

## 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号 : 37104

研究種目 : 若手研究(B)

研究期間 : 2011~2012

課題番号 : 23792094

研究課題名(和文) 短時間一過性四肢虚血がもたらす心筋虚血耐性メカニズムの解明

研究課題名(英文) A novel mechanism for remote ischemic preconditioning

研究代表者

大場 豊治(OBA TOYOHARU)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号 : 10389257

研究成果の概要(和文) : 短時間四肢虚血による心筋保護メカニズムの検証として、まず我々はマウスにおいて短時間四肢虚血後心筋保護に重要とされる血清エリスロポエチン濃度の上昇を確認した。さらに、同現象が一過性四肢虚血後の腎血流低下による HIF1 $\alpha$  の誘導が腎臓からのエリスロポエチン分泌に重要であることを見いだした。この短時間四肢虚血後の腎血流の低下は腎神経を除神経すると見られなくなることから、我々は短時間四肢虚血後の腎血流低下には神経調節が重要であることを発見した。短時間四肢虚血後の腎臓からのエリスロポエチン分泌が心保護に働くか心筋梗塞モデルを用いて考察し、短時間四肢虚血後に心筋梗塞を作成すると梗塞層の縮小が見られることを確認し、この縮小は抗エリスロポエチン抗体で消失することを確認した。人においても、一過性四肢虚血後に腎血流の低下が生じ、血清エリスロポエチン濃度が上昇することを確認した。

研究成果の概要(英文) : Remote ischemic preconditioning (RIPC) induced by brief episodes of blood flow occlusion applied in limbs is a powerful innate mechanism of cardiac protection against ischemia. Mechanisms for the cardiac RIPC have not been fully elucidated. Here we propose a novel mechanism of RIPC; renal nerve plays an important role in cardioprotection after myocardial infarction (MI) by releasing erythropoietin (EPO) production from the kidney. In mice transient limb ischemia decreased renal blood flow (RBF), upregulated hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) and EPO mRNA in the kidney, and increased the plasma EPO level. Transient limb ischemia activated cardioprotective signaling pathways and anti-apoptotic pathways in the heart, and reduced infarct size, which were abolished by administration of an EPO neutralizing antibody. Renal nerve denervation also abolished the transient limb ischemia-induced RBF reduction, EPO production, and cardioprotection. In humans, Transient limb ischemia of the upper arm decreased RBF and increased plasma EPO levels. Taken together, our data suggest that cardioprotection by transient limb ischemia is produced through renal nerve-mediated reduction of RBF associated with activation of the HIF1 $\alpha$ -EPO pathway.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：シグナル伝達、心筋保護、サイトカイン、神経調節、臓器連関

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 心筋逸脱酵素の上昇で表される心筋障害は、冠動脈形成術や冠動脈バイパス術後の患者の予後を規定すると言われている。

(J Am Coll Cardiol 2002;40: 1961-67)

(Anesthesiology 2003; 99: 270-74)

(Circulation 2006; 114: 1468-75)

(Am J Cardiol 2004; 94: 879-81)

(2) 1993年に一過性の心筋虚血により心筋が虚血耐性を獲得することが報告された。(Lancet 1993; 342: 276-77)

このような現象は ischemic preconditioning と言われる。近年一過性の四肢の虚血(例：上腕圧迫による5分間の虚血後、5分間の再灌流3回)が冠動脈バイパス術後や冠動脈形成術後の心筋保護および生存率改善に有効であったとの報告が相次いでなされている。

(Lancet 2007;370:575-79)

(Circulation 2009;119:820-827)

(3) この一過性の四肢虚血によって心筋が虚血耐性を獲得し、結果として心筋保護効果が得られる現象は remote ischemic preconditioning (以下 RIPC) と呼ばれている。そのメカニズムとして従来考えられている KATP チャネルを介した心筋プレコンディショニングや (Circulation 2007;116: 1386-1395)、酸化ストレスおよび炎症に関連した遺伝子の発現抑制の報告がなされている。しかしサイトカインを含む液性因子の関与については未だ十分な検討がなされていない。

(4) 一方、EPOなどのサイトカインは、心筋細胞の生存を促進させることが多くの動物実験で示されている。

(J. Clin. Inves 2003. 112:999-1007)

(Nature Medicine 2005;11:305-311)

(Circ. Res. 2007;101:910-918)

(5) さらに、EPOは心筋保護に働くとされる細胞内シグナルを活性化させ、心筋のアポトーシスの抑制や、血管新生を誘導すると報告されている。(Nat Med 11:305, 2005)

(6) このようにEPOと心筋保護の報告は数多くなされてはいるものの、RIPCにおいて四肢の一過性虚血がなぜ遠隔臓器である心筋での虚血耐性獲得を誘導し、心筋保護に働くのか、EPOについての十分な検討は現段階では

なされていない。

### 2. 研究の目的

近年一過性の四肢の虚血が心臓における虚血再灌流時の虚血耐性獲得に有効であるとの報告が相次いでなされている。この現象は remote ischemic preconditioning (以下 RIPC) といわれる。我々は一過性四肢虚血後人において血清 Erythropoietin (以下 EPO) 濃度が上昇することを見いだしている。RIPC において EPO の分泌亢進機序とそれが心筋虚血耐性に与える影響を検証し、骨格筋-腎臓-心臓の新たな臓器連関を検証することで、虚血再灌流時の臓器保護に革新的な治療戦略を見いだすことを目的にしている。

### 3. 研究の方法

我々は、まずマウス腎臓において一過性四肢虚血後 EPO の発現が亢進し、血清 EPO 濃度が上昇するかを検証する。また、腎血流の変化も検証する。さらに一過性四肢虚血後、心臓での細胞内シグナルの活性化の評価をおこなう。マウス抗 EPO 抗体をもちいて、それら細胞内シグナルが EPO 依存性であることを証明する。また同抗体を用いて一過性四肢虚血後の心筋障害抑制が EPO 依存性であることも、心筋梗塞モデルマウスを用いて評価する。一過性四肢虚血が EPO 分泌を亢進させる機序として、神経性因子もしくは液性因子の関与が推測される。神経性因子の検証のため、マウス腎神経を除神経し、一過性四肢虚血後の EPO 分泌亢進が見られるか、及び腎血流の変化を検証する。さらにマウス腎除神経が一過性四肢虚血後の心筋障害抑制に与える影響についても、心筋梗塞モデルを用いて検証する。

### 4. 研究成果

(1) マウスにおいて一過性四肢虚血後腎臓での EPOm-RNA の発現亢進がおり、血清 EPO 濃度の上昇が見られた。

(2) マウス一過性四肢虚血後 EPO の発現誘導因子である HIF1 $\alpha$  の発現が、腎臓の皮髄境界部において強くみられた。

(3) マウス一過性四肢虚血後、腎臓での HIF1 $\alpha$  の発現亢進は、一過性四肢虚血後の腎血流の低下によるということが判明した。

(4) マウス心筋梗塞モデルにおいて一過性四肢虚血によってもたらされる RIPC は梗塞

層を縮小させた。

(5) RIPC はマウス心筋梗塞後心筋保護に重要とされる STAT3 AKT ERK のリン酸化を亢進させた。

(6) RIPC によってもたらされる。梗塞層の縮小効果はマウス抗 EPO 抗体の投与で消失した。これは RIPC によりもたらされる心筋梗塞縮小効果には EPO が重要であることを意味する。

(7) マウス腎神経をフェノールで除神経すると、一過性四肢虚血後腎血流の低下が観察されなくなり、血清 EPO 濃度の上昇や、RIPC による心筋梗塞縮小効果が消失した。これは一過性四肢虚血後マウスにおいて、腎血流の低下を介した EPO 分泌が心筋保護に重要であることを意味する。

(8) 人において、一過性四肢虚血後、マウスと同様に血清 EPO 濃度の上昇がみられ、腎血流の低下が確認された。

#### 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 5 件)

(1) Mawatari K, Yasukawa H, Oba T, Nagata T, Togawa T, Tsukimura T, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T, Sakubaba H, Imaizumi T. Screening for Fabry disease in patients with left ventricular hypertrophy. Int J Cardiol in press 査読有

(2) Oba T, Yasukawa H, Hoshijima M, Sasaki KI, Futamata N, Fukui D, Mawatari K, Nagata T, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T, Nakamura K, Kang D, Yajima T, Knowlton KU, Imaizumi T: Cardiac-Specific Deletion of SOCS-3 Prevents Development of Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction. J Am Coll Cardiol 59 : 838-852, 2012 査読有

(3) Ohmura H, Yasukawa H, Minami T, Sugi Y, Oba T, Nagata T, Kyogoku S, Ohshima H, Aoki H, Imaizumi T : Cardiomyocyte-specific transgenic expression of lysyl oxidase-like protein-1 induces cardiac hypertrophy in mice. Hypertens Res 35 : 1063-1068, 2012 査読有

(4) Fukui D, Yasukawa H, Sugi Y, Nagata T, Kyogoku S, Futamata N, Oba T, Yokoyama T, Yokoyama S, Ueno T, Kage M, Imaizumi T : Transient reduction and activation of circulating dendritic cells in patients with acute myocardial infarction. Int J Cardiol 160: 216-219, 2012 査読有

(5) Yasukawa H, Nagata T, Oba T, Imaizumi T: SOCS3: a novel therapeutic target for cardioprotection. Jak-Stat 1: 234-240, 2012 査読有

[学会発表] (計 11 件)

① 安川 秀雄、大場 豊治、青木 浩樹、今泉 勉: 腎神経を介した臓器連関による心筋保護機構 -Remote ischemic preconditioning の臓器保護メカニズム-。第 16 回日本心血管内分泌代謝学会 (平成 24 年 11 月 24 日 東京) シンポジウム (臓器間ネットワークによる心血管内分泌代謝調節)

② The American Heart Association, The 85th Scientific Sessions, Los Angeles, USA, November 3-7, 2012  
Kyogoku S, Yasukawa H, Nagata T, Oba T, Ohshima H, Minami T, Yajima T, Hoshijima M, Aoki H, Knowlton KU, Imaizumi T. Cardiac-Specific Deletion of Suppressor of Cytokine Signaling-3 Prevents Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Mice.

③ The American Heart Association, The 85th Scientific Sessions, Los Angeles, USA, November 3-7, 2012  
Mawatari K, Tahara N, Yasukawa H, Oba T, Nagata T, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T, Mizoguchi M, Sugi Y, Adachi H, Imaizumi T. Pioglitazone Decreases Plasma Fibroblast Growth Factor-21 Levels in Patients with Type 2 Diabetes.

④ Kyogoku S, Yasukawa H, Nagata T, Oba T, Ohshima H, Minami T, Fukui D, Sugi Y, Aoki H, Imaizumi T: Prevention of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Cardiac-Specific SOCS3 Deficient Mice by Preserving Energy Metabolism. 第 29 回 国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会総会 (2012 年 10 月 26~27 日 ; 福岡)

⑤ 安川 秀雄、大場 豊治、永田 隆信、京極 幸子、大島 英樹、南 知子、青木 浩樹、今泉 勉 : 腎交感神経を介した臓器連関による心筋保護機構

厚生労働省難治性疾患克服研究事業 特発性心筋症に関する調査研究 2011 年度北風班報告会 (2012 年 10 月 18 日 大阪)

⑥京極 幸子、安川 秀雄、永田 隆信、大場 豊治、大島 英樹、南 知子、福井 大介、杉 雄介、青木 浩樹、今泉 勉: Prevention of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Cardiac-Specific SOCS3 Deficient Mice by Augmenting STAT3 Signaling Pathway  
第 35 回 心筋代謝研究会 (2012 年 7 月 7~8 日: 東京)

⑦安川 秀雄、馬渡 一寿、永田 隆信、杉 雄介、大場 豊治、京極 幸子、大島 英樹、南 知子、今泉 勉: サムスカの安全情報と使用経験  
久留米心不全セミナー (2012 年 5 月 18 日 久留米)

⑧Ohshima H, Yasukawa H, Nagata T, Kyogoku S, Oba T, Mawatari K, Futamata N, Minami T, Sugi Y, Sasaki K, Imaizumi T: Impaired Angiogenesis During Hindlimb Ischemia in Skeletal Muscle-Specific STAT3 Deficient Mice  
第 76 回日本循環器学会 (2012 年 3 月 16~18 日; 福岡)

⑨Oba T, Yasukawa H, Nagata T, Kyougoku S, Futamata N, Mawatari K, Minami T, Sugi Y, Fukui D, Aoki H, Imaizumi T: Activation of hypoxia inducible factor-erythropoietin pathway may prevent acute myocardial injury during remote ischemic preconditioning.  
第 76 回日本循環器学会 (2012 年 3 月 16~18 日; 福岡)

⑩Minami T, Yasukawa H, Nagata T, Oba T, Kyogoku S, Ohshima H, Aoki H, Yoshimura A, Imaizumi T: Prevention of Left Ventricular Remodeling after Acute Myocardial Infarction in Interleukin-17 Deficient Mice.  
第 76 回日本循環器学会 (2012 年 3 月 16~18 日; 福岡)

⑪馬渡 一寿、田原 宣広、安川 秀雄、大場 豊治、二又 誠義、永田 隆信、京極 幸子、大島 英樹、南 知子、溝口 ミノリ、足達 寿、今泉 勉; Pioglitazone Decreases Plasma Fibroblast Growth Factor-21 Levels in Patients with Type 2 Diabetes  
第 76 回日本循環器学会 (2012 年 3 月 16~18 日; 福岡)

[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]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
大場 豊治 (OBA TOYOHARU)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号: 10389257

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号: