

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592027

研究課題名(和文) インターロイキン - 11 を用いた新規心血管外科治療法の確立

研究課題名(英文) The Cardioprotective Effect Of Interleukin-11 in Cardiac Surgery

研究代表者

黄野 皓木 (KOUNO, Hiroki)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40375803

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)：<目的> IL-11の虚血再灌流障害に対する心保護効果について検討した。<方法> ラット心を用いた移植心モデルを作成しランゲンドルフで再還流した。それをIL-11投与群とコントロール群とで比較した。<結果> IL-11群では、再灌流後の心収縮力の改善とアポトーシス細胞数の有意な減少を認めた。<結論> IL-11には移植後の心機能不全を予防する効果があり、通常の開心術においても有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：<Objective> We sought to evaluate the cardioprotective effect of IL-11 during prolonged hypothermic ischemia and subsequent reperfusion using a rat heart donor model. <Methods> IL-11 was administered intravenously before harvesting the rat heart. The hearts were preserved in cold buffer for 6 hours, and then mounted onto a Langendorff perfusion apparatus for reperfusion using an oxygenated solution containing IL-11. Normal saline was used instead of IL-11 in the control group. Functional recovery of the reperfused heart was observed and measured, and apoptotic cells were counted using the TUNEL staining technique. <Results> Functional recovery was significant after 6 hours of cold ischemia in the IL-11 group. The number of apoptotic cells was also significantly smaller in the IL-11 group. <Conclusion> IL-11 significantly protected the heart in this rat ischemic model. This was associated with the prevention of apoptosis of the cells exposed to the ischemia-reperfusion injury.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：IL-11 心臓血管外科 心筋保護効果

1. 研究開始当初の背景

(1) 皮肉にも生活水準の向上や医学の進歩に伴い世界中の心不全患者は増加している。心不全は、悪性腫瘍に勝るとも劣らない予後不良な病態であり、その発症予防および治療に向けた取り組みが重要である。心臓外科領域において、手術中の心筋虚血が心不全悪化の大きな要因となることから、虚血再還流障害を抑制することこそ大きな進歩への転機となる。特に、増加傾向にある末期重症心不全患者に対する心臓移植への期待は、虚血再還流問題の解決により飛躍的に高まると言える。ただし、重症心不全に対する最終的な治療法とも言える心臓移植は、移植心の冷却保存時間の限度が4時間とされており、保存時間の超過は心臓移植成績の低下につながる重大な問題である。

(2) 我々はこれまで、心筋細胞にインターロイキン(IL)-11の受容体が発現しており、マウスを用いた実験で、IL-11を前投与することにより心筋の虚血再灌流障害が抑制されること(プレコンディショニング効果)、心筋梗塞後に投与することにより心不全の発症が抑制されること(心筋リモデリング抑制効果)を報告してきた。さらに、大動脈(イヌ)を用いた実験から、冠動脈結紮時(虚血時)にIL-11を投与し再灌流を行ったところ、虚血再灌流障害領域が縮小した(ポストコンディショニング効果)。また、米国では、IL-11は化学療法後の血小板減少症に対する治療薬として承認されており安全性の確認がなされている。以上のことから、IL-11は心筋保護作用を有するサイトカインであり、IL-11を用いた新規心血管病治療法の確立を構想するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、心筋細胞保護作用を有するサイトカインであるIL-11を用いて、心不全の発症・増悪予防法を確立することを目的とする。本研究では、移植心モデルを作成し、IL-11の虚血再灌流障害に対する心保護効果について調べ、移植心の保存状態の改善や保存時間の延長効果があるかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 概要

雄のSDラットの心臓を摘出し、6時間の冷却保存後にランゲンドルフ装置にて再灌流するが、心臓摘出前と再灌流中にIL-11を入れた投与群と非投与群において、心収縮力および採取した冠還流液中の心筋逸脱酵素の値を比較した。また、再灌流後、各種染色法を用いて壊死範囲を計測し、心筋のアポトーシス細胞数を計測し比較した。

(2) 研究プロトコール

全身麻酔下で気道確保、人工呼吸器管理されたラットで移植心モデルを作成した。ヒト組替えIL-11を用いて、IL-11投与群(n=10)には12 μg/kgのIL-11を心臓摘出10分前に経静脈的に全身投与し、摘出後は6時間の冷却保存(4℃)の後、ランゲンドルフ装置にて摘出心を復温(37℃)再灌流した(最大2時間)。その際、酸素化された還流液(KHバッファー液)中に18 μg/kgのIL-11を混入した。コントロール群(n=10)では、IL-11の代わりに同量の生理食塩水を用いた。

(3) 左室機能評価と心筋逸脱酵素測定

ランゲンドルフ装置で再灌流中、左室バルーンを用いて経時的に次のパラメータを測定した：左室収縮期圧(LVSP)、左心室拡張終期圧(LVEDP)、心室内圧上昇/下降曲線の傾き(+dP/dt、-dP/dt)、最大左心室圧(LVDP)は、測定したLVSPからLVEDPを引いて求めた。また、冠静脈(右房)より流出した還流液からも経時的に心筋逸脱酵素(CK-MB、AST)を採取し測定した。測定・採取する時間は、再灌流開始後30分(ベースライン)、60分、90分、120分とした。

(4) 心筋壊死範囲の測定

2時間の再灌流後、摘出心の乳頭筋レベルで切片を作成し、15分間triphenyltetrazolium chloride (TTC)染色を行ったあと、染色範囲を撮影した。

(5) TUNEL染色法によるアポトーシス検出

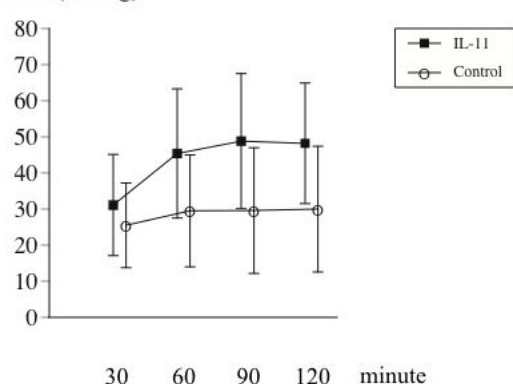
新たに5匹ずつのIL-11群とコントロール群を用意し、2時間の再灌流後、摘出心からそれぞれ15枚の切片を作成しTUNEL染色を行い、アポトーシス細胞数を計測し比較した。

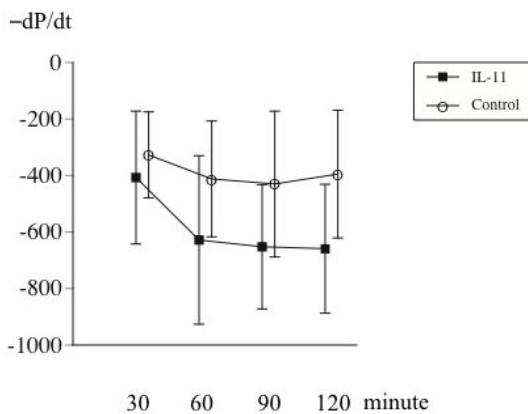
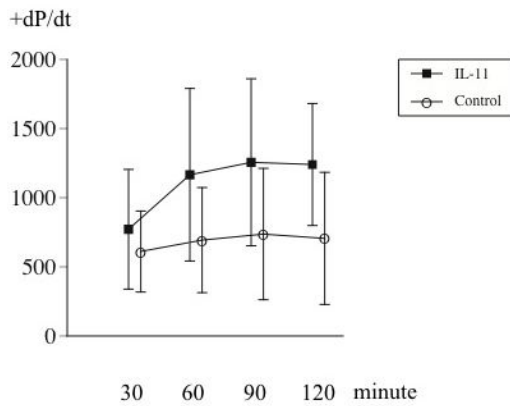
4. 研究成果

(1) 左室機能評価及び心筋逸脱酵素と壊死

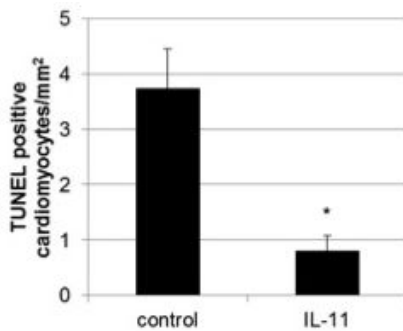
心機能評価において、ベースライン測定では両群間に有意差はなく、60分ではLVDPはIL-11群に有意に上昇していた。90分ではLVDPと+dP/dtがIL-11群に有意に高く、120分では全測定項目においてIL-11群に有意に高く認められた。心筋逸脱酵素(CK-MB、AST)においては、どの時点も両群間に有意差を認めなかった。また、TTC染色による壊死範囲も両群とも見られなかった。

LVDP (mmHg)





(2) TUNEL 染色によるアポトーシス検出
アポトーシス細胞数は IL-11 を投与した群で有意に少なかった。



Mean \pm S.E (control; n=75 fields from 5 mice, IL-11; n=75 fields from 5 mice).
* $p < 0.05$ by unpaired t-test.

(3) 考察

本研究では、移植心モデルを用いて、虚血再灌流障害に対する IL-11 の効果を調べた。本研究で明らかになったことは、IL-11 は、虚血・冷却保存に引き続く再灌流後の心機能回復を著明に改善し、心筋のアポトーシス細胞数を著明に減少させた。検索した範囲では、本研究が IL-11 の移植心モデルを用いて虚血再灌流障害に対する心保護効果を証明した最初の報告である。

IL-11 は IL-6 family のサイトカインで、脳や骨、精巣や腸管などに存在し、多機能を

持つことが知られている。しかしこれまでは、IL-11 の生理的役割は明らかでなかった。実験では IL-11 は骨髄造血作用を刺激することが証明されている。臨床ではヒト組換え IL-11 は血小板減少症に用いられている。また骨細胞の分化を促進するので骨粗鬆症にも用いられている。また、その抗炎症作用からクローン病や関節リウマチのような慢性炎症性疾患にも使用されている。さらに放射線治療中の腸管粘膜を保護する作用も認められており、あらゆる臓器で治療応用できる可能性がある。

最近我々は、IL-11 受容体が心筋細胞にも表出しており、IL-11 の投与で、細胞増殖・分化・生存過程を制御する STAT3 経路を活性化することを証明した。また、イヌの心臓で虚血前に IL-11 を投与すると、再灌流障害を軽減することを証明した。さらに心筋梗塞後に IL-11 を投与しても、線維化の抑制や細胞死の減少および血管新生の促進作用により、心機能障害を軽減させることが分かった。

本研究において、IL-11 は STAT3 経路を活性化し心筋のアポトーシス細胞数を減少させたと推測できる。しかし、このことが直接心機能回復の改善につながったとは考えにくく、それはアポトーシスによる心機能低下が認められるのは通常 24 時間以上経過してからと考えられるからである。心機能の回復に影響したのは、仮説ではあるが STAT3 を介したシグナル伝達により活性酸素(ROS)スカベンジャーが発現し、ROS を減少させ、心筋の stunning (仮死心筋) を抑制した可能性がある。しかしこれを証明するにはさらなる実験が必要である。

(4) 結論

IL-11 は冷却保存後の虚血再灌流障害に対し心保護作用があることが証明された。本研究結果から、虚血再灌流後の早期回復に IL-11 は有用であることがわかり、また、アポトーシス抑制効果もあることから受傷数日後の回復期における継続的な心筋保護にも関与する可能性があることもわかった。これは、実際の心臓移植において、IL-11 の投与により移植後の心機能の回復を早め、グラフト不全の発症を減少させる可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黄野 皓木 (KOUNO, Hiroki)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40375803

(2) 研究分担者

松宮 護郎 (MATSUMIYA, Goro)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：20314312

石坂 透 (ISHIZAKA, Toru)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10372616

石田 敬一 (ISHIDA, Keiichi)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40375671

藤尾 慈 (FUJIO, Yasushi)
大阪大学・薬学研究科・教授
研究者番号：20359839