

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461052

研究課題名(和文)ハイブリッド・コンディショニングによる心筋救済法の開発とHSPを介する機序の解明

研究課題名(英文)Development of hybrid-conditioning methods to salvage myocardium and elucidation of HSP mediated cardioprotection

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：初回急性心筋梗塞症例を対象にコントロール群とハイブリッド・コンディショニング群の2群に無作為に割り付けた。ハイブリッド・コンディショニング群では、下肢を5分間の加圧と5分間の除圧を繰り返すリモート・プレコンディショニングを3サイクル行う。その後、バルーンによる60秒間の拡張と30秒以内の再灌流を4回繰り返すポストコンディショニングを行い、最終的に適切なサイズのスtentを留置した。両群ともに再灌流治療の前後で経時的に採血を行い、分離白血球中のHSP72発現量を定量的に評価した。ハイブリッド・コンディショニング法はHSP72、HSP73の発現を増加させ、再灌流障害抑制をもたらすことが示された。

研究成果の概要(英文)：The first acute myocardial infarction patients were randomly assigned to the control group and the hybrid-conditioning group. In the hybrid-conditioning group, three cycles of remote preconditioning were repeated, with the lower limb being pressurized for 5 minutes and depressurized for 5 minutes. After remote preconditioning, postconditioning was performed 4 cycles of 60s balloon inflation and 30s deflation, and finally the appropriate sized stent was placed. In both groups, blood was collected over time with time before and after reperfusion treatment, and the expression level of HSP72 in the separated leukocytes was quantitatively evaluated. Hybrid-conditioning method was shown to increase the expression of HSP 72, resulting in suppression of reperfusion injury.

研究分野：循環器内科学

キーワード：急性心筋梗塞 再灌流障害 熱ショック蛋白 ポストコンディショニング リモート・コンディショニング
ハイブリッド・コンディショニング

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、急性心筋梗塞患者に対し経皮的冠動脈インターベンション治療が広く行われているが、その際に致死性不整脈や slow flow 現象を惹起してしまうことがあり、この再灌流障害をいかに抑制するかが大きな課題となっている。臨床的プレコンディショニングである梗塞前狭心症は心筋傷害を軽減し、心機能保持に好影響をもたらすことが知られているが、われわれは梗塞前狭心症を有する患者でも、高血圧性肥大心などの病的心では、心筋サルベージ効果が減弱することを報告した (*Takeuchi T. Circ J 275: 1192-9, 2011*)。これまでニコランジルによる薬理的プレコンディショニング効果 (*Lancet. 27;370:1483-93, 2007*) や、末梢保護・血栓吸引デバイスの有用性 (*JAMA. 293:9:1063-72, 2005*) が検討されてきたが、いずれも再灌流障害抑制効果は認められず、決定的手法がないのが現状である。

(2) 動物実験において、長時間の冠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、強力な心保護効果をもたらすことが報告されている (*Am J Physiol. 285:H579-88, 2003*)。ヒトでは急性心筋梗塞患者のステント留置の際にポストコンディショニングを施行したところ、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行ったところ、CPK 総和値の低下、再灌流不整脈の減少を認め、これまで検討された“modified reperfusion”の中で最も有効な方法であることが示唆された。そして注目すべきことは、梗塞前狭心症を有する症例ではポストコンディショニング効果がより顕著であり、CPK 総和値は 42% 低下、心室頻拍/心室細動は認めず、慢性期の心筋サルベージ率は 26% 増加した。この結果は梗塞前狭心症によるプレコンディショニングの上乗せ効果と考えられた。

(3) 近年リモート・プレコンディショニングという手法が認知されてきている。これは先行する短時間の虚血を標的臓器とは別の臓器で発生させ、引き続いて起こる標的臓器の虚血に対する抵抗性を増加させる方法である。本手法は予定された虚血を発生させる心臓手術のなどで臨床応用されているが、最近、急性心筋梗塞の再灌流療法直前にリモート・プレコンディショニングを施行すると、心保護効果が得られる可能性が報告された (*Lancet. 2010;375(9716):727-34*)。

(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。我々はヒト心筋梗塞において、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見出した (*Circulation 104: II-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。

(5) 今回われわれはプレコンディショニングとポストコンディショニングの心保護に対する相乗効果という新しい知見を得て、ポストコンディショニングとリモート・プレコンディショニングを組み合わせた“ハイブリッド・コンディショニング”法を考案した。本法は簡便ながら確実に強力な心保護効果が期待できるため、早急に標準的手法の確立が必要と考える。

2. 研究の目的

ハイブリッド・コンディショニング法が急性心筋梗塞患者の予後改善に優れた治療法となるように開発をすすめ、さらに本法による梗塞サイズの縮小効果や心機能回復効果について、HSP72 との関連を検討しその機序を解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 対象

当院に救急搬送され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)およびカテーテルインターベンション治療を行う予定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 creatine kinase の上昇により判定する。心筋梗塞の既往、心原性ショック、冠動脈バイパス手術施行症例は除外する。これらの対象をコントロール群とハイブリッド・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) ハイブリッド・コンディショニングの方法：

①リモート・コンディショニング

再灌流療法の 30-60 分前から施行するために、救急外来で急性心筋梗塞と診断した時点で手技を開始する。大腿部（下肢閉塞性動脈硬化症がある場合は上腕部）を加圧マスターを用いて 5 分間圧迫（収縮期血圧+50mmHg）する。圧迫解除を 5 分間した後、再度 5 分間同様に加圧する。この加圧—除圧を 3 サイクル繰り返し行う（計 25 分間）。この間に、カテーテル検査室の準備、採血、心エコーなどを同時進行で行い、再灌流治療の遅れがないように心がける。

②ポストコンディショニング

血栓吸引療法や血栓溶解療法は行わず、直接バルーンによる拡張を行い、その後 1 分以内（約 30 秒）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 TENT を留置する。

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 TENT を留置を行う。

最終的なス TENT の拡張状態などを血管内超音波(View-it, Terumo 社)にて確認する。

(3) 評価方法

①標準 12 誘導心電図 (ST resolution)

来院時と再灌流 1 時間後と 24 時間後の標準 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(前壁の場合: I, aVL, V1-6、非前壁の場合: II, III, aVF, V5-6)、ST レベル減少率を算出する。

②生化学検査

creatine kinase (CK) : 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 CK を測定する。さらに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, HSP73 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 時間まで採血を行い、分離白血球中の HSP72, HSP73 発現量を測定する。測定には HSP72, HSP73 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。

③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 の心筋染影の程度によって評価する myocardial blush grade で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。

④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 か月後と 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。

⑤心臓 MRI

発症後 14 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。

⑥評価項目

下記の評価項目に対し、コントロール群とハイブリッド・コンディショニング群との比較検討を行う。

- ① 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。
- ②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。
- ③再灌流障害: VT・Vf などの再灌流性不整脈の発生、ST 再上昇。
- ④微小循環障害: TIMI flame count、complete ST resolution、myocardial blush grade。
- ⑤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

(1) 患者背景はコントロール群とハイブリッド・コンディショニング群の両群で差は認めなかった。再灌流療法前の白血球中の HSP72 および HSP73 発現量は、コントロール群とハイブリッド・コンディショニング群の両群で差は認めなかったが、以前我々が報告した結果と同様に梗塞前狭心症を有する症例では、虚血プレコンディショニング効果により HSP72、HSP73 の発現量は有意な増加を示して

いた。また再灌流療法前後での HSP72、HSP73 発現量を比較した結果、再灌流前に比し再灌流後のピーク値は、ハイブリッド・コンディショニングを施行することにより 13 倍に増加した。梗塞サイズ、左心機能、微小循環障害の各指標には両群で差を認めなかったが、電氣的除細動を要する VT・Vf といった再灌流不整脈の出現はハイブリッド・コンディショニング群では認めなかった。

(2) 本研究の限界としては、完全なハイブリッド・コンディショニングを実施できる症例が少ない点である。リモート・コンディショニングの際に行う下肢加圧の疼痛が強く、加圧を低く抑えざるをえなかったり、加圧時間の短縮をした症例もある。また重症例では、IABP の挿入時に大腿のマニシュレットが清潔でないために再消毒が必要となることもあった。

(3) ハイブリッド・コンディショニング法は HSP72、HSP73 の発現を増加させ、再灌流障害抑制をもたらすことが示されたが、その方法には問題点もあり、ポストコンディショニング単独以上の有用性は示すことができず、重症例などではむしろ有害になる可能性もあり、今後更なる検討が必要である。

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)

[英文雑誌論文] (計 10 件)

- ① Saito T, Kawamura Y, Sato N, Sugiyama E, Okada M, **Takeuchi T**, Akasaka K, **Hasebe N**. Cerebral Microbleeds Remain for Nine Years: A Prospective Study with Yearly Magnetic Resonance Imaging. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2018 Feb;27(2):315-320.
- ② Kawaguchi S, **Takeuchi T**, **Hasebe N**. Pulmonary artery compression by a localized epicardial hematoma in a patient with idiopathic thrombocytopenic purpura

- after percutaneous coronary intervention: a case report. *BMC Cardiovasc Disord.* 2016 Oct 28;16(1):206.
- ③ Talib AK, Sato N, Myojo T, Sugiyama E, Nakagawa N, Sakamoto N, Tanabe Y, Fujino T, **Takeuchi T**, Akasaka K, Matsuhashi H, Saijo Y, Kawamura Y, Doi A, **Hasebe N**. Insight into specific pro-arrhythmic triggers in Brugada and early repolarization syndromes: results of long-term follow-up. *Heart Vessels.* 2016 Mar 11.
- ④ Sakamoto N, Sato N, Talib AK, Sugiyama E, Minoshima A, Tanabe Y, Fujino T, **Takeuchi T**, Akasaka K, Saijo Y, Kawamura Y, **Hasebe N**. Late Gadolinium Enhancement on Cardiac MRI Correlates with QT Dynamicity Represented by QT/RR Relationship in Patients with Ventricular Arrhythmias. *Ann Noninvasive Electrocardiol.* 2015 Jun 24. doi: 10.1111/anec.12280.
- ⑤ Sakamoto N, Sato N, Oikawa K, Karim Talib A, Sugiyama E, Minoshima A, Tanabe Y, **Takeuchi T**, Akasaka K, Saijo Y, Kawamura Y, **Hasebe N**. Late gadolinium enhancement of cardiac magnetic resonance imaging indicates abnormalities of time-domain T-wave alternans in hypertrophic cardiomyopathy with ventricular tachycardia. *Heart Rhythm.* 2015 Aug;12(8):1747-55.
- ⑥ Ota H, Takehara N, Aonuma T, Kabara M, Matsuki M, Yamauchi A, **Takeuchi T**, Kawabe J, **Hasebe N**. Association between Microalbuminuria Predicting In-Stent Restenosis after Myocardial Infarction and Cellular Senescence of Endothelial Progenitor Cells. *PLoS One.* 2015 Apr 13; 10(4): e0123733.
- ⑦ Sato N, Saijo Y, Sasagawa Y, Morimoto H, **Takeuchi T**, Sano H, Koyama S, Takehara N, Morita K, Sumitomo K, Maruyama J, Kikuchi K, **Hasebe N**; CAMUI Investigators. Visit-to-visit variability and seasonal variation in blood pressure: Combination of Antihypertensive Therapy in the Elderly, Multicenter Investigation (CAMUI) Trial subanalysis. *Clin Exp Hypertens.* 2015 Apr 9:1-9.
- ⑧ Sakamoto N, Kawamura Y, Sato N, Nimura A, Matsuki M, Yamauchi A, Kanno T, Tanabe Y, **Takeuchi T**, Natori S, Saijo Y, Aburano T, **Hasebe N**. Late gadolinium enhancement on cardiac magnetic resonance represents the depolarizing and repolarizing electrically damaged foci causing malignant ventricular arrhythmia in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart Rhythm.* 2015 Feb 12. pii: S1547-5271(15)00150-2.
- ⑨ Maruyama K, Chinda J, Kabara M, Nakagawa N, Fujino T, **Takeuchi T**, **Hasebe N**. Successful percutaneous transluminal angioplasty for the treatment of renovascular hypertension with an atrophic kidney. *Heart Vessels.* 2015 M; 30(2):274-9. (IF: 2.109)
- ⑩ Noro T, Takehara N, Sumitomo K, **Takeuchi T**, Ishii Y, Kato J, Kawabe J, **Hasebe N**. Initial reduction of oxidative stress by angiotensin receptor blocker contributes long term outcomes after

percutaneous coronary intervention. Am J
Cardiovasc Dis. 2014 29;4(4):159-67.

〔国際学会発表〕（計 2 件）

- ① **Takeuchi T**, Goto M, Aita M, Date A, Sugiyama E, Minoshima A, Sakamoto N, Tanabe Y, Sato N, **Hasebe N**. A Combination of 123I-BMIPP SPECT and Stress 201Tl Myocardial Perfusion SPECT as a Useful Prognostic Marker of Asymptomatic Patients with Non-obstructive Hypertrophic Cardiomyopathy. ACC2015, San Diego USA, 3/14-16, 2015
- ② **Takeuchi T**, Kitani Y, Minoshima A, **Hasebe N**. Ischemic Post-conditioning Enhances Induction of Cardioprotective Heat Shock Protein 72 in Patients With Acute Myocardial Infarction. AHA2017, Anaheim USA, 11/11-15, 2017

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

藁島 暁帆 (MINOSHIMA, Akiho)
旭川医科大学・医学部・特任助教
研究者番号：90645962

木谷 祐也 (KITANI, Yuya)
旭川医科大学・医学部・特任助教
研究者番号：10804809