



Title	ラットの短時間心筋全虚血モデルにおけるトレハロース前処置の効果の検討 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	安東, 悟央
Description	配架番号 : 2656
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14741号
Issue Date	2021-12-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83850
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Norihiro_Ando_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 安東 悟央

学位論文題名

ラットの短時間心筋全虚血モデルにおけるトレハロース前処置の効果の検討
(Trehalose Preconditioning for Transient Global Myocardial Ischemia in Rats)

【背景と目的】 心筋保護液の進歩で心臓外科手術成績は向上したが、心停止中の心筋虚血と再灌流後の心機能低下は依然問題であり完全には解決されていない。心臓術後の心機能低下を抑える手段として、心停止による心筋虚血に対して短時間の心筋虚血を先行させ虚血耐性を獲得させる虚血プレコンディショニングという概念が1980年代に提唱され、その効果発現機序として、アデノシン三リン酸感受性カリウムチャネルの開口、生存促進キナーゼの活性化、オートファジー(自食作用)の活性化が報告されている。これらの機序を利用した薬剤プレコンディショニング法が開発できれば、新たな心筋保護法となる可能性があるが、我々はこの中でも、心臓外科領域では報告の少ないオートファジーに注目した。オートファジーは、細胞内の不要蛋白除去や細胞内エネルギー保持に重要な役割を果たすとされており、二糖類の一種であるトレハロースの持つオートファジー活性化作用が、様々な病態に有効であるという報告がある。本研究の目的は、トレハロースプレコンディショニングが、短時間ラット心筋虚血再灌流後の心機能に及ぼす影響と心筋オートファジーの関与を明らかにすることである。

【対象と方法】 研究目的を鑑み以下の仮説に基づいて実験を行った。

仮説1 : トレハロース心筋灌流後に心筋オートファジーが活性化する。

仮説2 : トレハロースによるプレコンディショニングは、短時間虚血再灌流後の心筋オートファジーを活性化し、心機能低下を抑制する。

仮説3 : オートファジー阻害剤を添加することで、トレハロースプレコンディショニングによる短時間虚血再灌流後の心保護効果が減弱する。

週令10週の雄のラットを犠牲死させ、ランゲンドルフ灌流回路を用いて心臓を灌流した。灌流液には Krebs Henseleit (KH) 液を使用した。エネルギー基質はグルコース (5 mmol/L) とした。95%O₂ / 5%CO₂ で灌流液を酸素化した。オートファジーの活性化は、マーカーである microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) II と p62/SQSTM1 (p-62) をウエスタンブロッティング法で定量し評価した。LC3-IIの増加と p62 の減少を認めた場合にオートファジーが活性化したと判断した。

実験1 (仮説1の検証) : KH液で灌流した群 (コントロール群 : n=4) と KH液に2%トレハロースを加えた群 (トレハロース群 : n=4) に分け、心臓を35分間灌流した後左室心筋を凍結保存し、心筋組織における LC3-II と p62 の蛋白定量を行った。

実験2 (仮説2の検証) : KH液で灌流する群 (コントロール群 : n=5) と KH液に2%トレハロースを加えた群 (トレハロース群 : n=5) に分け、心臓を35分間灌流 (プレコンディショニング) し、20分間全虚血とした。その後60分間いずれの群も KH液で再灌流した。再灌流中の心機能 (冠灌流量, 冠血管抵抗, 心拍数, 左室最大圧, maximum dP/dt, minimum dP/dt, rate pressure product) を測定した。再灌流後に左室心筋を凍結保存し、実験1と同様にオートファジーマーカー (LC3-II, p62) を蛋白定量した。

実験 3 (仮説 3 の検証) : それぞれオートファジーの上流と下流に作用するオートファジー阻害剤である 3MA と CQ を用いた。KH + 2%トレハロースで灌流する群 (Tre 群 : n=5), KH + 2%トレハロース + 3-methyladenine (3MA) 1mM で灌流する群 (Tre + 3MA 群 : n=5), KH + 2 %トレハロース+chloroquine (CQ) 5 μ M で灌流する群 (Tre+ CQ 群 : n=5) に分け、実験 2 と同様に心機能測定と蛋白定量を行った。

【結果】

実験 1 : LC3-II は、トレハロース群でコントロール群と比較し有意に高値であった。一方 p62 は、有意差はないものの LC3-II の傾向とは逆にトレハロース群でコントロール群より低値を示した。トレハロース心筋灌流は心筋オートファジーを活性化することが示唆された。

実験 2 : トレハロース群では、再灌流後に左室収縮能の指標である maximum dP/dt がコントロール群よりも有意に高値であった。これにより、トレハロースプレコンディショニングが虚血再灌流後の心機能低下を抑制することが示唆された。冠血管抵抗は、トレハロース群でコントロール群と比較し低い傾向にあった。再灌流 60 分後の LC3-II は、トレハロース群でコントロール群と比較し有意に低値であった。一方で再灌流後の p62 は、有意差はないもののトレハロース群でコントロール群より高値を示した。つまり、仮説 2 に反して、トレハロースプレコンディショニングは再灌流後のオートファジー活性化させていないことが示唆された。

実験 3 : Tre + 3MA 群, Tre + CQ 群では Tre 群と比較して、虚血再灌流後の左室最大圧, rate pressure product が有意に低値であった。Maximum dP/dt は Tre + 3MA 群で、minimum dP/dt は Tre + CQ 群で Tre 群と比較し低値であった。つまり、短時間虚血再灌流モデルにおいて、トレハロースへのオートファジー阻害剤の添加は、プレコンディショニングによる心保護効果を減弱させることが示唆された。

【考察】 本研究では、トレハロースプレコンディショニングは、短時間心筋虚血後の再灌流時の心機能低下を抑制した。また、オートファジー活性はトレハロースプレコンディショニングにより亢進した一方で、虚血再灌流後 60 分の時点では低下していた。さらに、プレコンディショニング時にオートファジー阻害剤を併用すると、虚血再灌流後の心機能は低下した。これらの結果は、トレハロースプレコンディショニングによりオートファジーが虚血導入前に活性化し、心筋が虚血耐性を獲得したことを示唆している。一方、トレハロースにはオートファジー活性化作用の他に、抗炎症作用、抗酸化作用、血管拡張作用等があり、心機能の改善がオートファジーに依存するとは断定できない。現にトレハロース群で冠血管抵抗が低い傾向にあり、効果発現機序の 1 つとして今後の検討課題である。

オートファジーは、虚血等のストレス時に細胞内の恒常性を維持するため、アミノ酸、脂肪酸、グルコース等のアデノシン三リン酸産生に必要なエネルギー基質を供給する役割を持つ。よってオートファジーは、虚血時には必要不可欠で心筋保護的な役割を果たすとされる。一方、再灌流時の過剰なオートファジーの活性化は細胞死をきたすことも報告されている。現時点では、虚血時、再灌流時ともにある程度のオートファジー活性化は必要で心筋保護的であるとする見解が多い。しかし、虚血再灌流時のオートファジーの適切な強度や活性化のタイミングに関しては未だ不明な点が多い。

【結論】 ラットの心筋全虚血モデルにおいて、短時間虚血再灌流後の心機能はトレハロースプレコンディショニングにより改善した。トレハロースの効果発現機序としてオートファジーの関与が示唆されたが、今後さらなる検討が必要である。