



Title	ラット虚血性心筋症モデルにおける左室形成術後の左室リモデリングに対するトレハロースの効果
Author(s)	稗田, 哲也
Description	配架番号 : 2711
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14974号
Issue Date	2022-03-24
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14974">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14974</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85959">https://hdl.handle.net/2115/85959</a>
Type	doctoral thesis
File Information	HIEDA_Tetsuya.pdf



# 学位論文

ラット虚血性心筋症モデルにおける  
左室形成術後の左室リモデリングに対する  
トレハロースの効果

(Effects of trehalose on left  
ventricular remodeling after  
surgical ventricular reconstruction  
in a rat model of ischemic  
cardiomyopathy)

2022年3月

北海道大学

稗田 哲也



# 学位論文

ラット虚血性心筋症モデルにおける  
左室形成術後の左室リモデリングに対する  
トレハロースの効果

(Effects of trehalose on left  
ventricular remodeling after  
surgical ventricular reconstruction  
in a rat model of ischemic  
cardiomyopathy)

2022年3月

北海道大学

稗田 哲也

# 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	5 頁
緒言	6 頁
方法	12 頁
結果	20 頁
考察	38 頁
結論	45 頁
謝辞	47 頁
利益相反	48 頁
引用文献	49 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. Tetsuya Hieda, Yasushige Shingu, Satoshi Sugimoto, Hidetsugu Asai, Tomoji Yamakawa, Satoru Wakasa. (2022) Effects of trehalose on recurrence of remodeling after ventricular reconstruction in rats with ischemic cardiomyopathy. Heart Vessels. DOI: 10.1007/s00380-021-01990-0.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 稗田哲也, 新宮康栄, 加藤伸康, 加藤裕貴, 大岡智学, 若狭哲  
ラット虚血性心筋症モデルにおける左室形成術とオートファジー活性化  
による左室機能改善効果の検討  
胸部外科学会(第73回日本胸部外科学会総会), 2020年10月28日・  
名古屋(Web開催)

# 要旨

## 【背景と目的】

虚血性心筋症は、心不全の原因の一つであり、陳旧性心筋梗塞を原因とした心機能障害である。虚血性心筋症では、左室リモデリングと呼ばれる左室拡大と収縮能低下を認め、高度の左室リモデリングは予後不良因子である。

虚血性心筋症に対する外科治療の一つとして、左室リモデリングに対する左室形成術がある。左室形成術の目的は①瘢痕組織の除外、②左室形態の改善、③拡大した左室の縮小である。しかし、欧米で実施された大規模無作為比較試験では、左室形成術の生命予後、運動耐容能に関する有効性は見出せなかった。その原因は明らかではないが、左室形成術の問題点として左室形成術後の左室リモデリングの再発が指摘されている。遠隔期の左室リモデリングの再発機序の解明により、左室形成術の治療成績の改善につながる可能性がある。

我々はこれまで、左室形成術後の左室リモデリングの再発と心筋オートファジーの関連を研究してきた。オートファジーは、細胞内で行われる自食作用の一つであり、「細胞内品質管理」と「エネルギー基質の供給」という二つの役割を持っている。オートファジーは、左室形成術後早期には抑制されるが、遠隔期に左室リモデリング再発とともに再活性化することが明らかとなった。さらに、遠隔期にオートファジー阻害剤を使用すると、左室リモデリングの程度は増悪した。この結果より我々は、左室形成術後におけるオートファジーが左室リモデリングの再発抑制に重要な役割を持っていると考えた。そこで、オートファジー活性化作用が報告されているトレハロースを投与することで、左室形成術後の左室リモデリングの再発を予防できるかどうかについて研究することとした。

本研究の目的は、ラット虚血性心筋症モデルに対する左室形成術後において、オートファジー活性化作用をもつトレハロースの投与が、左室リモデリングの再発に及ぼす影響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、研究の目的を鑑み、「ラット虚血性心筋症モデルに対する左室形成術後にオートファジー活性化作用を持つトレハロースの投与が左室リモデリングの再発を抑制する」という仮説のもと実験を行った。

週齢 10 週の雄の Sprague-Dawley ラットを用いて、前下行枝結紮による心筋梗塞により虚血性心筋症モデルを作成した。心筋梗塞後 28 日目に左室形成術または sham 手術を行い、術後のトレハロース投与の有無により、sham(28 日)群、左室形成術(28 日)群、sham+トレハロース(28 日)群、左室形成術+トレハロース(28 日)群の 4 群に分類した。トレハロース投与群には、術後 7 日目から 28 日目まで 10%トレハロース水溶液を経口で自由飲水させた。術後 28 日目に、経胸壁心エコーによる心機能評価を行った後に犠牲死させ、採取した心筋を用いてオートファジー活性化の指標となる microtubule-associated light chain 3-II (LC3-II), p62/SQSTM1 (p62) のタンパク発現をウェスタンブロッティングで測定した。オートファジーが活性化された場合には、一般的に LC3-II は増加し、p62 は低下するため、両者を合わせてオートファジー活性の評価とした。

また、左室形成術後早期の効果を確認するために、上記とは別のラットを左室形成術または sham 手術後 2 日目に犠牲死させ、左室形成術(2 日)群、sham(2 日)群とした。

## 【結果】

左室形成術(2 日)群では、sham(2 日)群と比して左室拡張末期径は小さく( $7.2 \pm 0.5$  vs.  $11.0 \pm 0.3$  mm,  $P < 0.01$ ), 左室短縮率は大きかったが( $28.0\% \pm 3.7\%$  vs.  $16.5\% \pm 2.5\%$ ,  $P < 0.01$ ), 左室形成術(28 日)群では左室拡張末期径および左室短縮率は、それぞれ sham(28 日)群と同等であった。この結果は、左室形成術後早期には左室径の縮小と左室収縮能の改善効果が見られたが、遠隔期にはその効果が消失していることを示しており、本研究においても左室形成術後遠隔期の左室リモデリングの再発を確認した。一方、左室形成術+トレハロース(28 日)群において、左室拡張末期径は左室形成術(28 日)群と比して小さく( $9.5 \pm 0.4$  vs.  $10.9 \pm 0.4$  mm,  $P < 0.05$ ), 左室短縮率は大きかった( $33.7\% \pm 5.5\%$  vs.  $14.6\% \pm 1.8\%$ ,  $P < 0.01$ )。この結果より、左室形成術後にトレハロースを投与することで、遠隔期の左室リモデリングの再発が抑制されたことが示された。

オートファジー活性に関しては、左室形成術(2 日)群では、sham(2 日)群と比して LC3-II は小さく( $0.6 \pm 0.02$  vs.  $1.6 \pm 0.3$  arbitrary unit,  $P < 0.05$ ), p62 は大きかった( $2.5 \pm 0.3$  vs.  $1.0 \pm 0.1$  arbitrary unit,  $P < 0.01$ )。一方、左室形成術(28 日)群では、左室形成術(2 日)群よりも、LC3-II は大きく( $3.4 \pm 0.3$  vs.  $0.6 \pm 0.03$

arbitrary unit,  $P < 0.01$ ), p62 は小さく ( $0.9 \pm 0.4$  vs.  $2.5 \pm 0.5$  arbitrary unit,  $P < 0.01$ ), それぞれ sham(28 日)群と同等であった。この結果より, 左室形成術後のオートファジー活性は早期に sham 群よりも抑制されるが, 遠隔期には回復して sham 群と同等になることが示された。一方で, 左室形成術+トレハロース(28 日)群では左室形成術(28 日)群と比して, LC3-II には差を認めなかったが, p62 は有意に小さかった ( $0.1 \pm 0.1$  vs.  $0.9 \pm 0.4$  arbitrary unit,  $P < 0.05$ )。この結果より, トレハロースを投与することで, 左室形成術後遠隔期のオートファジー活性は, 左室形成術単独よりも亢進したことが示唆された。

### 【考察】

我々は先行研究において, 左室形成術後にオートファジー阻害剤を投与すると, 術後遠隔期の左室リモデリング再発の程度が増悪することを見出した。一方本研究では, 左室形成術後にオートファジー活性化作用のあるトレハロースを投与することで左室リモデリング再発が抑制されることを示した。これらの結果は, 左室形成術後の左室リモデリング再発に対してオートファジーが抑制的に働いており, トレハロースが左室リモデリング再発抑制のためのアジュバント療法となりうることを示唆している。

本研究でオートファジー活性化評価のために用いた LC3-II と p62 は, 特殊な状況下で変化することがあり, トレハロースによるオートファジー活性化を裏付けるためには, 蛍光タンパクプローブを用いたオートファジー活性の定量的評価やオートファジー阻害剤を併用した実験が今後求められる。また, トレハロースにはオートファジー活性化以外にも心保護的作用が存在するため, トレハロースの左室リモデリング再発抑制機序の解明は, 今後の重要な課題である。

### 【結論】

ラット虚血性心筋症モデルに対する左室形成術後に, オートファジー活性化作用のあるトレハロースを投与することで, 左室形成術単独に比して左室リモデリング再発は抑制され, オートファジー活性が亢進することが示された。トレハロースが左室リモデリング再発を抑制する機序に関して, オートファジーの定量的評価に関する研究と, トレハロースの持つオートファジー活性化以外の心保護的作用に関する研究は, 今後の重要な課題である。

# 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。

AW	: atrial weight
BNP	: brain natriuretic peptide
BW	: body weight
CO	: cardiac output
DCT	: deceleration time
DNA	: deoxyribonucleic acid
FS	: fractional shortening
LC3	: microtubule-associated light chain 3
LVEDD	: left ventricular end-diastolic dimension
LVESD	: left ventricular end-systolic dimension
LW	: lung weight
MHC	: myosin heavy chain
RNA	: ribonucleic acid
RT-PCR	: reverse transcription polymerase chain reaction
SA	: skeletal actin
STICH	: Surgical Treatment for Ischemic Heart Failure
SV	: stroke volume
SVR	: surgical ventricular reconstruction
Tre	: trehalose

# 緒言

## ①論文の背景

### 虚血性心筋症と左室リモデリング

心疾患は、本邦における死因としては悪性新生物に次いで2番目に多く、その数は年々増加傾向にある[厚生労働省. 令和元年(2019年)人口動態統計(確定数)の概況. <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei19/index.html> 2021/11/1 参照]. 心疾患による死亡の中で、最も死亡数の多い疾患は心不全である。心不全は、心臓に生じた何らかの器質的または機能的な異常により、心臓のポンプ機能不全を来した状態である。心不全をきたす疾患群の一つに、冠動脈疾患を原因とした虚血性心筋症がある。虚血性心筋症では、冠動脈の血流低下から左室リモデリングと呼ばれる収縮能低下と心内腔の拡大が認められる。心筋梗塞後の約20%に左室リモデリングが生じ、重度の左室リモデリングは死亡のリスク因子と考えられている(Gaudron et al., 1993; White et al., 1987)。虚血性心筋症に対する治療は、重症度に応じた内科的治療、外科的治療であるが、それらの治療に抵抗性の重症心不全患者に対する最終的な治療は現状心移植のみである。

### 本邦での心移植の現状

本邦での心移植の問題点は、移植までの待機期間が海外と比して著明に長いことである(日本心臓移植研究会. 心臓移植の現状 2020. <http://www.Jsht.jp/registry/japan/> 2021/11/1 参照)。そのため移植待機中は補助人工心臓を使用することが多いが、補助人工心臓による合併症や補助人工心臓を含めたあらゆる治療に抵抗性の心不全により、心移植へ辿り着けない症例も少なくない。また、心移植の適応年齢は「65歳未満」とされており、高齢者は心移植を受けられないのが現状である。そのため本邦においては、重症心不全患者に対する心移植以外の内科治療および外科治療の重要性が海外に比して高いと言える。

### 虚血性心筋症に対する左室形成術

高度に収縮能が低下した虚血性心筋症症例に対し、冠動脈バイパス術による血行再建が薬物療法単独と比して10年生存率を改善させると報告されて

いる (McMurray et al., 2012). 一方で, 広範囲の癒痕組織を有し高度の左室リモデリングを認める場合には, 冠動脈バイパス術単独では予後が不良であると考えられている.

心筋梗塞によって左室収縮能が低下すると, 左室一回拍出量および心拍出量が低下する. これを補うため, フランク-スターリングの機序により左室前負荷すなわち左室容積を増大し一回拍出量を保とうとするが, 病期の進行に伴って一回拍出量と無関係に左室は拡大してしまう (Gaudron et al., 1993; Kitamura et al., 1973). 一方左室容積の増大は, ラプラスの定理により左室壁応力の上昇を引き起こし, 心筋仕事量および心筋酸素需要量を増加させて相対的な心筋虚血を助長する. また, 心拍出量の低下は神経体液性因子の活性化を惹起し, それらが心筋の線維化や肥大を引き起こしてさらなる心収縮力の低下につながるということがわかっている. このように虚血性心筋症では, 左室リモデリングの増悪と, 心筋虚血および神経体液性因子活性化との悪循環が形成されている. このような病態に対して, 左室リモデリングの悪循環を断ち切ることを目的に左室形成術の適応が考慮される (図 1).

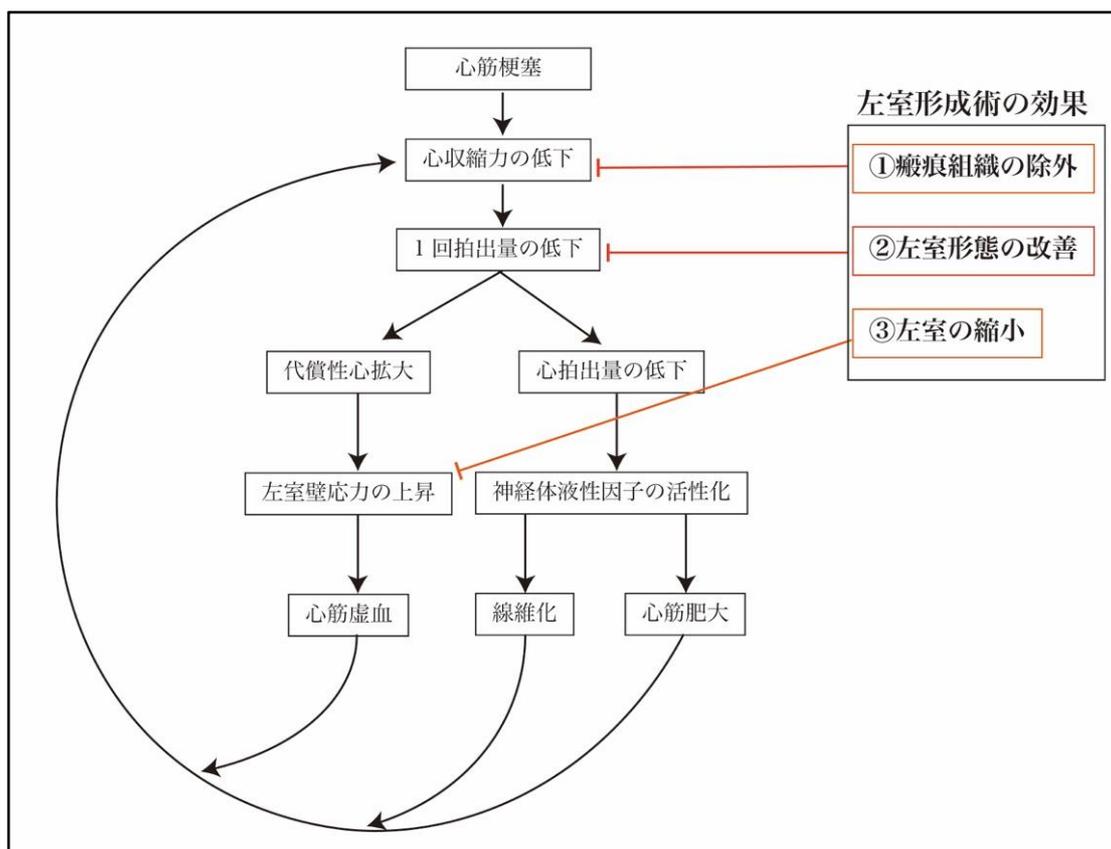


図 1. 左室リモデリングの悪循環における左室形成術の想定される作用

左室形成術の目的は、①癒痕組織の血行動態からの除外、②左室形態の改善、③拡大した左室の縮小により、左室リモデリングの悪循環を断ち切ることである(Matsui, 2009)。癒痕組織の血行動態からの除外とは、収縮能の低下した癒痕組織を切除あるいは正常心筋とオーバーラップさせることで左室駆出に携わる癒痕組織の割合を減らすことであり、心収縮能の改善が期待できる。左室形態の改善とは、心不全の進行に伴い駆出効率の悪い球状に変化した左室を、正常な円錐形に近づけることであり、一回拍出量の改善が期待できる。拡大した左室の縮小により、心筋壁応力を低下させ、相対的な心筋虚血の改善が期待できる。さらに、心拍出量を改善させることで、神経体液性因子の分泌抑制が期待できる。左室形成術による有効性は、いくつかの臨床試験でも確認されている(Athanasuleas et al., 2004; Menicanti et al., 2007)。現在の本邦のガイドラインでは、前壁癒痕組織を有する低左心機能例で、左室形成術後に収縮期容積係数が40~80 mL/m<sup>2</sup>となることを期待できる症例に対して、クラスIIaの推奨となっている(2018年改訂版 安定冠動脈疾患の血行再建ガイドライン)。

### 左室形成術の問題点

左室形成術の効果を検証した唯一の大規模臨床試験である Surgical Treatment for Ischemic Heart Failure (STICH) 試験では、冠動脈バイパス術単独群と、冠動脈バイパス術に左室形成術を併施した群の間に、心不全症状、運動耐容能、死亡率において有意差はなく、左室形成術の有効性は見出せなかったと結論付けられた(Jones et al., 2009)。同試験ではその研究デザインに多くの問題が指摘され、結果の信憑性に一定の疑義が生じたが、一方で本邦の重症心不全に対する外科治療症例を登録したレジストリデータベースを用いた解析においても、左室形成術の効果は限定的なものであった(Wakasa et al., 2018)。

左室形成術の問題点として、左室リモデリングの再発が挙げられる。左室形成術早期には左室径の縮小と収縮能の改善が得られるが、遠隔期には左室の再拡大と収縮能の低下が認められることが臨床研究および基礎研究で報告されている(Nishina et al., 2001; Nomoto et al., 2002; Shipulin et al., 2007)。我々は、STICH 試験において左室形成術の有効性が証明されなかった原因の一つとして、遠隔期の左室リモデリング再発に着目し、その機序や抑制方法が明らかとなれば、左室形成術の効果を最大化させ得るのではないかと考えた。左室リモデリングの再発機序はこれまでに明らかとなっていないが、Shipulin らの報告では、心筋の血管増生やミ

トコンドリアの量が影響を与えている可能性が示されている (Shipulin et al., 2007). 一方我々は, 左室形成術後の左室リモデリング再発機序について, 近年心疾患との関わりが報告されている「オートファジー」に注目して研究を行ってきた.

## オートファジー

オートファジーは, 細胞内における自食作用の一つであり, マクロオートファジー, ミクロオートファジー, シャペロン介在性オートファジーの3種類があるが, 最も研究が進んでいるマクロオートファジーのことを一般的にオートファジーと呼んでいる. 以下, 本研究におけるオートファジーとはマクロオートファジーのことを指すものとする. オートファジーの概要を図2に示す.

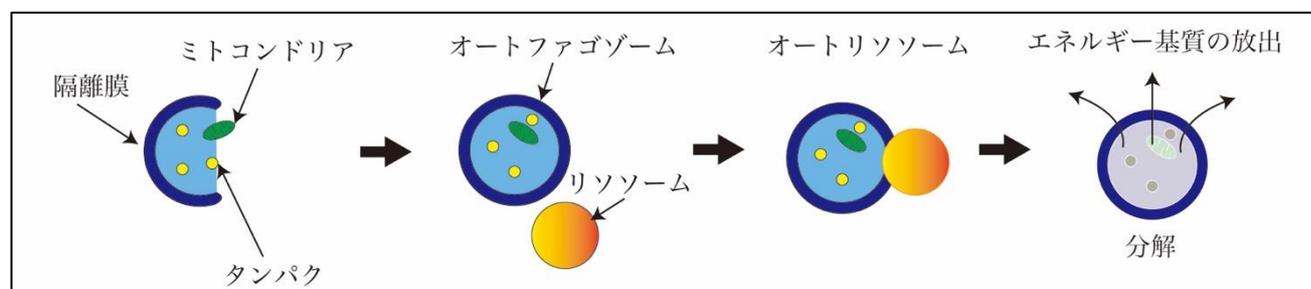


図2. オートファジーの概要

細胞内に異常または傷害された不要なタンパクやミトコンドリアが生じると, 細胞内に存在する隔離膜がそれらを取り込み, 二重膜のオートファゴゾームを形成する. オートファゴゾームが細胞内リソソームと融合しオートリソソームを形成し, 最終的に内容物が分解されて脂肪酸やアミノ酸などのエネルギー基質が供給される.

これまで, 神経細胞, 肝細胞, 心筋細胞などにおいてオートファジーの果たす役割が研究されてきた (DeBosch et al., 2016; Rusmini et al., 2019; Sciarretta et al., 2018). ハンチントン病やパーキンソン病においては, 神経細胞に沈着する異常タンパクがオートファジーにより分解されることが示された. また肝細胞においては, 脂肪肝の抑制などオートファジーが保護的に働くことが示されている.

心筋細胞では, 心筋梗塞などによる心機能低下とそれに伴う心室容積増大により左室壁応力が増大すると, ミトコンドリアなどの細胞小器官の障害や, 異常タンパクの蓄積をきたし (Nishida et al., 2015b), 障害されたミトコンドリアは, 活性酸素種の蓄積や細胞内の炎症を引き起こすことが

知られている(Nishida and Otsu, 2017; Nishida et al., 2015a). これらは心筋細胞障害や心筋細胞死, 心臓線維化を引き起こすが, この過程においてオートファジーは, 障害されたミトコンドリアや異常タンパクを除去することによって, 心機能を維持する働きをしていると考えられている. マウスにおいては, 急性心筋梗塞後におけるオートファジーの活性化が, 遠隔期の左室拡大や心機能障害, 心臓線維化を抑制することがわかっている(Sciarretta et al., 2018).

## ②何がわかっていて, 何がわかっていないのか

### 左室形成術後のリモデリング再発とオートファジー

我々はこれまで, ラットの虚血性心筋症に対する左室形成術後のオートファジーの変化を研究してきた. これまでの研究から, 左室形成術後早期には, 左室径の縮小とオートファゴソームマーカーの低下がみられ, 遠隔期の左室再拡大に伴ってオートファゴソームマーカーが再上昇することがわかっている(Sugimoto et al., 2020). さらに, 左室形成術後からオートファジー阻害剤を投与すると, 遠隔期のオートファジーマーカーは低値となり, 左室再拡大の程度が悪化することが示された. この結果よりオートファジーは, 虚血性心筋症に対する左室形成術後の左室リモデリングの再発を抑制する効果を持っている可能性が示され, オートファジーの活性化が左室リモデリングに与える影響について検討することとした. 現在オートファジー活性化剤として実験的に使用されている薬剤は副作用が強く臨床応用しにくいいため, 我々は, 副作用がほとんどないとされるオートファジー活性化作用を持つ天然の二糖類トレハロースに注目した.

### トレハロース

トレハロースは, 自然界に存在する二糖類の一種であり, 現在では食品添加物として広く使用されている物質である. さらに, トレハロースはオートファジーを活性化させることがわかっており, これまでの諸家の報告においてオートファジーを活性化させるために使用されている. トレハロースがオートファジーを活性化する機序は, 近年, EB 転写因子を介した経路であることが解明されつつある. さらに, 心筋梗塞後にトレハロースを投与した研究において, 心筋内においてもオートファジーの活性化作用を示すことが明らかとなっている(Sciarretta et al., 2018). 今回我々は, ラット虚

血性心筋症モデルに対する左室形成術後の心筋オートファジーの活性化を期待しトレハロースを使用することとした。

これまでの報告では，虚血性心筋症モデルにおける左室形成術後にトレハロースを使用した報告はなく，トレハロースが左室形成術後の左室リモデリングの再発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

本研究の目的は，ラット虚血性心筋症モデルに対する左室形成術後において，オートファジー活性化作用をもつトレハロースの投与が，左室リモデリングの再発に及ぼす影響を明らかにすることである。

# 方法

本研究では，左室形成術後にオートファジー活性化作用のあるトレハロースを投与することが，左室リモデリングに対して与える影響を明らかにすることを目的として，以下の仮説を立てて実験を行った．

**仮説：**ラット虚血性心筋症モデルに対する左室形成術後に，オートファジー活性化作用のあるトレハロースの投与が，左室リモデリングの再発を抑制する．

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動物実験使用指針に従い施行した．

## 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) を使用した。飼育環境は、温度 22.0~24.0 度、湿度 40%~60%、照明の明暗は 12 時間サイクル (7-19 時) とした。餌は MF (オリエンタル) を使用し、水分は自由飲水、個別換気ケージシステムを使用した。すべてのラットは、実験開始日の 1 週間前に北海道大学大学院医学研究院附属動物実験施設に輸送され管理された。

## 2. プロトコール

実験プロトコールを図 2 に示す。

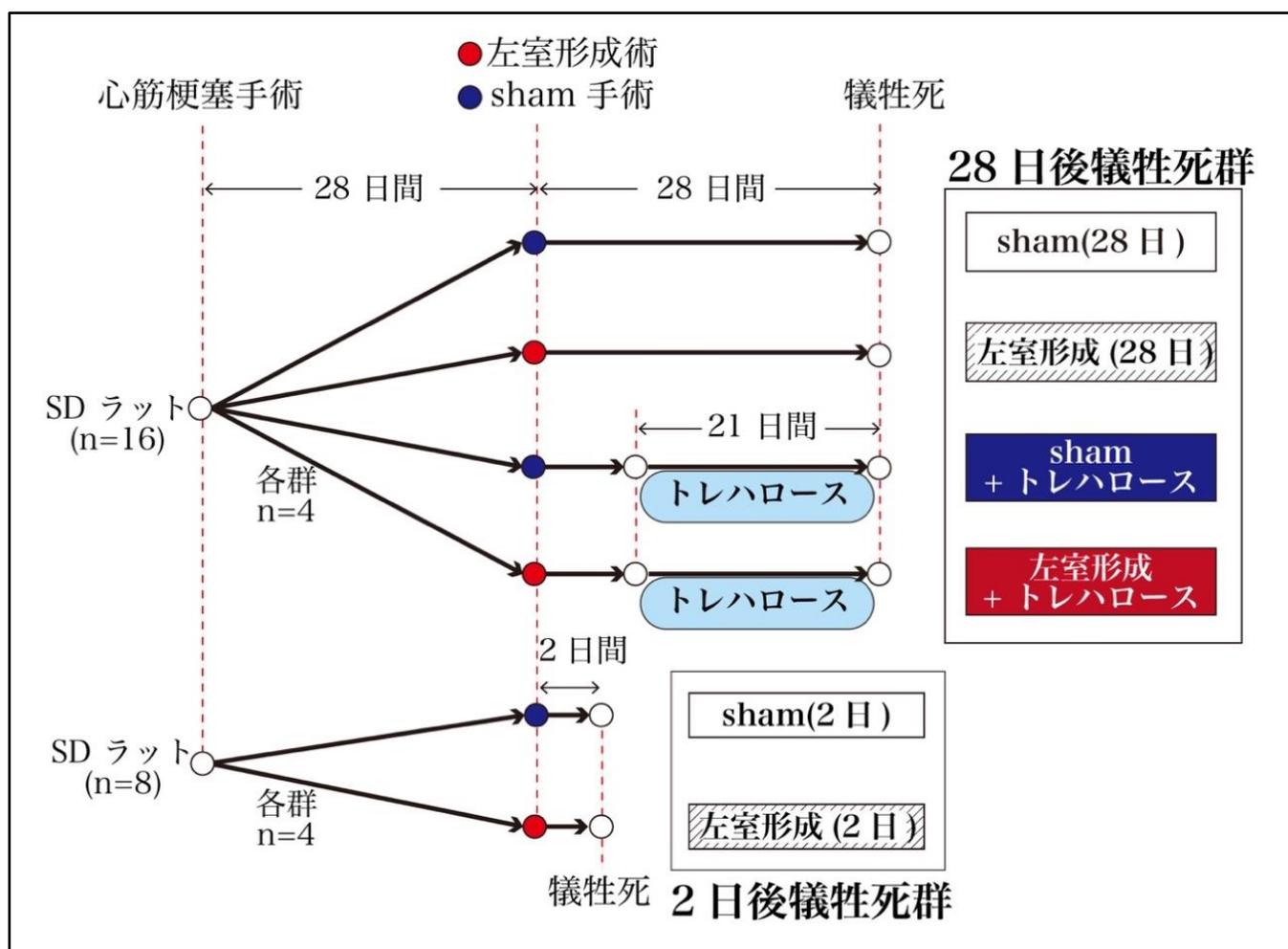


図 2. 実験プロトコール

SD : Sprague-Dawley.

全てのラットに心筋梗塞手術を行い、虚血性心筋症モデルを作成した。心筋梗塞手術から 28 日後に左室形成術または開胸操作のみの sham 手術 (擬似

手術)を行い，その後の犠牲死までの期間により 28 日後犠牲死群と 2 日後犠牲死群を設けた．28 日後犠牲死群は，トレハロース投与の有無により，sham(28 日)群(n=4)，左室形成術(28 日)群(n=4)，sham+トレハロース(28 日)群(n=4)，左室形成術+トレハロース(28 日)群(n=4)の 4 群に分けた．2 日後犠牲群は，左室形成術後早期の効果を確認することを目的とし，sham(2 日)群(n=4)，左室形成術(2 日)群(n=4)の 2 群に分けた．トレハロース群には左室形成術後あるいは sham 手術後 7 日目から，飲水ボトルをトレハロース水溶液へ変更し，自由摂取させた．食事の 10%まで無害であるという報告を参考に，トレハロースの濃度を 10%とした(Richards et al., 2002)．各手術直前および犠牲死直前に経胸壁心エコーによる心機能評価を行った．犠牲死後に心臓と肺を摘出し，それぞれの重量を測定した．左室心筋を速やかに液体窒素で凍結させて-80℃で保管し，後日ウェスタンブロッティングと reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)に使用した．また，心筋の一部は，3.5%ホルムアルデヒド含有中性緩衝ホルマリン液(武藤化学株式会社)に保存し組織検査に使用した．

### 3. 麻酔

各手術の開始前に，90mg/kg のケタミン(第一三共株式会社)，10mg/kg のキシラジン(バイエル)を大腿外側に筋注した．心筋梗塞手術，左室形成術および sham 手術では開胸操作が必要となるため，気管内挿管し換気量 3～5ml/回，呼吸回数 80 回/分で陽圧換気を行なった．

### 4. 心筋梗塞手術

図 3 に心筋梗塞手術のシェーマを示す．

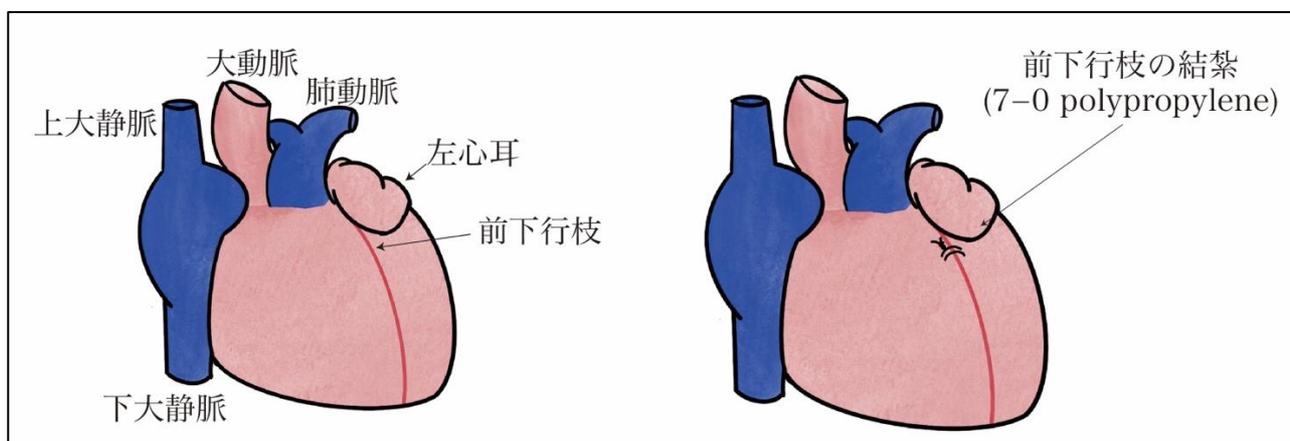


図 3. 心筋梗塞手術のシェーマ

麻酔導入後に，ラットを仰臥位で手術台に固定し，左第 5 肋間胸開を行った．左前下行枝は細いため視認できないが，心膜切開後，解剖学的に左前下行枝が走行している左心耳と肺動脈との間の心筋を縫合糸 (7-0 polypropylene, Ethicon) を用いて縫合結紮を行った．結紮後に左室前壁表面の色調変化の視認と，心エコー検査で左室前壁の無収縮を確認した．無収縮が認められない場合は，前下行枝の結紮を追加した．閉創したのち，自発呼吸を確認してから抜管しケージへ戻した．

## 5. 左室形成術

図 4 に左室形成術のシェーマを示す．

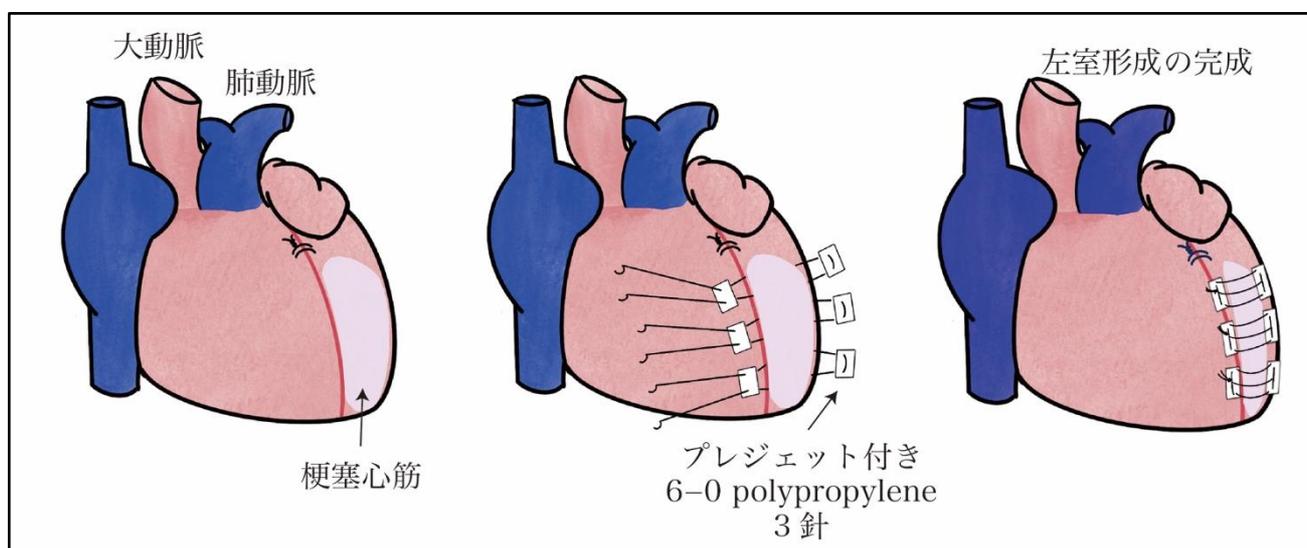


図 4. 左室形成術のシェーマ

麻酔薬投与後に，経胸壁心エコー検査で左室の拡大と収縮能低下から虚血性心筋症モデルが作成されていることを確認した．左室瘤形態および有意な僧帽弁逆流を認めるものは除外した．気管内挿管後，ラットを仰臥位で手術台に固定し，まず，内胸動脈からの出血を予防するために第 4，第 6 肋間で内胸動脈を結紮した．第 5 肋間レベルで胸骨横切開し心臓に到達した．左室前壁に白色で収縮能の低下した瘢痕組織を確認した．瘢痕組織周囲の正常心筋に針が出るようにプレジェット付き縫合糸 (6-0 polypropylene, Ethicon) を用いて，3 対のマットレス縫合で縫い縮めた．さらに，同じ縫合糸を用いた over & over 連続縫合で瘢痕組織を完全に排除した．

sham 手術では，同様の手順で胸骨横切開し心臓に到達後，直ちに閉創した．術後は，自発呼吸を確認した後に抜管し，ケージへ戻した．

## 6. 犠牲死

経胸壁心エコー検査で心機能評価を行なった後に、150 mg/kg のペントバルビタールナトリウム(ナカライテク)を腹腔内投与した。痛み刺激に対する反応が完全に消失したことを確認し、腹部横切開し、腹部正中から胸部正中を胸骨上端まで切り上げて、心臓と肺を摘出した。冷水の中で余剰組織を切除し、全心臓重量、心房を取り除いた心室重量、肺重量を測定した。心室を乳頭筋レベルで横切開し、心基部側を3.5%ホルムアルデヒド含有中性緩衝ホルマリン液(武藤化学株式会社)で保存し、心尖部側は、癒痕組織を除去した上で速やかに液体窒素にて凍結させ-80℃で保管した。

## 7. 経胸壁心エコー検査

経胸壁心エコー検査は、各手術の直前に実施した。麻酔薬投与後に、温熱板(37度)上で仰臥位にして実施した。エコー機器はSONOS5500、プローブはPediatric Sector Probe 12-MHz(Philips Medical Systems)を使用した。

全ての手術時にM-モード法にて、以下を測定した。

- ・左室拡張末期径(mm)
- ・左室収縮末期径(mm)
- ・左室短縮率(%)

左室形成術および犠牲死時にパルスドプラー法にて、以下を測定した。

- ・一回拍出量(ml) = 左室流出路面積 × 単位面積あたりの通過血流量
- ・心拍出量(ml/min) = 一回拍出量 × 心拍数
- ・E波(拡張早期波)(cm/s)
- ・E波の減速時間(ms)

拡張機能障害が軽度の場合に正常よりもE波は小さく、減速時間は大きくなり、高度の場合にE波が大きく、減速時間は小さくなるとされている。A波(心房波)はE波との癒合により測定困難であった。

左室形成術時のみ、B-モード法(乳頭筋レベル左室単軸像)にて、以下を測定した。

- ・左室癒痕比率(%) = 癒痕組織の円周 / 左室全体の円周

全ての項目は、3回ずつ測定してその平均値を採用した。

## 8. ウェスタンブロッティング

図5にオートファジーフラックスと関連タンパクの概要を示す。

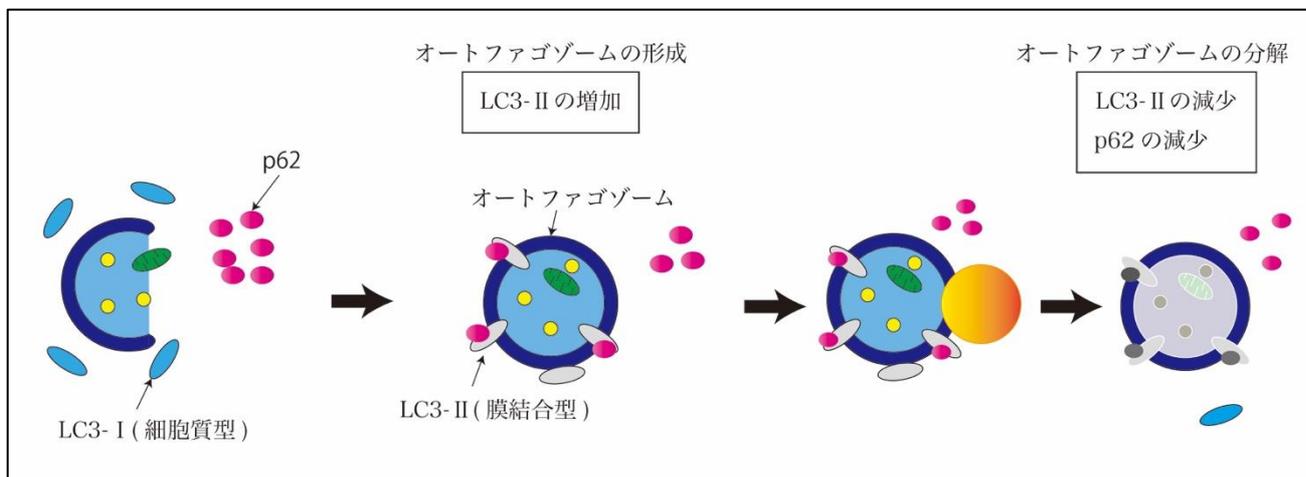


図5. オートファジーフラックスと関連タンパク

LC3-II, microtubule-associated light chain 3; p62, p62/SQSTM1.

オートファジーフラックスとは、細胞質内の不要なタンパクやミトコンドリアなどを細胞質内の隔離膜が取り込み、二重膜のオートファゴゾームを形成し、リソソームと結合して最終的にこれらを分解する動的な一連の流れであり、オートファジーフラックスが亢進した場合に、オートファジーの活性化という。本研究では、オートファジーフラックスの状態を推定するために、オートファジーマーカーである microtubule-associated light chain 3-II (LC3-II) と p62/SQSTM1 (p62) のタンパク発現をウェスタンブロッティングで測定した。

オートファゴゾームが形成される際に、LC3-I (細胞質型) がオートファゴゾームの外膜に引き込まれることで LC3-II (脂質化細胞膜結合型) に変換される。LC3-II は、オートファゴゾームが形成されると増加し、分解されると減少するため、LC3-II の増加は、オートファジーフラックスの亢進に伴うオートファゴゾームの形成増加か、オートファジーフラックスの下流阻害、すなわちオートファゴゾームの分解阻害を意味する。したがって、LC3-II の増減はオートファゴゾームの形成と分解のバランスに規定されることになり、LC3-II 単独でのオートファジーフラックスの評価は困難である。そこで本研究では、オートファゴゾームの分解の程度を確認するために、LC3-II に特異的に結合して分解される p62 も測定することとした。

p62 の減少は，オートファゴゾーム分解の亢進を示すため，LC3-II と同時に評価することでオートファジーフラックスの状態を推定することができると考えられている．

電気泳動とブロッティングは，セミドライ式ウェスタンブロッティング装置 (Mini-PROTEAN Tetra Cell ; Bio-Rad) を用いて行った．ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (12% Mini-PROTEANTGX ; Bio-Rad) の後に，タンパクをポリビニデンジフルオリド膜にブロットした．ブロッティングには blocking agent (Cytiva) を用いた．一次抗体は Anti-LC3B (abcam) , anti-p62 (Cell Signaling Technology) を使用し，二次抗体は Anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology) を使用し，detection reagent (Cytiva) を膜に反応させて化学発光させた．バンド強度は JustTLC (Sweday) を用いて定量した．ナフトールブルーブラック (Wako) 溶液染色を用いてバンド強度の補正を行なった．

## 9. 組織学的検査

3.5%ホルムアルデヒド含有中性緩衝ホルマリン液 (武藤化学株式会社) で固定した心筋を，パラフィン包埋し，単軸方向に 5mm 厚で切り出し，心室中部レベルで組織学的検査を行なった．

心筋肥大の評価は，ヘマトキシリン-エオジン染色標本で行った．梗塞範囲から離れた中隔組織 (remote area) の中で，無作為に 10 視野を抽出し，続いて 1 視野につき約 10 個の核を伴った円形または卵円形の心筋細胞を選択した．Image J software (NIH) を用いて選択された約 100 個の心筋細胞の面積を測定し，その平均値を採用した．心筋線維化の評価は，マッソン・トリクローム染色標本で行なった．remote area から無作為に 10 視野を抽出し，各視野で Image J software (NIH) を用いて線維化率 (%) (コラーゲン線維面積 / 全組織面積) を算出し，その平均値を採用した．

## 10. RT-PCR

病的心筋肥大のマーカーを調べるために，犠牲死後に採取し凍結保存した心筋から， $\alpha$ -myosin heavy chain (MHC) ,  $\beta$  MHC , brain natriuretic peptide (BNP) ,  $\alpha$ -skeletal actin (SA) の遺伝子発現を real-time RT-PCR を用いて評価した．心筋の全 ribonucleic acid (RNA) は，凍結検体を用いてハイピュア RNA キット (Roche) にて抽出した．全 RNA は Transcriptor First Strand c-deoxyribonucleic acid

(DNA) Synthesis Kit (Roche)を用いてcDNAへ逆転写した。Real time RT-PCRはFastStart Essential DNA Probes Master (Roche)および, RealTime ready assay (Roche Assay ID, 501294 [ $\alpha$ MHC]; 500524 [ $\beta$ MHC], 501006 [BNP], 506347 [ $\alpha$ SA])を用いた。ポリメラーゼ連鎖反応増幅には, LightCycler Nano (Roche)を使用した。遺伝子発現量は, 各グループ間で同等であったハウスキーピング遺伝子である S29 で補正した。

## 11. 統計解析

すべての連続変数は平均±標準誤差で表記した。4群間の比較では one-way analysis of variance で検定し, 事後解析として Tukey-Kramer 検定で群間差を明らかにした。2群間の検定は, Student's t 検定を, 対応のある2群間の検定は, paired t 検定を用いて行った。サンプルサイズは, これまでの当教室で行った同モデルにおける左室収縮末期径の値を用いて, 有意水準を 0.05, 検出力を 0.80 に設定し, G POWER 3.1.9.3 (Heinrich Heine Universität Dusseldorf)を用いて決定した。統計解析には JMP pro version 15.0 (SAS Institute Inc.)を用いた。

# 結果

## 1. 経胸壁心エコー検査

表 1, 表 2 に心筋梗塞手術時の経胸壁心エコーの結果を示す. 心筋梗塞手術時において, 左室径, 左室短縮率ともに群間差を認めなかった.

表 1. 2 日後犠牲死群の心筋梗塞手術時の心機能

	2 日後犠牲死群		P 値
	sham 群 (n = 4)	SVR 群 (n = 4)	
BW, g	333 ± 10	342 ± 7	0.88
LVEDD, mm	7.7 ± 0.1	7.9 ± 0.1	0.81
LVESV, mm	4.4 ± 0.2	4.9 ± 0.2	0.89
FS, %	43 ± 2	37 ± 2	0.74

数値は平均値 ± 標準誤差 ; BW, 体重 ; FS, 短縮率 ; LVEDD, 左室拡張末期径 ; LVESD, 左室収縮末期径 ; SVR, 左室形成術.

表 2. 28 日後犠牲死群の心筋梗塞手術時の心機能

	28 日後犠牲死群				P 値
	sham 群 (n = 4)	SVR 群 (n = 4)	sham+Tre 群 (n = 4)	SVR+Tre 群 (n = 4)	
BW, g	358 ± 12	350 ± 4	350 ± 11	345 ± 3	0.78
LVEDD, mm	8.0 ± 0.4	7.5 ± 0.1	7.4 ± 0.6	7.7 ± 0.1	0.52
LVESD, mm	5.0 ± 0.4	4.6 ± 0.5	4.2 ± 0.3	4.5 ± 0.2	0.53
FS, %	42 ± 6	40 ± 6	43 ± 2	42 ± 2	0.94

数値は平均値 ± 標準誤差 ; BW, 体重 ; FS, 短縮率 ; LVEDD, 左室拡張末期径 ; LVESD, 左室収縮末期径 ; SVR, 左室形成術 ; Tre, トレハロース.

表 3, 表 4 に左室形成術時の経胸壁心エコーによる心機能パラメータを示す. 2 日後犠牲死群と 28 日後犠牲死群ともに, 心機能パラメータは群間差を認めなかった. 左室前壁に無収縮で菲薄化した心筋梗塞後瘢痕組織 (瘢痕化率 32% ± 1%) を認め, 心筋梗塞手術時と比して左室が大きく (10.3 ± 0.7 vs. 7.6 ± 0.1 mm,  $P < 0.01$ ), 左室短縮率が小さい (19% ± 1% vs. 42% ± 1%,  $P < 0.001$ ) ことから, 心筋梗塞による左室リモデリングの発生を確認した.

表 3. 2 日後犠牲死群の左室形成術時の心機能

	2 日後犠牲死群		P 値
	sham 群 (n = 4)	SVR 群 (n = 4)	
BW, g	446 ± 17	418 ± 17	0.30
scar ratio, %	32 ± 3	29 ± 2	0.51
LVEDD, mm	10.9 ± 0.3	10.7 ± 0.5	0.76
LVEDS, mm	9.1 ± 0.6	8.5 ± 0.7	0.48
FS, %	16 ± 4	22 ± 4	0.34
E wave, cm/s	108 ± 10	97 ± 7	0.41
E wave DCT, ms	48 ± 2	48 ± 2	0.85
CO, ml/min	76 ± 8	88 ± 7	0.31
SV, ml/beat	0.29 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.29

数値は平均値 ± 標準誤差 ; BW, 体重 ; CO, 心拍出量 ; DCT, 減速時間 ; FS, 短縮率 ; LVEDD, 左室拡張末期径 ; LVEDS, 左室収縮末期径 ; SV, 一回拍出量 ; SVR, 左室形成術.

表 4. 28 日後犠牲死群の左室形成術時の心機能

	28 日後犠牲死群				P 値
	sham 群 (n = 4)	SVR 群 (n = 4)	sham+Tre 群 (n = 4)	SVR+Tre 群 (n = 4)	
BW, g	440 ± 16	433 ± 17	423 ± 31	452 ± 7	0.76
scar ratio, %	31 ± 2	36 ± 1	29 ± 2	33 ± 3	0.19
LVEDD, mm	10.3 ± 0.1	10.0 ± 0.3	10.7 ± 0.4	9.7 ± 0.2	0.14
LVEDS, mm	8.6 ± 0.4	8.2 ± 0.6	8.9 ± 0.4	7.6 ± 0.5	0.30
FS, %	18 ± 4	18 ± 4	17 ± 1	22 ± 4	0.70
E wave, cm/s	118 ± 8	97 ± 7	98 ± 14	102 ± 7	0.43
E wave DCT, ms	43 ± 5	49 ± 7	58 ± 9	46 ± 6	0.47
CO, ml/min	79 ± 5	73 ± 2	92 ± 13	91 ± 16	0.47
SV, ml/beat	0.29 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.34 ± 0.05	0.34 ± 0.06	0.23

数値は平均値 ± 標準誤差 ; BW, 体重 ; CO, 心拍出量 ; DCT, 減速時間 ; FS, 短縮率 ; LVEDD, 左室拡張末期径 ; LVEDS, 左室収縮末期径 ; SV, 一回拍出量 ; SVR, 左室形成術 ; Tre, トレハロース.

図 6 に犠牲死時の左室長軸像での M-mode 法の代表的写真を提示する。

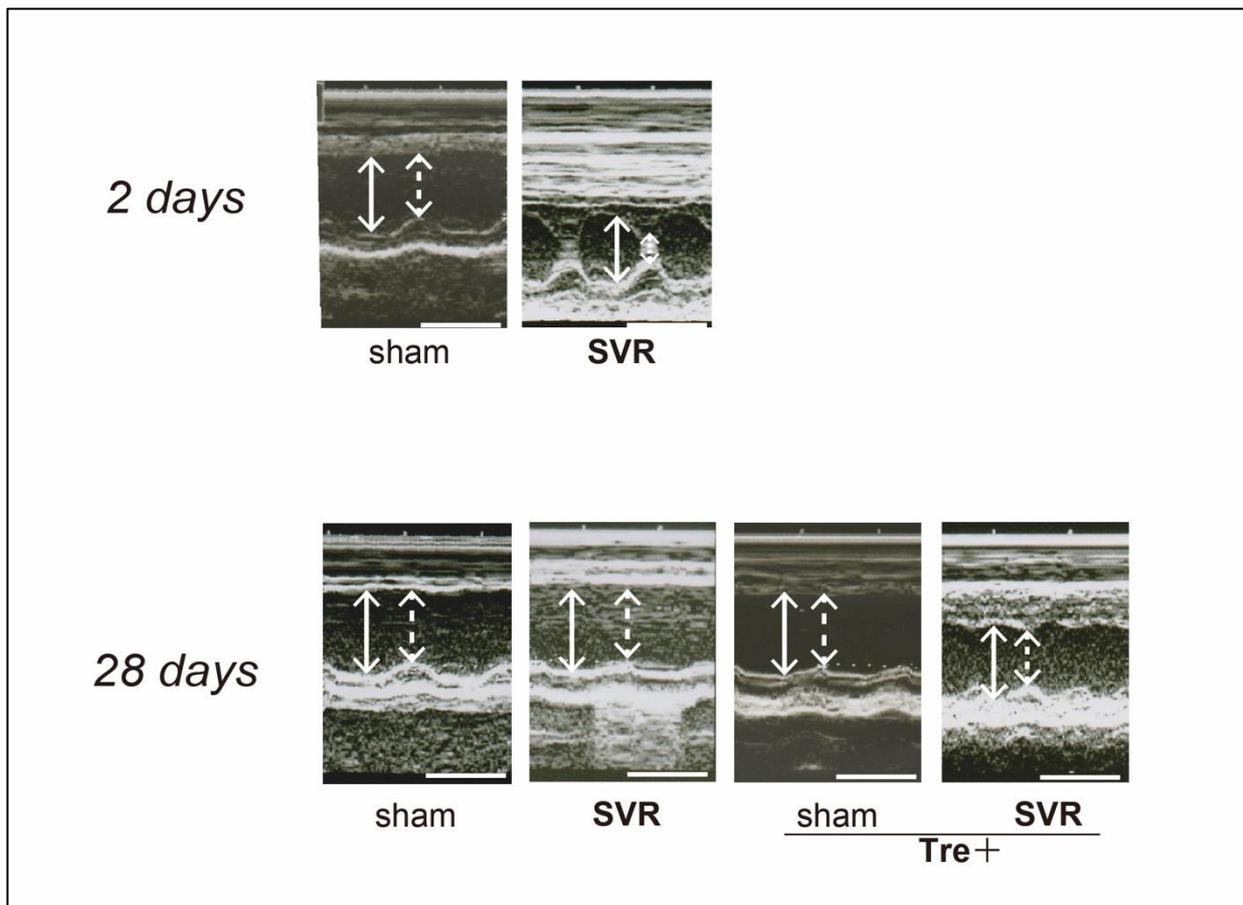


図 6. 犠牲死時の左室拡張末期径

実線矢印は左室拡張末期径；点線矢印は左室収縮末期径；横棒線は0.2秒；SVR，左室形成術；Tre，トレハロース。

図 7 に犠牲死時の左室拡張末期径を示す。左室形成術(2 日)群では, sham(2 日)群と比して小さいが, 左室形成術(28 日)群では, sham(28 日)群と同程度であった。一方, 左室形成術+トレハロース(28 日)群では, 左室形成術(2 日)群より大きい, 左室形成術(28 日)群より小さかった。sham+トレハロース(28 日)群では, sham(28 日)群と同程度であった。

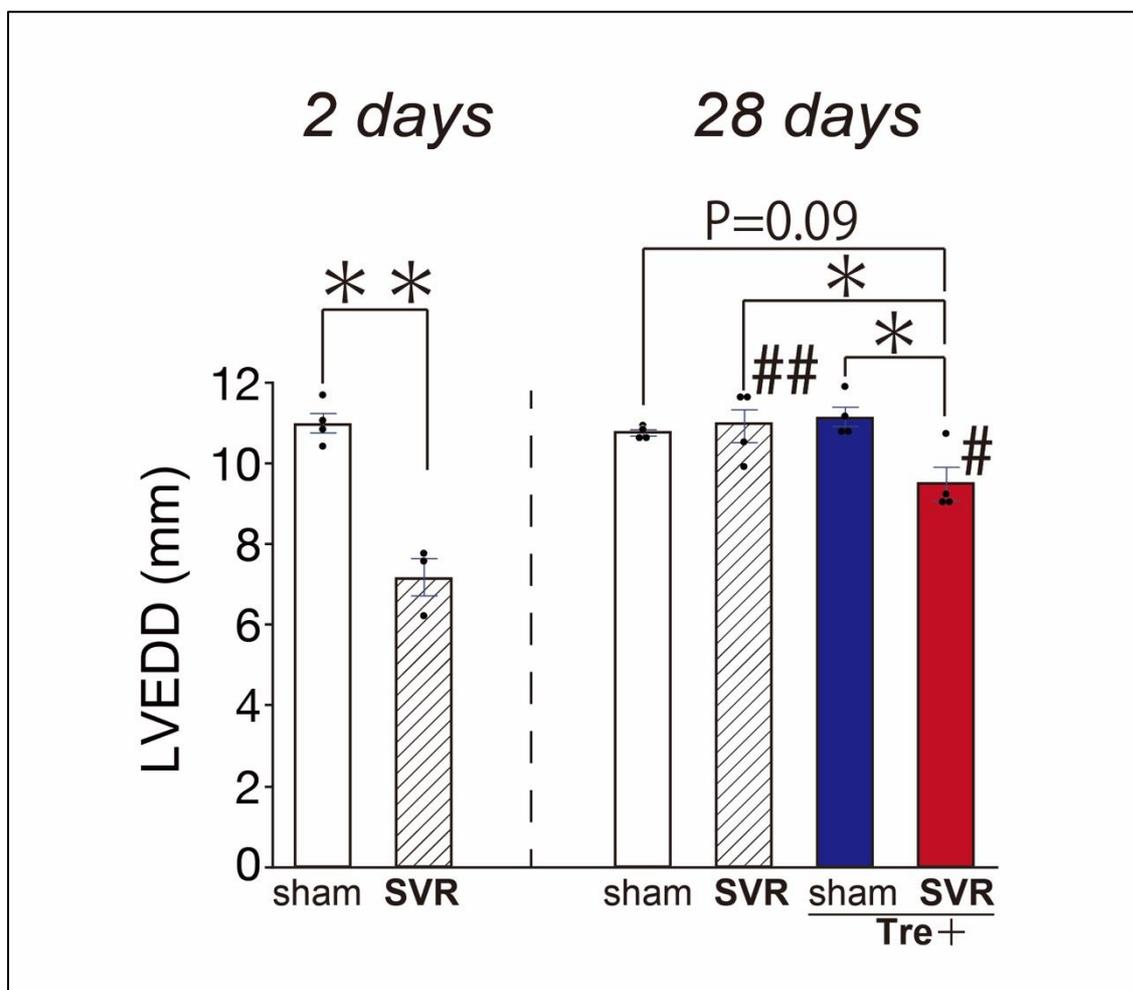


図 7. 犠牲死時の左室拡張末期径

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  対左室形成術(2 日)群; LVEDD, 左室拡張末期径; SVR, 左室形成術; Tre, トレハロース.

図 8 に犠牲死時の左室収縮末期径を示す。左室形成術(2 日)群では, sham(2 日)群と比して小さいが, 左室形成術(28 日)群では, sham(28 日)群と同程度であった。一方, 左室形成術+トレハロース(28 日)群では, 左室形成術(28 日)群より小さく, 左室形成術(2 日)群と同程度であった。sham+トレハロース(28 日)群では, sham(28 日)群と同程度であった。

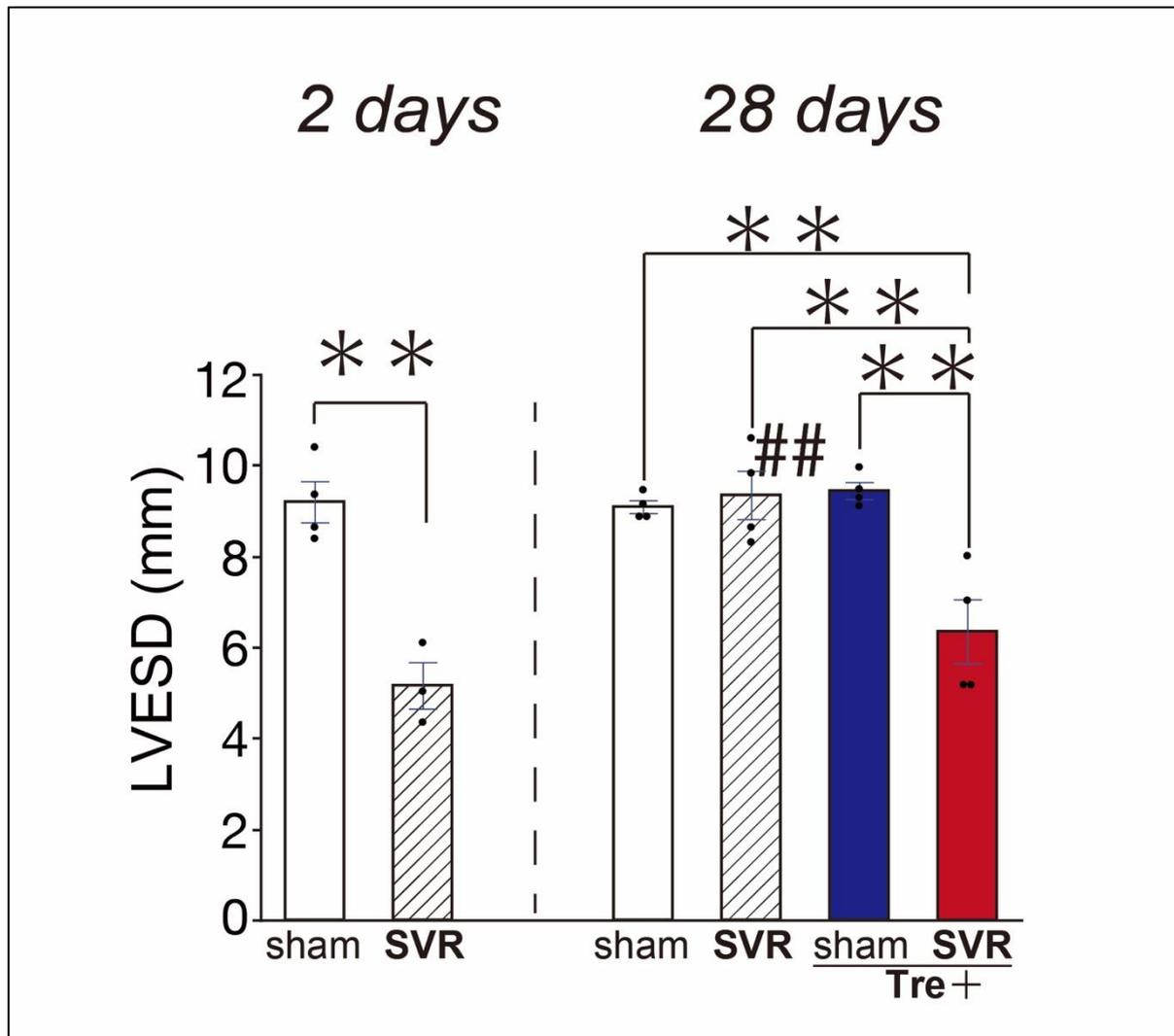


図 8. 犠牲死時の左室収縮末期径

\*\*P < 0.01; ##P < 0.01 対左室形成術(2 日)群; LVESD, 左室拡張末期径; SVR, 左室形成術; Tre, トレハロース。

図 9 に犠牲死時の左室短縮率を示す。左室形成術(2 日)群では, sham(2 日)群よりも大きい, 左室形成術(28 日)群では, sham(28 日)群と同程度であった。一方, 左室形成術+トレハロース(28 日)群では, 左室形成術(2 日)群と同程度であった。sham+トレハロース(28 日)群では, sham(28 日)群と同程度であった。

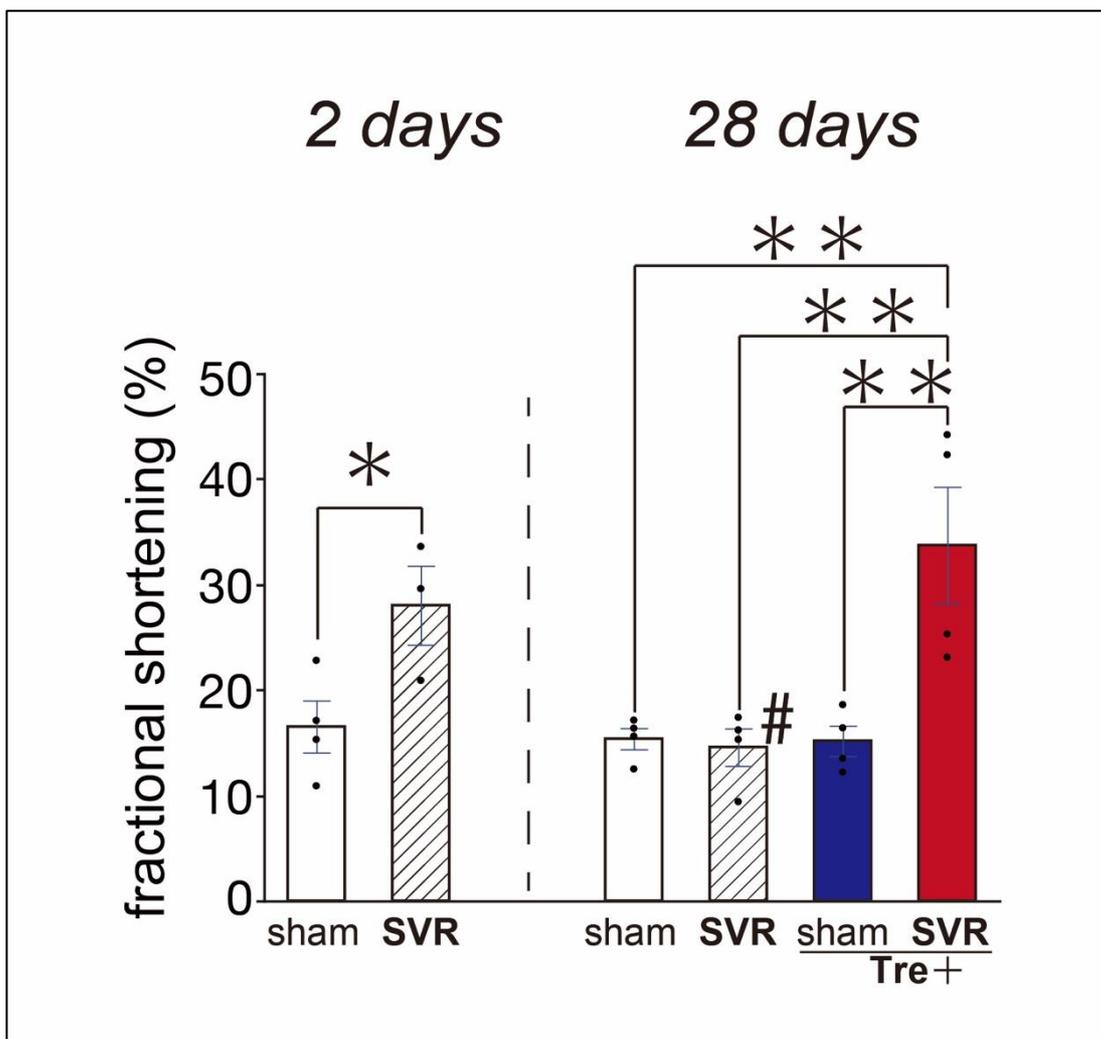


図 9. 犠牲死時の左室短縮率

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01; SVR, 左室形成術; Tre, トレハロース.

以上の結果より, 左室形成術後では, sham 手術後と比して, 術後早期には左室径は小さく左室収縮能は高いが, 遠隔期では同程度となることが示され, 本研究のモデルにおいても, 左室形成術後遠隔期の左室リモデリング再発が示された。これに対して, 左室形成術後のトレハロース投与は, 遠隔期の左室リモデリング再発の程度を抑制することが示された。

図 10 に犠牲死時の心拍出量を示す．左室形成術(2 日)群では，sham(2 日)群と同程度であった．左室形成術+トレハロース(28 日)群では，左室形成術(28 日)群よりも心拍出量は大きかった．

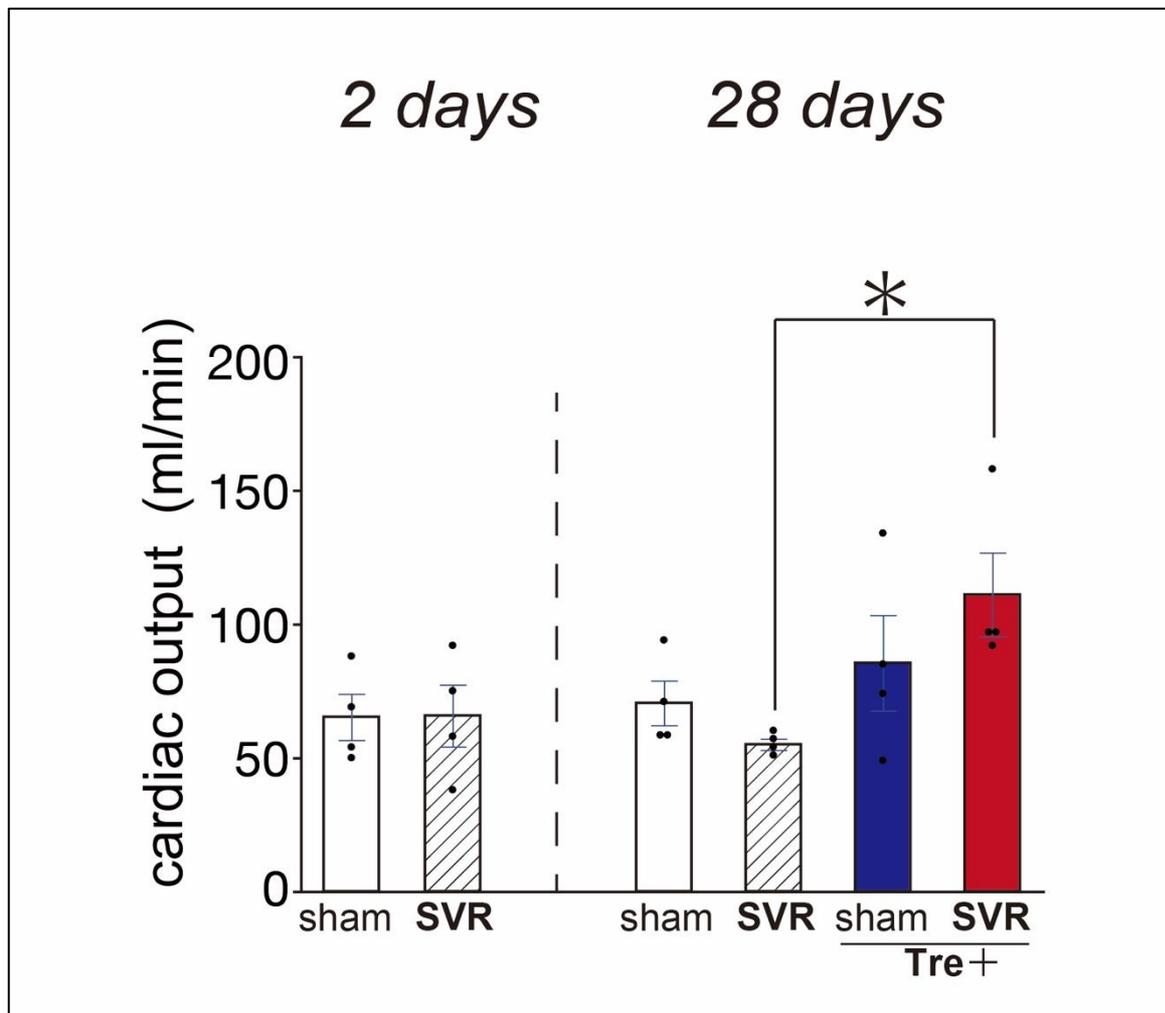


図 10. 犠牲死時の心拍出量

\*P < 0.05 ; SVR, 左室形成術 ; Tre, トレハロース.

図 11 に犠牲死時の一回拍出量を示す．一回拍出量は，全ての群において有意差を認めなかった．

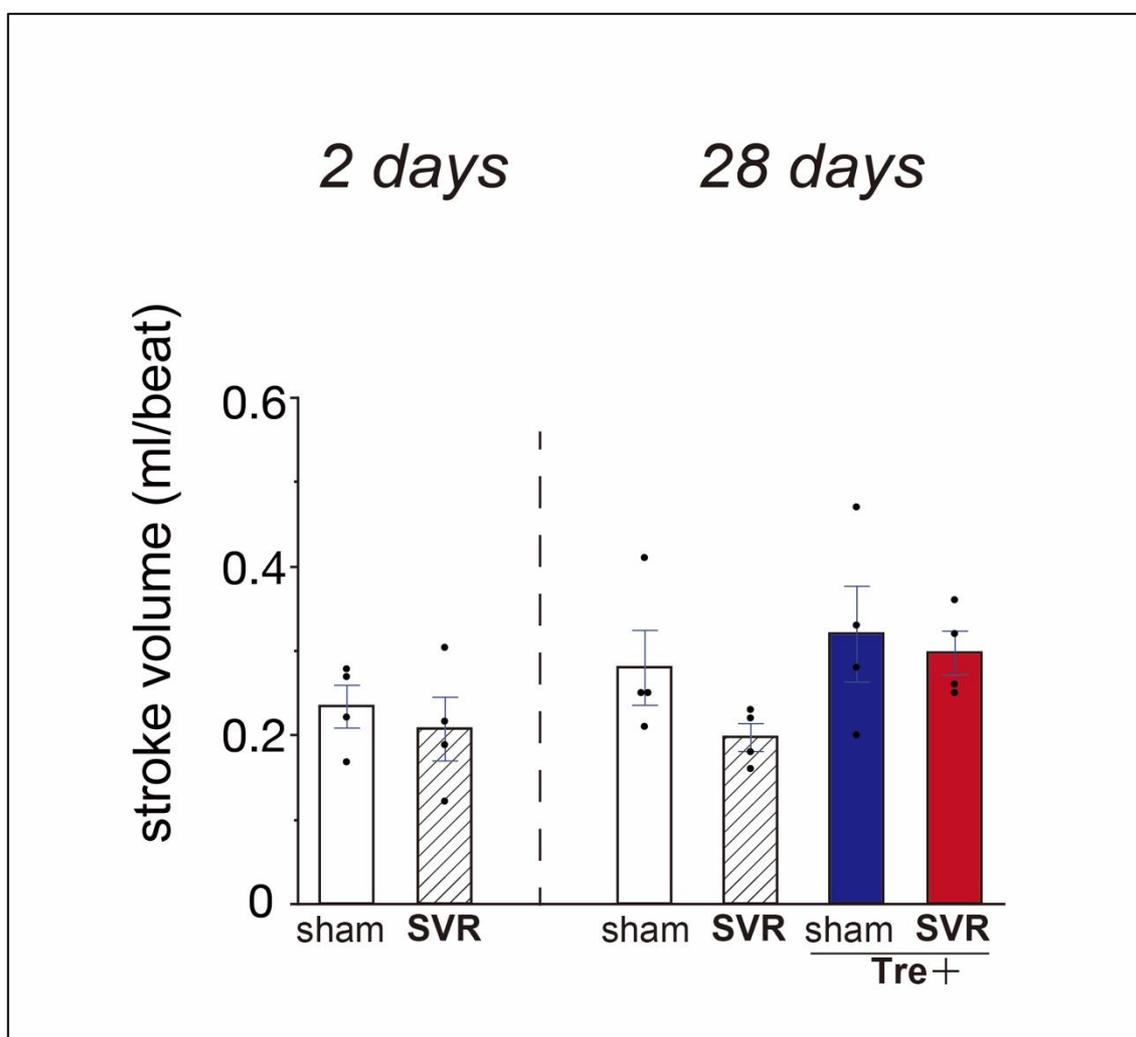


図 11. 犠牲死時の一回拍出量  
SVR, 左室形成術 ; Tre, トレハロース.

図 12 に犠牲死時の心拍数を示す。28 日後の心拍数は，左室形成術+トレハロース (28 日) 群において他の 3 群よりも大きかった。

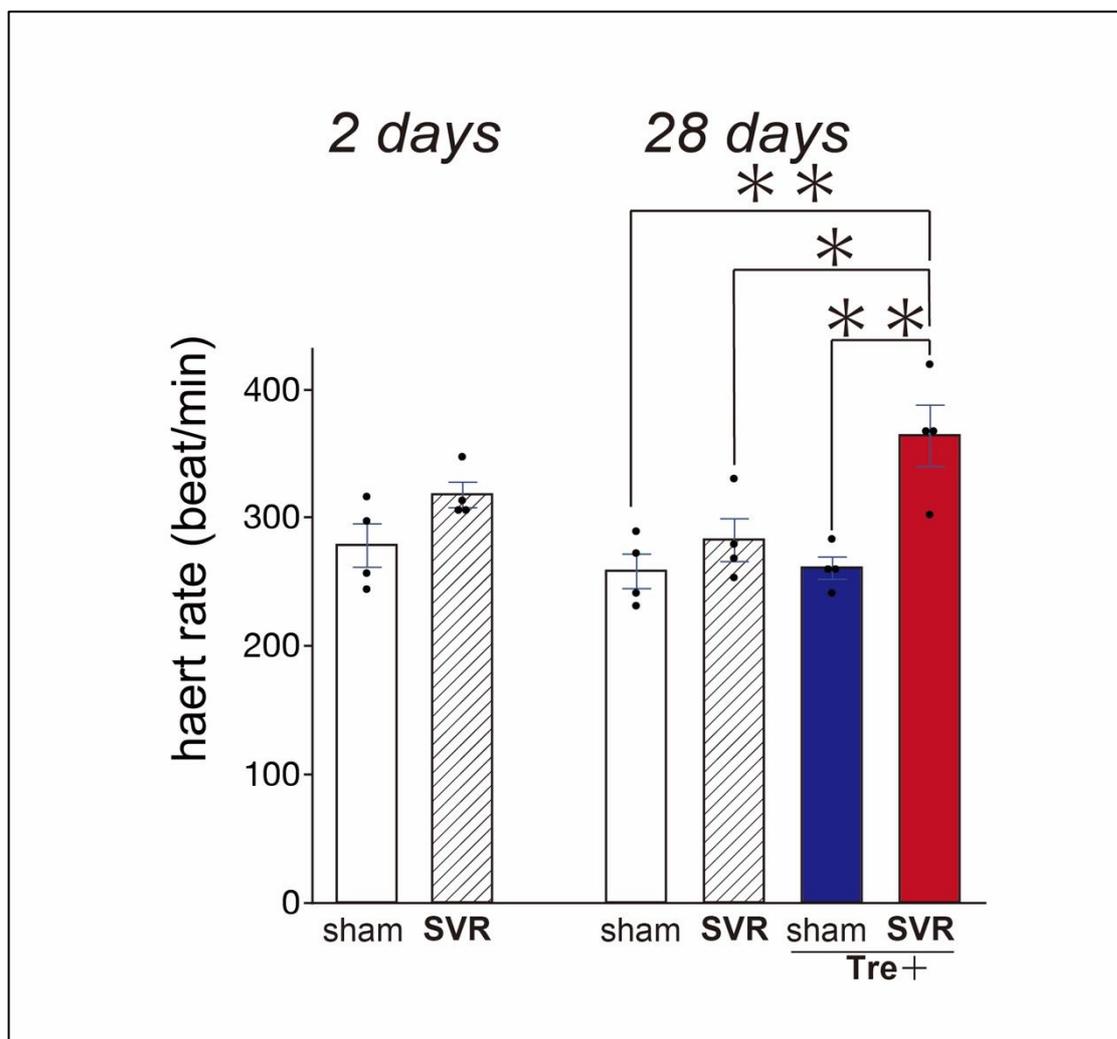


図 12. 犠牲死時の心拍数

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01; SVR, 左室形成術; Tre, トレハロース.

左室形成術+トレハロース (28 日) 群の心拍出量は，一回拍出量が他の群と変わらないことから，心拍数の影響を受けている可能性が考えられた。

図 13 に犠牲死時の E 波 (左室流入血流の早期波) を示す. 左室形成術 (28 日) 群では, 左室形成術 (2 日) 群より大きかった. 左室形成術+トレハロース (28 日) 群では, 左室形成術 (2 日) 群と比して差を認めなかった.

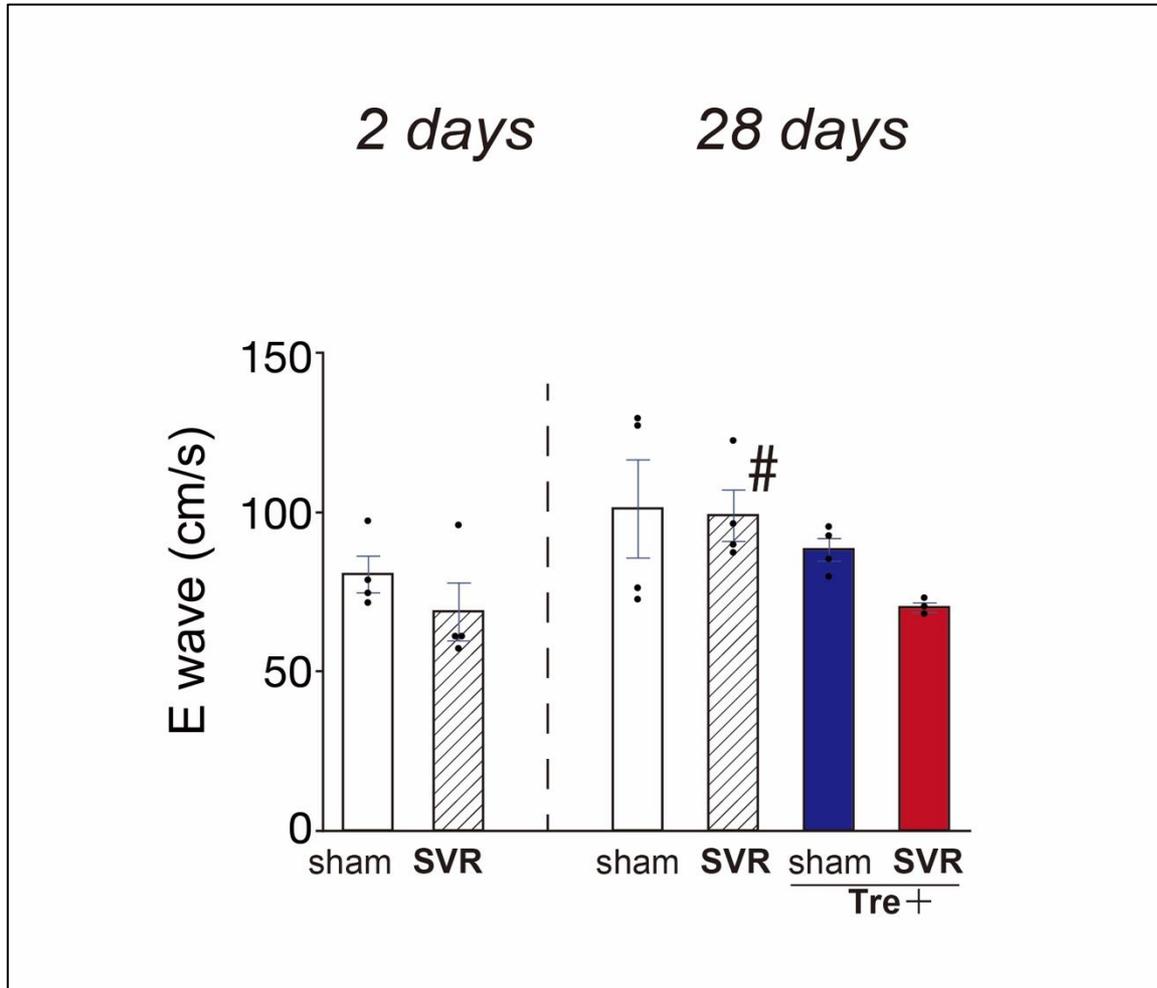


図 13. 犠牲死時の E 波 (左室流入血流の早期波)

#P < 0.05 対左室形成術 (2 日) 群 ; SVR, 左室形成術 ; Tre, トレハロース.

図 14 に犠牲死時の E 波の減速時間を示す。E 波の減速時間は、全ての群において有意差を認めなかった。

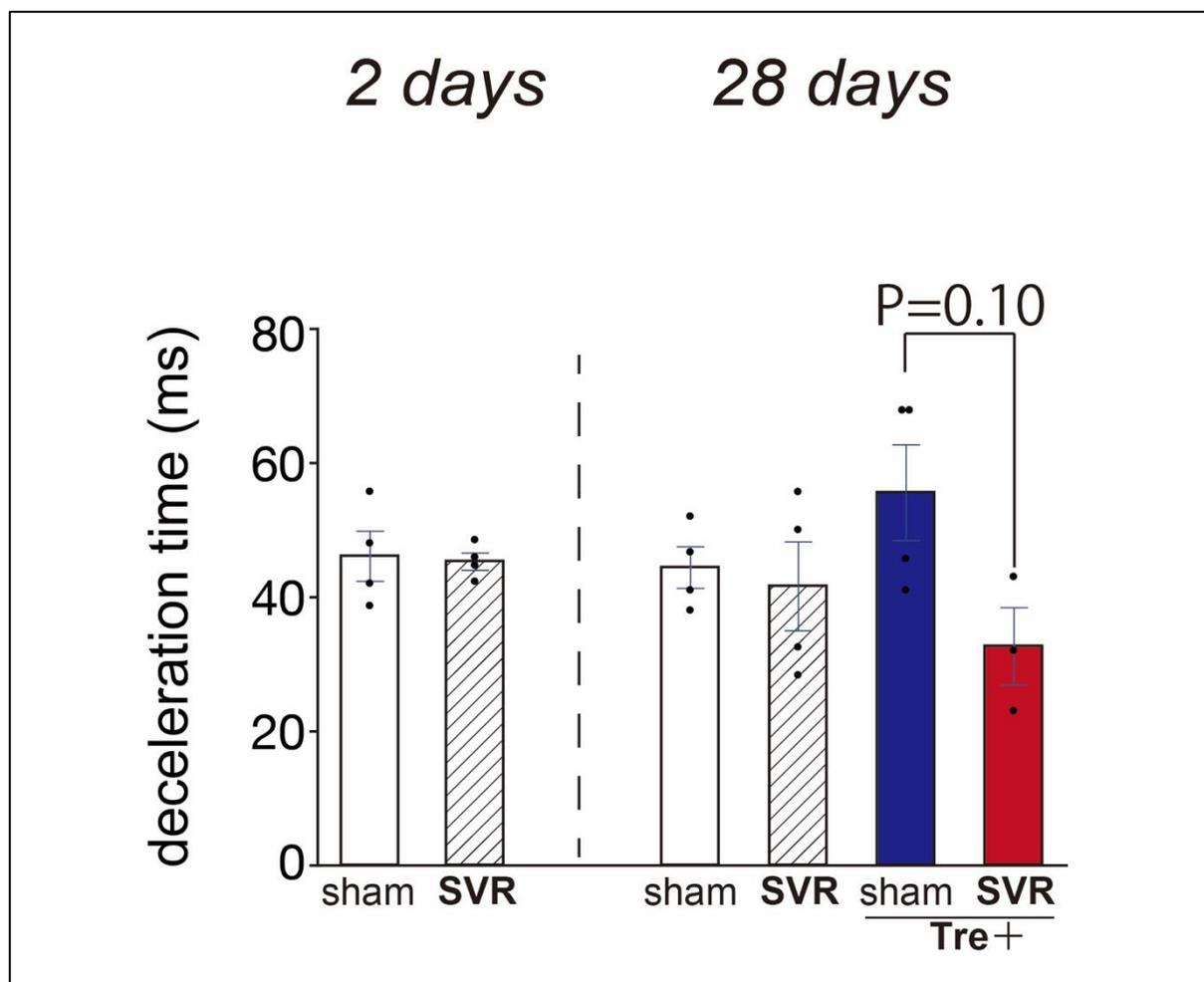


図 14. 犠牲死時の E 波の減速時間

SVR, 左室形成術 ; Tre, トレハロース.

今回測定した拡張能を反映するパラメーターである E 波および E 波の減速時間において、左室形成術による変化は認めなかった。

## 2. 肺と心臓重量

表 5, 表 6 に犠牲死後に採取した肺と心臓の重量を示した. 全心臓重量は, 左室形成術時にプレジェットを使用しているため, 比較することができなかった. 左室形成術(2 日)群の体重は, sham(2 日)群と比して小さかったが, 肺重量には有意差がなく, 手術侵襲により経口摂取が不良であった可能性が考えられた. 28 日後犠牲死群においては, 各重量に群間差を認めなかった.

表 5. 2 日後犠牲死群の肺と心臓重量

	2 日後犠牲死群		P 値
	sham 群 (n = 4)	SVR 群 (n = 4)	
BW, g	423 ± 15	368 ± 17	0.049
LW, mg	2034 ± 126	1630 ± 114	0.85
AW, mg	315 ± 56	277 ± 60	0.91
LW/BW, mg/g	4.8 ± 0.2	4.3 ± 0.4	0.88
AW/BW, mg/g	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.89

数値は平均値 ± 標準誤差 ; AW, 心房重量 ; BW, 体重 ; LW, 肺重量 ; SVR, 左室形成術.

表 6. 28 日後犠牲死群の肺と心臓重量

	28 日後犠牲死群				P 値
	sham 群 (n = 4)	SVR 群 (n = 4)	sham+Tre 群 (n = 4)	SVR+Tre 群 (n = 4)	
BW, g	485 ± 17	453 ± 22	483 ± 21	473 ± 10	0.59
LW, mg	3093 ± 648	3286 ± 196	2740 ± 429	3155 ± 724	0.90
AW, mg	609 ± 202	389 ± 77	331 ± 39	261 ± 21	0.19
LW/BW, mg/g	6.3 ± 1.3	7.3 ± 0.4	5.8 ± 1.1	6.8 ± 1.7	0.85
AW/BW, mg/g	1.2 ± 0.4	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.23

数値は平均値 ± 標準誤差 ; AW, 心房重量 ; BW, 体重 ; LW, 肺重量 ; SVR, 左室形成術 ; Tre, トレハロース.

### 3. ウェスタンブロッティング

図 15 にオートファゴゾームのマーカである LC3-II のタンパク発現の結果を示す。左室形成術(2 日)群では, sham(2 日)群と比して小さかった。左室形成術(28 日)群では, 左室形成術(2 日)群よりも大きく, sham(28 日)群と同程度であった。左室形成術+トレハロース(28 日)群では, 左室形成術(28 日)群と同程度であった。sham+トレハロース(28 日)群では, sham(28 日)群と同程度であった。

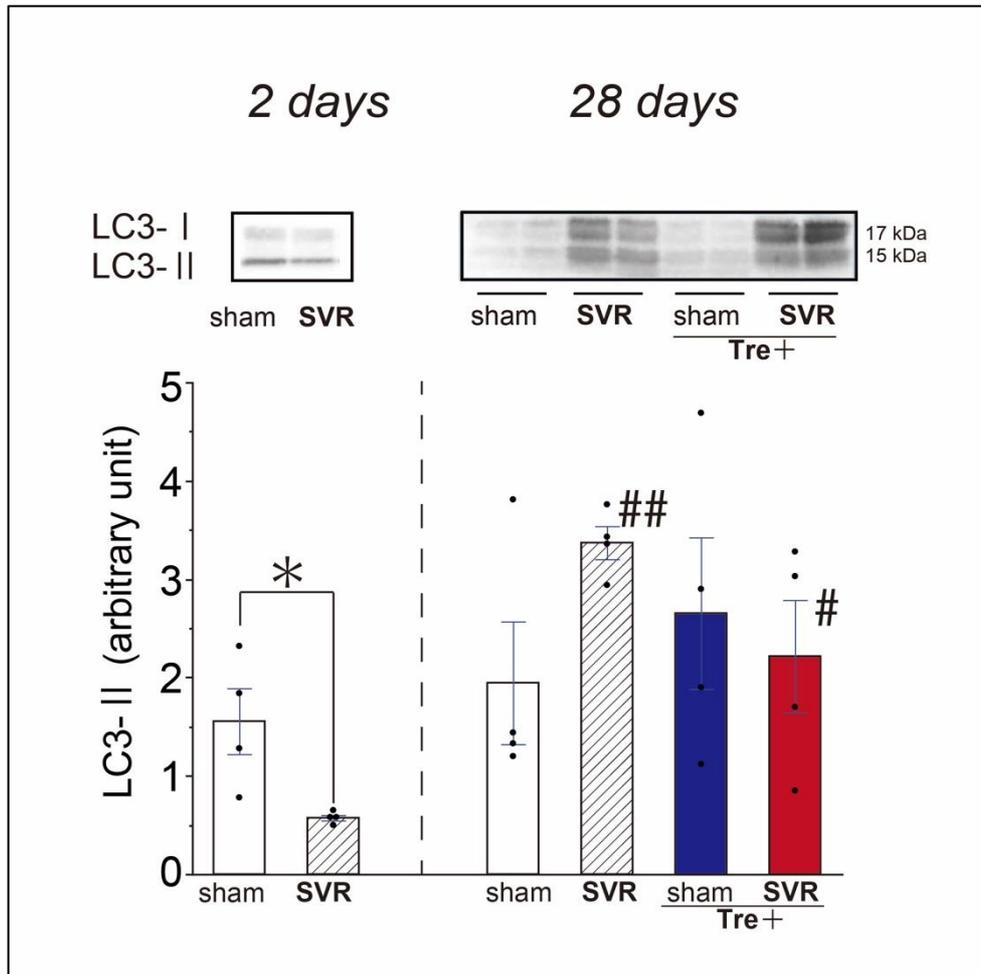


図 15. LC3-II の発現量

\* $P < 0.05$ ; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  対左室形成術(2 日)群; LC3, microtubule-associated light chain 3; SVR, 左室形成術; Tre, トレハロース.

図 16 にオートファジーによって選択的に分解される p62 のタンパク発現の結果を示す。左室形成術(2 日)群では, sham(2 日)群よりも大きかった。左室形成術(28 日)群では, 左室形成術(2 日)群より小さく, sham(28 日)群と同程度であった。左室形成術+トレハロース(28 日)群では, 左室形成術(28 日)群より小さかった。sham+トレハロース(28 日)群では, sham(28 日)群と同程度であった。

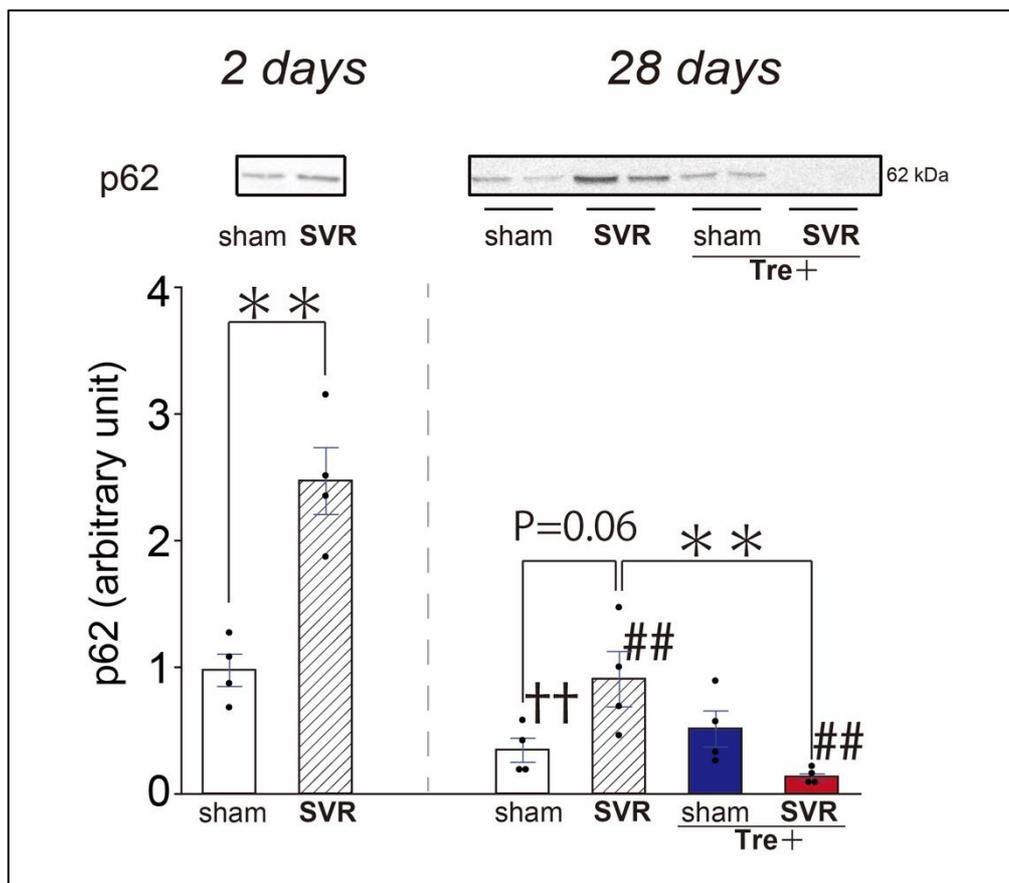


図 16. p62 の発現量

\*\* $P < 0.01$ ; ## $P < 0.01$  対左室形成術(2 日)群; †† $P < 0.01$  対 sham(2 日)群; SVR, 左室形成術; Tre, トレハロース。

以上の結果より, オートファジーフラックスは, 左室形成術後早期には sham 手術後に比して減弱するが, 遠隔期には sham 手術後と同程度まで回復することが示唆された。さらに, 左室形成術+トレハロース(28 日)群ではオートファジー特異的に分解される p62 が左室形成術(28 日)群よりも有意に小さいことから, オートファジーフラックスは, 左室形成術(28 日)群よりも亢進していたと考えられた。一方で, sham+トレハロース(28 日)群では, sham(28 日)群と比してオートファジーフラックスの有意な亢進を認めなかった。

#### 4. RT-PCR

表 7, 表 8 に犠牲死時に採取した心筋における病的心筋肥大マーカーの遺伝子発現を示す. 左室形成術(2日)群のBNPは, sham(2日)群と比して低かった. 術後28日目において,  $\alpha$ MHC,  $\beta$ MHC, BNPは各群間での差を認めなかったが,  $\alpha$ SAはsham+トレハロース(28日)群においてsham(28日)群と左室形成術(28日)群よりも高かった.

表 7. 2日後犠牲死群の病的心筋肥大マーカー

2日後犠牲死群			
	sham 群 (n=4)	SVR 群 (n=4)	P 値
$\alpha$ MHC	0.12 $\pm$ 0.06	0.02 $\pm$ 0.01	0.16
$\beta$ MHC	1.63 $\pm$ 0.29	0.83 $\pm$ 0.16	0.07
BNP	2.06 $\pm$ 0.59	0.54 $\pm$ 0.19	0.028
$\alpha$ SA	0.96 $\pm$ 0.76	1.36 $\pm$ 1.15	0.78

数値は平均値 $\pm$ 標準誤差, 単位は arbitrary unit; BNP, 脳性ナトリウム利尿ペプチド; MHC, ミオシン重鎖遺伝子; SA, スケルタル アクチン; SVR, 左室形成術.

表 8. 28日後犠牲死群の病的心筋肥大マーカー

28日後犠牲死群					
	sham 群 (n=4)	SVR 群 (n=4)	sham+Tre 群 (n=4)	SVR+Tre 群 (n=4)	P 値
$\alpha$ MHC	0.06 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.10	0.31 $\pm$ 0.08	0.25 $\pm$ 0.11	0.24
$\beta$ MHC	1.42 $\pm$ 0.23	0.73 $\pm$ 0.33	1.40 $\pm$ 0.32	0.78 $\pm$ 0.08	0.16
BNP	1.43 $\pm$ 0.07	1.58 $\pm$ 0.22	1.80 $\pm$ 0.39	2.50 $\pm$ 1.25	0.68
$\alpha$ SA	0.65 $\pm$ 0.20	0.70 $\pm$ 0.11	1.51 $\pm$ 0.09 <sup>**#</sup>	1.03 $\pm$ 0.16	0.005

数値は平均値 $\pm$ 標準誤差, 単位は arbitrary unit; <sup>\*\*</sup>P < 0.01 vs. sham(28日)群; <sup>#</sup>P < 0.05 vs. 左室形成術(28日)群; BNP, 脳性ナトリウム利尿ペプチド; MHC, ミオシン重鎖遺伝子; SA, スケルタル アクチン; SVR, 左室形成術; Tre, トレハロース.

BNPが左室形成術術後早期にsham手術と比して低かったことは, 左室の縮小による左室壁応力の低下を反映していると考えられた.  $\alpha$ SAがsham+トレハロース(28日)群において, sham(28日)群および左室形成術(28日)群よりも高値となった意義は不明であった.

## 5. 組織学的検査

図 17 にマッソントリクローム染色を用いた心室中部横断像の代表的な組織像を示す。左室形成術+トレハロース(28 日)群では、瘢痕組織の割合が小さく、左室内腔も小さいことがわかる。

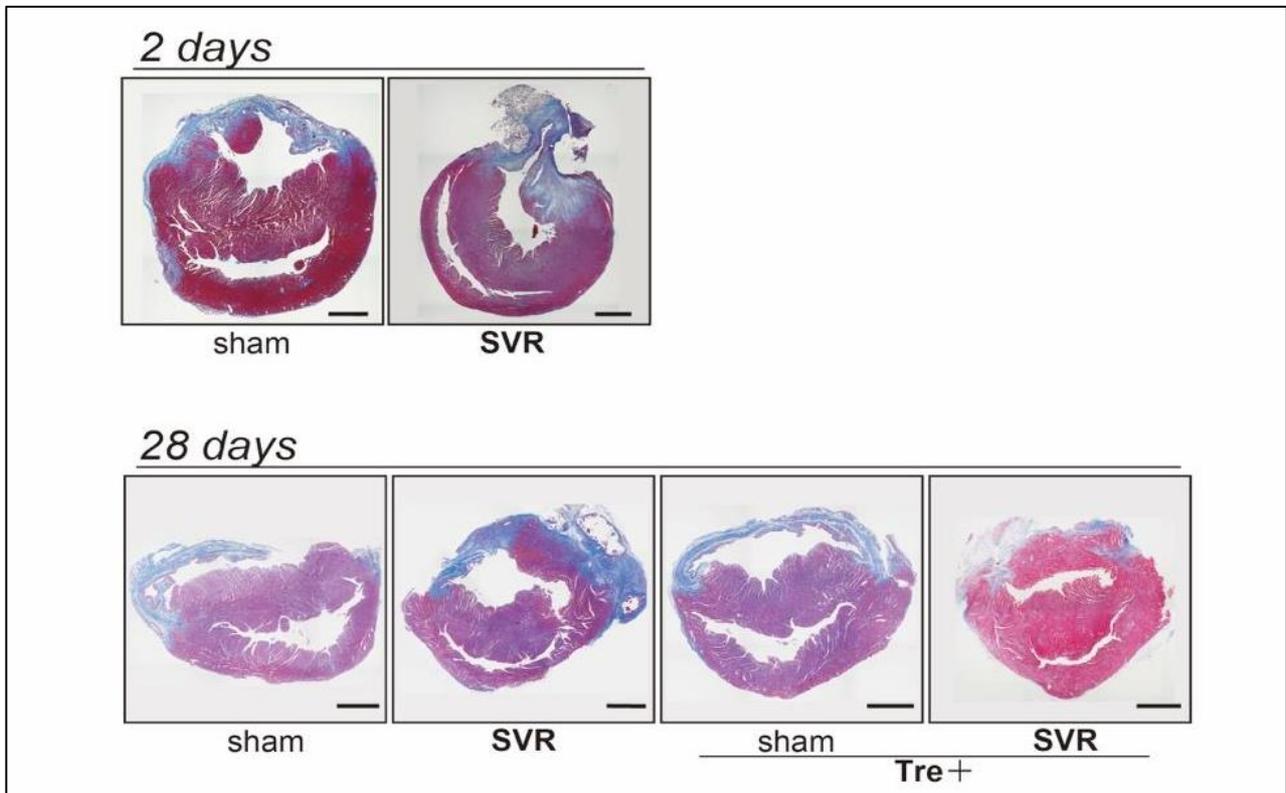


図 17. 心室中部横断像(マッソントリクローム染色)

Scale bar = 2 mm ; SVR, 左室形成術 ; Tre, トレハロース.

図 18 にヘマトキシリンエオジン染色の代表的組織像と remote area の心筋細胞面積を示す。左室形成術(2 日)群の心筋細胞面積は, sham(2 日)群と比して有意に小さかった。左室形成術+トレハロース(28 日)群では, 左室形成術(28 日)群と同程度であり, sham(28 日)群と比して有意に小さかった。

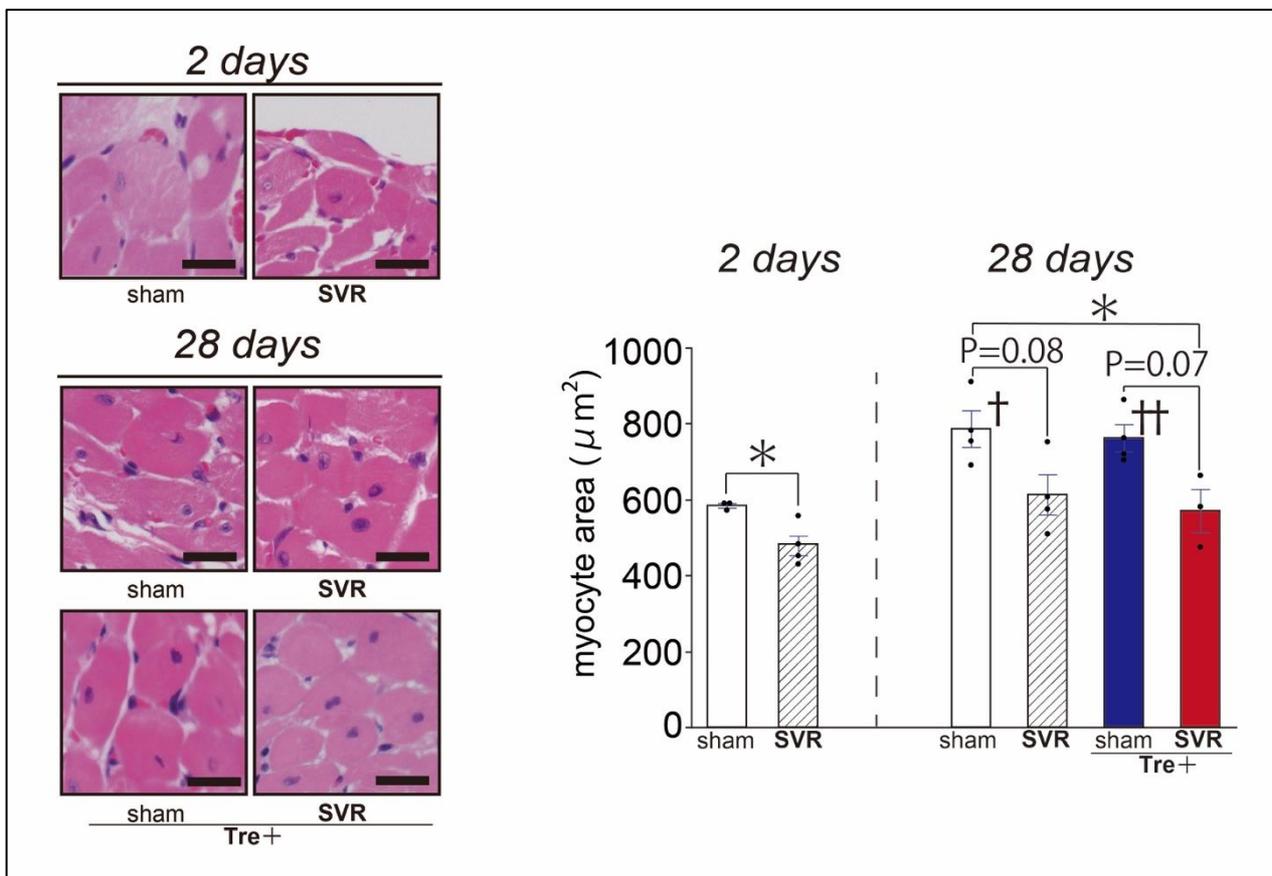


図 18. 心筋細胞面積

\* $P < 0.05$ ; † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$  対 sham(2 日)群; Scale bar = 25  $\mu\text{m}$ ; SVR, 左室形成術; Tre, トレハロース。

図 19 に、マッソントリクローム染色の代表的組織像と remote area の心筋組織に対する線維化面積の割合を示す。sham+トレハロース(28 日)群では、sham(2 日)群と比して線維化の割合は大きかった。

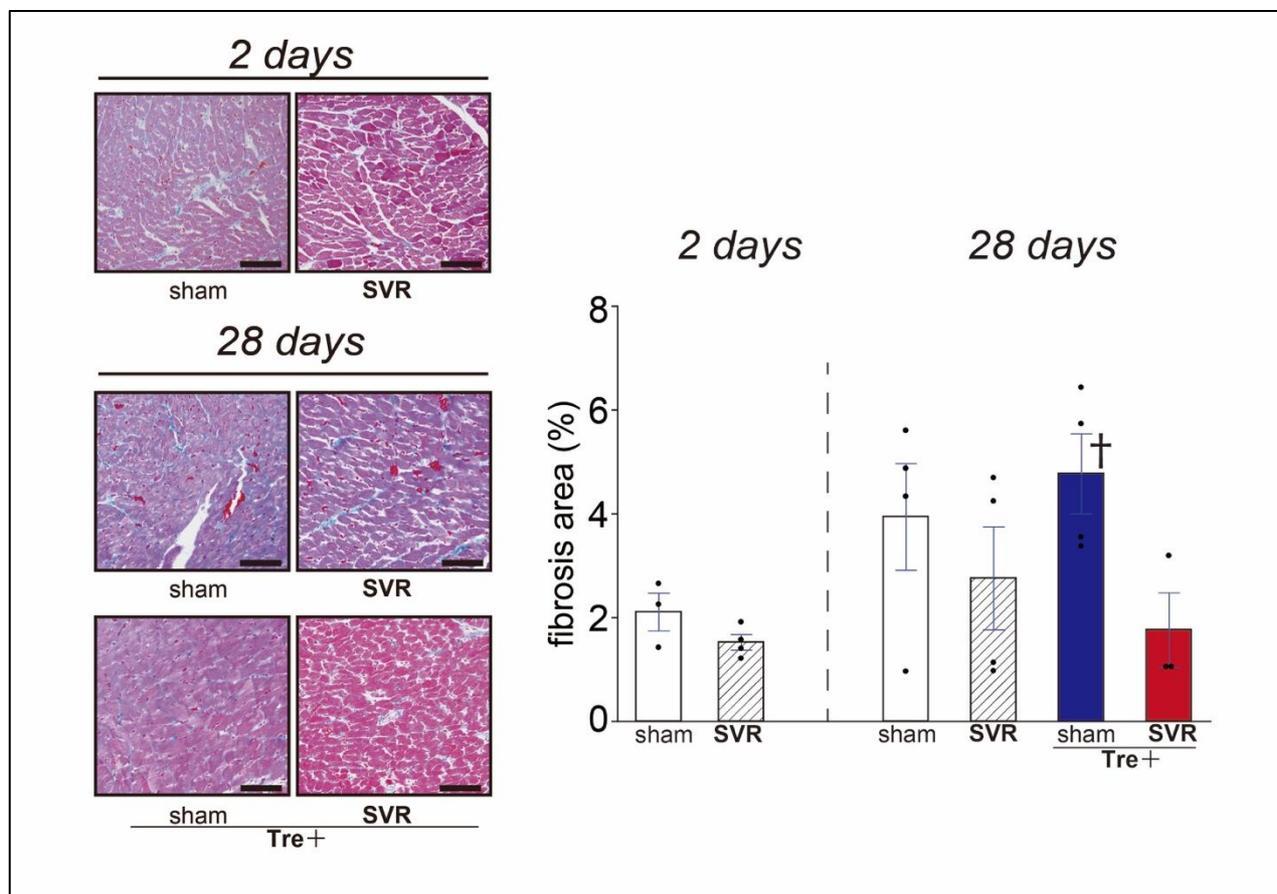


図 19. 線維化面積割合

†P < 0.05 対 sham(2 日)群 ; Scale bar = 100 μm ; SVR, 左室形成術 ; Tre, トレハロース.

心筋細胞面積が、左室形成術後早期に sham 手術と比して小さいことは、左室の縮小による左室壁応力の低下が影響していると考えられた。

# 考察

## 1. 本研究で得られた新知見

ラット虚血性心筋症モデルにおいて，左室形成術後にオートファジー活性化作用のあるトレハロースを投与すると，左室リモデリングの再発が抑制される。

## 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) 左室形成術後のリモデリングとオートファジーの変化

左室形成術後 2 日目には，左室径の縮小，左室収縮能の上昇が見られたが，28 日目には左室径の拡大と収縮能の低下がみられた。左室形成術後 2 日目には，LC3-Ⅱは低下し，p62 が上昇していたが，28 日目には LC3-Ⅱは上昇し，p62 は低下した。

以上の結果から，左室形成術後の左室リモデリングは，術後早期には改善するが，遠隔期には再発することが示され，オートファジーフラックスは，左室形成術後早期に減弱し，遠隔期には亢進に転ずることが示唆された。

### 2) 左室形成術後トレハロース投与のリモデリング抑制効果

左室形成術後にトレハロースを投与した個体では，左室形成術後 28 日目の左室拡大の程度は抑制され，収縮能は低下しなかった。この結果より，左室形成術後にトレハロースを投与することで，遠隔期の左室リモデリングの再発を抑制することが示された。また，左室形成術単独と比して，LC3-Ⅱは同程度であるものの，オートファジー選択的に分解される p62 は有意に小さかった。オートファジーフラックスは，トレハロース投与により左室形成術単独と比して亢進することが示唆された。

## 3. 文献的考察

### 1) 左室形成術後早期の効果

本研究の結果において，左室形成術後早期には sham 手術と比して左室径が小さく，収縮能が大きくなったが，この変化は左室形成術の目的である拡大した左室の縮小，瘢痕組織の血行動態からの除外によるものと考えられた。

さらに、左室形成術後早期には sham 手術よりも BNP が低いこと、心筋細胞面積が小さいことは、左室の縮小による左室壁応力の減少を反映していると考えられた。これらの変化は左室形成術後早期の結果を示した過去の報告と相違しない(Nishina et al., 2001)。また、左室形成術後に心拍出量に変化しなかったことは、左室形成術により左室が縮小したにも関わらず、左室収縮能が上昇したことから、一回拍出量が維持された影響と考えられた。

## 2) 左室形成術後左室リモデリング再発の抑制方法

ラットの虚血性心筋症モデルに対する左室形成術後において、左室径は、術後早期には縮小し、遠隔期には再拡大が見られ、BNP 遺伝子発現は、早期に低下し、遠隔期に再上昇することが報告されている(Nishina et al., 2001)。このことは、左室形成術の左室機能改善効果は、早期に認められるが遠隔期まで持続しないことを示している。これに対し、左室形成術後にアンギオテンシン変換酵素阻害剤や $\beta$ 遮断薬を使用し、左室再拡大を抑制し得たという報告がある(Nomoto et al., 2002; Yoshikawa et al., 2010)。これらの報告から、左室形成術後の左室リモデリング再発抑制に、薬物治療が有効である可能性が示されたが、これらの報告内ではアンギオテンシン変換酵素阻害剤のリシノプリル(80mg/kg)、 $\beta$ 遮断薬のカルベジロール(50m/kg)ともに非常に高容量で使用されており、副作用予防の観点から臨床応用は難しいと考えられる。現在、左室形成術後の左室リモデリング再発抑制を目的とした治療方法は実臨床においては確立されていない。

今回我々が使用したトレハロースは、左室形成後遠隔期の左室リモデリング再発を抑制しうることを示された。トレハロースは、自然界に存在する二糖類の一種であり、細菌、酵母、真菌などのさまざまな生物に偏在しているが、哺乳類は合成することはできない。トレハロースを経口摂取すると、大部分はトレハラーゼという酵素で分解されグルコースとして吸収されるが、一部はトレハロースとして血中に取り込まれる。きのこ類などの多くの食材に含まれており、食品添加物として多くの食品にも使用されている。トレハロースは、人体にとって安全な物質と考えられており、食事の10%までの摂取では副作用を認めておらず、1日最大摂取量の上限も特に設けられてはいない(Richards et al., 2002)。したがって、本研究で使用したトレハロースは、左室形成術後の左室リモデリング再発を抑制するためのアジュバント療法として、実臨床においても安全に使用できる可能性があると考えられる。

### 3)トレハロースによるオートファジー活性化と左室リモデリング再発抑制効果との関連

トレハロースがオートファジーを活性化する機序は、近年、EB 転写因子を介した経路であることが解明されつつある。Rusmini らは、運動神経細胞において細胞内に取り込まれたトレハロースが、プロテインフォスファターゼ 3 を活性化させ、それが EB 転写因子を脱リン酸化することで、オートファジー関連遺伝子発現が増加する機序を報告している (Rusmini et al., 2019)。

トレハロースは、心筋においてもオートファジーを活性化させることがわかっている。マウスの急性心筋梗塞モデルに対してトレハロースを投与すると、心筋のオートファゴゾームマーカーである LC3-II が増加し、オートファジー特異的に分解される p62 の発現が低下したとの報告がある (Sciarretta et al., 2018)。これらのタンパク変化は、トレハロースがオートファジーを活性化させたことを示しており、さらに、心筋梗塞後遠隔期の左室リモデリングの抑制効果も示された。同研究ではさらに、オートファジー活性化の過程で重要な遺伝子であるベクリン-1 をノックアウトしたマウスにおいて、トレハロースのオートファジー活性化効果と左室リモデリング抑制効果が消失したことも報告している。これらの結果から著者らは、急性心筋梗塞後にトレハロースを投与すると、オートファジーの活性化と左室リモデリング抑制効果が認められ、後者の効果はオートファジー依存적であると結論づけている。

我々の研究では、虚血性心筋症モデルラットの左室形成術後にトレハロースを投与することで、遠隔期の左室リモデリング再発が抑制されるとともに、オートファジーが活性化することが示された(図 20)。

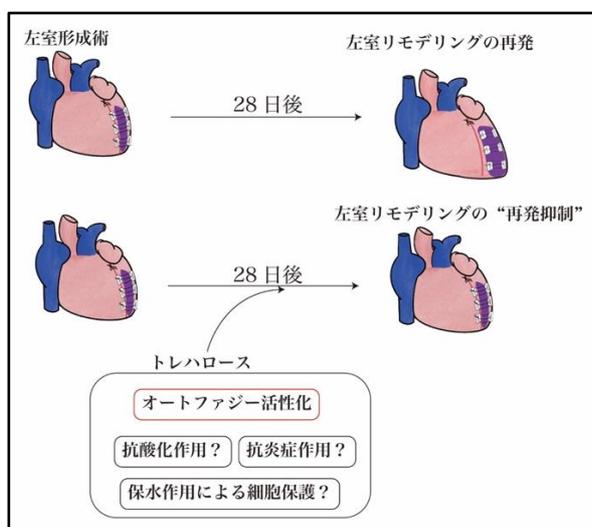


図 20. 本研究における左室リモデリング再発とトレハロースの関係

我々はこれまでの研究において、ラット虚血性心筋症モデルに対する左室形成術後早期に、左室リモデリングの改善とともに LC3-II が低下し、遠隔期には LC3-II が増加することを報告している (Sugimoto et al., 2020). さらに、オートファジーの左室リモデリングへの影響を調べる目的で、左室形成術後からオートファジー上流の経路の阻害作用を持つ 3-メチルアデニンを投与したところ、左室リモデリングは増悪したことから、左室リモデリング再発に対するオートファジーの抑制的作用が示唆された。一方今回の研究において、同モデルにおける左室形成術後のトレハロース投与は、遠隔期の左室リモデリングの再発を抑制し、さらにオートファジーを活性化することを示唆する結果を得た。オートファジーが左室リモデリング再発を抑制する機序として、障害ミトコンドリアの除去が関与している可能性がある。心筋梗塞後などにより左室容積の増大から左室壁応力が増大すると、障害されたミトコンドリアの蓄積が起きる。さらに、ミトコンドリアの蓄積は、左室形成術後遠隔期の左室再拡大に関連する因子と報告されている (Shipulin et al., 2007). オートファジーの活性化により、障害されたミトコンドリアの分解が促進し、左室形成術後の左室リモデリングを抑制している可能性が考えられる。今後、本研究と同様のモデルで、ミトコンドリアの量や機能の変化に関する研究を行うことで、これらのメカニズムが明らかとなる可能性がある。

我々の一連の研究結果から、トレハロースによる左室リモデリング再発抑制効果発現においてオートファジーの関与が推定されるものの、因果関係を証明するには至っていない。トレハロースには、オートファジーの活性化作用の他に、抗酸化作用や抗炎症作用、保水作用による細胞保護効果があるとされており、これらの作用が単独または複合的に左室リモデリング再発抑制効果をもたらした可能性がある。(Benaroudj et al., 2001; Iturriaga et al., 2009; Taya et al., 2009). 我々は、本モデルにおけるトレハロースの左室リモデリングの再発抑制効果がオートファジー依存적かどうかについて検討するために、トレハロースとオートファジー阻害作用を持つクロロキンの併用を試みたが、クロロキンの副作用により生存個体が得られず断念した。また他にも、ベクリン-1 などのオートファジー関連遺伝子のノックアウトマウスを使用した研究も検討したが、ラットよりも心臓が小さいため左室形成術の実施が困難なことからこれも断念した。トレハロースによるオートファジー活性化と左室リモデリングの再発抑制効果との因果関係の解明は、今後の課題である。

#### 4. 臨床応用に向けて

本研究の結果から、虚血性心筋症に対する左室形成後のトレハロース投与が、左室リモデリング再発抑制を目的としたアジュバント療法になりうることを見出した。しかし、今後実臨床へ応用するにあたっては、さまざまな課題を解決しなければならない。

第一に、左室リモデリングの再発抑制とオートファジーの活性化との因果関係を検討することである。今後、トレハロースとオートファジー阻害剤とを併用する研究や、オートファジー関連遺伝子のノックアウトマウスを使用した研究、トレハロースの別の作用である抗酸化作用や抗炎症作用の影響を明らかにする研究によりこの因果関係が解明されることが期待される。オートファジー阻害剤に関しては、クロロキンの併用で生存個体が得られなかったため、オートファジー阻害作用を持つ他の薬剤の併用や、今後オートファジーの特異的阻害剤が開発されることにより研究の進展が期待できる。また、マウスを使用した実験においては、小さな心臓に対しても実施可能な左室形成術の手技の改良が求められる。

第二に、実臨床における、虚血性心筋症に対する左室形成術後の心筋オートファジー活性の研究が必要である。ヒトにおける心筋オートファジーの研究についてはこれまでほとんど報告がない。心筋オートファジー活性測定のために、心筋を採取する必要があることが理由と考えられる。今後は、血液検査や画像診断などのように、オートファジーを評価できる低侵襲な検査方法の開発が望まれる。

第三に、トレハロースを実臨床で使用する際の、投与量や投与期間の設定が必要である。本研究では10%トレハロースを経口で自由摂取としたが、濃度や総投与量により効果に差がでるかについては検討していない。そのため、左室リモデリングの再発を予防するための適切な濃度、投与量を、血中濃度の測定をするなどして検討することが必要である。また、投与期間について、本研究では先行研究のオートファジー阻害剤の使用期間と揃える意味で左室形成術後7日目から投与したが、投与開始を術前、術直後、術後数日後とした場合に効果が異なる可能性もある。また、心不全患者へ長期投与した場合の影響も不明であるため、適切な投与期間の検討も必要であると考えられる。

第四に、トレハロースの注射剤の開発である。トレハロースを経口投与すると、大部分はグルコースへ分解されてしまうため、注射剤の方が効果的に血中濃度を上げられる可能性がある。一方、注射剤として臨床応用をするためには、薬品としての精製方法や濃度設定の検討が必要である。現在、トレハロース製剤として、肺移植の際に使用される肺保存液 ET-Kyoto 液(大塚

製薬)が存在する。同製剤は4%トレハロースを含有するとされているが、人体への投与が認められていない。トレハロースを注射剤として使用するには、新たに薬事承認を得る必要がある。

## 5. 本研究の問題点

### 1) オートファジー活性の評価方法

本研究では、オートファジー活性の評価に、LC3-IIとp62のウェスタンブロッティングによるタンパク定量評価を行なった。しかし、LC3-IIは、オートファジーフラックスの下流阻害によっても増加することや、p62は、飢餓などの特殊な状態では上昇することが知られている。そのため、2つのマーカーを使用しても、オートファジー活性を正確に判定できていない可能性がある。現在、オートファジーフラックスの定量評価には、緑色蛍光タンパク質と赤色蛍光タンパク質を融合させたオートファジー活性測定プローブなどが知られているが、当教室ではそれらの評価を行う環境が揃っていないため、今後の検討事項である(Kaizuka et al., 2016)。

### 2) 本研究と実臨床との違い

本研究で用いた左室形成術の術式は、人工心肺を使用していない点、左室切開をしていない点、左室縫縮率の調整ができない点などから、現在臨床で行われている左室形成の術式と相違する。しかし、欧米では、本研究で用いた術式と人工心肺を使用しない点、左室切開しない点で共通する「経カテーテル的左室形成術」が開発され、現在臨床研究が行われている(Klein et al., 2019)。今後本邦でも臨床使用が承認されれば、本研究の意義は増すと考えられる。また本研究では、心不全ガイドラインで推奨されているような心不全治療薬を用いていない。そのため、それらの薬剤とトレハロースとの相互作用の点からも、本研究の結果をそのまま実臨床に当てはめることは難しい。

### 3) 高い死亡率とバイアス

当教室で先行的に行なった86匹の実験から死亡率を算出すると、心筋梗塞手術で35%(33/86)、左室形成術で54%(19/35)、sham手術では11%(2/18)であった。左室形成術後およびsham手術後の死亡は、術後1日目までが7割程度で最も多く、全て術後7日以内での死亡であった。左室形成術後の高い死亡率の原因は、心不全治療薬が使用されていないこと、術中

および周術期の血行動態および全身管理を行なっていないことなどが考えられる。そのため、本研究における sham 手術と左室形成術の比較において、手術前の心機能パラメータには群間差を認めなかったものの、これらのデータには反映されない生存バイアスが存在している可能性がある。一方、トレハロース投与後の死亡は認めていないため、左室形成術後におけるトレハロース投与の有無での比較には、生存バイアスの影響はないと考える。また、トレハロース投与群の飲水量は対照群の飲水量と異なる可能性があるが、当教室の先行実験において、1週間の飲水量は10%トレハロース水溶液投与群(237 ± 25 ml)と飲用水投与群(218 ± 19 ml)での飲水量に差がないことが確認されている。本研究では飲水量を計測しなかったが、飲水量のバイアスが存在する可能性は低いと考えられる。

#### 4) 病的心筋肥大マーカー，肺と心房重量，組織学的検査への影響

本研究では左室形成術後にトレハロースを投与することで、遠隔期の左室リモデリングの再発が抑制されたものの、病的心筋肥大マーカーの遺伝子発現，肺と心房重量，心筋細胞面積や線維化面積割合に対する影響は認められなかった。左室形成術後のトレハロース投与が，これらの項目に影響を及ぼさなかった理由は不明であるが，ばらつきの大きい検査項目であること，本実験でのプロトコールではこれらの項目への影響が顕在化しなかったことなどが推測された。今後，ラットの個体数を増やすこと，左室形成術から犠牲死までの期間を変更すること，などにより検討することが必要である。

#### 5) 左室形成術を実施しない，トレハロース単独の効果

本研究では虚血性心筋症モデルラットに，左室形成術を行わずにトレハロースを投与した場合，左室リモデリングの抑制やオートファジー活性化効果は見られなかった。これは，急性心筋梗塞モデルにトレハロースを投与し，左室リモデリングの抑制とオートファジー活性化効果を見出した報告と相反する結果であった(Sciarretta et al., 2018)。この結果の違いは，使用した動物の種類，トレハロースの投与開始タイミング，投与方法に由来する可能性がある。特にトレハロース投与開始タイミングに関して，心筋梗塞後初期の炎症過程から後期の梗塞治癒過程へと心筋の環境が大きく変わるため，それぞれの段階におけるトレハロースの作用には，大きな違いがあると考えられる(Nahrendorf et al., 2010)。今回我々が使用した虚血性心筋症モデルは，癒痕組織の完成した心筋梗塞後後期にあたるため，トレハロース単独投与の効果が発現しにくかった可能性がある。

# 結論

## 1. 本研究で得られた新知見

ラット虚血性心筋症モデルにおいて，左室形成術後にオートファジー活性化作用のあるトレハロースを投与すると，左室リモデリングの再発が抑制される。

## 2. 本研究で得られた新知見の意義

本研究では，ラット虚血性心筋症モデルに対して左室形成術を行い，オートファジー活性化作用のあるトレハロースを経口投与することで，遠隔期の左室リモデリングの再発抑制が得られ，同時にオートファジーの活性化が示唆された。左室形成術後の左室リモデリングの再発抑制を目的としたアジュバント療法として，トレハロースが有効である可能性があり，臨床応用に向けたさらなる研究につながると考えられた。

## 3. 新知見から今後どのような研究が展開されうるか。

トレハロースを左室形成術後において臨床応用するために，下記のような研究が今後展開されうる。

- 1) オートファジーの活性化と左室リモデリング再発抑制効果の因果関係に関する研究
- 2) 臨床における心筋オートファジー活性の評価方法に関する研究
- 3) 臨床におけるトレハロースの投与期間や投与方法に関する研究

## 4. 今後の課題

### 1) トレハロースと左室リモデリングの再発抑制効果

トレハロースの左室リモデリングの再発抑制効果が，オートファジー依存性であることを確認するために，トレハロースとオートファジー阻害剤の併用や，オートファジー関連遺伝子をノックアウトさせたマウスを用いた研究に期待が持たれる。しかし，現状ではオートファジー阻害作用を持つ薬剤の併用による生存個体が得られないことや，マウスの小さい心臓では左室形成の手技が困難であることが問題である。また今後，オートファジーの特異的

阻害剤が開発されることで研究のさらなる展開が期待できる。さらに、トレハロースが持つ、抗炎症作用、抗酸化作用などのオートファジー活性化以外の効果が、左室リモデリング再発抑制に与える影響を検討する必要がある。

## 2) 臨床における心筋オートファジーの評価方法に関する研究

実臨床で虚血性心筋症患者における、左室形成術後の心筋オートファジーの研究が必要である。しかし、心筋オートファジー評価に必要な心筋検体が日常診療では得難いため、ヒトにおける心筋オートファジーの研究は進んでいない。血液検査や画像診断などのように、オートファジー活性を評価できる低侵襲な検査方法の開発が課題である。

## 3) 臨床におけるトレハロース投与期間や投与方法に関する研究

臨床においてトレハロースを投与する際の、投与量、投与期間に関する研究が求められる。また、左室形成術後のアジュバント療法としてトレハロースを注射剤として使用するためには、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，北海道大学大学院 医学研究院 循環器・呼吸器外科学教室 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指導とご鞭撻を賜りました北海道大学大学院 医学研究院 循環器・呼吸器外科学教室 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を頂いた勤医協中央病院山川智士先生，北海道立こども総合医療・療育センター浅井英嗣先生，帯広厚生病院杉本聡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病院循環器・呼吸器外科部門のスタッフの皆様に，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

Athanasuleas, C.L., Buckberg, G.D., Stanley, A.W., Siler, W., Dor, V., Di Donato, M., Menicanti, L., Almeida de Oliveira, S., Beyersdorf, F., Kron, I.L., *et al.* (2004). Surgical ventricular restoration in the treatment of congestive heart failure due to post-infarction ventricular dilation. *J. Am. Coll. Cardiol.* *44*, 1439-1445.

Benaroudj, N., Lee, D.H., and Goldberg, A.L. (2001). Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* *276*, 24261-24267.

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. *Sci. Signal.* *9*, ra21.

Gaudron, P., Eilles, C., Kugler, I., and Ertl, G. (1993). Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation.* *87*, 755-763.

Iturriaga, G., Suárez, R., and Nova-Franco, B. (2009). Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *Int. J. Mol. Sci.* *10*, 3793-3810.

Jones, R.H., Velazquez, E.J., Michler, R.E., Sopko, G., Oh, J.K., O'Connor, C.M., Hill, J.A., Menicanti, L., Sadowski, Z., Desvigne-Nickens, P., *et al.* (2009). Coronary Bypass Surgery with or without Surgical Ventricular Reconstruction. *New England Journal of Medicine* *360*, 1705-1717.

Kaizuka, T., Morishita, H., Hama, Y., Tsukamoto, S., Matsui, T., Toyota, Y., Kodama, A., Ishihara, T., Mizushima, T., and Mizushima, N. (2016). An Autophagic Flux Probe that Releases an Internal Control. *Molecular Cell.* *64*, 835-849.

Kitamura, S., Kay, J.H., Krohn, B.G., Magidson, O., and Dunne, E.F. (1973). Geometric and functional abnormalities of the left ventricle with a chronic localized noncontractile area. *Am. J. Cardiol.* *31*, 701-707.

Klein, P., Anker, S.D., Wechsler, A., Skalsky, I., Neuzil, P., Annet, L.S., Bifi, M., McDonagh, T., Frerker, C., Schmidt, T., *et al.* (2019). Less invasive ventricular reconstruction for ischaemic heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* *21*, 1638-1650.

Matsui, Y. (2009). Overlapping left ventricular restoration. *Circ. J.* *73*, 13-18.

McMurray, J.J., Adamopoulos, S., Anker, S.D., Auricchio, A., Böhm, M., Dickstein, K., Falk, V., Filippatos, G., Fonseca, C., Gomez-Sanchez, M.A., *et al.* (2012). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.* *33*, 1787-1847.

Menicanti, L., Castelvechio, S., Ranucci, M., Frigiola, A., Santambrogio, C., de Vincentiis, C., Brankovic, J., and Di Donato, M. (2007). Surgical therapy for ischemic heart failure: single-center experience with surgical anterior ventricular restoration. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *134*, 433-441.

Nahrendorf, M., Pittet, M.J., and Swirski, F.K. (2010). Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation.* *121*, 2437-2445.

Nishida, K., and Otsu, K. (2017). Inflammation and metabolic cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* *113*, 389-398.

Nishida, K., Taneike, M., and Otsu, K. (2015a). The role of autophagic degradation in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *78*, 73-79.

Nishida, K., Yamaguchi, O., and Otsu, K. (2015b). Degradation systems in heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *84*, 212-222.

Nishina, T., Nishimura, K., Yuasa, S., Miwa, S., Nomoto, T., Sakakibara, Y., Handa, N., Hamanaka, I., Saito, Y., and Komeda, M. (2001). Initial effects of the left ventricular repair by plication may not last long in a rat ischemic cardiomyopathy model. *Circulation.* *104*, 1241-245.

Nomoto, T., Nishina, T., Miwa, S., Tsuneyoshi, H., Maruyama, I., Nishimura, K., and Komeda, M. (2002). Angiotensin-converting enzyme inhibitor helps prevent late remodeling after left ventricular aneurysm repair in rats. *Circulation.* *106*, 1115-119.

Richards, A.B., Krakowka, S., Dexter, L.B., Schmid, H., Wolterbeek, A.P.M., Waalkens-Berendsen, D.H., Shigoyuki, A., and Kurimoto, M. (2002). Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem. Toxicol.* *40*, 871-898.

Rusmini, P., Cortese, K., Crippa, V., Cristofani, R., Cicardi, M.E., Ferrari, V., Vezzoli, G., Tedesco, B., Meroni, M., Messi, E., *et al.* (2019). Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration. *Autophagy.* *15*, 631-651.

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.

Shipulin, V.M., Kazakov, V.A., Suhodolo, I.V., Krivoshekov, E.V., Lezhnev, A.A., Kozlov, B.N., Vaizov, V., and Miller, A.A. (2007). Causes of repeated remodeling of left ventricle after Dor procedure. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* *6*, 772-777.

Sugimoto, S., Shingu, Y., Doenst, T., Yamakawa, T., Asai, H., Wakasa, S., and Matsui, Y. (2020). Autophagy during left ventricular redilation after ventriculoplasty: Insights from a rat model of ischemic cardiomyopathy. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *20*, 30429-3.

Taya, K., Hirose, K., and Hamada, S. (2009). Trehalose inhibits inflammatory cytokine production by protecting I kappa B-alpha reduction in mouse peritoneal macrophages. *Arch. Oral Biol.* *54*, 749-756.

Wakasa, S., Matsui, Y., Kobayashi, J., Cho, Y., Yaku, H., Matsumiya, G., Isomura, T., Takanashi, S., Usui, A., Sakata, R., *et al.* (2018). Estimating postoperative left ventricular volume: Identification of responders to surgical ventricular reconstruction. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *156*, 2088-2096.

White, H.D., Norris, R.M., Brown, M.A., Brandt, P.W., Whitlock, R.M., and Wild, C.J. (1987). Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation.* *76*, 44-51.

Yoshikawa, E., Marui, A., Tsukashita, M., Nishina, T., Wang, J., Muranaka, H., Ikeda, T., and Komeda, M. (2010). Carvedilol may alleviate late cardiac remodelling following surgical ventricular restoration. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* *37*, 362-367.

2018年改訂版 安定冠動脈疾患の血行再建ガイドライン：

[https://www.j-circ.or.jp/cms/wp-content/uploads/2018/09/JCS2018\\_nakamura\\_yaku.pdf](https://www.j-circ.or.jp/cms/wp-content/uploads/2018/09/JCS2018_nakamura_yaku.pdf) (2021/11/1 参照)