



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
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
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14741">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14741</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/83851">https://hdl.handle.net/2115/83851</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Norihiro_Ando.pdf



# 学位論文

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)

2021年12月  
北海道大学  
安東 悟央



# 学位論文

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)

2021年12月  
北海道大学  
安東 悟央

# 目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	6 頁
緒言	7 頁
方法	13 頁
方法 (実験 1)	14 頁
(実験 2)	19 頁
(実験 3)	22 頁
結果 (実験 1)	25 頁
(実験 2)	27 頁
(実験 3)	34 頁
考察	41 頁
結論	47 頁
謝辞	49 頁
利益相反	50 頁
引用文献	51 頁

# 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Norihiro Ando, Yasushige Shingu, Kenichiro Suno, Satoru Wakasa.  
Trehalose Preconditioning for Transient Global Myocardial Ischemia in  
Rats

雑誌名 : Biochemical and Biophysical Research Communications. 2021 Feb  
22; 548: 14-19

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 安東 悟央, 新宮 康栄, 須野 賢一郎, 若狭 哲  
トレハロースによる autophagic preconditioning が心筋全虚血後の心機能  
に与える影響 第73回日本胸部外科学会定期学術集会 ; 2020年10月28-31  
日名古屋 (web開催)

# 要旨

## 【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】

実験を計画するにあたり，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%O<sub>2</sub> / 5%CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ 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を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．

# 略語表・用語解説

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AMPK	: adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMP 活性化蛋白キナーゼ)
CQ	: chloroquine (クロロキン)
KH	: Krebs-Henseleit (クレブス・ヘンゼライト)
LC3	: microtubule-associated protein light chain 3 (微小管関連蛋白質 1A/1B-軽鎖 3)
mPTP	: mitochondrial permeability transition pore (ミトコンドリア膜透過性遷移孔)
p62	: p62/SQSTM1 (p62/セクエストソーム-1)
ROS	: reactive oxygen species (活性酸素種)
SR	: sarcoplasmic reticulum (筋小胞体)
3-MA	: 3-methyladenine (3-メチルアデニン)

# 緒言

## ①論文の背景

### 虚血再灌流障害

心臓外科手術では、心停止中に左心室と右心室を含めた心臓の全虚血となるため、術後に心筋の「虚血再灌流障害」が問題となる。虚血再灌流障害の程度は、心筋が虚血中に受ける障害と再灌流後に受ける障害の程度により決まる。虚血再灌流障害の機序を図1に示す。

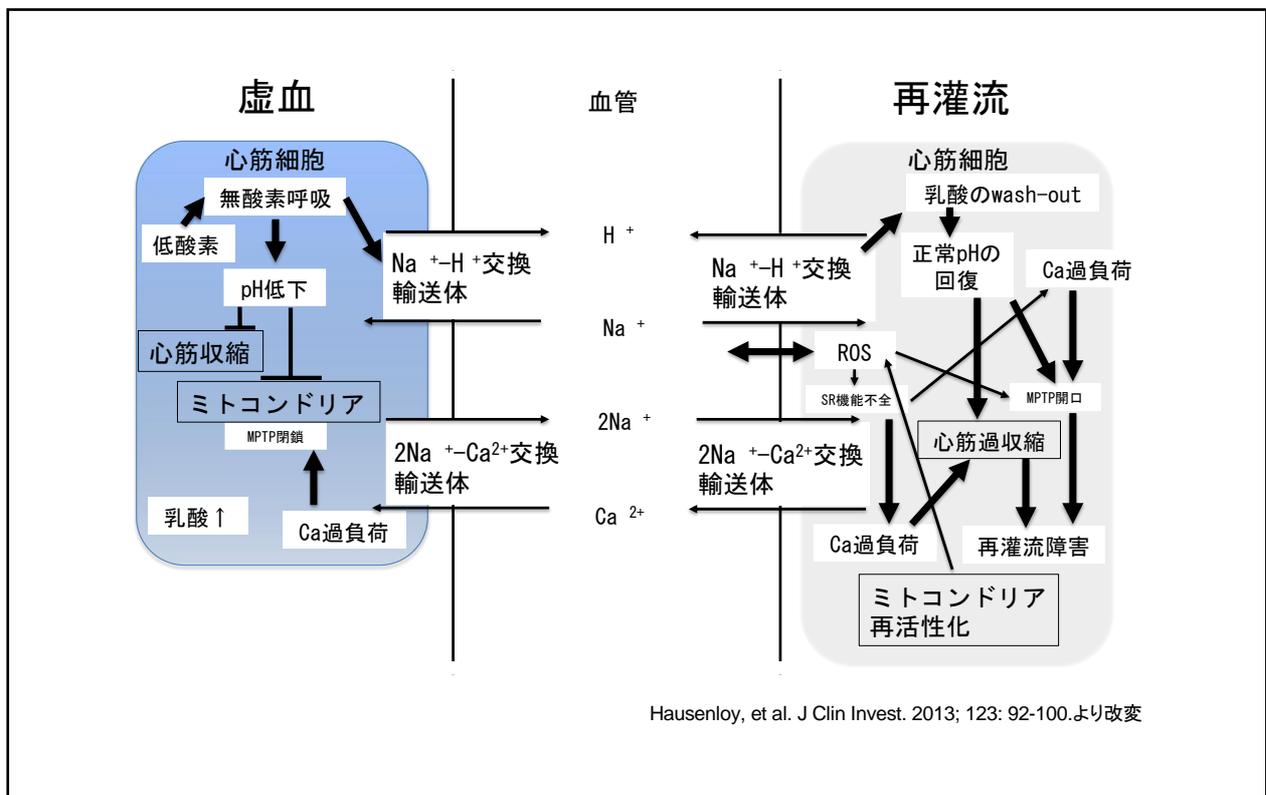


図1. 虚血再灌流障害

虚血再灌流障害のメカニズムを模式図に示す。虚血後の再灌流で生じた活性酸素種がミトコンドリア機能を障害し、エネルギーの産生停止、細胞死、臓器障害を招く。ROS: reactive oxygen species(活性酸素種), mPTP: mitochondrial permeability transition pore(ミトコンドリア膜透過性遷移孔), SR: sarcoplasmic reticulum (筋小胞体)

虚血時には、心筋細胞の低酸素、無酸素状態による嫌気性代謝が活性化し、乳酸値が上昇することでpHが低下する(細胞内アシドーシス)。細胞内のpH

を保つために  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  交換輸送体が活性化する。次いで  $\text{H}^+$  イオンとの交換で増加する  $\text{Na}^+$  イオンの影響で、 $2\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  交換輸送体が活性化し  $\text{Na}^+$  イオンをくみ出す。この  $\text{Na}^+$  イオンとの交換で増加する  $\text{Ca}^{2+}$  により細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷をきたす。細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷とアシドーシスにより、ミトコンドリアの機能が低下しエネルギーが枯渇することで心機能も低下する。一方、再灌流時には、虚血時に増加した乳酸が洗い流され、pH が正常に回復する。急激な pH の正常化は活性酸素種の産生をきたし、ミトコンドリア膜透過性遷移孔を開口させる。これにより、ミトコンドリアの膨張、崩壊、機能低下をきたす。ミトコンドリアでのエネルギー産生がさらに低下することで、筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$  の活性が低下し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度はさらに上昇する。 $\text{Ca}^{2+}$  過負荷による心筋の過収縮は、再灌流障害をさらに増悪させるといふ悪循環にいたる。

これらの虚血再灌流障害の結果は、心機能の不可逆的あるいは可逆的な低下をもたらす、すなわち虚血時間が長くなると心筋細胞はアポトーシスやネクローシスをおこし、不可逆的な心機能の低下をきたす（梗塞心筋）。一方、短時間で血流が再開した場合は、心筋は不可逆的な障害をうけることなく一時的な心機能の低下にとどまり、その後回復する（気絶心筋）。Braunwald らは、後者の気絶心筋を「短時間の虚血後の可逆的な心筋収縮力の低下であり、心筋が壊死にいたっていないもの」と定義した (Braunwald and Kloner, 1982)。ラットの心筋全虚血モデルでは、20 分から 25 分の虚血で気絶心筋を生じる（30 分以上の虚血では梗塞心筋となる） (Tiwari et al., 2008)。気絶心筋のメカニズムには、前述の  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷、活性酸素種 (ROS) のほか、血管内皮障害などが関係するとされている (Guaricci et al., 2018)。心臓術後の気絶心筋にはアポトーシスの関与も報告されている (Schmitt et al., 2002)。これらの虚血再灌流障害を軽減するために、あらかじめ虚血への耐性をつける「プレコンディショニング」という概念が提唱され、これまで多くの研究がなされてきた。

### 虚血プレコンディショニング

1986 年に Murry らは、あらかじめ虚血への耐性をつける「プレコンディショニング」の方法としてはじめて「虚血プレコンディショニング」を報告した (Murry et al., 1986)。彼らは、犬の心筋梗塞モデルにおいて虚血前に冠動脈の左回旋枝を 5 分毎に繰り返し閉塞させることで、その後の 40 分間の虚血後に発症する心筋梗塞サイズを劇的に縮小させることに成功した。しかしながら、繰り返し物理的に冠動脈を閉塞させることは冠動脈の損傷につながる可能性があることや、心臓外科手術の際に大動脈を何度も遮断して心臓

を虚血にする方法は大動脈の損傷や塞栓症の危険をともなうことから、虚血プレコンディショニングは臨床応用されるには至っていない。一方、冠動脈の血流遮断を行わずに薬剤を用いて虚血プレコンディショニングと同様の効果を得ることができれば、より低侵襲に心筋虚血再灌流障害を抑制することが可能と考えられる。そのため、虚血プレコンディショニングの効果発現のメカニズムに関する研究がこれまで多くなされてきた。

現在、虚血プレコンディショニングのメカニズムとして以下が想定されている

- 1) 細胞膜およびミトコンドリアの ATP 感受性 K チャネルの開口（ミトコンドリア膜透過性遷移孔の閉鎖）(Zaugg et al., 2003)
- 2) 生存促進キナーゼの活性化(Hausenloy et al., 2005)
- 3) オートファジー(Huang et al., 2010).

しかし、これらの機序を用いた薬剤プレコンディショニング法は心臓外科領域では未だ実用化されていない。私たちは、この中でも比較的新しい概念であり、これまでに心臓外科領域で研究されたことのない「オートファジー」に着目した。

## ②何がわかっていて、何がわかっていないのか

### オートファジー

オートファジーは「自食作用」とも言われ、酵母から哺乳類にいたるまでよく保存された細胞内の生理作用である。オートファジーには、不要になった蛋白質や脂肪を分解し、アミノ酸や脂肪酸を細胞のエネルギー源として提供する作用がある。また、オートファジーには傷害されたミトコンドリアなどの細胞器官を分解することで細胞内の恒常性を保つ働きもある(Mizushima and Komatsu, 2011)。オートファジー機構はいくつかの段階をもつため、「オートファジー・フラックス（流れ）」とも呼ばれている（図 2）。

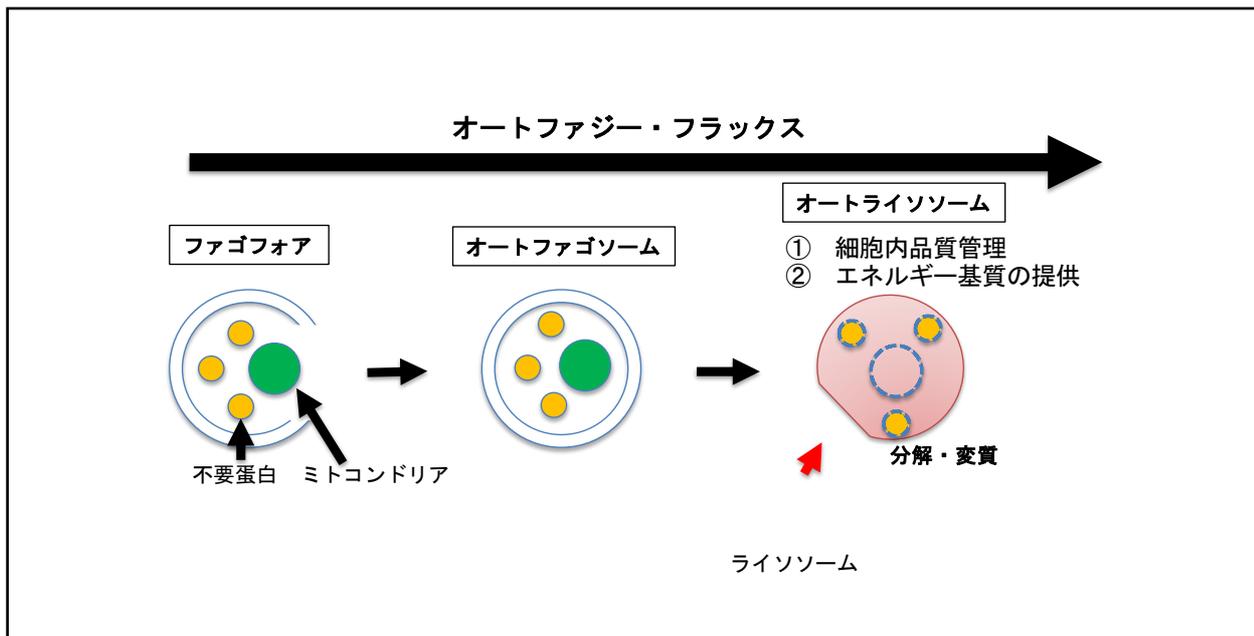


図 2. オートファジー・フラックス

オートファジー・フラックスを模式図で示す．不要蛋白や傷害されたミトコンドリアを二重膜（ファゴフォア）で取り込み，オートファゴソームが形成される．その後ライソソームと融合しオートライソソームとなり，内容物が分解されることで，細胞内品質管理とエネルギー基質の供給の役割を果たす．

Huang らは，ラットにおいて虚血プレコンディショニングがオートファジーを活性化することを報告した (Huang et al., 2010)．さらに彼らは，虚血プレコンディショニングによる心筋梗塞サイズの減少効果は，オートファジー阻害により消失することも示した．つまりオートファジーは，虚血プレコンディショニングによる虚血再灌流障害抑制効果発現において重要な役割を果たすと考えられる．オートファジーが虚血再灌流を抑制するメカニズムは依然明確ではないが，オートファジーが活性化することで，エネルギー基質が提供され，エネルギー代謝が改善されることがプレコンディショニング効果発現の機序のひとつである可能性がある．私たちは，オートファジーを活性化する物質として，トレハロースに注目した．

### トレハロース

トレハロースは無害な天然物とされる二糖類の一種で，グルコースが 1,1-グリコシド結合した物質である (図 3)．

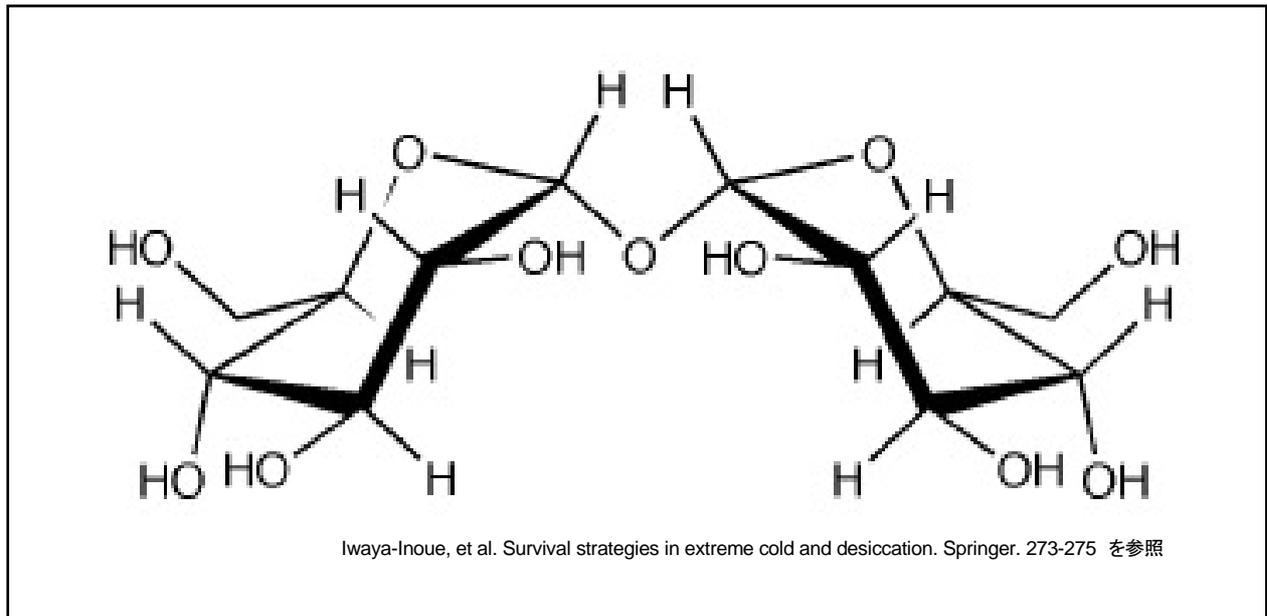


図 3. トレハロースの構造

トレハロースはグルコースが 1,1-グリコシド結合してできた二糖類の一種である。他の二糖類と違い、水溶液中でアルデヒド基 (CHO) に変化する構造が存在せず、還元性を示さない。また、エーテル結合 (-O-) の角度が約 120 度であり、非常に安定した強固な結合であることが知られている。

哺乳類はトレハロースを産生することはできない。トレハロースは、微小動物や植物の細胞内に存在しており、特にシイタケなどのキノコ類に多く含まれている。経口で摂取されるトレハロースの大部分は、腸管で分解されグルコースとして体内に吸収される一方、一部は分解を受けずトレハロースとして血中に移行する。安定したグリコシド結合のため、他の二糖類にはない特徴がある (Iwaya-Inoue et al., 2018)。トレハロースは、オートファジーを活性化する物質として注目され、これまで神経変性疾患に対する有効性が多く報告されてきた (Sarkar et al., 2007)。一方で、心疾患に応用した報告は乏しく、Sciarretta らは、マウスにおいて心筋梗塞直後からのトレハロースの経口摂取が、オートファジーを活性化し心機能を改善するとともに左室の拡大も抑制したと報告しているが (Sciarretta et al., 2018)、心筋虚血再灌流障害モデルにトレハロースを応用した報告はこれまでになく、トレハロースがオートファジーを活性化し虚血再灌流障害を抑制するかについてはわかっていない。

③本研究で何を明らかにしようとしているのか

本研究では，ラット心臓の短時間虚血再灌流モデルを用いて、トレハロースによるプレコンディショニングと，心筋オートファジーならびに，短時間虚血再灌流後の心機能の関係を，以下の点から明らかにすることを目的とした．

- 1) トレハロース心筋灌流後の心筋オートファジーの変化を明らかにする．
- 2) トレハロースプレコンディショニングが，短時間虚血再灌流後の心機能に与える影響を明らかにする．
- 3) オートファジー阻害剤を用いてトレハロースプレコンディショニングにおける，オートファジーの関与を明らかにする．

# 方法

本研究では，ラット心臓の短時間虚血再灌流モデルを用いて、トレハロースによるプレコンディショニングが心筋オートファジーに与える影響ならびに短時間虚血再灌流後の心機能に及ぼす影響を明らかにするために，以下の3つの仮説を立て，それぞれに対して研究方法を立案し実験を実施した．

すべての実験過程は国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程，アメリカ国立衛生研究所により定められた実験動物使用指針に従い施行した．

**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（心保護効果を示す）．

**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．

# 実験 1

以下の仮説に基づき実験を行った。

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。

## 1. 対象

10 週齢の雄の Sprague-Dawley ラット (三共ラボサービス株式会社) (体重: 275 g から 370 g)

## 2. 麻酔

90 mg/kg のケタミン (第一三共株式会社) と 10 mg/kg のキシラジン (バイエル) の筋注で麻酔した。心摘出の直前に 150 mg/kg のペントバルビタールナトリウム (ナカライテク) を腹腔内投与し痛み刺激への反応が全くないことを確認した。

## 3. 心臓の摘出とランゲンドルフ回路による灌流

腹部を横切開しヘパリンナトリウム (持田製薬株式会社) 100 単位を下大静脈内に投与した。胸骨正中切開にて心臓を摘出し氷で冷却した Krebs Henseleit (KH) 液の中に入れた。上行大動脈をランゲンドルフ回路に接続し、37°C の KH 液で冠動脈を灌流し心臓を拍動させた (図 4)。KH 液の酸素化は、混合ガス (酸素 95% + 二酸化炭素 5%) 1 L/min の送気により行った。心臓の採取から灌流までの虚血時間は 3 分以内とした。冠動脈灌流圧 (上行大動脈からの逆行性灌流) は 80 mmHg に設定した。KH 液の組成は以下とした: 塩化ナトリウム 128 mmol/L, 塩化カリウム 5.0 mmol/L, 硫酸マグネシウム 1.3 mmol/L, 塩化カルシウム 2.5 mmol/L, D-グルコース 5 mmol/L (いずれもシグマアルドリッチ)。

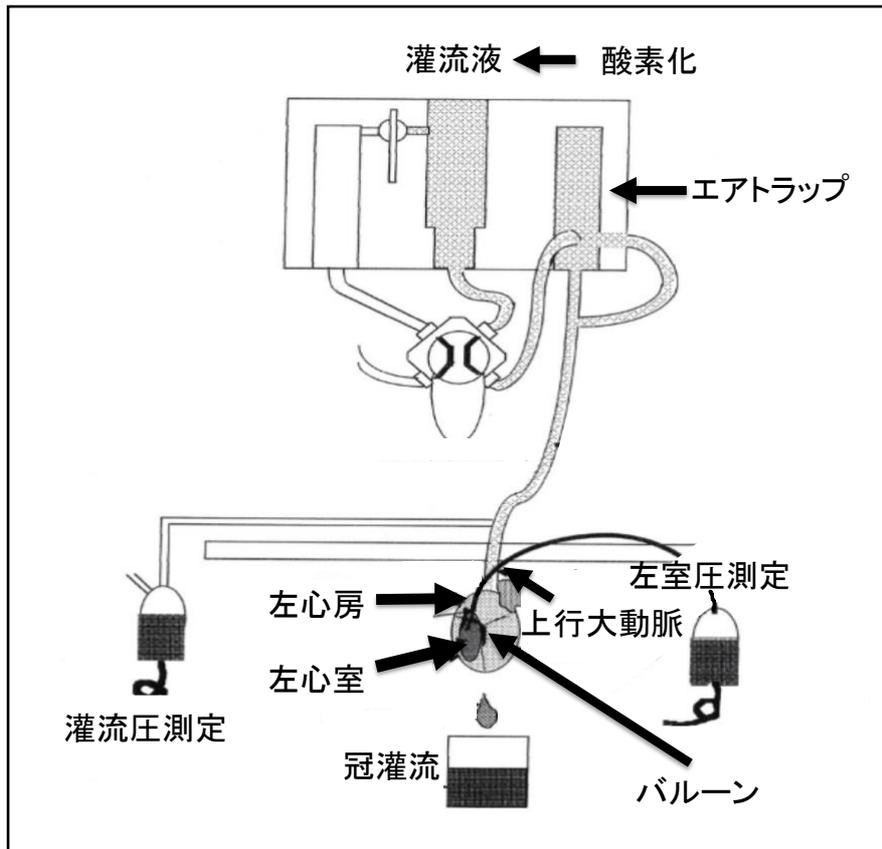


図 4. ランゲンドルフ回路

ラットの心臓を摘出し，上行大動脈をカニューレションし酸素化された灌流液を冠動脈に灌流した．心拍数，左室圧， $dP/dt$ ，冠灌流量をモニタリングした．冠動脈に空気が混入せぬよう，エアトラップを設けた．圧測定用のバルーンは左房経由で左室に挿入した．

#### 4. 実験プロトコール(図 5)

8 匹のラットを灌流液の違いで 2 群に分けた．

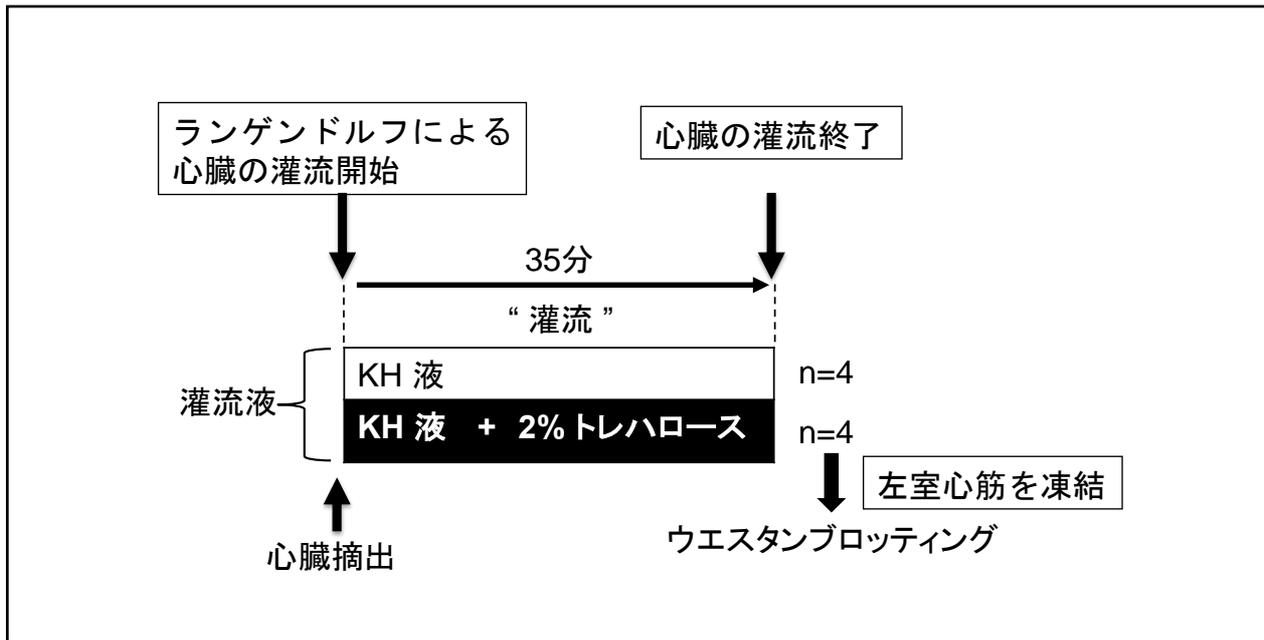


図 5. 実験プロトコール（実験 1）

ラットの心臓を摘出し，ランゲンドルフ回路で灌流した．KH 液で灌流する群（コントロール群：n=4）と KH 液に 2%トレハロースを加えた灌流液で灌流する群（トレハロース群：n=4）に分けた．35 分間灌流し，その後心臓をランゲンドルフ回路からとりはずして左室心筋を冷凍保存した．後日，左室心筋のオートファジーマーカーをウェスタンブロットにて測定した．トレハロースは株式会社 林原（岡山）から購入した．

KH: Krebs-Henseleit

## 5. ウェスタンブロットティング

ラットの左室心筋を用いて以下 1) 2) の蛋白発現を定量した．

### 1) オートファジーマーカー：LC3-II と p62（図 6）

オートファジーのマーカーとして代表的な，microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3)-II と p62/sequestosome-1 (SQSTM1) を測定した．

オートファジーが活性化されるとオートファゴゾームが増加する．その際に LC3-I（細胞質型）が LC3-II（膜結合型）に変換され，LC3-II はオートファゴゾームの膜に付着するため，LC3-II の発現量はオートファゴゾームの数を反映することになる．このため LC3-II は最も一般的なオートファジー活性のマーカーとされている．一方，LC3-II はオートファゴゾームの分解抑制によ

っても増加する可能性がある。p62 は LC3 と相互的に作用し選択的にオートファゴゾームに取り込まれ，オートファジー・フラックスの増加によるオートファゴゾームの分解に伴って減少する傾向を示すため (Mizushima et al., 2010)，LC3-II の増加と p62 の減少をもって，オートファジーの活性化と判断した。

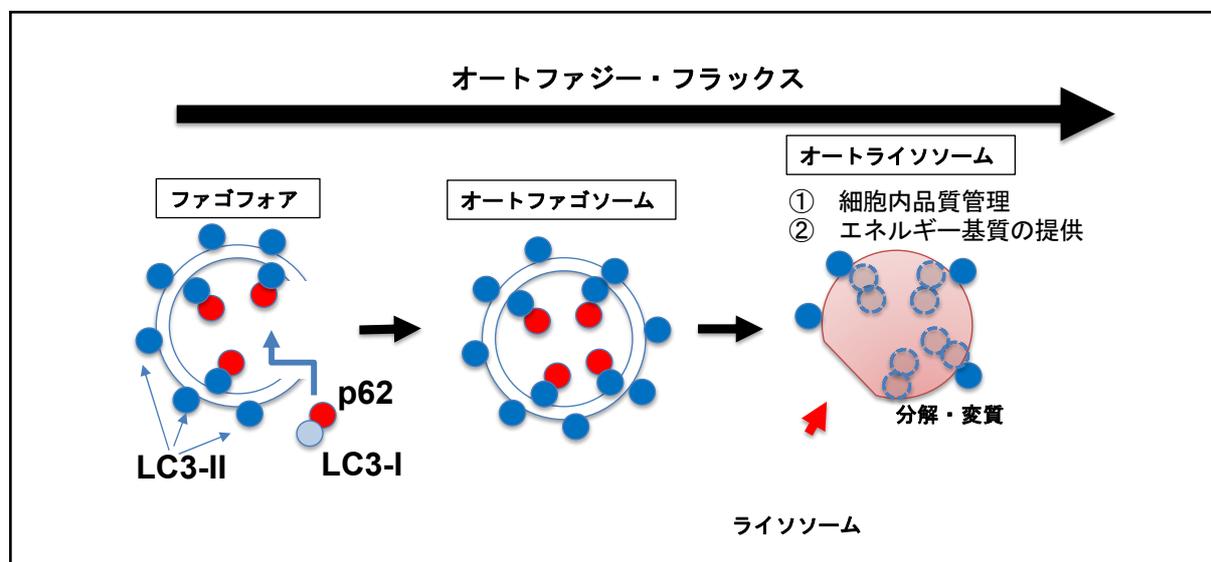


図 6. オートファジーマーカー

LC3-II: microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3; p62: p62/sequestosome-1 (SQSTM1)

## 2) Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)

トレハロースのオートファジー活性化の機序のひとつとして，adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)の活性化が報告されている (DeBosch et al., 2016). これには，トレハロースによるグルコース・トランスポーターの阻害が関与している可能性が指摘されている。本実験でもトレハロースが，AMPKの活性化を介してオートファジーを活性化する可能性がある。

## 3) 蛋白定量方法

ランゲドルフ灌流後に凍結保存した左室心筋をホモジナイズし，Bradford法で蛋白定量を行った。ラウリル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル (12% Mini-PROTEANTGX™, BIO-RAD) にて蛋白を電気泳動した後，蛋白をポリフッ化ビニリデン膜 (PVDF, MILLIPORE) に転写した。電気泳動と転写にはセミドライウエスタンブロット装置 (Mini-PROTEAN Tetra Cell, BIO-RAD) を

用いた。PVDF 膜を以下の一次抗体を用い、4℃で一晩インキュベートした：LC3B (abcam) ; p62/SQSTM1 (Cell Signaling) ; AMPK , p-AMPK [Thr172] (Cell Signaling). さらに、PVDF 膜を二次抗体 (anti-rabbit IgG, Cell Signaling) を用いて室温で2時間インキュベートした。ECL prime western blotting detection reagents (GE Healthcare)を用いて抗体を化学発光させ Lumi Cube (Liponics Inc.)を用いて露光、撮影した。蛋白のバンド強度は Just TLC (Sweday) を用いて測定した。ナフトールブルーブラック (Wako) で PVDF 膜を染色しバンド強度を補正した。

## 6. 統計解析

全てのデータは平均±標準誤差で表記した。コントロール群とトレハロース群の連続変数の比較には Mann-Whitney U test を用いた。P 値<0.05 を有意差ありとした。統計解析には SPSS version 26 (SPSS Inc.) を用いた。

## 実験 2

以下の仮説に基づき実験を行った。

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 (心保護効果を示す)。

### 1. 対象, 麻酔, 心臓の摘出とランゲンドルフ回路による灌流方法

実験 1 と同様に行った。

### 2. 実験プロトコール

図 7 に実験プロトコールを示す。10 匹のラットをプレコンディショニング方法の違いで 2 群に分けた。

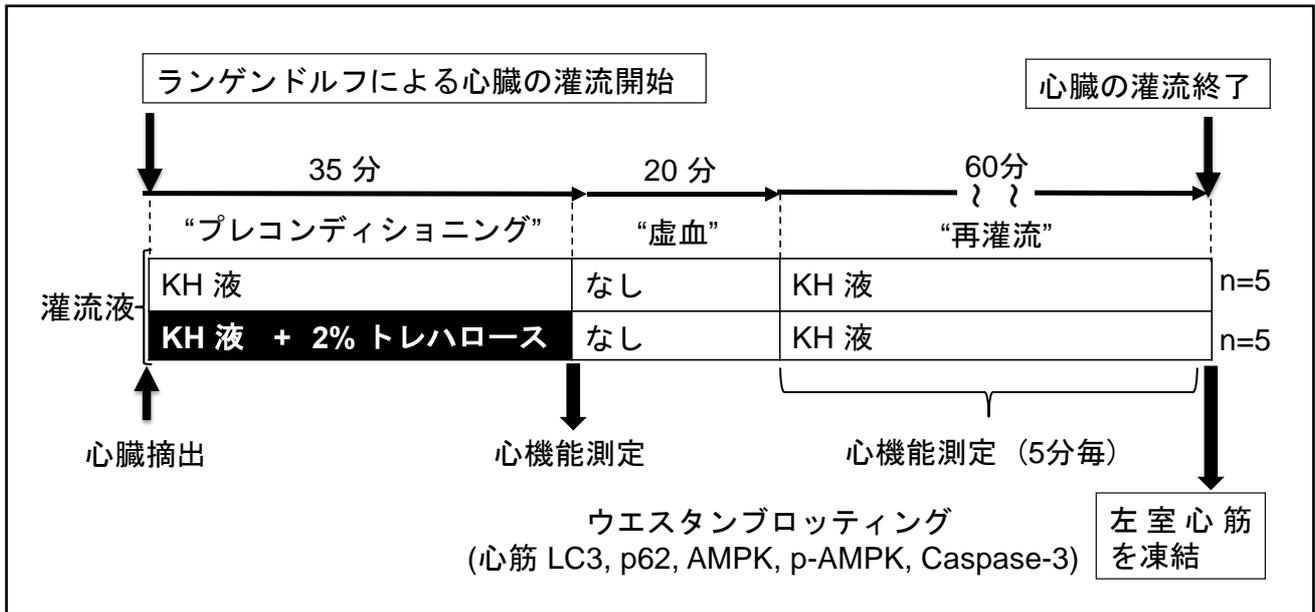


図 7. 実験プロトコール (実験 2)

ラットの心臓を摘出し, ランゲンドルフ回路で灌流した。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) に分けた。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 分間どちらの群も KH 液で再灌流した。プレコンディショニング後と, 再灌流中 5 分毎に心機能を計測した。再灌流終了後左室心筋を冷凍保存し, ウエスタンブロッティングにてオートファジーマーカー

ー (LC3-II, p62), AMPK, p-AMPK, Caspase-3 を定量した. AMPK: adenosine monophosphate-activated protein kinase; KH: Krebs-Henseleit; LC3-II: microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3; p62: p62/sequestosome-1(SQSTM1); p-AMPK: phospho-AMPK

### 3. 心機能パラメータの測定

生食を満たした 0.06 ml のラテックスバルーン (ADI Instruments) を切開した左房から左室に挿入し左室圧を検出した. 最小圧は 5 mmHg から 15 mmHg に設定した. 左室圧波形を PowerLab4ch (ADI Instruments) で検出し, 心機能パラメータは LabChart (ADI Instruments) を用いて解析した. 冠灌流量は冠静脈洞からドレナージされる 1 分間の灌流液の量として測定した.

上記の方法によって以下の心機能パラメータを, プレコンディショニング直後と再灌流後 5 分毎に計測した:

- 1) 冠灌流量 (mL/min)
- 2) 冠血管抵抗 (mmHg · min/ml) = 80/冠灌流量
- 3) 心拍数 (beat/min)
- 4) 左室最大圧 (mmHg) = (左室収縮期血圧)-(左室拡張末期圧)
- 5) Maximum dP/dt (mmHg) (左室圧一次微分の最大陽性値): 左室収縮能の指標のひとつ
- 6) Minimum dP/dt (mmHg) (左室圧一次微分の最大陰性値): 左室拡張能の指標のひとつ
- 7) Rate pressure product (mmHg · beat/min) = (心拍数) × (左室最大圧)

### 4. ウェスタンブロッティング

- 1) オートファジーマーカー: LC3-II と p62

実験 1 と同様に測定した.

- 2) AMPK

虚血再灌流後の心筋エネルギーの維持状態を, AMPK を用いて検討した. AMPK は「エネルギーセンサー」とも言われており, 細胞内のエネルギー (ATP) の過不足を反映する (Matsui et al., 2007). ATP が減少すると phospho-AMPK (pAMPK) が AMPK よりも相対的に大きくなる. よって, pAMPK と AMPK の比 (pAMPK/AMPK) は虚血再灌流後の心筋のエネルギー状態を反映し, 細胞内エネルギーが不足していると増加し, 十分な場合は低下すると考えられる.

### 3) 心筋細胞死（アポトーシス）マーカー：Caspase-3

Caspase-3 はアポトーシスを実行する蛋白である。前駆体の pro-Caspase-3 が切断され、cleaved Caspase-3 となることでアポトーシスを誘導する。

### 4) 蛋白定量方法

実験 1 と同様の手法を用いた。アポトーシス評価のために以下の一次抗体を用いた： Caspase-3 (Cell Signaling)。

## 5. 灌流液中の乳酸値の測定

嫌気性代謝の指標として、再灌流 60 分後の冠静脈ドレナージ液中の乳酸値を測定した。専用の測定キット (Lactate Colorimetric Assay Kit II, BioVision) を用い、ELISA 法で計測した。

## 6. 統計解析

全てのデータは平均±標準誤差で表記した。コントロール群とトレハロース群の連続変数の比較には Mann-Whitney U test を用いた。同じグループ内の経時的な心機能変化には repeated measures ANOVA (post hoc Dunnett 法) 検定を用いた。P 値<0.05 を有意差ありとした。統計解析には SPSS version 26 (SPSS Inc.) を用いた。



機能を測定した CQ：クロロキン；KH：Krebs-Henseleit；3MA：3メチルアデニン；Tre：トレハロース

3MA と CQ はそれぞれ作用部位が異なるオートファジー阻害剤である（図 9）。3MA は、ファゴフォアの形成を阻害し、CQ はライソソームの機能を障害することでオートライソソームの形成を阻害する。つまり、3MA はオートファジー・フラックスの上流を阻害するのに対し、CQ は下流を阻害する。二種の阻害剤を用いることで、トレハロースの効果とオートファジー・フラックスの関係性を検証した。3MA と CQ は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。濃度は下記の文献を参考にした (Fang et al., 2019; Xiao et al., 2012; Zhang et al., 2016)。

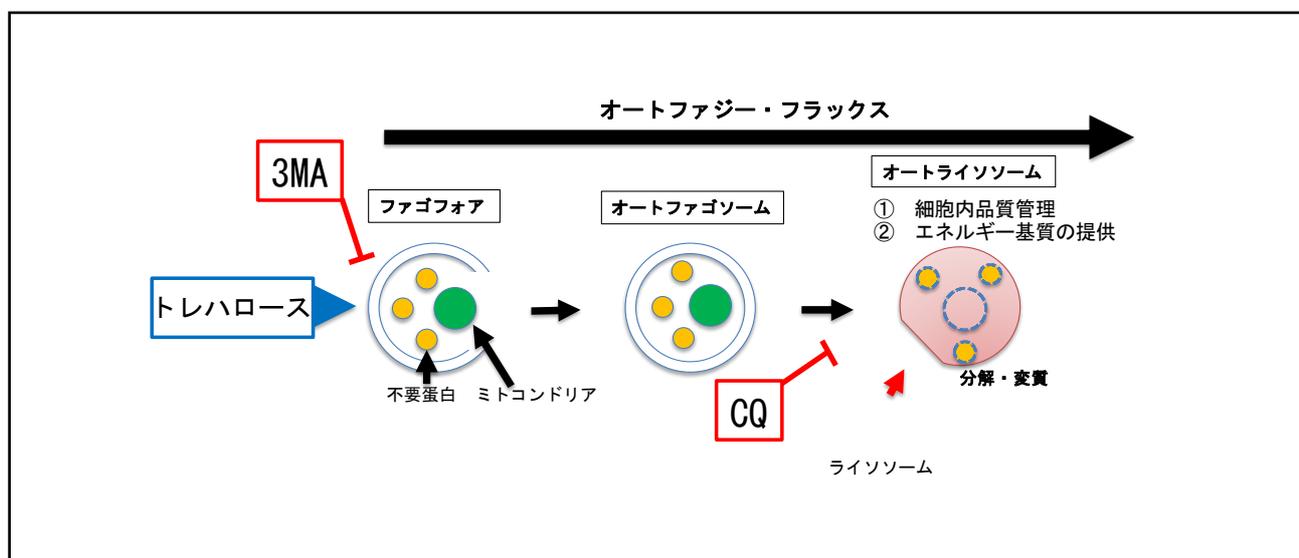


図 9 . オートファジー阻害剤の作用部位

3MA：3メチルアデニン，CQ：クロロキン

### 3. 心機能パラメータの測定

実験 1, 2 と同様に行った。

### 4. ウェスタンブロッティング

実験 1, 2 と同様に行った。

### 5. 灌流液中の乳酸値の測定

実験 2 と同様に行った。

## 6. 統計解析

全てのデータは平均±標準誤差で表記した。連続変数の群間比較には Kruskal-Wallis test (post-hoc 検定では Bonferroni 法を用いて P 値を調整) を用いた。同じグループ内の経時的な心機能変化には repeated measures ANOVA (post-hoc Dunnett 法) 検定をもちいた。P 値<0.05 を有意差ありとした。検定は SPSS version 26 (SPSS Inc.) を使用して行った。

# 結果

## 実験 1

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.

### 1. トレハロース心筋灌流後のオートファジーマーカー発現

図 10 にトレハロース心筋灌流後の左室心筋における LC3-II (図 10A) と p62 (図 10B) の蛋白発現を示す. 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かった. トレハロースの灌流によりオートファジーが活性化したことが示唆された.

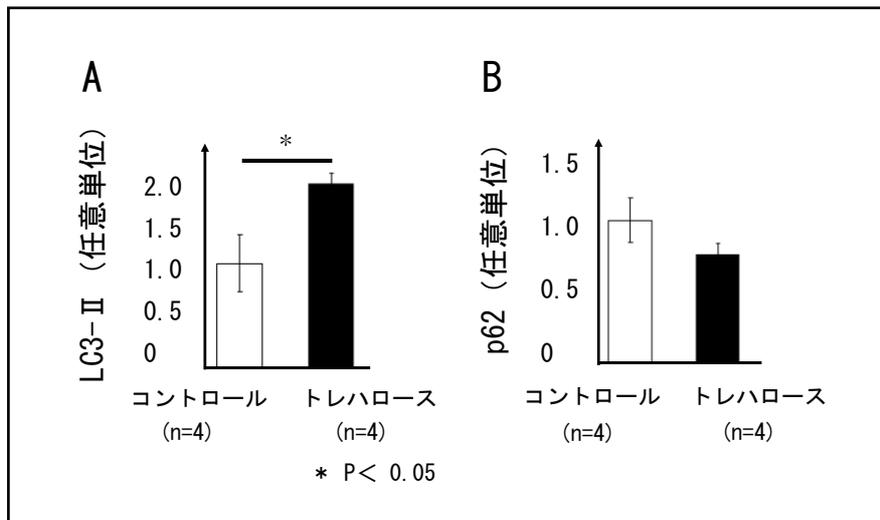


図 10. 心筋灌流後のオートファジーマーカー LC3-II (A) と p62 (B) の比較

LC3-II: microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3; p62: p62/sequestosome-1 (SQSTM1)

### 2. トレハロース心筋灌流後の AMPK 発現

図 11 にトレハロース心筋灌流後の左室心筋における AMPK (図 11A), pAMPK (図 11B), pAMPK/AMPK (図 11C) を示す. AMPK, pAMPK, pAMPK/AMPK は, いずれもコントロール群とトレハロース群に差を認めなかった. トレハロース

によるオートファジーの活性化には AMPK は関与していないことが示唆された。

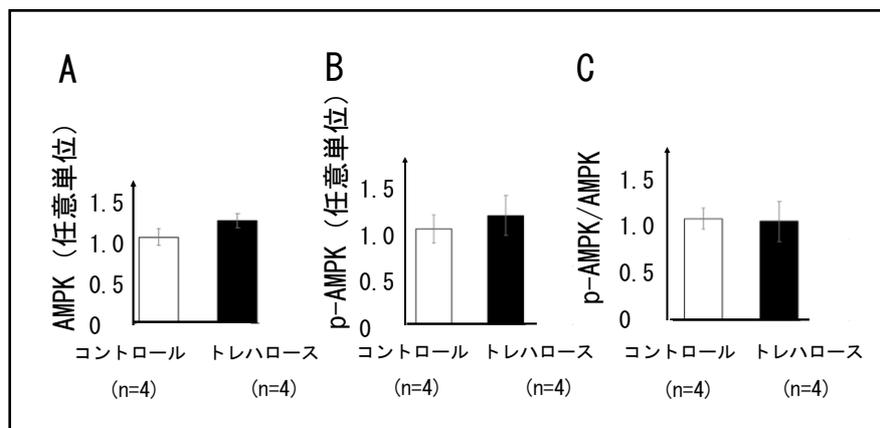


図 11 .トレハロース群とコントロール群における心筋灌流後の AMPK の比較  
AMPK : adenosine monophosphate-activated protein kinase ; pAMPK : phospho AMPK

### 3. 実験 1 の結果のまとめ

LC3-II の蛋白発現は、トレハロース群でコントロール群よりも有意に高値だった。p62 の蛋白発現は、トレハロース群でコントロール群よりも低値であったが、有意差はなかった。これらは、2%トレハロースで心臓を 35 分間灌流することによりオートファジーが活性化されたことを示唆する。一方、p-AMPK/AMPK には両群で群間差を認めなかったため、本灌流モデルにおいてトレハロースのオートファジー活性化に AMPK は関与していないと考える。

## 実験 2

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（心保護効果を示す）。

### 1. 心機能パラメータの変化

#### 1) 冠灌流量

図 12 に冠灌流量の変化を示す。トレハロース群では，コントロール群と比較し再灌流後 30 分から 60 分にかけて，有意差はないものの冠灌流量が多い傾向にあった。両群において再灌流直後に虚血前に比して一時的に有意な増加を示した。

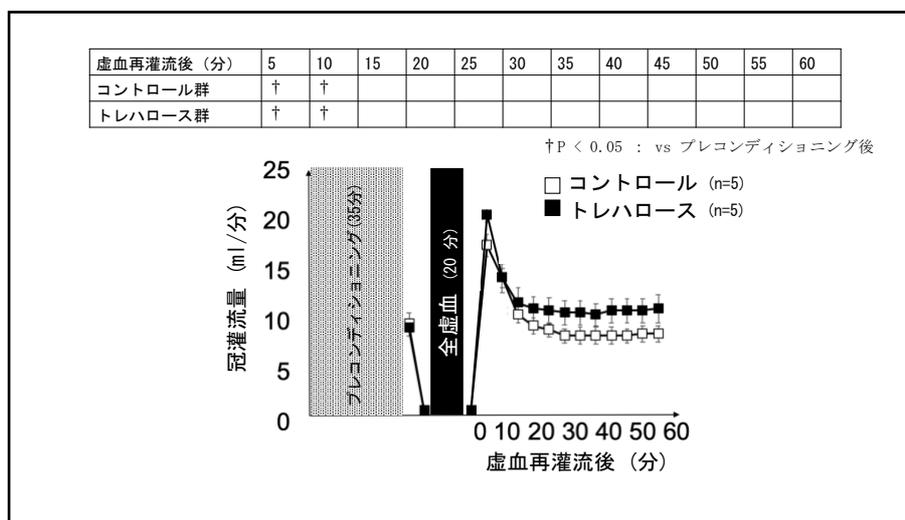


図 12. 冠灌流量の変化

#### 2) 冠血管抵抗

図 13 に冠血管抵抗の変化を示す。トレハロース群では，コントロール群と比較し再灌流後 30 分から 60 分にかけて，有意差はないものの冠血管抵抗が低い傾向にあった。再灌流後 10 分間は両群において虚血前に比して一時的に有意な低下を示した。

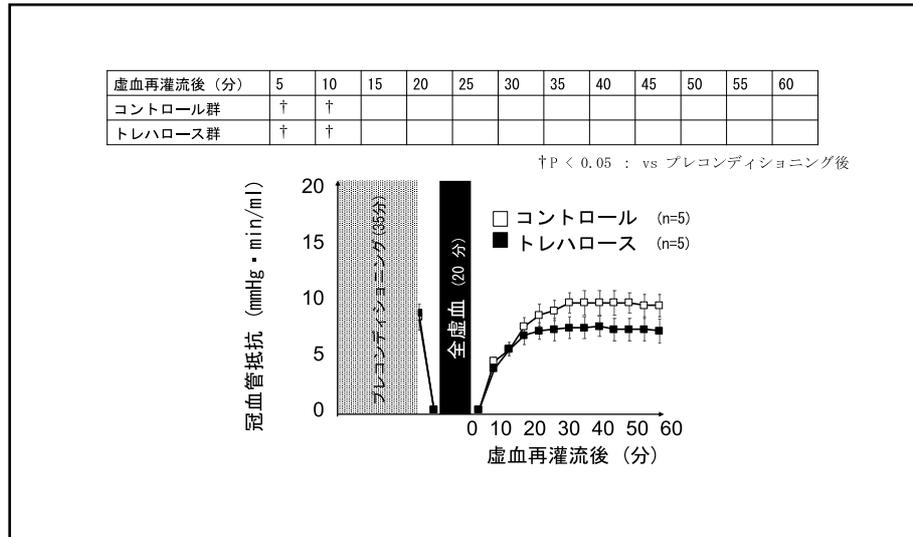


図 13. 冠血管抵抗の変化

### 3) 心拍数

図 14 に心拍数の変化を示す. 虚血再灌流後の心拍数は両群間に有意差を認めなかった. 再灌流後 10 分間はコントロール群においてのみ虚血前に比して一時的に有意な上昇を示した.

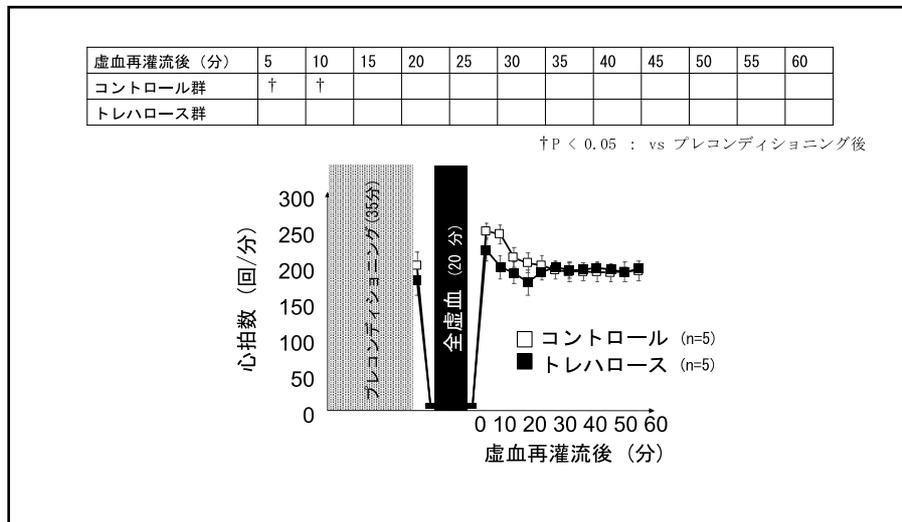


図 14. 心拍数の変化

### 4) 左室最大圧

図 15 に左室最大圧の変化を示す. 左室最大圧は両群間に有意差を認めなかった. コントロール群では, 再灌流後 10 分間と 50 分後に, トレハロース群では, 再灌流後 35 分間と 45 分後の左室最大圧が虚血前に比して有意に上昇した.

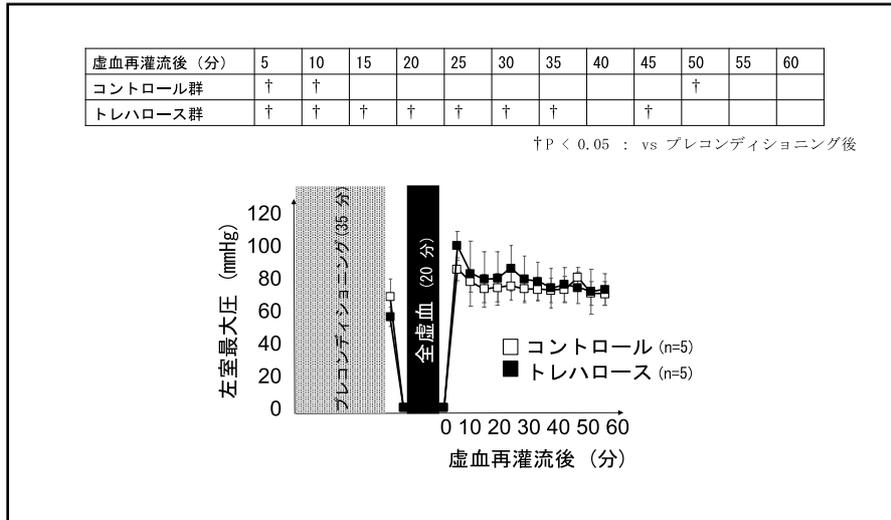


図 15. 左室最大圧の変化

5) Maximum dP/dt

図 16 に maximum dP/dt の変化を示す. 再灌流後の maximum dP/dt 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. さらに, トレハロース群における再灌流後の maximum dP/dt は, 再灌流後 10 分間, 25 分後から 35 分後, 45 分後, 50 分後, 60 分後において虚血前に比して有意に上昇した. コントロール群においては, 再灌流 5 分後にのみ maximum dP/dt が有意に上昇した.

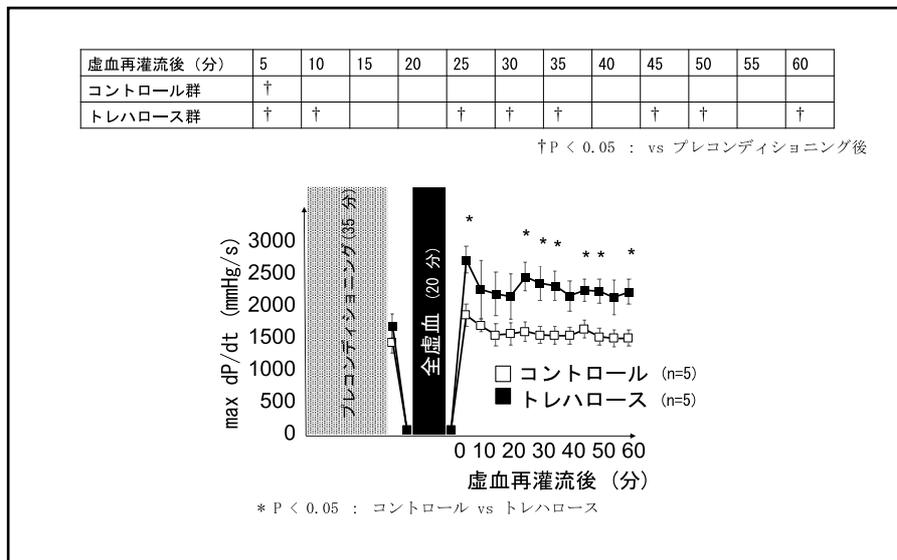


図 16. Maximum dP/dt の変化

6) Minimum dP/dt

図 17 に minimum dP/dt の変化を示す. minimum dP/dt はトレハロース群と

コントロール群の間に有意差がなかった。トレハロース群における再灌流後の minimum dP/dt は、再灌流後 5 分後、25 分後から 50 分後、60 分後において虚血前に比して有意に高値であった。

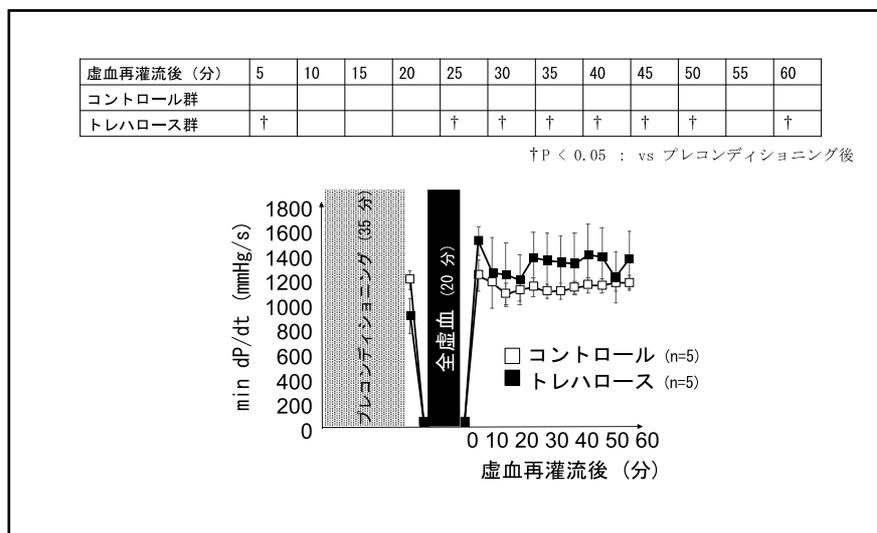


図 17. Minimum dP/dt の変化

7) Rate pressure product

図 18 に rate pressure product の変化を示す。Rate pressure product は、両群間に有意差がなかった。再灌流 10 分間は両群において、25 分後と 30 分後にはトレハロース群において虚血前に比して一時的に有意な上昇を認めた。

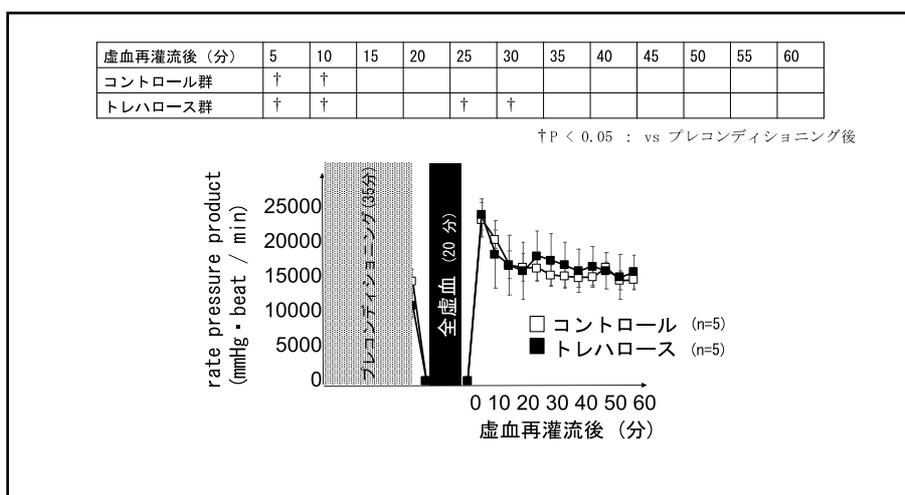


図 18. Rate pressure product の変化

## 2. オートファジーマーカーの発現

図 19 に左室心筋における LC3-II (図 19 A) と p62 (図 19 B) の蛋白発現を示す。再灌流後の 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。また再灌流後の 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。

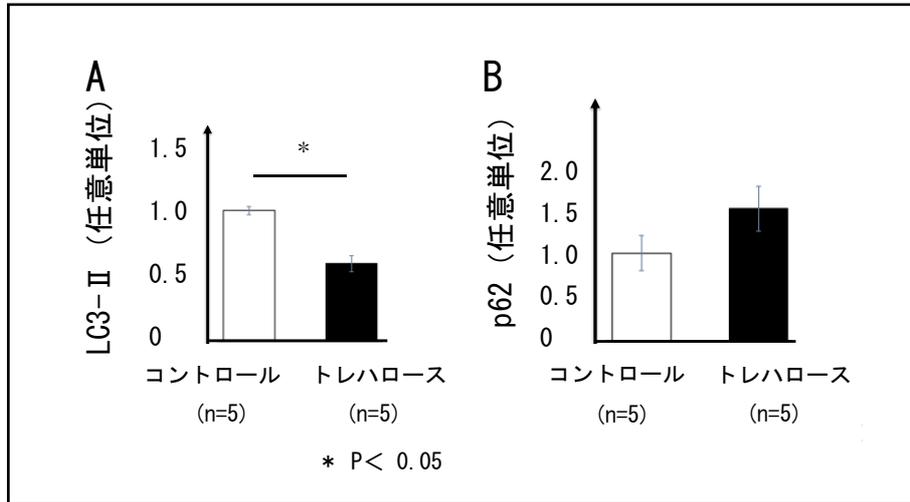


図 19. 虚血再灌流後のオートファジーマーカー LC3-II (A) と p62 (B) の比較  
LC3-II: microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3; p62: p62/sequestosome-1 (SQSTM1)

## 3. 心筋エネルギーマーカーの発現

図 20 に左室心筋における AMPK (図 20 A), pAMPK (図 20 B) の蛋白発現と pAMPK/AMPK (図 20 C) を示す。AMPK, p-AMPK, p-AMPK/AMPK のいずれにおいても、トレハロース群とコントロール群の間に有意差を認めなかった。

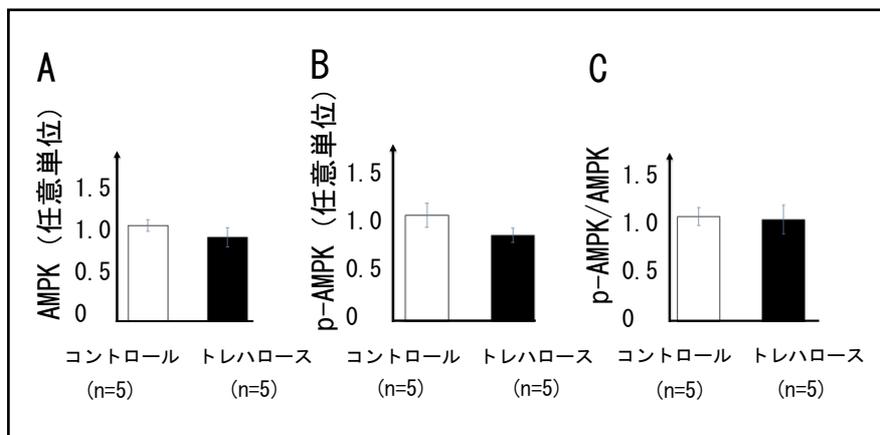


図 20 . 虚血再灌流後の AMPK の比較

AMPK: adenosine monophosphate-activated protein kinase; pAMPK:

#### 4. アポトーシスマーカーの発現

図 21 にアポトーシスマーカーである Caspase-3 の蛋白発現を示す。両群ともに cleaved Caspase-3 の発現を認めた個体は存在しなかった。

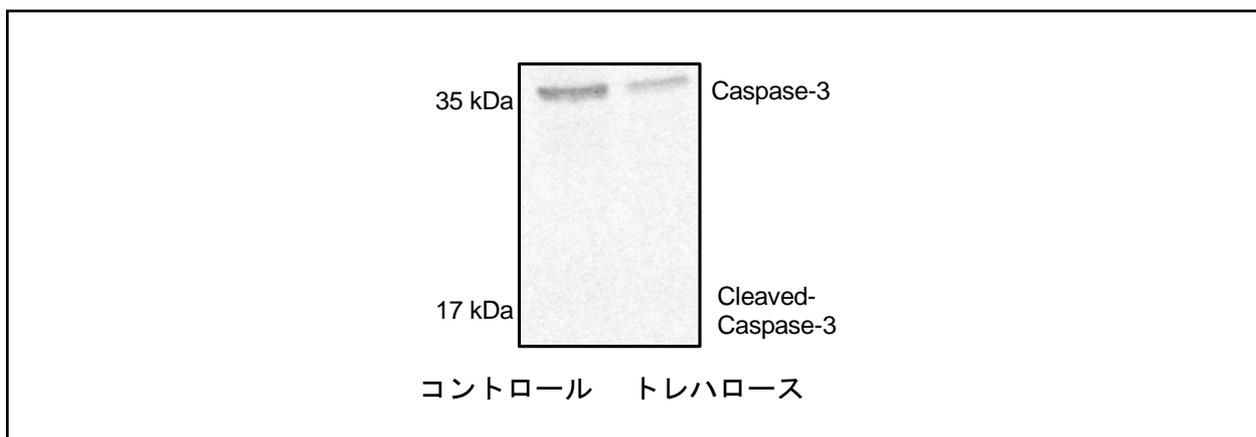


図 21. 虚血再灌流後の Caspase-3

#### 5. 灌流液中の乳酸値

図 22 に再灌流 60 分後の冠静脈ドレナージ液中の乳酸値を示す。乳酸値は、トレハロース群とコントロール群の間に有意差を認めなかった。

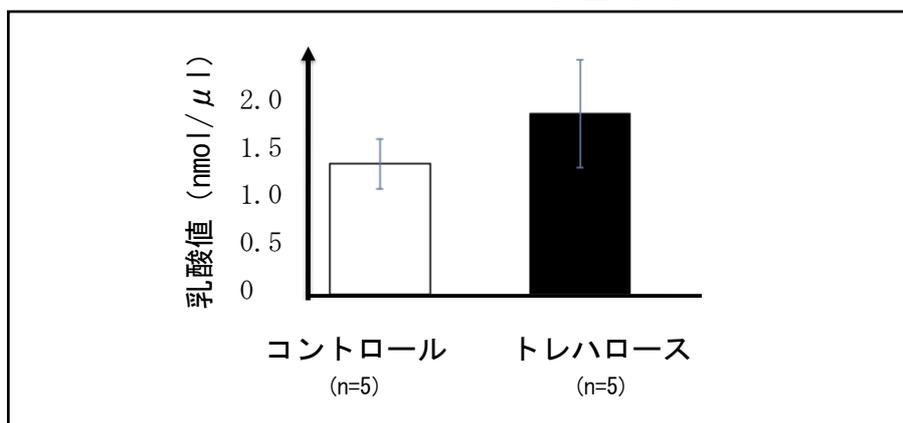


図 22. 虚血再灌流後の乳酸値の比較

## 6. 実験2の結果のまとめ

- 1) 心機能：トレハロース群では，再灌流後に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，トレハロースによる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したことが示唆された．冠血管抵抗は有意差がないもののトレハロースで低い傾向にあった．
- 2) 心筋オートファジーマーカー：トレハロース群では，左室心筋の LC3-II がコントロール群よりも有意に低値であった．一方，左室心筋の p62 は群間に有意差を認めなかったが，トレハロース群でコントロール群より高値であった．これらの結果は，仮説に反して，トレハロースによるプレコンディショニングが虚血再灌流後のオートファジーを活性化していないことを示唆すると考えられた．
- 3) 心筋エネルギー代謝：左室心筋の p-AMPK/AMPK には群間差を認めなかった．したがって，細胞内エネルギー維持の程度は，トレハロースによるプレコンディショニングによる心機能への影響には関与していないと考える．一方，嫌気性代謝の指標である冠灌流液の乳酸値にも群間差を認めなかった．
- 4) アポトーシスマーカー：両群ともに cleaved Caspase-3 が発現した個体は認められず，アポトーシスの誘導を認めなかった．

## 実験 3

仮説：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。

### 1. 心機能パラメータ

#### 1) 冠灌流量

図 23 に冠灌流量の変化を示す。再灌流後の冠灌流量はオートファジー阻害剤使用群で低値であったものの、有意な群間差を認めなかった。Tre+3MA 群ではプレコンディショニング後の冠灌流量が Tre 群，Tre+CQ 群と比較し有意に高値であり，虚血再灌流後はプレコンディショニング後にくらべ有意に低下した。

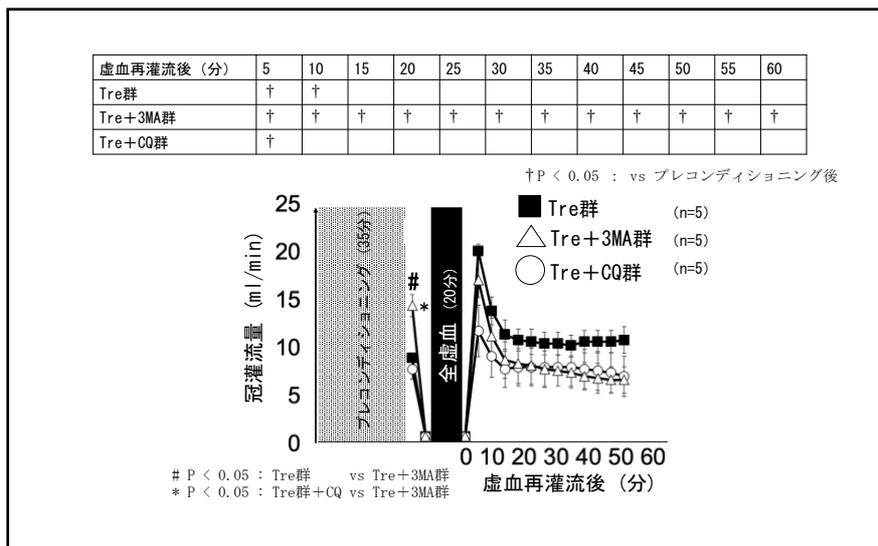


図 23. 虚血再灌流前後の冠灌流量の変化

CQ：クロロキン；3MA：3メチルアデニン；Tre：トレハロース

#### 2) 冠血管抵抗

図 24 に冠血管抵抗の変化を示す。虚血再灌流後の冠血管抵抗はオートファジー阻害剤使用群で高値であったものの，有意な群間差を認めなかった。Tre+3MA 群ではプレコンディショニング後の冠血管抵抗が Tre 群，Tre+CQ 群と比較し有意に低値であり，虚血再灌流 20 分以降はプレコンディショニング後にくらべ有意に増加した。

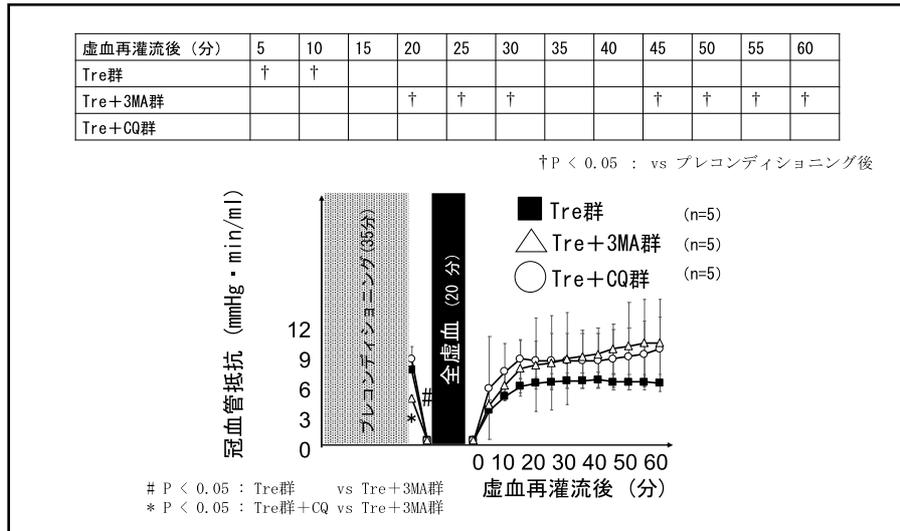


図 24. 虚血再灌流前後の冠血管抵抗の変化

CQ : クロロキン; 3MA : 3 メチルアデニン; Tre : トレハロース

### 3) 心拍数

図 25 に心拍数の変化を示す. 再灌流後の心拍数は再灌流 5 分後に Tre+3MA 群において Tre+CQ 群と比較し有意に高値であったが, その後は群間差を認めなかった. Tre+3MA 群ではプレコンディショニング後の心拍数が Tre+CQ 群と比較し有意に高値であり, 虚血再灌流 15 分後からはプレコンディショニング後にくらべて有意に低下した.

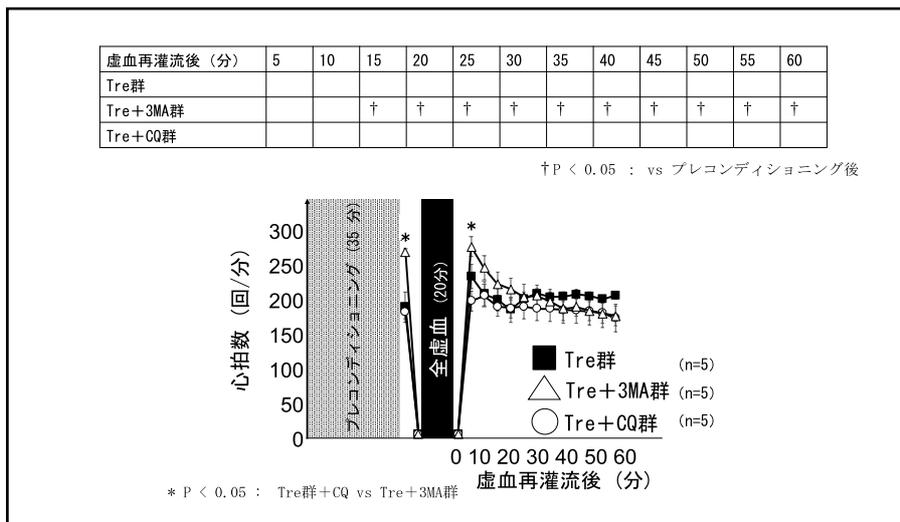


図 25. 虚血再灌流前後の心拍数の変化

CQ : クロロキン; 3MA : 3 メチルアデニン; Tre : トレハロース

#### 4) 左室最大圧

図 26 に左室最大圧の変化を示す. 再灌流後の左室最大圧は, Tre+3MA 群と Tre+CQ 群において Tre 群よりも有意に低値であった. Tre+CQ 群における左室最大圧は, 虚血再灌流 10 分から 25 分後まではプレコンディショニング後よりも有意に低下した. (Tre 群における左室最大圧は, 再灌流直後から 35 分間, 45 分後においてプレコンディショニング後より増加した.)

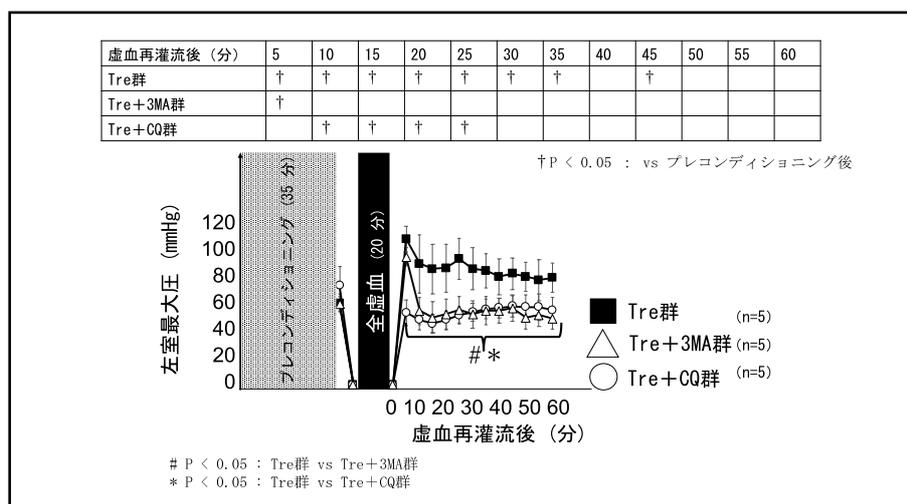


図 26. 虚血再灌流前後の左室最大圧の変化

CQ : クロロキン; 3MA : 3 メチルアデニン; Tre : トレハロース

#### 5) Maximum dP/dt

図 27 に maximum dP/dt の変化を示す. 再灌流後の maximum dP/dt は, Tre+3MA 群と Tre+CQ 群において Tre 群より低値であった. 特に, その傾向は Tre+3MA 群において顕著であった. Tre+3MA 群における maximum dP/dt は, 再灌流 5, 15, 50, 55, 60 分後にプレコンディショニング後よりも有意に低下した. Tre+CQ 群における maximum dP/dt は, 再灌流後 30 分間はプレコンディショニング後よりも有意に低下した. (Tre 群における maximum dP/dt は, 再灌流後はほとんどの計測点においてプレコンディショニング後よりも有意に増加した.)

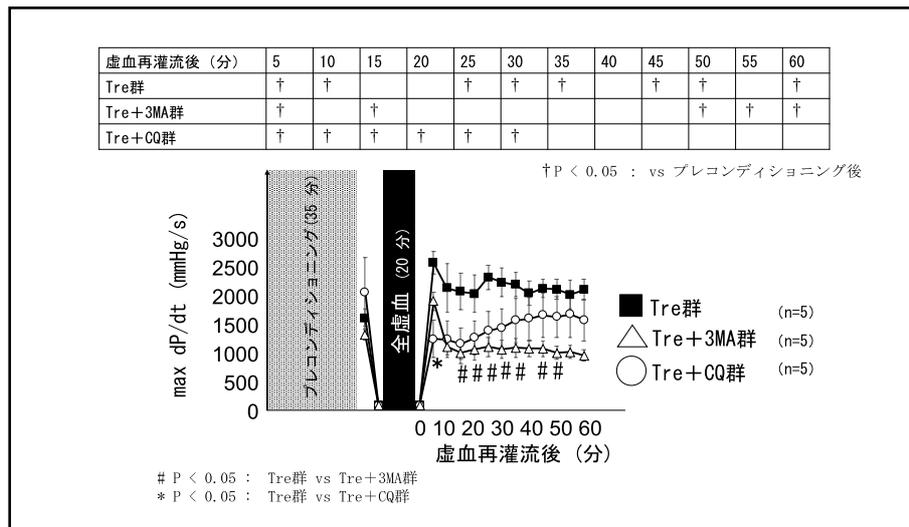


図 27. 虚血再灌流前後の maximum dP/dt の変化

CQ : クロロキン ; 3MA : 3 メチルアデニン ; Tre : トレハロース

6) Minimum dP/dt

図 28 に minimum dP/dt の変化を示す. 再灌流後の minimum dP/dt は, Tre+CQ 群において Tre 群より有意に低値であった. Tre+CQ 群における minimum dP/dt は, プレコンディショニング後は Tre+3MA 群と比較し有意に低値であり, 再灌流後は Tre 群より有意に低値となった. (Tre 群における minimum dP/dt は, 虚血再灌流 5 分後, 25 分以降でプレコンディショニング後よりも有意に増加した.)

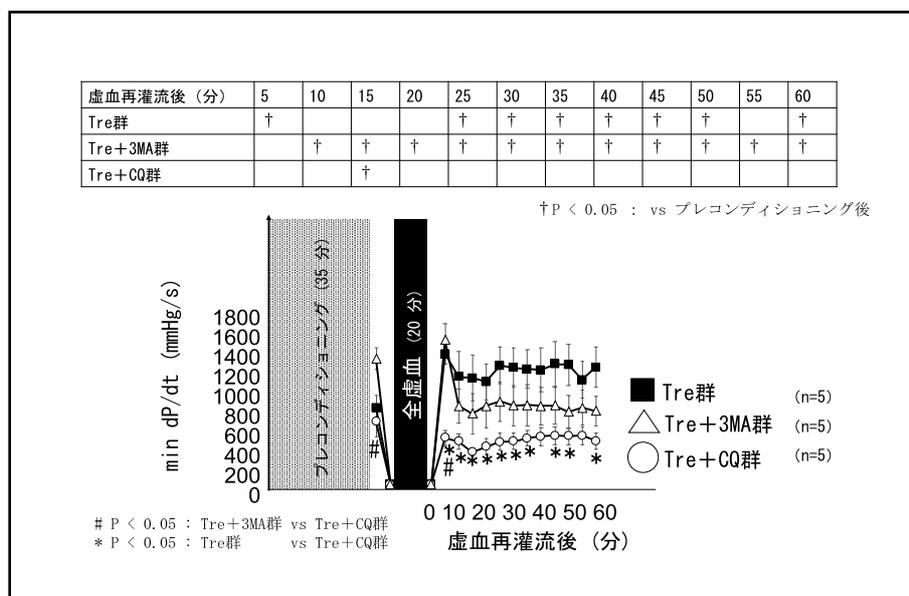


図 28. 虚血再灌流前後の minimum dP/dt の変化

CQ : クロロキン ; 3MA : 3 メチルアデニン ; Tre : トレハロース

7) Rate pressure product

図 29 に rate pressure product の変化を示す。再灌流後の rate pressure product は、Tre+3MA 群と Tre+CQ 群において Tre 群よりも有意に低値であった。Tre+3MA 群における rate pressure product は、虚血再灌流後はプレコンディショニング後よりも有意に低下した。Tre+CQ 群における rate pressure product は、再灌流 15, 20 分後でプレコンディショニング後よりも有意に低下した。(Tre 群における RPP は、再灌流 5, 10, 25, 30 分後でプレコンディショニング後よりも有意に増加した。)

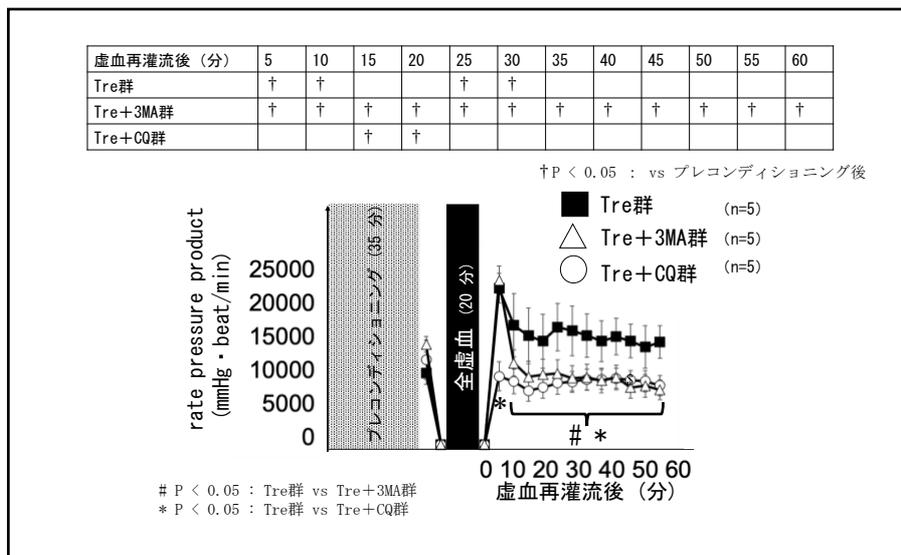


図 29. 虚血再灌流前後の rate pressure product の変化

CQ : クロロキン; 3MA : 3 メチルアデニン; Tre : トレハロース

## 2. アポトーシスマーカーの発現

図 30 にアポトーシスマーカーである Caspase-3 のバンドを示す。Tre+CQ 群でのみアポトーシスの誘導を示す cleaved Caspase-3 を検出した。

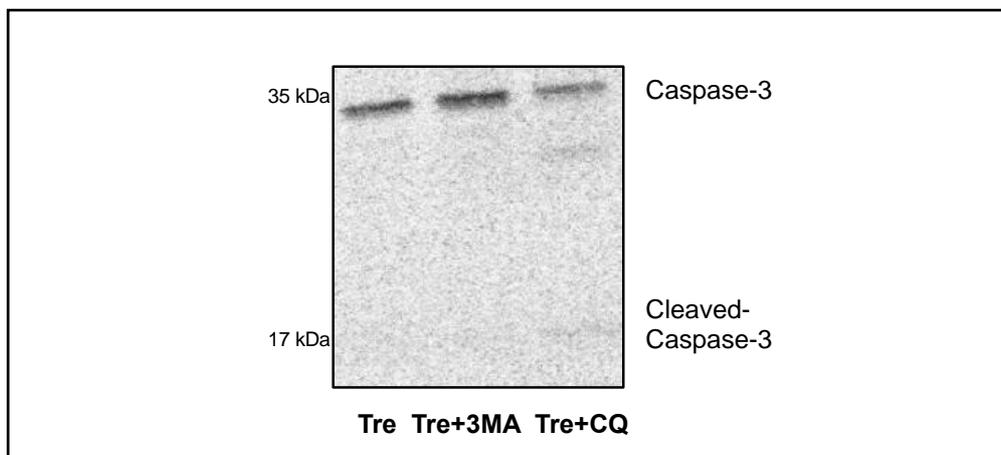


図 30. 虚血再灌流後の Caspase-3

## 3. 灌流液中の乳酸値

図 31 に虚血再灌流 60 分後に採取した冠灌流液中の乳酸値を示す。乳酸値は Tre+3MA 群と Tre+CQ 群で高値の傾向であったが、有意差を認めなかった。

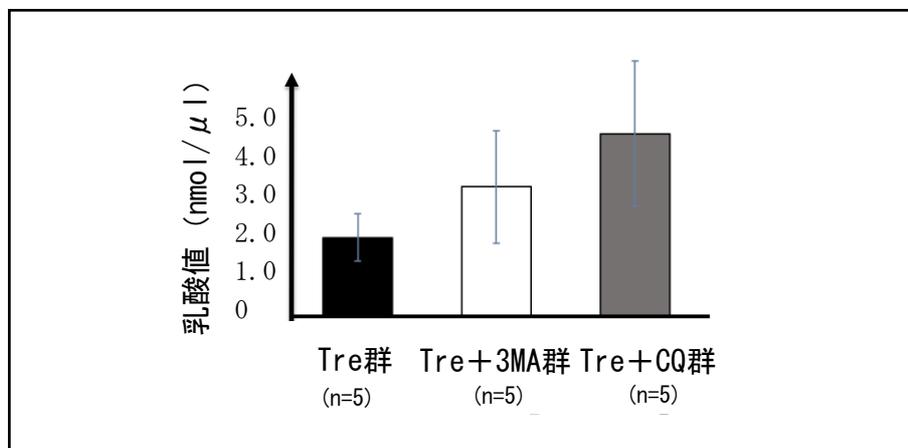


図 31. 虚血再灌流後の乳酸値の比較

CQ: クロロキン; 3MA: 3メチルアデニン; Tre: トレハロース

#### 4. 実験3の結果のまとめ

トレハロースへの二種のオートファジー阻害剤の添加は、いずれも心機能を抑制する傾向を認めた。

- 1) 虚血再灌流後の左室最大圧の低下および RPP の抑制 : 3MA, CQ
- 2) Maximum  $dP/dt$  の抑制 : 3MA
- 3) Minimum  $dP/dt$  の抑制、アポトーシス誘導 : CQ

# 考察

## 1. 本研究で得られた新知見

- 1) トレハロースによる心臓の灌流は心筋オートファジーを活性化する。  
(実験 1)
- 2) 短時間虚血再灌流モデルにおいて、トレハロースによるプレコンディショニングは再灌流後の心機能低下を抑制する。また、トレハロースによる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を亢進させない。(実験 2)
- 3) 短時間虚血再灌流モデルにおいて、オートファジー阻害剤の添加は、トレハロース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(実験 3)。

## 2. 新知見に至った根拠

上記新知見の根拠と解釈を以下に述べる。

- 1) トレハロース灌流後の心筋 LC3-II は有意に増加し、p62 は低下する傾向を認めた。図 32 にオートファジーのマーカーの変化を示す。オートファジーマーカー LC3-II はオートファゴゾームの膜に付着するためオートファゴゾームの数を反映するとされている。しかしながら、オートファジー・フラックス下流の阻害によってもオートファゴゾームの数は増加しうるため、LC3-II のみではオートファジー活性化の評価は困難である。一方、p62 は LC3-II に接着しオートファジーによって選択的に分解されるため、オートファジー・フラックスが亢進すれば p62 は減少し、下流の阻害が起これば増加する。よって、オートファジーが活性化すると通常 LC3-II は増加するとともに p62 は減少し、下流の阻害では両者が増加する。このように p62 の変化でオートファジーの活性化と下流の阻害は鑑別可能だが、実験 1 では有意差はないものの p62 の減少傾向を認めており、トレハロース灌流により心筋オートファジーを活性化したと判断した。

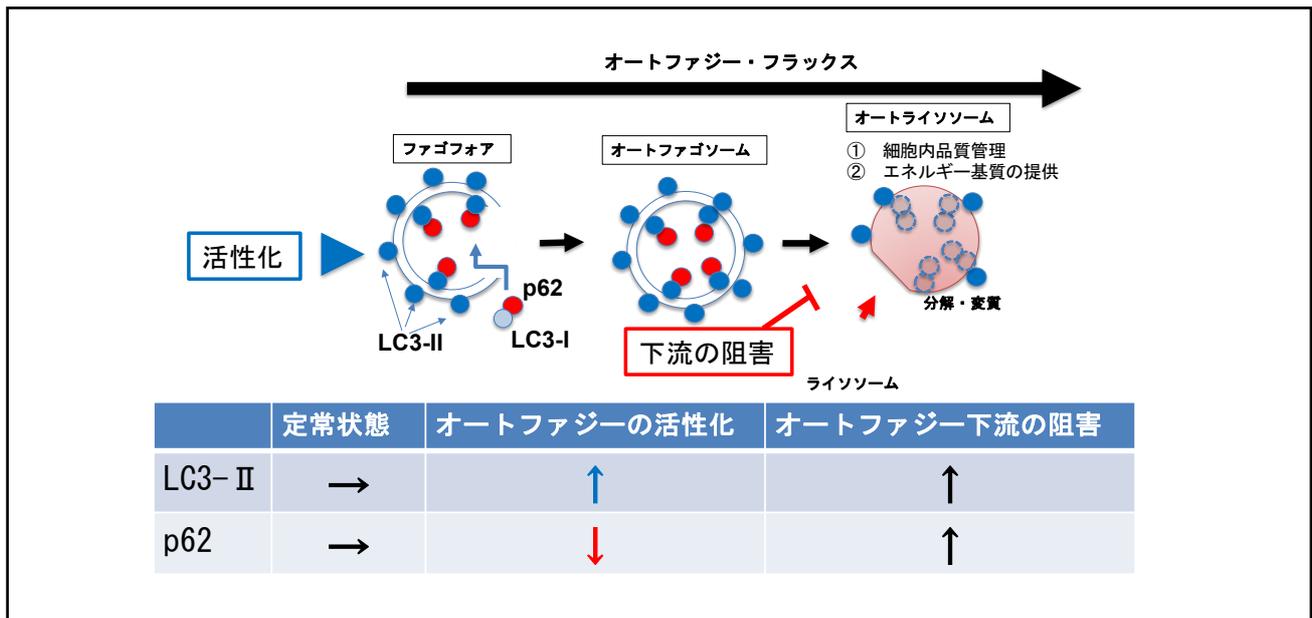


図 32. オートファジーとオートファジーマーカー

LC3- II : microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3; p62 : p62/sequestosome-1 (SQSTM1)

2) トレハロースによるプレコンディショニング後の短時間の虚血再灌流モデルにおいて、収縮能の指標のひとつである maximum dP/dt 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。また、冠灌流量はトレハロース群で多い傾向を認めた。オートファゴソームマーカー LC3- II は、トレハロース群においてコントロール群と比較し有意に低値であった。一方、p62 は両群に有意差を認めなかったが、トレハロース群で高値であった。よって、実験 1 のプレコンディショニング直後の結果とは逆に、トレハロースによるプレコンディショニングは虚血再灌流後のオートファジーを活性化させないと判断した。これは仮説に反する結果であった。

今回示したトレハロースによるプレコンディショニング群における、再灌流後の収縮能低下の抑制とオートファジーの活性低下について考察する。トレハロース群では、トレハロースによるプレコンディショニングにより虚血前にオートファジーが活性化したため、心筋がその後の虚血耐性を獲得した可能性がある。つまり、トレハロース群では虚血中のエネルギー代謝の改善が、再灌流後の心機能に良い影響を及ぼし、再灌流によるオートファジー活性化が抑制されたのではないかと考えた。しかし、エネルギーセンサーである pAMPK/AMPK に有意差を認めず、本研究ではトレハロース

のいかなる作用が心機能改善に寄与したのかは明確にならなかった。

- 3) オートファジー阻害剤（3メチルアデニン，クロロキン）を添加した群において，トレハロース単独群（Tre 群）と比較し再灌流後の心機能が低下する傾向を認めた．特に左室最大圧，RPP は，オートファジー阻害剤の添加により有意に低下した．また，収縮能の指標である maximum dP/dt は3メチルアデニン添加群（Tre+3MA 群）で，拡張能の指標である minimum dP/dt はクロロキン添加群（Tre+CQ 群）でトレハロース単独群（Tre 群）と比較し有意に低値であった．これらの結果は，実験2で示されたトレハロースの心機能低下抑制作用にオートファジーが関与していることを示している．

### 3. 文献的考察

#### 1) 心筋虚血再灌流におけるオートファジーの役割

オートファジーは，主に細胞内の不要となった蛋白質などを除去する仕組みである．さらに，オートファジーは，虚血など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，グルコースなどの ATP 産生に必要なエネルギー基質を供給することもできる (Mizushima and Komatsu, 2011)．このようにオートファジーは，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あるため，「諸刃の剣」とされる．しかしながら，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 (Matsui et al., 2007)．しかし，実験的に虚血時だけ，あるいは再灌流時だけオートファジーを選択的に活性化あるいは阻害することは困難であり，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．

本研究では，トレハロースによるプレコンディショニング後の段階でオートファジーは活性化し，虚血再灌流後は逆に低下した．一方，オートファジー・フラックスの阻害実験では心機能は低下した．以上より，私たちは虚血に対してはトレハロースによるプレコンディショニングが心筋保護的に作用したと考える．プレコンディショニングによってオートファジーが活性化し虚血中の細胞の恒常性が維持されたことで，再灌流後はオートファジー活性が相対的に低下したと考えることもできる．しかしながら，この作用が真にトレハロースのオートファジー活性化作用によるものであるか，さらなる研

究が必要である。

## 2) トレハロースによるオートファジー活性化

トレハロースは、自然界に存在する毒性のない二糖類である。酵母や細菌、昆虫や植物などはトレハロースを合成できるが、哺乳類は合成できない (Chen and Haddad, 2004)。詳細なメカニズムは解明されていないが、トレハロースはオートファジーを活性化する物質として注目されている (Wang and Ren, 2016)。

例えば、マウス肝細胞においてトレハロースは、オートファジーを誘導し細胞内の脂肪滴を減少させるという報告がある (DeBosch et al., 2016)。この報告では、トレハロースはグルコーストランスポーターの一つである solute carrier 2A を阻害し AMPK が関与する経路からオートファジーを誘導する (疑似飢餓) と説明されている。

神経細胞においてもトレハロースは重要な役割を果たすことが知られている。ハンチントン病のマウスモデルにおいては、変異したハンチンチンという不要蛋白が、オートファジーの減少のため除去できないが、トレハロースによってその不要蛋白の除去が改善することが報告された (Sarkar et al., 2007)。

心疾患におけるトレハロースの役割は不明であった。近年、陳旧性心筋梗塞のマウスモデルにおいて、トレハロースによるオートファジー活性化は左室のリモデリングを抑制し、心機能を改善したという報告がなされた (Sciarretta et al., 2018)。彼らは、トレハロースがオートファジー上流遺伝子の transcription factor EB の活性化を介してオートファジーを活性化する可能性を示している。

本研究では、虚血再灌流においてトレハロースは心筋保護的に作用することが示唆された。今回はオートファジーに注目したが、トレハロースにはオートファジー活性化作用以外にも抗酸化作用や血管拡張作用などが報告されている。今回の研究では、トレハロース群で冠血管抵抗が低い (冠灌流量が多い) 傾向にあり、血管拡張作用の関与も否定できない。本研究の結果が、オートファジーに依存するのか、今後の研究で明らかにしていく必要がある。

## 4. 臨床応用へ向けて

前述のようにトレハロースには血管攣縮の防止、抗炎症作用、抗酸化作用などの様々な機能が報告されている (Echigo et al., 2012)。これらのトレ

ハロースの作用点は心臓手術時の心機能障害機序にも密接に関係しており，特に人工心肺を使用する手術においてその予防効果が期待できる．本研究では，トレハロースによるプレコンディショニングが短時間心筋虚血後の心機能低下を抑制した．この結果は，トレハロースの使用が心臓手術後のカテコラミン等強心剤の使用を減じさせ，また手術時間の短縮や術後の回復期間の短縮にも寄与しうると期待される．トレハロースを心臓手術において臨床応用につなげるために，さらに長時間の虚血における検討や，心筋保護液を用いた検討が求められる．

トレハロースは毒性のない二糖類で，経口摂取では食事の 10%までは安全用量とされる．しかしながら，トレハロースは消化管からは 0.5%未満しか吸収されないため，経静脈投与がより有効と考えられる．トレハロースの経静脈投与に関する情報はほとんどないが，血中濃度が 0.14%までは安全であるとする米国の特許情報もある (United States Patent No: US 9,125,924 B2)．適切なトレハロースの投与量，血中濃度に関しては更なる研究が必要であり，また臨床応用のためにはオートファジー以外のさまざまなトレハロースの生理作用も明らかにされなければならない．

## 5. 本研究の問題点

### 1) トレハロースの心筋虚血再灌流後の心機能上昇がオートファジーに依存するかは不明である：

今後，トレハロースの抗炎症作用，抗酸化作用などに関するマーカーを用いた検討が必要である．また，トレハロース群だけでなくコントロール群にもオートファジー阻害剤を使用し心機能を比較することで，オートファジー以外の機序の存在が推測できる可能性がある．つまり，心機能が同程度まで低下すれば，トレハロースの効果がよりオートファジーに依存している可能性が高い．一方，依然としてトレハロース群の心機能がコントロール群より良ければ，オートファジー以外の機序の存在が示唆される．しかしながら，本研究で用いた阻害剤 (3MA, CQ) によってオートファジーが両群同程度まで抑制されるとは限らず，結局オートファジー依存性の判定にはならないと考え，今回は追加実験を断念した．確実なオートファジー阻害が可能なノックアウトマウスなどを用いた実験が望ましいかもしれないが，プレコンディショニング中のみオートファジー阻害とはならないため，本研究の趣旨に合わない．今後，より選択的で効果的なオートファジー阻害剤が開発されれば検討が可能になると期待される．

- 2) 気絶心筋モデル（短時間虚血）以外の，長時間の虚血モデルや心筋保護液モデルにおいても同様の結果が得られるかは不明である：

心臓手術では心筋保護液を用いて瞬時に心停止させ，20分から30分おきに同様の保護液を投与して心停止を長時間維持する．本研究モデルは心臓外科の実臨床に即したモデルではないため今後さらなる研究が必要である．

- 3) 実験3でオートファジー阻害剤使用群の虚血前の心機能が一定していなかった：

トレハロースに3メチルアデニンを添加した群（Tre+3MA群）で冠灌流量や心拍数がトレハロース群（Tre群）と異なっていた．虚血前の心機能が再灌流後の心機能に影響を与えた可能性が排除できず，今後これに配慮した追実験が望まれる．

# 結論

## 1. 本研究で得られた新知見

- 1) トレハロースを心臓に灌流することによって心筋オートファジーが活性化する.
- 2) 短時間虚血再灌流モデルにおいて、トレハロースによるプレコンディショニングは再灌流後の心機能低下を抑制する. 一方で再灌流後のオートファジー活性は低下する.
- 3) 短時間虚血再灌流モデルにおいて、オートファジー阻害剤を添加すると、トレハロースプレコンディショニングによる心機能低下抑制作用が減弱する.

## 2. 本研究で得られた新知見の意義

本研究では、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低下がトレハロースを用いたプレコンディショニングにより抑制されることが示された。今後、心筋梗塞後や心臓手術後の心機能低下に対してトレハロースを治療に応用することができるようになれば、心不全の予防・治療、心不全に伴うさまざまな合併症の低減、ならびに入院期間の短縮に寄与できる可能性がある。

## 3. 新知見から今後どのような研究が展開されうるか

トレハロースを心臓手術において臨床応用するために、今後さらに以下のような研究が展開されうる。

- 1) より長時間の虚血での検討：本研究では、虚血再灌流後の心機能低下が比較的軽度である20分間の虚血に対するトレハロースの効果を検証したが、臨床応用に際してはより強い心筋障害に対する心保護効果も検証されるべきである。現在当研究室では、30分以上の常温虚血再灌流後の心機能障害に対するトレハロースの有効性も明らかになりつつある。
- 2) 心筋保護液の研究：心筋保護液の開発には長い歴史があり、現在心臓手術時に使用される心筋保護液には様々な組成がある他、注入方法についても血液混合の有無や投与時間など施設によって様々である。より簡便に心筋保護液の効果を向上させるために、現在汎用されているミオテクター®などの一般的な心筋保護液にトレハロースを添加し使用することで虚血再灌流後の心機能を改善できるかという研究が展開されうる。さらに、トレ

ハロースの細胞膜を保護する不凍液としての役割から着想し、心臓移植を想定した長時間冷却・凍結保存の研究にも発展しうると考える。

#### 4. 今後の課題

- 1) トレハロース効果発現メカニズムの解明：トレハロースには血管拡張作用や抗酸化作用，抗炎症作用などもあるため，これらの関与を検証することも今後必要である．トレハロースの血管拡張作用の関与については，血管内皮から産生される内皮一酸化窒素合成酵素や一酸化窒素の変化を計測することで検証可能と考えられる．抗酸化作用に関しては，活性酸素種（ROS）の計測や，フェロプトーシスの検証が有用と考えられる．フェロプトーシスは，鉄依存の過酸化脂質の蓄積に起因するとされ，近年虚血再灌流障害に重要な役割を果たしていると考えられる，脂質酸化による細胞死である．鉄は脂質の過酸化を強く促進し ROS を生じさせ，細胞の ROS 処理能力を超えるとタンパク質，核酸，脂質を損傷すると考えられている．一方で抗炎症作用に関しては，TNF $\alpha$ などの炎症性マーカーを測定することで検証が可能と考えられる．
- 2) トレハロースの製剤化におけるハードル：臨床応用に際しては，トレハロースを製剤化するための精製方法や，至適濃度の設定が必要である．肺移植の際の肺保存液として開発された ET-Kyoto 液（株式会社大塚製薬工場）には，4%のトレハロースが含まれているが，現在人体への投与が認められていない（医薬品ではない）．心臓移植臓器用の保存液としてのトレハロース使用は比較的ハードルが低いかもしれないが，トレハロースを人体に投与する医薬品（開心術で使用する心筋保護液）として使用するには，新たに薬事承認を得る必要がある．

# 謝辞

本研究にあたり，学会発表，論文作成を通して懇切なるご指導とご鞭撻を賜り，北海道大学病院医学研究院 循環器・呼吸器外科 若狭 哲 教授に深く感謝いたします。

本研究全体の遂行にあたり，研究計画の立案・研究方法，学会発表，論文作成を通して多大なるご意見とご指導・ご協力を賜りました北海道大学大学院医学研究院 循環器・呼吸器外科 新宮 康栄 講師に深く感謝いたします。

本研究にあたり，実際の実験でサポート頂いた北海道大学病院 医学研究院 循環器・呼吸器外科 須野 賢一郎 先生に深く感謝いたします。

研究期間中に臨床面の仕事で多大なるサポートをいただきました北海道大学大学院医学研究院 循環器・呼吸器外科部門スタッフの皆様に，この場をお借りして深く感謝いたします。

# 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

# 引用文献

- Braunwald, E., and Kloner, R.A. (1982). The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* *66*, 1146-1149.
- Chen, Q., and Haddad, G.G. (2004). Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals. *J Exp Biol* *207*, 3125-3129.
- DeBosch, B.J., Heitmeier, M.R., Mayer, A.L., Higgins, C.B., Crowley, J.R., Kraft, T.E., Chi, M., Newberry, E.P., Chen, Z., Finck, B.N., *et al.* (2016). Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis. *Science signaling* *9*, ra21.
- Echigo, R., Shimohata, N., Karatsu, K., Yano, F., Kayasuga-Kariya, Y., Fujisawa, A., Ohto, T., Kita, Y., Nakamura, M., Suzuki, S., *et al.* (2012). Trehalose treatment suppresses inflammation, oxidative stress, and vasospasm induced by experimental subarachnoid hemorrhage. *Journal of translational medicine* *10*, 80.
- Fang, X., Wang, H., Han, D., Xie, E., Yang, X., Wei, J., Gu, S., Gao, F., Zhu, N., Yin, X., *et al.* (2019). Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *116*, 2672-2680.
- Guaricci, A.I., Bulzis, G., Pontone, G., Scicchitano, P., Carbonara, R., Rabbat, M., De Santis, D., and Ciccone, M.M. (2018). Current interpretation of myocardial stunning. *Trends in cardiovascular medicine* *28*, 263-271.
- Hausenloy, D.J., Tsang, A., Mocanu, M.M., and Yellon, D.M. (2005). Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* *288*, H971-976.
- Huang, C., Yitzhaki, S., Perry, C.N., Liu, W., Giricz, Z., Mentzer, R.M., Jr., and Gottlieb, R.A. (2010). Autophagy induced by ischemic preconditioning is essential for cardioprotection. *Journal of cardiovascular translational research* *3*, 365-373.
- Iwaya-Inoue, M., Sakurai, M., and Uemura, M. (2018). *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation Adaptation Mechanisms and Their Applications Preface. Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation: Adaptation Mechanisms and Their Applications* *1081*, Vii-Viii.
- Matsui, Y., Takagi, H., Qu, X., Abdellatif, M., Sakoda, H., Asano, T., Levine, B., and Sadoshima, J. (2007). Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res* *100*, 914-922.
- Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*

147, 728-741.

Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140, 313-326.

Murry, C.E., Jennings, R.B., and Reimer, K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124-1136.

Sarkar, S., Davies, J.E., Huang, Z., Tunnacliffe, A., and Rubinsztein, D.C. (2007). Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 282, 5641-5652.

Schmitt, J.P., Schroder, J., Schunkert, H., Birnbaum, D.E., and Aebert, H. (2002). Role of apoptosis in myocardial stunning after open heart surgery. *Ann Thorac Surg* 73, 1229-1235.

Sciarretta, S., Yee, D., Nagarajan, N., Bianchi, F., Saito, T., Valenti, V., Tong, M., Del Re, D.P., Vecchione, C., Schirone, L., *et al.* (2018). Trehalose-Induced Activation of Autophagy Improves Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 71, 1999-2010.

Tiwari, M., Hemalatha, T., Ganesan, K., Nayeem, M., Murali Manohar, B., Balachandran, C., Vairamuthu, S., Subramaniam, S., and Puvanakrishnan, R. (2008). Myocardial ischemia and reperfusion injury in rats: lysosomal hydrolases and matrix metalloproteinases mediated cellular damage. *Mol Cell Biochem* 312, 81-91.

Wang, Q., and Ren, J. (2016). mTOR-Independent autophagy inducer trehalose rescues against insulin resistance-induced myocardial contractile anomalies: Role of p38 MAPK and Foxo1. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 111, 357-373.

Xiao, R., Teng, M., Zhang, Q., Shi, X.H., and Huang, Y.S. (2012). Myocardial autophagy after severe burn in rats. *PLoS One* 7, e39488.

Zaugg, M., Lucchinetti, E., Uecker, M., Pasch, T., and Schaub, M.C. (2003). Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. *Br J Anaesth* 91, 551-565.

Zhang, J., Nadtochiy, S.M., Urciuoli, W.R., and Brookes, P.S. (2016). The cardioprotective compound cloxyquin uncouples mitochondria and induces autophagy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310, H29-38.