

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462082

研究課題名(和文) インターロイキン-11の臨床外科領域への応用 - 大動物モデルによる前臨床試験 -

研究課題名(英文) The effect of interleukin-11 in a donation after circulatory death heart model

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラットで温阻血に対するIL-11の効果を検討した。IL-11群とコントロール群の摘出心臓に温阻血障害を与え、ランゲンドルフ装置で再灌流を行った。再灌流中の左室圧と冠灌流圧はIL-11群で良好であり、心筋逸脱酵素もIL-11群で低かった。両群とも明らかな壊死、アポトーシスはなかったが、電子顕微鏡でミトコンドリア障害の減弱をIL-11群に認めた。結論として、IL-11による心収縮機能改善効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：<Objective> The effect of IL-11 on warm ischemia was examined using a rat Langendorff heart model. <Method> Rats were allocated into IL-11-treated and untreated groups. Both groups were subjected to 25 min of warm ischemia followed by 60 min of reperfusion. The functional recovery of the reperfused heart was compared. Coronary effluents were collected to measure myocardial biomarkers. Myocardial necrosis and apoptosis were quantified using electron microscopy and staining techniques. <Results> The IL-11 group showed better contractile performance indicating improved recovery. The biomarkers were not significantly different. Electron microscopy revealed partial necrosis in both groups, but apoptosis was not present in either group. <Conclusion> IL-11 treatment improved the contractile performance of the heart subjected warm ischemia. This may be due to the alleviation of necrosis caused by IL-11, but another mechanism eliciting the cytokine's cytoprotective function may exist.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：IL-11 心筋保護効果 サイトカイン療法

1. 研究開始当初の背景

(1) 心移植は重症慢性心不全患者のための最も有効な治療だが、深刻なドナー心不足が続いている。日本だけでなく、世界的にも深刻なドナー心不足であり、これを解決する一つの方法として注目されているのが心停止後ドナー心移植(DCD)である。しかしながら、脳死後移植とは異なり、DCD ドナー心は温阻血障害を受けており、不可逆性臓器障害をもたらしているかもしれない。DCD 心移植の際に、温阻血障害時間(一般に、生命維持の中止と心臓保存液の投与の間の時間と定義される)の許容制限時間は比較的短く、通常 30 分未満とされている。

(2) インターロイキン-11(IL-11)は、虚血-再灌流傷害に対して心保護的な役割を備えていることが示されたインターロイキン-6ファミリーサイトカインであり、我々はIL-11受容体が心筋細胞で表されて、心筋線維化防止、リモデリング減少、脈管形成促進、アポトーシス阻害といった機序で虚血前と虚血後両方で虚血に対するIL-11の心保護作用があることを心筋梗塞動物モデルで示した。また最近では、我々は、IL-11が6時間の冷虚血で影響される心臓の機能的な回復を有意に改善すると示した。

(3) 当初、今回の研究では、前研究のテーマであった虚血に対するIL-11の心筋保護作用を、より臨床現場に近づけるため大動物を用いて同様に検証することで準備を進めてきた。しかしながら、この研究には温阻血時間が発生するため、温阻血に対するIL-11の影響も同時に検討する必要性がでてきた。また、実際の臨床現場においても温阻血に対する心筋保護も重要な課題であり、これに関しては未だ有益な研究成果の報告がない。そこで、まずはIL-11による温阻血心に対する心筋保護効果を検証した。

2. 研究の目的

この研究において、我々は、IL-11が温阻血障害を受けた心臓の機能的な回復に有益な影響を及ぼすと仮定し、DCD心臓移植をシミュレーションするラットでのランゲンドルフ灌流モデルを使用して、温阻血障害に関するIL-11の作用を調べた。

3. 研究の方法

(1) 概要

雄のSDラットの心臓を摘出し、25分の温阻血障害を加えた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灌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。また、電子顕微鏡検査にて細胞の形態的な異常について検討した。

(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DCDドナー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=11)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25分の温阻血を加え、ランゲンドルフ装置にて摘出心を再灌流した(60分間)。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、一定流量の冠灌流下での冠灌流圧も測定した。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(トロポニンI, CK-MB, Lactate)を採取し測定した。測定・採取する時間は、再灌流開始後10分、30分、60分とした。

(4) 心筋壊死範囲の測定

60分間の再灌流後、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、60分間の再灌流後、摘出心からそれぞれ複数の切片を作成しTUNEL染色を行い、アポトーシス細胞数を計測し比較した。

(6) 電子顕微鏡検査

新たに1匹ずつのIL-11群とコントロール群を用意し、60分間の再灌流後、摘出心を2%のグルタルアルデヒドで固定、2%のパラホルムアルデヒド(2%の四酸化オスミウムによるpostfixed)で後固定して水分を除き、重合させてから電子顕微鏡検査のためにスライスを作成した。画像は、126倍から21100倍の複数の倍率で観察した。

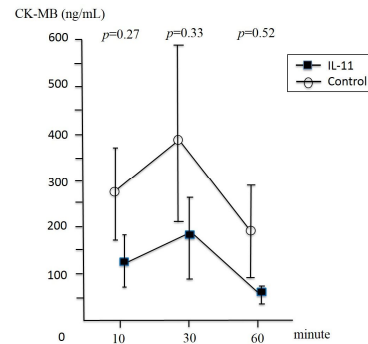
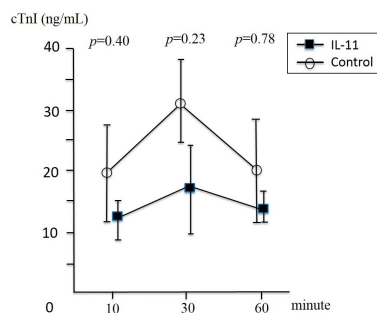
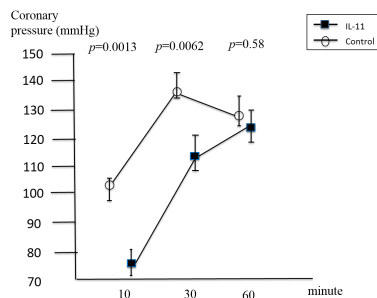
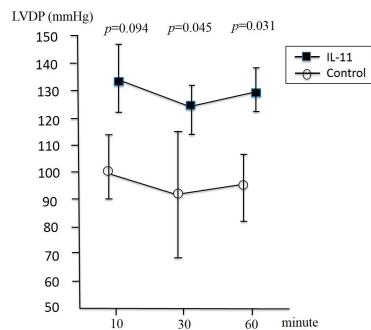
4. 研究成果

(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、30分、60分ではLVDPはIL-11群が有意に上昇していた。一定流量での冠灌流圧はIL-11投与群で有意に低かった。+dP/dt、-dP/dtにおいては有意差を認めなかった。心筋逸脱酵素(トロポニンI, CK-MB, Lactate)においては、トロポニンIとCK-MBではどの時点でもコントロール群が大きい結果で、Lactateは再灌流開始10分時点ではコントロール群が有意に大きかったが、その後は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。

(2) TUNEL染色によるアポトーシス検出
両群でアポトーシス細胞を検出しなかった。

(3) 電子顕微鏡検査

断片化したクリステとマトリックス濃度減少を認めるミトコンドリアと微細構造がよく保存されたミトコンドリアの両方がIL-11群、コントロール群の両方で観察された。よく保存されたミトコンドリアの比率は、2つの心臓間で同程度だった。



(4) 考察

本研究ではDCD心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、虚血後心臓収縮機能改善させ、血管抵抗低下をもたらした。また、コントロール群におけるそれらと比較してより低いトロポニンIとCK-MB値となったことから、IL-11群では壊死が阻害されているかもしれない。しかしながら、両群のTTC染色で壊死を検出できなかったことから不可逆的損傷が不十分であった可能性がある。本研究はIL-11のDCD心移植モデルを用いた虚血再灌流障害に対する心保護効果を示した最初の報告である。

IL-11はIL-6 familyのサイトカインで、造血組織、脳、骨、消化管などに存在し、多機能を持つことが知られている。しかしこれまで、IL-11の生理的役割は明らかでなかった。実験ではIL-11は骨髓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。

我々は、以前IL-11受容体が心筋細胞にも発現しており、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。我々はラット移植心モデルでの虚血再灌流障害での先行研究でも心保護効果を示している。

本研究において、IL-11はJAK/STAT経路経由で活性酸素種 scavenger を活性化させ、これにより心筋 stunning 抑制による心保護効果が示されたと推測できる。また、STATのうちSTAT3が直接ミトコンドリア機能を制御し、心機能を改善する経路も報告されており、本研究結果に影響した可能性がある。冠灌流圧

低下については JAK/STAT 経路活性化で VEGF 産生増加、NO 産生増加がもたらされるとされており、本研究結果もこれによるものと推察される。しかしこれら作用機序が本研究モデルでの結果に影響していたか証明するにはさらなる実験が必要である。

(5) 結論

IL-11 は DCD 心移植モデル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心機能改善に IL-11 は有用であり、IL-11 投与が DCD 心ドナーのグラフト不全発症を減少させ、DCD ドナー心の利用拡大につなが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

石田 敬一 (ISHIDA, Keiichi)
千葉大学・大学院医学研究院・
特任准教授
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