



Title	ラット心臓全虚血モデルにおけるERK1/2活性化を介したクロロキンの心保護効果 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	村瀬, 亮太
Description	配架番号 : 2746
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15480号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90031
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	MURASE_Ryota_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 村瀬 亮太

学位論文題名

ラット心臓全虚血モデルにおける ERK1/2 活性化を介したクロロキンの心保護効果
(Cardioprotective effects of chloroquine pretreatment on ischemic reperfusion
injury through the activation of ERK1/2 in isolated rat hearts)

【背景と目的】

心臓血管外科手術においては、虚血再灌流障害は術後の心機能障害の主な原因であり、術後死亡率に影響する。虚血再灌流障害を抑制するためにさまざまな研究が行われてきたが、いまだ確立された方法はなく、さらなる研究が必要である。腎臓や脳においては、抗マラリア薬として開発され膠原病に対して薬事承認を受けているクロロキン (CQ) の投与が再灌流障害を抑制するという報告が存在する。しかしながら、心臓の全虚血再灌流モデルにおける CQ の再灌流障害抑制効果に関する報告はない。

虚血再灌流障害の抑制機序として、①reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway, ②オートファジー (自食作用), ③抗炎症作用などが報告されている。CQ は抗炎症作用や自己免疫抑制作用を有している他、オートファジーの阻害薬として知られている。CQ による脳および腎臓の再灌流障害抑制においては抗炎症作用の関与が報告されているが、心臓においてはどのように虚血再灌流障害に関与するかは知られていない。本研究の目的は、ラットを用いた心筋全虚血モデルにおいて、CQ の虚血前投与が再灌流後の心機能障害抑制効果を有するかを検討し、さらにその機序を解明することである。

【対象と方法】

実験①：心臓の全虚血再灌流モデルにおける CQ の適正な投与濃度の検討

10 週齢の雄の Sprague-Dawley ラットの心臓をランゲンドルフ回路で灌流した。Klebs-Henseleit buffer (KHB) で 30 分間灌流したのち、30 分間の常温全虚血 (37°C) とした。虚血直前に冠動脈に投与した CQ の濃度により 4 群 (各群 4 匹ずつ) に分けた (KHB 群: KHB のみ, KHB + CQ 50 μ M 群, KHB + CQ 75 μ M 群, KHB + CQ 100 μ M 群)。その後 60 分間 KHB で再灌流した後、左室最大圧と心拍数の積である rate pressure product (RPP) の回復率を測定した。

実験②：CQ 虚血前投与による再灌流後の心機能障害抑制効果と虚血再灌流障害関連マーカーの検討

ランゲンドルフ回路での心臓灌流は実験①と同様に行った。虚血直前に冠動脈に投与した溶液により 2 群 (各群 4 匹ずつ) に分けた (KHB 群: KHB のみ, KHB + CQ 群: KHB + クロロキン)。その後 60 分間 KHB で再灌流した後、以下の心機能の回復率を測定した: 冠灌流量, 心拍数, left ventricular developed pressure (LVDP), +dp/dt, -dp/dt, RPP。さらに再灌流 60 分後の心臓を採取し、後日 CQ の作用機序を検討するために使用した。再灌流後の心筋細胞のアポトーシスを評価するため、TUNEL 染色を行った。RISK pathway を評価するため、AKT および extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 をウェスタンブロッティングで定量した。オートファジー活性化評価のため、オートファ

ジーマーカーとして最も一般的な microtubule-associated light chain 3 (LC3) -II および p62 をウェスタンブロッティングで定量した。炎症性マーカーとして tumor necrosis factor (TNF) - α を ELISA 法で定量した。

実験③ : CQ 虚血前投与による心機能障害抑制効果における作用機序の検証

実験②において CQ 群でウェスタンブロッティングおよび ELISA 法で増加していたタンパクに対する阻害薬を使用し、再灌流後の心機能およびアポトーシスを再評価した (KHB 群, KHB + CQ 群, KHB + 阻害薬群, KHB + CQ + 阻害薬群, 各群 4 匹ずつ)。

【結果】

実験① : 各 CQ の濃度ごとの RPP の回復率はそれぞれ KHB 群 $43.8 \pm 2.6\%$, KHB + CQ $50 \mu\text{M}$ 群 $37.0 \pm 3.2\%$, KHB + CQ $75 \mu\text{M}$ 群 $65.3 \pm 2.3\%$, KHB + CQ $100 \mu\text{M}$ 群 $69.0 \pm 7.4\%$ であり, KHB + CQ $75 \mu\text{M}$ ($P = .048$) 群および KHB + CQ $100 \mu\text{M}$ 群 ($P = .002$) において有意に KHB 群より高かった。従って本実験では最も回復率が高かった CQ の濃度である $100 \mu\text{M}$ を以降の実験では使用することとした。

実験② : 再灌流後の LVDP, +dp/dt, -dp/dt, RPP の回復率は, KHB + CQ 群で有意に高かった : LVDP (KHB, $68 \pm 8\%$ vs. KHB + CQ, $91 \pm 3\%$; $P = .034$), +dp/dt (KHB, $52 \pm 3\%$ vs. KHB + CQ, $91 \pm 7\%$; $P = .002$), -dp/dt (KHB, $47 \pm 4\%$ vs. KHB + CQ, $74 \pm 8\%$; $P = .019$), RPP (KHB, $44 \pm 3\%$ vs. KHB + CQ, $69 \pm 7\%$; $P = .019$)。TUNEL 陽性細胞率は KHB + CQ 群で有意に低かった (KHB, $8.3 \pm 1.2\%$ vs. KHB + CQ, $4.8 \pm 0.6\%$; $P = .044$)。AKT のリン酸化率には群間差が見られなかった。一方, ERK1/2 のリン酸化率は KHB + CQ 群で有意に高かった (KHB, 0.78 ± 0.05 vs. KHB + CQ, 1.03 ± 0.07 ; $P = .029$)。LC3-II, p62 および TNF- α の発現量には群間差を認めなかった。

実験③ : CQ による +dp/dt, -dp/dt, RPP の上昇は, 選択的 ERK1/2 阻害薬の添加により低下し KHB 群と同等となった。さらに, CQ 群の TUNEL 陽性細胞率は, 選択的 ERK1/2 阻害薬の添加により増加し KHB 群と同等となった。

【考察】

本研究ではラット心筋全虚血モデルにおいて, CQ 虚血前投与により再灌流後の心機能障害およびアポトーシス抑制効果が得られた。さらに CQ 投与により RISK pathway の一つである ERK1/2 の活性化を認めた。また, 選択的 ERK1/2 阻害薬の CQ への添加により, CQ の心機能障害およびアポトーシス抑制効果が消失した。したがって, CQ 虚血前投与により再灌流後の心機能障害抑制効果が得られ, その心機能障害抑制効果は, RISK pathway の一つである ERK1/2 の活性化に依存していると考えられた。本研究では CQ 投与のオートファジーおよび炎症反応への関与は否定的と考えられるが, さらなる検討が必要である。CQ の長期投与では QT 延長症候群や致死性不整脈, 網膜症などの副作用の報告がある。本研究の KHB + CQ 群には再灌流後に明らかな不整脈を認めなかったが, 実臨床に応用するためには大動物を含めた in vivo モデルでのさらなる研究が必要である。

【結論】

ラットの心筋全虚血モデルにおいて, CQ 虚血前投与により再灌流後の心機能障害抑制効果が得られた。その心機能障害抑制効果は, RISK pathway の一つである ERK1/2 の活性化に依存していた。この研究結果は心臓手術における新たな心筋保護液や移植保存液への臨床応用に向けた, さらなる研究につながると思われる。