



HOKKAIDO UNIVERSITY

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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 村瀬亮太

主査 教授 安斉 俊久
審査担当者 副査 教授 野田 展生
副査 教授 園下 将大

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)

心臓血管外科手術において、虚血再灌流障害は術後の心機能障害の主な原因となる。虚血再灌流障害を抑制するために多くの研究が行われてきたが、いまだ確立された方法はない。クロロキン (CQ) の投与が様々な臓器において虚血再灌流障害を抑制するという報告はあるが、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。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。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可能性がある。

審査にあたり、まず副査の野田教授より CQ 処理前後の変化を見なければ CQ のオートファジーへの影響が判断できないのではないかと質問があった。申請者は、再灌流後の心機能評価のために 60 分後の組織評価のみしか行うことができなかつたと回答した。また、学位論文のオートファジーの模式図に関して修正をすべき点について指摘を受け、申請者は、修正を行うと回答した。

次に副査の園下教授より RISK pathway のシグナルの詳細に関して最新の研究報告内容を論文に含めるよう指摘を受けた。申請者は文献的検索を行い適宜修正すると回答した。また、CQ の使用濃度に関して、75 μM と 100 μM で回復率に有意差がないのであれば、毒性の観点からより低用量である 75 μM を使用すべきではないかと指摘を受けた。申請者は、CQ の有害濃度が報告されているのが生体内の全身投与モデルであり心筋局所投与モデルの報告はないため、局所投与では十分な効果を発揮させるために用量を増やせる可能性があると考え、今回は心機能に対して最も効果のあった 100 μM を採用したと回答した。また TUNEL 染色に関する詳細な方法の記載がないとの指摘を受けた。申請者は学位論文に追記すると回答した。また ERK 阻害薬を使用して ERK リン酸化が低下するのは何故かという質問を受けた。申請者は、ERK 阻害薬として報告されている薬剤を使用して問題ないと考えていたものの、この阻害薬の作用機序の詳細について、学位論文に追記すると回答した。

次いで主査の安斉教授より CQ 使用濃度に関して 100 μM を採用した理由をやはり明示すべきで

あるとの指摘を受けた。申請者は学位論文に追記すると回答した。また CQ 投与群では有意差はないものの、冠血流量が増えているように見え、CQ が血管拡張作用などを有して心保護作用を示している可能性もあるのかという質問を受けた。申請者は、文献的には一酸化窒素 (NO) を介した血管内皮細胞保護効果もあるが、この作用に関しては本研究では検討していないため、limitation に追記すると回答した。またランゲンドルフの虚血方法に関しては、酸素送気を止めただけなのかという質問を受けた。申請者は完全に血流を遮断したモデルになると回答した。また、30 分の虚血だけではタンパク発現に影響を及ぼすには短すぎるのではないのかという質問を受けた。申請者は 40 分以上虚血にするモデルも実験は行ったが、虚血時間が延びると心機能が回復しないため検討ができなかったと回答した。

最後に各主査・副査より改めて質問および指摘があった。副査の野田教授より、園下教授の質問を踏まえ、「ERK の自己リン酸化の抑制自体が、ERK の効果を抑制しているという文献があるのであれば問題ないが、そういった文献がないのであれば ERK を介していると言い切れない可能性がある。」との助言があった。申請者は文献的に検索すると回答した。次いで副査の園下教授より、これまでの心筋における実験に比べ、今回の実験の優れている点はどこか。心機能の評価であれば、ラットの生体内実験の方がよかったのではないのかとの質問を受けた。申請者は、ラットの人工心肺モデルは、技術的に不可能であるため生体内実験はできなかったと述べ、limitation に加筆すると回答した。また、学位論文内の図の説明に関して、より詳細な情報を載せるべきという指摘を受けた。申請者は修正すると回答した。また、ERK 阻害薬は 100 nM で使用しているが、既報は同一の実験系ではないため濃度設定の実験も必要だったのではないのかとの質問を受けた。申請者は、指摘の通り 100 nM でしか検討しておらず、既報も心筋虚血再灌流モデルではないため再検討が必要であったと述べ、Limitation に加筆すると回答した。また、今回の冠動脈内への投与方法で心筋全てに薬剤が行き渡っていると考えてよいのかとの質問があった。申請者は、本実験では心尖部のみしか組織学的検討をしていないため、こちらも limitation に加えると回答した。最後に主査の安斉教授より、この実験で CQ に注目した理由は何かという質問を受けた。申請者は、元々当教室ではプレコンディショニングモデルにおけるオートファジーに注目して研究を行っていた経緯があり、以前の実験でオートファジーを阻害する目的で CQ を使用し、予想に反して心機能が回復した個体を経験し、オートファジーとは別の機序を介して CQ に心保護作用があるのではないかと考え、実験をはじめたと回答した。

本論文の成果は、CQ が心臓の短時間全虚血後の心機能低下を抑制することを示しており、今後心臓手術に応用できれば術後心不全の予防や長期成績の向上につながる可能性がある。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。