

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592025

研究課題名(和文) 顆粒球コロニー刺激因子の術前投与による致死的不整脈抑制の検討

研究課題名(英文) The prevention of perioperative mortal arrhythmia : the effect of Granulocyte-Colony Stimulating Factor Administration

研究代表者

下條 信威 (Shimojo, Nobutake)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：20462210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：集中治療室管理下において難治性致死性不整脈の治療には苦慮しているのが現状である。これまでの研究により、心臓手術患者へのG-CSF術前投与による適応が期待される。しかし、副作用を含めた認容性、その実際の効果など、そのための基礎研究は不十分であり、臨床に則した理想的な手術によるモデル動物を作成し、顆粒球コロニー刺激因子投与の術前投与の予防効果を検討し、その詳細なメカニズムの検討を行った。その結果、動物実験レベルでのその効果、メカニズムは解明され、新たな展開へも研究は進んだが、実臨床においては検討中であり、その結果が現在待たれている。

研究成果の概要(英文)：The antiarrhythmic effect of Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on hypertrophic cardiomyopathy (HCM) has not been clarified. Salt-sensitive rats were maintained on a high-salt diet as HCM models (n=17) and a low-salt as normal heart models (NH; n=5). After the treatments with 50µg/kg (i.p.) of G-CSF (9 HCMs and 2 NHs) and vehicle (8 HCMs and 3 NHs), rapid ventricular pacing was performed to evaluate the vulnerability to VT. The G-CSF reduced inducibility of VT as compared to vehicle in HCM (1 of 9 vs. 5 of 8, p=0.03). In addition, VT was not inducible in NH treated with G-CSF, although it was inducible in 1 of 3 NHs treated with vehicle. The G-CSF increased the phosphorylated Connexin-43 level as compared to vehicle in both HCM (1.4-fold vs. 1.2-fold, p<0.01) and NH (1.4-fold vs. 1-fold, p=0.04). The G-CSF is proposed as an antiarrhythmic agent in patients with HCM, because it reduces the vulnerability to VT by up-regulating the phosphorylated Connexin-43.

研究分野：循環器病学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

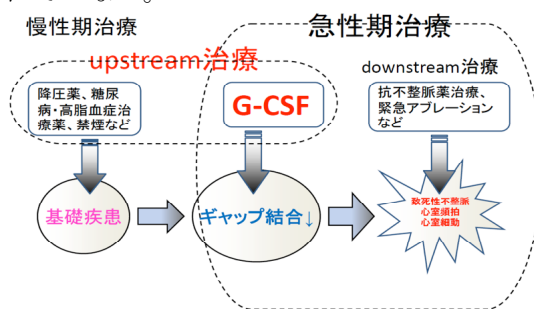
キーワード：心臓大血管外科学 致死性不整脈 顆粒球コロニー刺激因子 集中治療学

## 1. 研究開始当初の背景

集中治療室管理下において難治性致死性不整脈の治療に対するの現行の治療としては不整脈を押さえ込むような、いわゆる downstream 治療のみである。しかし、今後は長期予後を考慮し、平行して行える心筋保護のための強力な up-stream 治療の開始が必要である。一方、虚血性心疾患に対する顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の血管新生については、議論の余地を残すところであるが、G-CSF による治療法は簡便かつ侵襲を伴わない治療法として今後の発展が期待されている。

その中で、近年 G-CSF の血管新生によらない、心筋リモデリングおよびアポトーシスの両方の抑制効果が示唆された。さらに、G-CSF の心筋細胞間の gap junction の維持による心筋内不整脈の抑制効果が報告された。G-CSF には、up-stream 効果としての不整脈抑制効果が示唆された。

しかし、心筋虚血に伴う不整脈に対する効果およびメカニズムについては十分解明されていない。



## 2. 研究の目的

本研究では、心筋培養細胞を用い、G-CSF による gap junction の維持とそのメカニズムを解明する。さらに、急性心筋梗塞 (AMI) モデルマウス、虚血再灌流モデルマウスの両方を用いて G-CSF 治療群と非治療群の心室性頻拍 (VT)、心室細動 (VF) の発生頻度および生存率を比較する。不整脈モデルの確立とそれにコントロールを加えての G-CSF の不整脈に対する治療効果の検討を行うことを目標とした。

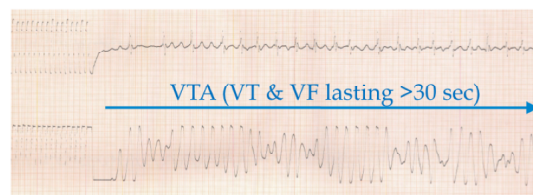
## 3. 研究の方法

臨床現場における集中治療管理下での不整脈の実態 (使用薬剤、発生頻度、致死率など) を把握する。モデル動物を作成し、動物実験による薬剤の認容性の検証、効果およびメカニズムの検討を行う。メカニズムについては、培養細胞も用いて、より詳細な検討を行う。

## VT モデルラット作成

12 weeks Rats (塩分感受性高血圧ラット) に高塩分食と低塩分食を与え、高血圧と普通血圧のラットを作成、17weeks より G-CSF (50g/kg) × 3 回/1 週で投与開始、同様に生食のみの投与群 (Vehicle 群) も作成した。18 weeks で以下の VT モデル作成プロトコルに従い、VT モデルを作成した。

下図の様に 30 秒以上の Rapid pacing のち経過観察とし、VT の持続時間などを計測した。G-CSF 投与効果の確認のため、血中白血球数をチェックしたが、G-CSF 投与群のみでの有意な上昇を認めた。



## Right Ventricular Burst pacing

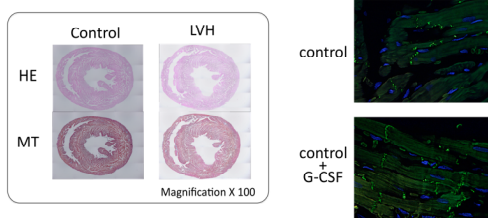
なお、AMI モデル、虚血再灌流モデルにおいては、十分な VT 発生頻度が得られず、今後検討が必要である。

## 4. 研究成果

電気刺激誘発によるラットの VT モデルの作成に成功した。この VT モデルラットを用いて、以下の図に示す結果を得た。

特に心肥大ラットにおいて、致死性不整脈 (VT) が誘発されやすいことが確認され、G-CSF の投与によりその発生は抑制された。非心肥大ラットにおいても VT の発生頻度は下がるものの、G-CSF による抑制効果は同様に観察された。G-CSF 投与に伴い、ラット心臓中の Connexin43 の発現は上昇しており、VT の発生への関与が示唆される結果であった。

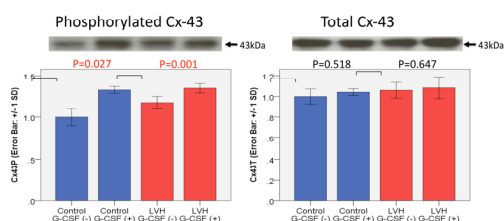
また、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ランジオロール (超短時間型 β 遮断薬) など心筋保護に働く他の薬剤との関与の検討も行った。結果はいずれも、学会発表レベルまで行い、EPA の心肥大との関連は論文化できた。EPA の心肥大への影響を調べるとともに、敗血症モデルなども用いて、エンドセリン拮抗薬、ランジオロールの頻脈への影響、心保護作用も検討した。



|                        | Control     |               | LVH model            |                      |
|------------------------|-------------|---------------|----------------------|----------------------|
|                        | G-CSF (n=2) | Vehicle (n=3) | G-CSF (n=9)          | Vehicle (n=8)        |
| Body weight, g         | 418±23      | 417±17        | 407±11               | 412±16               |
| Ventricle weight, g    | 1.1±0.1     | 1.1±0.1       | 1.2±0.1 <sup>#</sup> | 1.2±0.1 <sup>#</sup> |
| Sinus cycle length, ms | 188±32      | 208±3         | 176±31 <sup>#</sup>  | 176±25 <sup>#</sup>  |
| WBC, /μl               | 19370±1174* | 7700±2335     | 15083±4397*          | 6976±1308            |
| VT induction rate, %   | 0% (0/2)    | 33% (1/3)     | 11% (1/9)            | 63% (5/8)            |

\*p<0.05 vs Vehicle, <sup>#</sup>p<0.05 vs Control

|                              | G-CSF (n=9) | Vehicle (n=8) | P value |
|------------------------------|-------------|---------------|---------|
| Body weight, g               | 407±11      | 412±16        | 0.385   |
| Ventricle weight, g          | 1.2±0.1     | 1.2±0.1       | 0.658   |
| Sinus cycle length, ms       | 176±31      | 176±25        | 0.961   |
| WBC, /μl                     | 15083±4397* | 6976±1308     | <0.001  |
| VT induction rate, %         | 30±35       | 50±44         | 0.303   |
| 1 <sup>st</sup> induction, n | 4           | 5             | 0.488   |
| 2 <sup>nd</sup> induction, n | 3           | 2             | 0.728   |
| 3 <sup>rd</sup> induction, n | 1*          | 5             | 0.034   |



## 5. 主な発表論文等

(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 5 件)

1. Nobutake Shimojo, Subrina Jesmin, Satoshi Sakai, Seiji Maeda, Takashi Miyauchi, Taro Mizutani, Kazutaka Aonuma, Satoru Kawano. Fish oil constituent eicosapentaenoic acid inhibits endothelin-induced cardiomyocyte hypertrophy via PPAR- $\alpha$ . *Life Sci.* 2014 May 2;:S0024-3205(14)00445-7. doi: 10.1016/j.lfs.2014.04.025. 査読有り
2. Satoshi Sakai, Nobutake Shimojo, Taizo Kimura, Kazuko Tajiri, Hidekazu Maruyama, Satoru Homma, Keisuke Kuga, Taro Mizutani, Kazutaka Aonuma, Takashi Miyauchi. Involvement of peptidyl-prolyl isomerase Pin1 in the inhibitory effect of fluvastatin on endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Life Sci.* 2014 May 2;102(2):98-104. doi: 10.1016/j.lfs.2014.03.018. 査読有り

3. Yoshimoto Seki, Subrina Jesmin, Nobutake Shimojo, Majedul Islam, Arifur Rahman, Tanzila Khatun, Hidekazu Sakuramoto, Masami Oki, Aiko Sonobe, Junko Kamiyama, Keiichi Hagiya, Satoru Kawano, Taro Mizutani. Significant reversal of cardiac upregulated endothelin-1 system in a rat model of sepsis by landiolol hydrochloride. *Life Sci.* 2014 Apr 13. pii: S0024-3205(14)00405-6. 査読有り

4. Masami Oki, Subrina Jesmin, Majedul Islam, Chinba N Mowa, Tanzila Khatun, Nobutake Shimojo, Hideaki Sakuramoto, Junko Kamiyama, Satoru Kawano, Takashi Miyauchi, Taro Mizutani. Dual blockade of endothelin action exacerbates up-regulated VEGF angiogenic signaling in the heart of lipopolysaccharide-induced endotoxemic rat model. *Life Sci.* 2014 Feb 16. pii: S0024-3205(14)00238-0. 査読有り

5. Kazuko Tajiri, Nobutake Shimojo, Satoshi Sakai, Tomoko Machino-Ohtsuka, Kyoko Imanaka-Yoshida, Michiaki Hiroe, Yoshiko Tsujimura, Taizo Kimura, Akira Sato, Yasuhiro Yasutomi, Kazutaka Aonuma. Pitavastatin regulates helper T-cell differentiation and ameliorates autoimmune myocarditis in mice. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013 Oct;27(5):413-24. doi: 10.1007/s10557-013-6464-y. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

1. Yoshimoto Seki, Nobutake Shimojo, Jesmin Subrina, Majedul Islam, Tanzila Khatun, Hideaki Sakuramoto, Junko Kamiyama, Keiichi Hagiya, Satoru Kawano, Taro Mizutani. Effects of landiolol hydrochloride, an ultra-short-acting  $\beta$ -blocker, on cardiac endothelin system in a rat model of endotoxemia: a possible relevance with cardiac functional compensatory events at the early phase of sepsis. International Conference on Endothelin, 2013.9.11, Tokyo, Japan.
2. Nobutake Shimojo, Subrina Jesmin, Satoshi Sakai, Seiji Maeda, Takashi Miyauchi, Satoru Kawano, Taro Mizutani, Kazutaka Aonuma. Inhibitory effect of Eicosapentaenoic acid on cardiomyocyte in endothelin induced hypertrophy via PPAR- $\alpha$ .

International Conference on Endothelin,  
2013.9.11, Tokyo, Japan.

3. Masami Oki, Subrina Jesmin,  
Nobutake Shimojo, Majedul Islam,  
Tanzila Khatun, Hideaki Sakuramoto,  
Junko Kamiyama, Satoru Kawano,  
Taro Mizutani. Dual endothelin  
blockade exacerbates upregulated  
VEGF angiogenic signaling in the heart  
of lipopolysaccharide -induced  
endotoxemic rat model. International  
Conference on Endothelin, 2013.9.11,  
Tokyo, Japan.
4. Kazuko Tajiri, Nobutake Shimojo,  
Kazutaka Aonuma Pitavastatin  
ameliorates experimental autoimmune  
myocarditis by decreased Th1/Th17  
cytokines in mice. ESC Congress  
2012, 2012.8.25, Munich, Germany.
5. Takeshi Machino, Nobutake Shimojo,  
Dongzhu Xu, Rumi Koshitsuka, Yuri  
Kameda, Hideaki Sakuramoto, Satoru  
Kawano, Yukio Sekiguchi, Hiroshi Tada,  
and Kazutaka Aonuma. G-CSF Reduces  
Inducibility of Ventricular Tachycardia  
via Up-regulation of Phosphorylated  
Connexin-43 in Left Ventricular  
Hypertrophy Model Rats. 日本循環器学  
会, 2011.8.4, 横浜
6. Takeshi Machino, Nobutake Shimojo,  
Dongzhu Xu, Hiro Yamasaki, Miyako  
Igarashi, Kentaro Yoshida, Yukio  
Sekiguchi, Hiroshi Tada, and Kazutaka  
Aonuma, G-CSF Reduces Ventricular  
Tachycardia Inducibility in the Cardiac  
Hypertrophy via Up-regulation of  
Phosphorylated Connexin-43, Heart  
Rhythm 2011, 2011.5.5, San Francisco,  
California, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
なし

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
下條 信威 (SHIMOJO NOBUTAKE)  
筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号 : 20462210

(2) 分担研究者  
なし

(3) 連携研究者  
なし