

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08965

研究課題名(和文)PI3K/Akt経路からみたラクトフェリンの気絶心筋に対する保護効果の検討

研究課題名(英文)Cardioprotective effect of lactoferrin via PI3K/Akt pathway against stunned myocardium

研究代表者

松川 隆 (Matsukawa, Takashi)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：80209519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はラクトフェリンの心筋虚血再灌流障害に及ぼす効果と機序を解明することである。ラットの摘出心臓を用いたLangendorff法による虚血再灌流障害モデルで、ラクトフェリンが再灌流時の心機能をより改善するかどうか検討した。心筋灌流液への混合投与では効果がなかったが、経腸管的に投与すると虚血再灌流後の心機能の回復が促進された。シグナル経路はPKAを介しており、心筋採取前の血清ではGLP-1の上昇が認められた。以上から、ラクトフェリンの直接作用ではなく、二次物質を誘導して効果が得られたことが示唆された。ラクトフェリンの心臓外科手術経口投与が、周術期の心筋保護戦略になることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今日、手術技術の向上、モニター・麻酔薬の開発などにより、より多くの患者が人工心肺を用いた心臓手術を受けている。しかし、心臓手術では人工心肺装置による炎症反応の惹起・心停止による虚血再灌流障害に起因する術後心不全など合併症率が高い。心筋虚血再灌流障害に対しては、吸入麻酔やオピオイドを用いた薬理的プレコンディショニングによる心筋保護が臨床的に使用されているが、その効果は限定的である。今回の研究で経口ラクトフェリン投与の有効性が明らかになり、心臓手術患者の心筋保護戦略となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein. Although lactoferrin exhibits organ-protective effects, it is still unclear whether it attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. The purpose of this study was to investigate the effects and mechanism of lactoferrin on myocardial ischemia-reperfusion injury.

Hearts were harvested from Wistar rats and perfused using the Langendorff system. The primary outcome was the recovery of cardiac contractility after total cardiac ischemia. Enteral lactoferrin was superior in restoring cardiac contractility after ischemia; the PKA pathway was significantly activated and serum GLP-1 was elevated.

In conclusion, enteral lactoferrin induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury via the PKA signaling pathway and increased serum GLP-1 levels. Preoperative oral lactoferrin intake may be cardioprotective against ischemia-reperfusion injury in cardiac surgery patients.

研究分野：麻酔

キーワード：心筋虚血再灌流障害 ラクトフェリン 心臓手術 人工心肺 心収縮力

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 心臓手術における心筋虚血再灌流障害

今日、より多くの患者が人工心肺を用いた心臓手術を受けているが、人工心肺装置による炎症反応の惹起・心停止による虚血再灌流障害に起因する術後心不全など合併症率が高い。心筋虚血再灌流障害に対しては、PI3K/Akt 経路を介した吸入麻酔を用いた薬理的プレコンディショニングによる心筋保護が臨床的に使用され効果を示している (Anesthesiology 2020;132:1429-46.) が、その効果は限定的である。

#### (2) ラクトフェリンと臓器保護

ラクトフェリンは鉄結合性糖タン白質で母乳に多く含まれ、免疫に関して B 細胞、T 細胞の成熟化、IgA や IgG の分泌、炎症性サイトカインの分泌抑制、マクロファージの貪食能の強化などを示し (Acta Pharmacol Sin 2014;35:557-66.)、PI3K/Akt 経路が関与している (Biochem Cell Biol. 2012;90:476-84.)。さらに、抗炎症作用による脳保護効果 (Ann Clin Transl Neurol. 2014;1:955-67.)、肺保護・腎保護作用 (Mol Imaging Biol. 2020;22:526-38.) を認めている。心血管系に関しては、動脈硬化抑制 (J Med Food. 2019;22:1000-8.)、カテコラミン心筋症への保護効果 (Biometals. 2009;22:353-6.) がある。虚血再灌流障害に対しては、脳 (J Dairy Sci. 2020;103:4895-906.)・腸管 (Eur Surg Res. 2012;49:99-106.) で効果を認めるが、心筋虚血再灌流障害に対しては不明である。

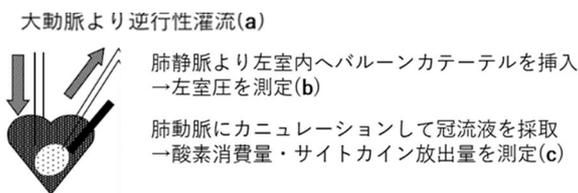
### 2. 研究の目的

本研究では「ラクトフェリンは心筋において PI3K/Akt 経路を活性化することにより、心筋虚血再灌流障害に対して保護作用を発揮する。」という仮説を立てて、ラットの摘出孤立心筋を用いて検討した。主要評価項目は心収縮力とした。その機序の一部としてシグナル経路を測定した。

### 3. 研究の方法

- (1) ペントバルビタール腹腔内投与による全身麻酔下にラットから心臓を摘出して、大動脈をカニューレションして、ランゲンドルフ法により KH buffer で逆行性灌流を行った (図 1)。
- (2) 心収縮力測定のために、バルーンカテーテルを左心室に挿入した (図 1)。

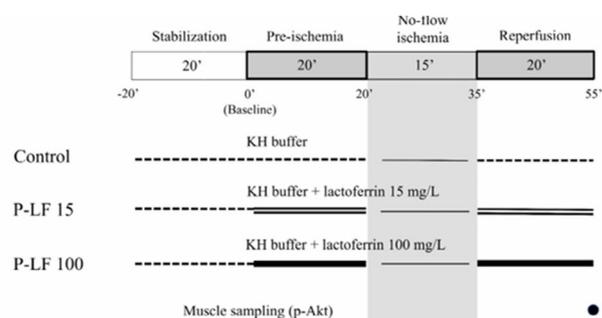
図 1 ランゲンドルフ法模式図



実験 ラクトフェリンの灌流液投与

- (3) - 摘出心の心収縮力が安定した後に、ラクトフェリン低用量群 (15mg/L) (P-LF15 群)、ラクトフェリン高用量群 (100mg/L) (P-LF100 群) で先行投与 20 分間を開始して、虚血 15 分、再灌流 20 分間のプロトコルでコントロールを加えた 3 群間 (各群 n=8) で比較した。虚血中は 222 回/分でペーシングを行った (図 2)。

図 2 実験 プロトコール



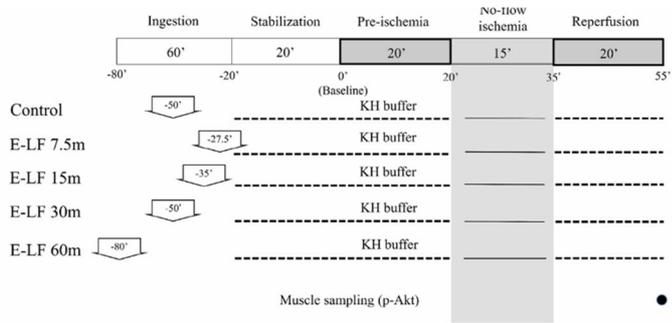
- (4) - 心収縮力 (左室圧 (LV) dP/dt max)、を先行投与前 (baseline)、先行投与 20 分、再灌流後 5 分、10 分、15 分、20 分で測定した。
- (5) - 再灌流後 20 分の心臓を液体窒素で瞬間凍結・凍結乾燥して、ウエスタンブロット法で再灌流法終了時の心筋内 pAkt を測定した。 (図 2)

実験 ラクトフェリンの強制給仕 1 (投与タイミングの検討)

(3) ラクトフェリン 1000mg/kg を全身麻酔(ペントバルビタール腹腔内投与)前 7.5 分前(E-LF7.5m 群)、15 分前(E-LF15m 群)、30 分前(E-LF30m 群)、60 分前(E-LF60m 群)に投与した。さらにコントロール群として生食投与群を用いた。

(4) 以下実験 と同様のタイムラインで行い、同様の測定を行った(図 3)。

図 3 実験 プロトコル

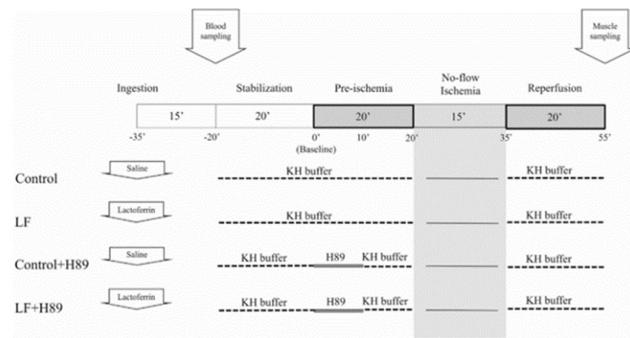


実験 ラクトフェリンの強制給仕 2

(PKA の関与の検討)

(3) 全身麻酔(ペントバルビタール腹腔内投与)前 15 分前に、ラクトフェリン 1000mg/kg もしくは生食投与をおこない、心臓切り出し時に血液検体採取し、遠心分離し、血清を保存した。

図 4 実験 プロトコル



(4) ランゲンドルフ法による心臓灌流後、心収縮力が安定したところで、それぞれをさらに 2 群に分け、先行投与 20 分の最初の 10 分間に PKA 遮断薬である H89 を入れる群(LF+H89 群、Control+H89 群)と KHbuffer で 20 分間灌流する群(LF 群、Control 群)の 4 群に分け、比較検討した。以後は実験 1.2 と同様の虚血 15 分、再灌流 20 分として心収縮力を比較した。(図 4)

(5) 再灌流後 20 分の心臓を瞬間凍結・凍結乾燥し、PKA をウエスタンブロット法で測定した。心臓摘出時に採取した血清を用いて ELISA 法で GLP1 とアディポネクチンを測定した。

統計は分散分析後に Dunnet 検定を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

#### 4. 研究成果

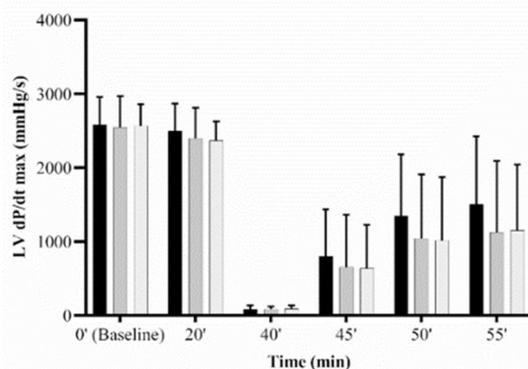
##### (1) 実験 と実験 の結果

実験 灌流液内ラクトフェリン投与は虚血再灌流後の心収縮力を改善しなかった(図 5A)。再灌流後 20 分の pAkt の発現レベルも変化がなかった(図 5B)。

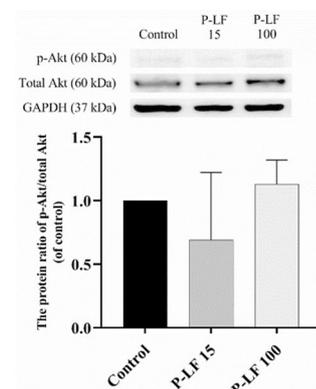
図 5 灌流液内ラクトフェリンの心収縮力(A)と心筋内 pAkt/tAkt(B)

実験 全身麻酔 15 分前と 30 分前のラクトフェリン強制給仕は虚血再灌流 10 分後・15 分後の

A

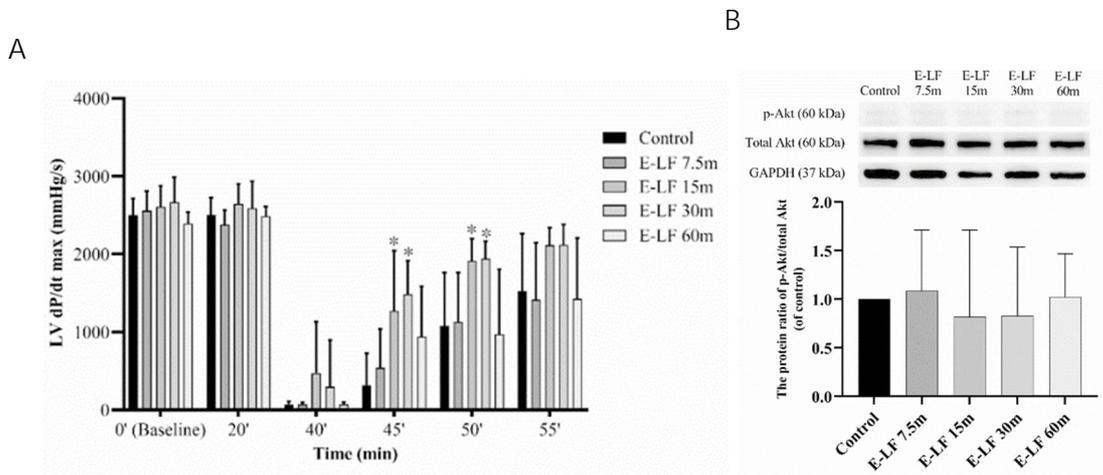


B



心収縮力の回復を促進した(図 6 A)。しかし、pAkt の発現レベルに変化はなかった(図 6 B)。

図6 ラクトフェリン強制給仕後の心収縮力(A)と心筋内 pAkt/tAkt(B)



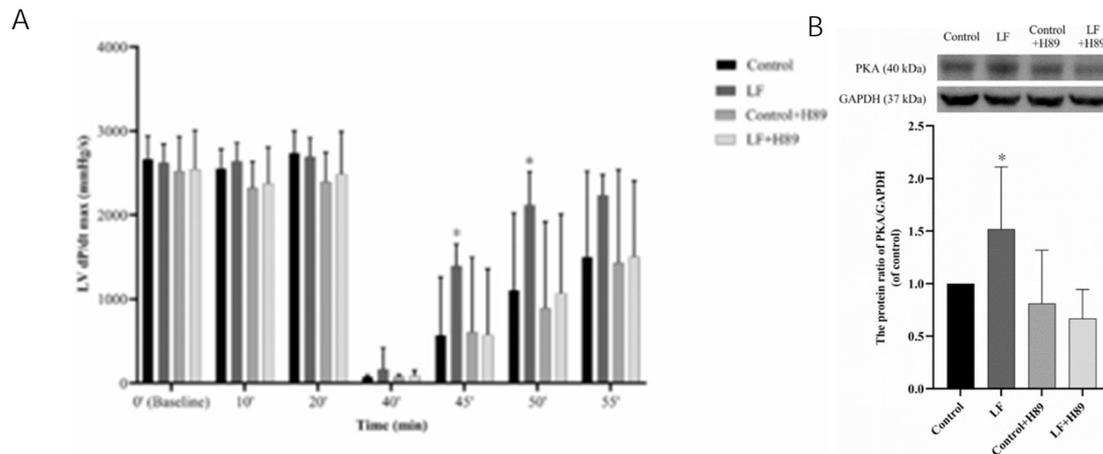
(2)実験 の解釈と実験 の計画

これらの実験からラクトフェリンには直接的な心筋保護作用はなく、腸管から吸収され、腸間膜脂肪に達した後に、何らかの物質を生成もしくは活性化することで、心筋保護作用を認めたと考えられた。さらに、ラクトフェリンはPKAを介した臓器保護効果も示していることから、PKAの関与を予測した。加えて、PKAを介する心筋保護物質としてGLP1とアディポネクチンが候補として考えられたため、実験を企画した(方法参照)。

(3)実験 の結果

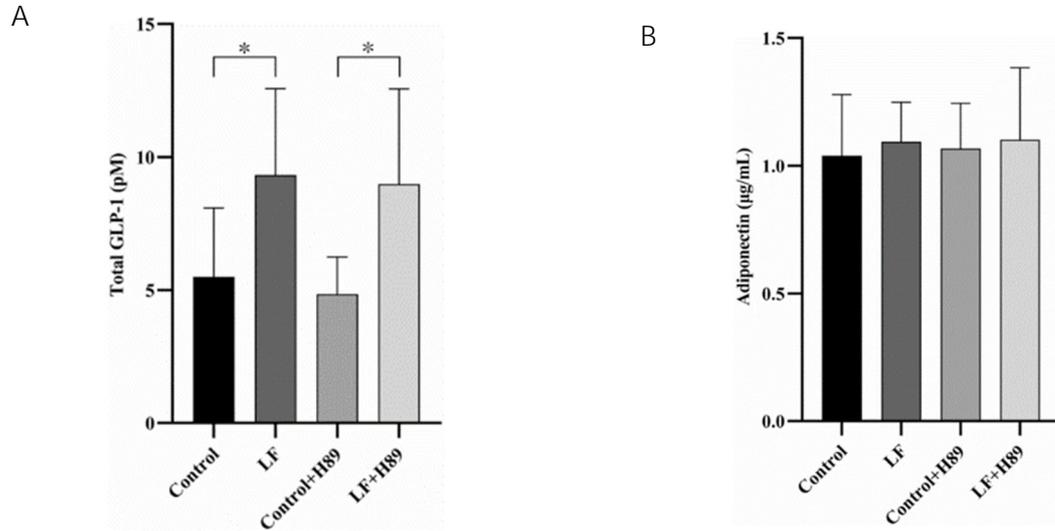
ラクトフェリン群では再灌流後10分・15分の心収縮力の回復を促進したが、その効果はPKA遮断薬を加えるとその効果は消失した(図7A)。ウエスタンブロットによるPKAの測定結果では、ラクトフェリン群でPKAの上昇が見られたが、LT+H89群ではPKAの活性化が見られなかった(図7B)。

図7 ラクトフェリン強制給仕後の心収縮力(A)と再灌流後20分の心筋内PKA(B)



ELISA法で測定したGLP1はLF群とLF+H89群で上昇した(図8A)が、アディポネクチンは、ラクトフェリンとコントロール群で差は認めなかった(図8B)。

図 8 心筋摘出時の血清 GLP1 濃度(A)とアディポネクチン濃度(B)



以上の結果から、経腸的ラクトフェリン投与の心筋保護効果は、ラクトフェリンの直接的な PI3K/Akt 経路を介した効果ではなく、二次物質の誘導もしくは活性化による PKA を介した効果であることが明らかになった。二次物質としては GLP1 の可能性が示唆された。

腸管から吸収されるラクトフェリンの心筋虚血再灌流障害に対する保護効果とその一部が明らかになった。心臓外科手術の術前に使用する根拠が得られ、周術期の心筋保護戦略の一つとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Omiya Keisuke, Nakadate Yosuke, Sato Hiroaki, Oguchi Takeshi, Matsuoka Toru, Kawakami Akiko, Schricker Thomas, Matsukawa Takashi	4. 巻 113
2. 論文標題 Role of the protein kinase A signaling pathway and identification of mediators in the cardioprotective effects of enteral lactoferrin for ischemia-reperfusion injury in an isolated rat heart model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrition	6. 最初と最後の頁 112088 ~ 112088
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nut.2023.112088	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 該当する

〔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	中橋 陽介  (Nakadate Yosuke)  (50597002)	筑波大学・医学医療系・講師   (12102)	
研究分担者	小口 健史  (Nakadate Yosuke)  (60201399)	山梨大学・大学院総合研究部・准教授   (13501)	

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