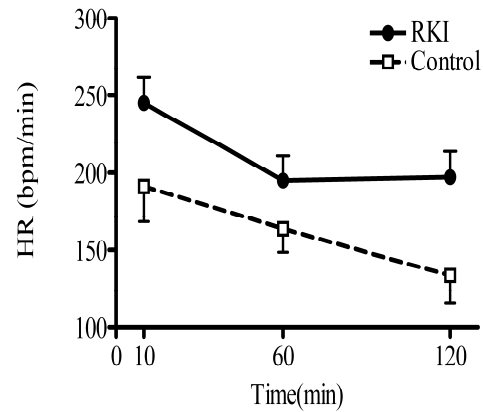
Group	x-intercept	Slope at x-intercept
Control	0.078 ± 0.497	42.391 ± 5.056
RKI	-1.402 ± 1.256	61.153 ± 5.871
P value	0.013	<0.0001

Mean ± SD

再還流後 60 分の Frank-Starling 曲線の傾きと X 切片における RKI 群と C 群の比較では、両群間に有意差がみられており、RKI 群にお

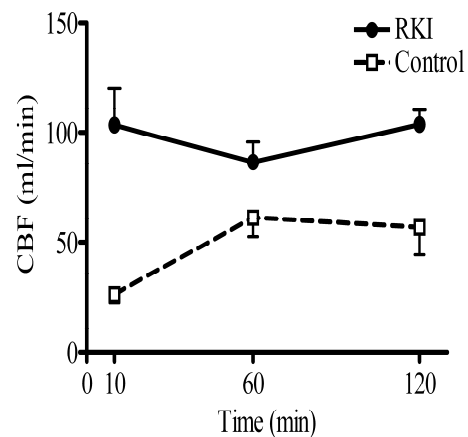
いて X 切片が低値 (低い LAP で大動脈流量が駆出されている) かつ、傾きが急峻であることより、C 群より心機能が良好であった。再還流後 120 分でも同様の結果が得られ、RKI 群において有意に心機能が良好であった。

(2) Donor 心臓の HR



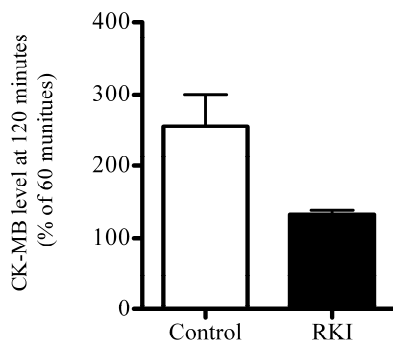
RKI 群において再還流後の HR は C 群よりも多く、正常値に近似した。2 群間の比較では、10 分 : $p < 0.05$, 60 分 : $p = n.s.$, 120 分 : $p = 0.08$ であった。

(3) CBF



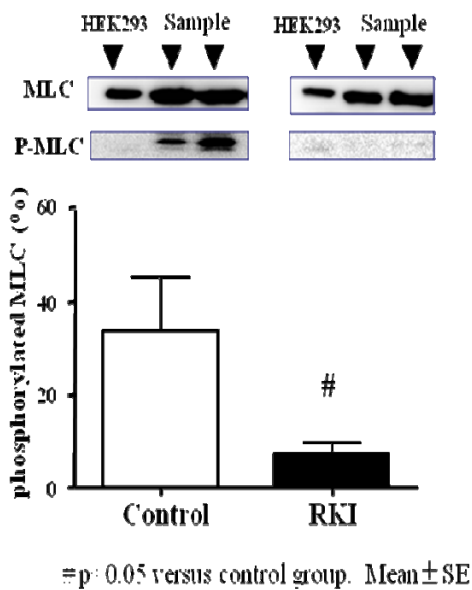
RKI 群において、再還流後の CBF は C 群と比較し、多い傾向がみられた。2 群間の比較では、10 分 : $p < 0.05$, 60 分 : $p = n.s.$, 120 分 : $p < 0.05$ であった。

(3) CK-MB の変化率



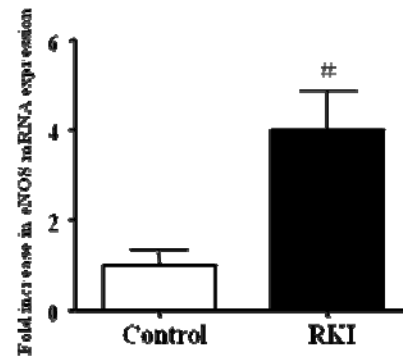
再灌流後 60 分から 120 分の CK-MB の変化率は、RKI 群では 132.9 ± 17.4% であるのに対し、C 群では 256.2 ± 125.2% であり (p < 0.05), RKI 群は C 群の約半分であった。

4) pMLC



RKI の心筋での有効性を証明するためには、Rho pathway の下流にある pMLC, ERM ファミリー, あるいはアデュシンの産生低下を示す必要がある。従って、本実験では pMLC を Western Blotting で検出した。その結果、RKI 群において、有意に pMLC が低下しており、Rho pathway が抑制されており、RKI が作用してた可能性が示唆された。(HEK293 は positive control として使用した。)

(5) eNOS



p: 0.01 versus control group. Mean ± SE

Rho の細胞発現として、eNOS の低下が報告されており、本実験において RNA レベルでの eNOS の発現を調べた結果、RKI 群では eNOS RKI 群 R は、C 群の約 4 倍 eNOS 産生が増加していた結果が得られた。

(6) HE 染色

RKI 群及び C 群 において明らかな炎症細胞の浸潤や血管構造異常等の所見はみられなかった。

(7) TUNEL 染色

再還流障害により、アポトーシス進行するとの報告がされている。再灌流障害による細胞障害を評価するために TUNEL 染色にてアポトーシスの発現を調べた。細胞核 1000 あたりの TUNEL 染色陽性率は、C 群で 0.3%, RKI 群で 0.1% であり、p=0.4 であった。両群においてアポトーシスの発現に差は見られなかった。

(8) 考察

長時間心保存後の虚血再灌流障害の軽減に、心筋保護液内に投与した RKI が有効であった。pMLC の結果より、虚血再灌流後の Rho 発現経路が抑制され、長時間心保存後の虚血再灌流障害が軽減したと考える。RKI 群において、心機能改善や冠動脈流量増加には、eNOS 発現

が関与していた可能性が示唆された。心移植後期の心機能障害は遠隔予後の不良因子となるため、本実験結果は、RKI が移植患者の遠隔予後改善に寄与する可能性があると考ええる。

本実験では、RKI を直接心臓内に投与しており、過去に同様の実験モデルにおける RKI の有用性の報告はされていない。

病理学所見では HE 染色, TUNEL 染色の所見上、両群において有意差が見られなかった原因には、再灌流時間が 120 分と短時間であったためと考える。一般に、再還流障害によるアポトーシスの発現は再灌流後 6 時間から 24 時間に生じると報告されているため、本実験では有意差が見られなかったと考える。

(9) 今後の展望

本実験では再還流時間が 120 分と短時間であるため、今後、RKI 投与後の遠隔期での心機能に与える影響を検討する必要がある。また、今回の使用動物は小動物であるため、人間に近い大動物での実験が必要と考える。本実験の結果は、24 時間心保存において再灌流障害軽減が得られるとの報告であったが、心臓血管外科手の際の心停止に伴う再灌流障害の軽減への可能性も考えられるため、検討が必要である。

5. 代表的な研究成果

(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)

- ① Kobayashi M, Tanoue Y, Eto M, Baba H, Kimura S, Oda S, Taniguchi K, Tominaga R. Rho-kinase inhibitor improves cardiac function after 24-hour heart preservation. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.

2008;136;1586-92. (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 小林真理子, 江藤政尚. 24 時間心保存における Rho-kinase inhibitor の心保護効果の検討. 2008 年 2 月 20 日. 第 38 回日本心臓血管外科学会学術総会. 福岡.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江藤 政尚 (ETO MASATAKA)
産業医科大学・大学病院・助教
研究者番号: 20419526