

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591025

研究課題名(和文) 熱ショック蛋白を介するポストコンディショニングの心保護効果

研究課題名(英文) Heat shock protein mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning

研究代表者

竹内 利治 (Takeuchi, Toshiharu)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：10372278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円、(間接経費) 540,000円

研究成果の概要(和文)：急性心筋梗塞の再灌流療法時に短時間の虚血と再灌流を繰り返すポストコンディショニングは再灌流障害を有意に抑制した。その機序を解明するために、白血球中のHSP72発現量を再灌流前から再灌流後48時間まで経時的に評価した。梗塞前狭心症(+)群は梗塞前狭心症(-)群に比し、再灌流前のHSP72発現量が3.4倍増加していたが、再灌流後のピーク値は両群で有意差を認めなかった。注目すべき点は、梗塞前狭心症(-)群でもポストコンディショニングを施行すると、HSP72の発現量は再灌流前に比し14.9倍の増加を認めた。以上よりポストコンディショニングは、HSP72の増加を介し心保護効果をもたらすことが示された。

研究成果の概要(英文)：Ischemic postconditioning to repeat ischemia and reperfusion of the short time at reperfusion therapy for patient with acute myocardial infarction is effective strategy to reduce reperfusion injury. To elucidate the mechanism of postconditioning, we evaluated HSP72 expression levels in a white blood corpuscle until 48 hours after reperfusion. We compared prodromal angina (+) group with prodromal angina (-) group. There was no significant difference in peak HSP72 level after reperfusion between both groups. However, in prodromal angina (+) group, HSP72 expression level before reperfusion has increased to 3.4 times of prodromal angina (-) group. Interestingly, in subgroup of postconditioning(+) among prodromal angina (-) group, HSP72 expression level showed a marked increase also 14.9 times as compared to before reperfusion. It was shown that the postconditioning induced the cardioprotection effect through increase of HSP72.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：臨床心血管病態学 急性心筋梗塞 再灌流障害 ポストコンディショニング 熱ショック蛋白

研究開始当初の背景

(1) 心筋梗塞の急性期再灌流療法の有用性は確立されており、現在多くの施設で積極的に行われている。しかし、致死性不整脈や slow flow 現象を惹起する再灌流障害は未解決の課題であり、これをいかに抑制するかが予後を決定する鍵とも言える。虚血プレコンディショニングは先行する短時間の虚血により虚血耐性を獲得する内因性の心保護機構であるが、臨床的にも梗塞前狭心症が心筋傷害を軽減し心機能保持に好影響をもたらすことが知られている。しかし、梗塞前狭心症を有する症例は約半数程度であり、さらに我々の検討では高血圧性肥大大心などの病的心ではその効果が減弱し(*Circ J* 275: 1192-9, 2011)、この恩恵を享受できる症例は限定されてしまう点が大きな問題である。

(2) ニコランジルはプレコンディショニングの end effector であるミトコンドリアの ATP 感受性 K チャンネルの開口薬であるため、再灌流障害の抑制効果が期待されたが、J-WIND 試験においてニコランジルの有効性は否定され(*Lancet*.27:370:1483-93, 2007)、薬理的プレコンディショニング効果は認められなかった。また EMERALD 試験では末梢保護・血栓吸引デバイスの有用性が検討されたが、梗塞サイズ縮小および予後改善効果は認められなかった(*JAMA*. 293:9: 1063 -72, 2005)。すなわち薬物治療・インターベンション治療のいずれにおいても、再灌流障害抑制効果を示すエビデンスはないというのが現状である。

(3) 動物実験において、長時間の冠動脈閉塞後に短時間の虚血と再灌流を繰り返すポストコンディショニングは、プレコンディショニングに匹敵する強い心保護効果があると報告された(*Am J Physiol*. 285:H579-88, 2003)。ヒトでは急性心筋梗塞患者にステント留置を行い、その直後に1分間のバルーン拡張と収縮を4回繰り返したところ、36%の梗塞サイズ縮小効果が認められた(*Circulation* 112:2143-48,

2005)。我々も同様の検討をしたところ、最大 creatine kinase (CK) 値は46%低下し、再灌流性不整脈は出現せず、これまで検討されてきた“modified reperfusion”の中で最も有効な方法であることが示唆された。

(4) 熱ショック蛋白(HSP)は、生体が熱刺激や低酸素などのストレスに曝されると誘導合成されるストレス蛋白であり、特に HSP70s は心保護的に作用する。我々は心筋梗塞再灌流療法時の白血球中 HSP72 の発現量は心筋逸脱酵素量と逆相関し、遠隔期の心機能と正相関することを示した(*Circulation* 104: 11-651, 2001(abstract))。すなわち HSP72 は心筋虚血・再灌流障害に対する虚血耐性を上昇させ、梗塞サイズ縮小・心機能回復を促進させる機能を有することを見出した。

(5) ポストコンディショニングは心保護効果が期待できる再灌流療法として注目されているが、その方法は統一されておらず、そのメカニズムの解明も十分ではない。我々は、虚血と再酸素化の反復により HSP72 の発現が増強することに着目し、ポストコンディショニングによる梗塞巣の拡大阻止や心機能回復に HSP72 の関与している可能性を考えた。これがメカニズムの解明に繋がり、本法の有用性が広く認識され、急性心筋梗塞患者の予後改善に寄与する標準的治療となる可能性がある。

研究の目的

(1) 急性心筋梗塞の再灌流療法前後で白血球中の HSP72 の発現量を測定し、ポストコンディショニングの機序として HSP72 を介する心保護効果について検討する。

(2) ポストコンディショニングと梗塞前狭心症によるプレコンディショニングにおける HSP72 の発現量と、梗塞サイズ縮小効果および心機能回復効果などについて比較検討を行い、両者の相乗効果の有無についても研究する。

3. 研究の方法

(1) 対象: 当院に来院した初回急性心筋梗塞症例で、発症 12 時間以内に冠動脈造影(CAG)を施行し、完全または亜完全閉塞の一枝病変の症例を対象とする。急性心筋梗塞の診断は 30 分以上持続する胸痛、標準 12 誘導心電図にて隣接する 2 誘導以上で 1mm 以上の ST 上昇、正常上限の 2 倍以上の CK 上昇により判定する。心筋梗塞の既往、心原性ショック、緊急冠動脈バイパス手術が施行された症例は除外する。これらの対象をコントロール群とポストコンディショニング群の 2 群に無作為に割り付けをする。

(2) ポストコンディショニングの方法: Staatらが報告(*Circulation*. 2005;112:2143-48)したポストコンディショニングの方法は、Direct stenting の後、1 分間の再灌流と 1 分間のバルーン拡張を 4 回繰り返すという方法であった。

しかし、この方法では閉塞長および閉塞部末梢血管径の情報などが不明であり、最適なステント選択が困難であるという問題点が浮き彫りになった。そこでわれわれは新たなポストコンディショニング法として、まずバルーンによる拡張を行い、その後 1 分以内の再灌流と 1 分間のバルーン拡張を 4 回繰り返し、最終的に適切なサイズのステントを留置するという方法を考案した。

コントロール群では、従来通りのバルーンによる前拡張もしくは血栓吸引療法を行い、その後適切なサイズのステント留置を行う。ポストコンディショニング群では血栓吸引は行わず、ポストコンディショニングを行った後にステントを留置する。最終的なステントの拡張状態などは、血管内超音波にて確認する。

さらに梗塞前狭心症(発症前 48 時間以内の狭心症発作)の有無により、各群とも 2 群に分類。ポストコンディショニングと梗塞前狭心症によるプレコンディショニング効果の同等性、相違点、相乗効果について検討する。

(3) 評価方法

標準 12 誘導心電図(ST resolution): 来院時と再灌流 1 時間後と 24 時間後の 12 誘導心電図について、J 点から 20ms 後の ST 上昇の総和を測定し、ST レベル減少率を算出する。

生化学検査:

CK 値: 再灌流直後から 24 時間までは 4 時間毎、以後 72 時間まで 6 時間毎に測定する。このデータをプロットし、CK 値曲線下面積(CK-AUC)を算出する。

HSP72 活性: 再灌流前、再灌流直後から 24 時間までは 4 時間毎、以後 72 時間まで、分離白血球中の HSP72 発現量を測定する。測定には HSP72 抗体(DAKO 社 kit)およびフローサイトメトリー法を用いて定量的に評価をする。

冠動脈造影(CAG)、左室造影(LVG): 梗塞責任血管の血流は DICOM ビューワを用いて TIMI frame count を算出し、slow flow の程度を評価する。また van 't Hof らの報告(*Circulation* 1998; 97; 2302-6)に基づき、再灌流後の CAG の心筋染影度 myocardial blush grade にて心筋微小循環障害を評価する。4 週間後の亜急性期と 6 カ月後の慢性期 LVG を施行する。左心機能解析ソフトを用いて、左室駆出率(LVEF)は右前斜位 30° で area-length 法にて算出する。

心臓核医学(TL, BMIPP): 発症後 1 週間以内に 2 日以上の間隔をあけて、²⁰¹Tl (TL) SPECT と ¹²³I-BMIPP (BMIPP) SPECT を撮像し、さらに 6 カ月後と 1 年後に TL を撮像する。得られた SPECT は短軸断層像および長軸断層像より 17 セグメントに分割し、TL の集積異常は視覚的に 0~3 の 4 段階でスコア化し(0; 正常、1; 軽度集積低下、2; 中等度集積低下、3; 高度集積低下または欠損)。各セグメントのスコアの総和を TL defect score とする。心筋救済率は risk area を BMIPP の集積低下領域と仮定し、その区域内における TL の集積度として算出する。さらに TL では Quantitative Gated SPECT により、LVEF などの左心機能も評価する。

心臓 MRI：発症後 10 日以内と 6 か月後にガドリニウム造影 MRI を施行する。遅延ガドリニウム造影 (LGE) 部位の分布を左室基部、中部、心尖部の各短軸像を、前壁・中隔・下壁・側壁に分割し、12 分画で LGE の壁内深度を 1～4 の 4 段階でスコア化し、各セグメントのスコアの総和を total LGE として算出する。

評価項目

下記に示す評価項目に対し、コントロール群とポストコンディショニング群とで比較し、HSP72 発現量との関連を明らかにする。

(a) 梗塞サイズ：CK-AUC、TL と BMIPP から算出した心筋救済率、心臓 MRI の total LGE。

(b) 左心機能：LVG より算出した LVEF と左室局所壁運動、TL の QGS から算出した LVEF。

(c) 再灌流障害：VT・Vf などの再灌流性不整脈の発生、ST 再上昇。

(d) 微小循環障害：TIMI frame count、complete ST resolution、myocardial blush grade。

(e) 予後：全死亡、心臓死、急性冠症候群の発生、心不全の発症、血行再建術の施行。

4 . 研究成果

再灌流療法前の白血球中の HSP72 発現量は、コントロール群とポストコンディショニング群の両群で差は認めなかった。しかし、梗塞前狭心症(-)群： 3.3 ± 2.2 MF1 に対し、梗塞前狭心症(+)群： 11.3 ± 8.0 MF1 と虚血プレコンディショニング効果により HSP72 の発現量は 3.4 倍の有意な増加を示していた。一方、再灌流後の HSP72 発現のピーク値は梗塞前狭心症(-)群： 20.2 ± 7.6 MF1 に対し、梗塞前狭心症(+)群： 16.8 ± 6.9 MF1 と両群で有意差を認めなかった。

しかし、再灌流前 HSP 発現量に対する再灌流後の HSP72 発現ピーク値は、梗塞前狭心症

(-)群でもポストコンディショニングを施行すると、HSP72 の発現量は再灌流前に比し 14.9 倍も著明な増加を認めた。以上よりポストコンディショニングは HSP72 の発現を増加させ、再灌流障害抑制および心保護効果をもたらすことが示された (論文投稿中)。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Ota H, Takeuchi T, Sato N, Hasebe N. Dipstick proteinuria as a surrogate marker of long-term mortality after acute myocardial infarction. J Cardiol. 2013 Nov;62(5):277-82. (査読あり) doi:10.1016/j.jjcc.2013.05.002.

Nimura A, Sakamoto N, Nakagawa N, Ota H, Tanabe Y, Takeuchi T, Natori S, Sato N, Hasebe N, Kawamura Y. Site of Transmural Late Gadolinium Enhancement on the Cardiac MRI Coincides With the ECG Leads Exhibiting Terminal QRS Distortion in Patients With ST-Elevation Myocardial Infarctions. Int Heart J. 2012; 53: 270-275. (査読あり) <http://dx.doi.org/10.1536/ihj.53.270>

Takeuchi T, Ishii Y, Kikuchi K, Hasebe N. Ischemic preconditioning effect of prodromal angina is attenuated in acute myocardial infarction patients with hypertensive left ventricular hypertrophy. Circ J. 2011; 75: 1192-1199. (査読あり) <http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-10-0906>

[学会発表](計4件)

Aita M, Takeuchi T, Hasebe N. Micro-circulatory dysfunction determines the long-term prognosis in asymptomatic patients with non-obstructive hypertrophic cardiomyopathy. The American College of Cardiology 62nd Annual Scientific Session. Mar, 2013. San Francisco, USA.

Ota H, Takeuchi T, Hasebe N. Micro-albuminuria Associated with Functionally Impaired Endothelial Progenitor Cells Predicts In-Stent Late Loss via Cellular Senescence after Myocardial Infarction. American Heart Association Scientific Session 2012. Nov, 2012. Los Angeles, USA.

Takeuchi T, Ota H, Ishii Y, Hasebe N. Postconditioning as More Effective Strategy for Reduction of Reperfusion Injury in Acute Myocardial Infarction. European Society of Cardiology Congress 2012. Aug, 2012. Munich, Germany.

Ota H, Takeuchi T, Hasebe N. Functional disorder of endothelial progenitor cells enhance microalbuminuria predicting in-stent late loss in acute myocardial infarction. European Society of Cardiology Congress 2012. Aug, 2012. Munich, Germany.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹内利治 (TAKEUCHI Toshiharu)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：10372278

(2)研究分担者

長谷部直幸 (HASEBE Naoyuki)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：30192272