



| | |
|---------------------|---|
| 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 |
| 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 |
| DOI | https://doi.org/10.14943/doctoral.k15480 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/90067 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | MURASE_Ryota.pdf |



学位論文

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)

2023 年 3 月

北 海 道 大 学

村 瀬 亮 太

学位論文

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)

2023 年 3 月

北 海 道 大 学

村 瀬 亮 太

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 |
| 実験① | |
| 方法 | 12 頁 |
| 結果 | 16 頁 |
| 実験② | |
| 方法 | 17 頁 |
| 結果 | 22 頁 |
| 実験③ | |
| 方法 | 28 頁 |
| 結果 | 31 頁 |
| 考察 | 36 頁 |
| 結論 | 41 頁 |
| 謝辞 | 42 頁 |
| 利益相反 | 43 頁 |
| 引用文献 | 44 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. Ryota Murase, Yasushige Shingu, Satoru Wakasa.
Cardioprotective effects of chloroquine pretreatment on ischemic and reperfusion injury via activation of ERK1/2 in isolated rat hearts. *Molecular Biology Reports* 2022;49(10):9429-9436. doi: 10.1007/s11033-022-07801-7.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 村瀬亮太, 新宮康栄, 加藤伸康, 加藤裕貴, 大岡智学, 若狭哲
クロロキンの心筋虚血再灌流障害抑制効果の実験的検討
第74回日本胸部外科学会総会, 2021年11月3日・東京 (ハイブリッド開催にてwebで発表)

要旨

【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】

実験を計画するにあたり、「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抑制効果が得られる。」という仮説のもと実験を行った。CQ虚血前投与による再灌流後の心機能障害抑制効果およびその作用機序を検証するため、以下の3つの実験を行った。

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

実験動物として、10週齢の雄のSprague-Dawleyラットを使用した。ラットの心臓を摘出し、速やかにランゲンドルフ回路に接続した。摘出した心臓はKlebs-Henseleit buffer (KHB)で30分間灌流したのち、30分間の常温全虚血（37℃）とした。虚血直前に上行大動脈より冠動脈に投与した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。再灌流 60 分後の RPP の回復率は、虚血前の RPP 値に対する割合 (%) で示した。

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

ラットの心摘出およびランゲンドルフ回路への接続は実験①と同様に行った。虚血直前に上行大動脈より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。虚血再灌流において重要な RISK pathway を評価するため、AKT および extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 をウエ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 をウエ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 群でウエ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：

再灌流後の冠灌流量および心拍数の回復率に群間差を認めなかった。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, $69 \pm 7\%$; $P = .019$)。再灌流後の左室心筋組織の TUNEL 染色において, 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, $4.8 \pm 0.6\%$; $P = .044$)。ウエスタンブロッティングにおける 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 ; $P = .029$)。オートファジーのマーカーである LC3-II および p62 のタンパク発現には群間差を認めなかった。再灌流後の左室心筋組織における TNF- α の発現量には群間差を認めなかった。

実験③：

実験②において ERK1/2 が有意に活性化していたため, 選択的 ERK1/2 阻害薬を添加して作用機序の検証を行った。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, TUNEL 染色においても 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。一方, オートファジーマーカーと炎症性マーカーには差が見られなかった。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。

本研究の問題点として，心筋細胞における CQ のイオンチャネルへの影響を検討していないことが挙げられる．細胞内イオン動態を含めたさらなる研究が必要である．また 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考えられる．

略語表

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.

| | |
|-------|--|
| CQ | : chloroquine |
| ERK | : extracellular signal-regulated kinase |
| GAPDH | : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| KHB | : Krebs-Henseleit buffer |
| LC3 | : microtubule-associated light chain 3 |
| LVDP | : left ventricular developed pressure |
| p62 | : p62/SQSTM1 |
| RISK | : reperfusion injury salvage kinase |
| RPP | : rate pressure product |
| SCH | : SCH772984 (選択的 ERK 阻害薬) |
| TNF | : tumor necrosis factor |

緒言

①論文の背景

心臓血管外科領域における虚血再灌流障害の重要性

虚血再灌流障害とは、虚血状態にあった臓器や組織に血液の再灌流が起きた際に、その臓器や組織内の微小循環において種々の毒性物質の産生が惹起されて引き起こされる障害のことである (McCord, 1985)。その機序としては、細胞死や炎症反応、微小血管内皮障害などが報告されている。

多くの心臓血管外科手術は大動脈遮断により心臓が虚血となる時間があり、その後の大動脈遮断解除により虚血心筋への再灌流が起こる。よって心筋の虚血再灌流障害は大動脈遮断を要する心大血管手術において重要な問題である。長時間の大動脈遮断は術中の心筋虚血時間の延長に直結しており、実際術中の大動脈遮断時間の延長は心筋障害を招き、術後の心拍出量減少や手術死亡の増加をもたらす (Iino et al., 2017) (Doenst et al., 2008)。さらに近年は内科的治療やカテーテル治療の発展に伴い単純な外科的手術が減少したため、長時間の大動脈遮断を要する複合的な外科的手術が増加している。実際に冠動脈バイパス術単独手術に比べて、冠動脈バイパス術と弁膜症の同時手術では90分以上の大動脈遮断を要する症例が有意に多く (6% vs. 33%)、90分以上の大動脈遮断を要する症例の方が90未満の大動脈遮断時間の症例より30日手術死亡率が有意に高い (2.4% vs. 6.5%) という報告がある (Smith et al., 2006)。したがって長時間虚血を伴う手術が増えている中で、虚血再灌流障害を抑制する手段を開発できれば手術成績のさらなる向上につながる可能性がある。

薬剤による虚血再灌流障害の抑制

虚血再灌流障害を回避するために、様々な薬剤的治療戦略が報告されている (Eltzschig and Eckle, 2011)。例えば麻酔薬として広く用いられているプロポフォールは心大血管手術において、心筋の虚血再灌流障害を抑制する効果が知られている (Kato and Foex, 2002)。またニコランジルの虚血中もしくは虚血後投与も、心筋における虚血再灌流性障害抑制効果が報告されており、実臨床にも利用されている (Takarabe et al., 2007)。また、クロロキン (Chloroquine: CQ) も虚血再灌流障害抑制効果が報告されている。CQは元来、抗マラリア薬として開発された薬剤であり、最近で

は COVID-19 の治療薬としても注目を浴びた (Wang et al., 2020). 現在では膠原病に対しての薬事承認も受けている. CQ の主な作用としては, ライソソームの阻害によるオートファジーの抑制, 抗原提示の抑制, 炎症性サイトカインの抑制, イオンチャネル活性の抑制などが報告されている (Schrezenmeier and Dorner, 2020) (Sanchez-Chapula et al., 2001).

虚血再灌流障害とその抑制のための分子機構

虚血再灌流障害の抑制に関して, 以下の 3 つのメカニズムが注目されている.

1) Mitogen-activated protein (MAP) kinase (図 1)

Hausenloy らはラットの心筋虚血再灌流モデルにおいて, 再灌流後の細胞死を抑制する重要な機序として, Reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway を報告した (Hausenloy and Yellon, 2004). RISK pathway は, MEK1/2 - ERK1/2 と PI3K - AKT という 2 つのカスケードより成り立っており, 再灌流によるストレス刺激に応答してこれらのカスケードが活性化し, 細胞死の抑制効果を示すとされている.

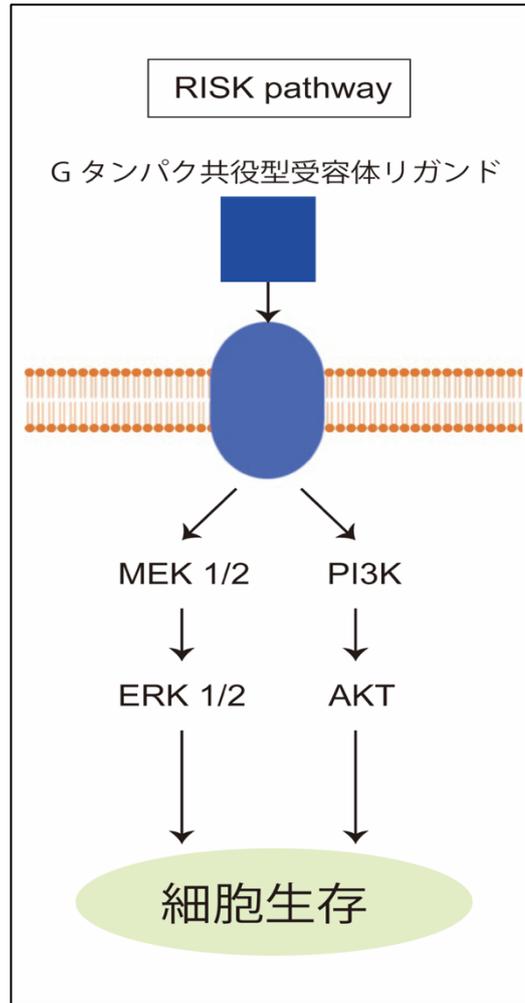


図1. Hausenloyらが提唱したRISK pathwayの概要

ERK, extracellular signal-regulated kinase ;
 MEK, mitogen-activated extracellular signal regulated
 kinase ; PI3K, phosphatidyl inositol-3 kinase ;
 RISK, reperfusion injury salvage kinase

2) オートファジー

オートファジーとは、細胞内における自食作用の一つである。細胞内の傷害されたタンパクを細胞内にある隔離膜が取り込み、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でライソソームと融合してオートファゴライソソームを形成し、最終的に内容物が分解されるという機構である（図2）。

虚血中には、オートファジーは細胞死に対して抑制的に働くことが知られている。虚血心筋細胞においては、オートファジーはエネルギー基質の利用効率を上げ、障害されたミトコンドリアを取り除き、酸化ストレスを軽減す

る。しかしながら，再灌流中のオートファジーの働きについては不明なところも多く，オートファジーが細胞死に抑制的に働くかどうかはまだ議論の余地がある (Sciarretta et al., 2018)。

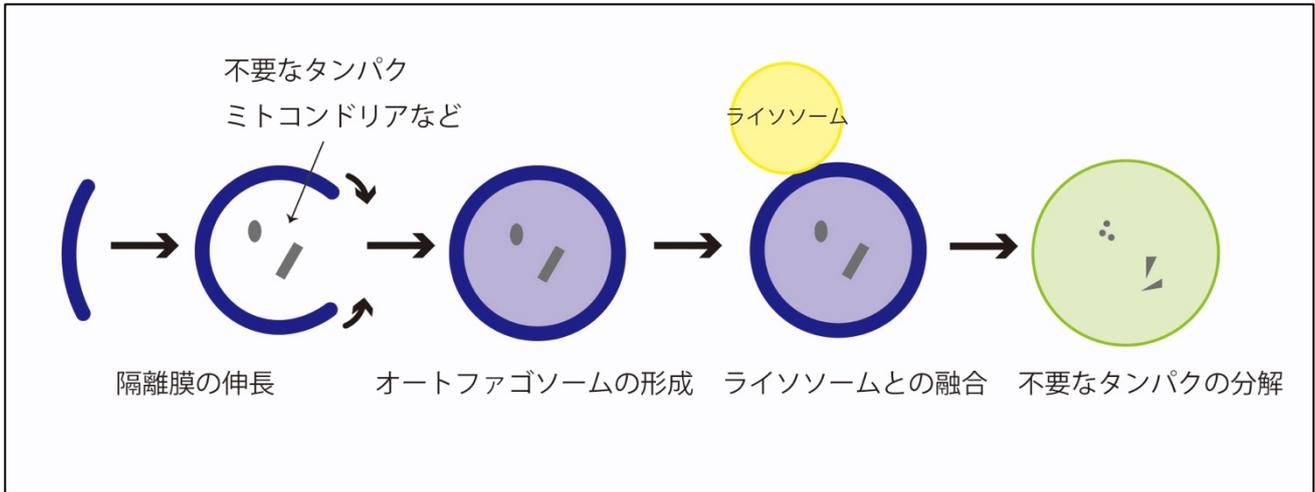


図 2. オートファジーの概要

3) 抗炎症作用

心筋虚血再灌流により惹起される炎症反応も，虚血再灌流障害の重要なメカニズムの一つである。TNF- α は心筋虚血再灌流における炎症反応のトリガーとなるタンパクである。TNF- α の上昇は炎症反応の重要な指標と考えられており，心筋虚血再灌流障害抑制のための治療ターゲットとしても注目されている (Xiong et al., 2010)。

②何がわかっていて，何がわかっていないのか

Todorovic らは，CQ の虚血前急速静注がラットの腎臓における全虚血再灌流後の血清クレアチニン値の上昇および病理学的な壊死を抑制したと報告しており，そのメカニズムとして TNF- α を介した抗炎症作用や血管内皮細胞における一酸化窒素合成酵素の刺激などを指摘した (Todorovic et al., 2014)。さらに，マウスの脳においては，3 週間前からの CQ の腹腔内投与が，片側の中大脳動脈閉塞による虚血再灌流障害を，抗炎症作用を介して抑制したと報告されている (Zhang et al., 2020)。また心臓においては，ラットにおける左前下行枝結紮による心筋梗塞モデルで，虚血前 3 日間の CQ 経口投与が，ERK1/2 活性化を介して梗塞サイズを減少したと

いう報告がある(Bourke et al., 2015). 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.

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, その機序を解明することである. この目的を達成するため, 本研究は以下の3つの実験に分けて行った.

実験①: 心臓の全虚血再灌流モデルにおいて異なる濃度の CQ を虚血前投与し, 適正な投与濃度を決定する.

実験②: 実験①で決定した濃度の CQ 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する. さらに心機能障害抑制効果の機序として RISK pathway, オートファジー, 抗炎症作用のマーカー変化を検討する.

実験③: 実験②において有意な変化を示した作用機序に対し, その選択的阻害薬を添加して心機能障害抑制効果が消失するかを検証する.

実験①

方法

目的：

ラットを用いた心筋全虚血モデルにおける CQ の投与濃度を決定する。

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. 実験動物と飼育環境管理方法

10 週齢の雄の Sprague-Dawley ラット (三共ラボサービス) (体重 300 ~ 330 g) を使用した。飼育環境は、温度 22.0 ~ 24.0 °C、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. 安楽死と心臓摘出方法

ラットの安楽死には、150 mg/kg のペントバルビタールナトリウム (ナカライテスク) の腹腔内投与を用いた。ラットの痛み刺激に対する反応が完全に消失したことを確認したのち、腹部を横切開し 1000 unit/kg のヘパリンナトリウム (持田製薬) を下大静脈に注射した。次に、胸部正中を胸骨上端まで切り上げて心臓を胸腺組織や気管と一塊に摘出した。氷冷の Krebs-Henseleit buffer (KHB) の中で余剰組織を切除し、上行大動脈を速やかにランゲンドルフ回路 (LaboSupport) (図 3) に接続した。

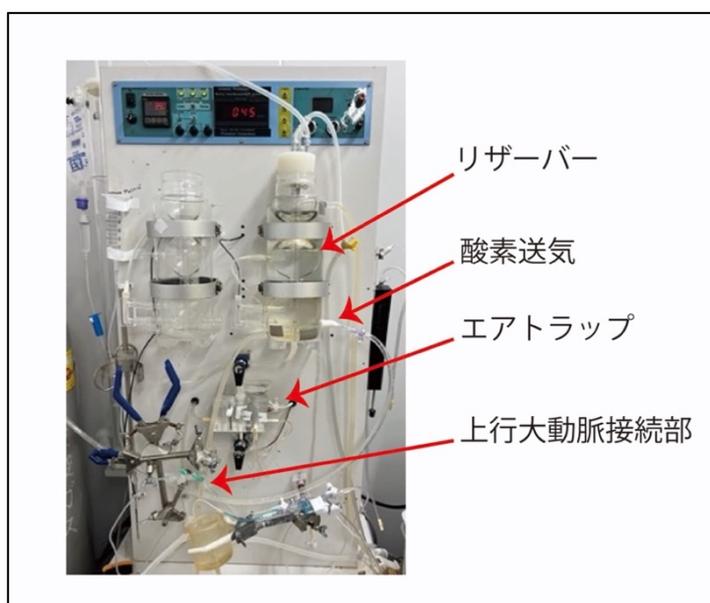


図 3. ランゲンドルフ回路

リザーバー内で酸素化された灌流液が、上行大動脈経由で冠動脈内に灌流される。

KHB の組成は以下とした：塩化ナトリウム 128 mM、塩化カリウム 5.0 mM、硫酸マグネシウム 1.3 mM、硫酸二水素カリウム 1.0 mM、塩化カルシウム 2.5 mM、炭酸ナトリウム 15 mM、D-グルコース 5.0 mM。いずれの

試薬も Sigma-Aldrich 社のものを使用した。冠動脈灌流圧は 76 mmHg で一定に保ち、KHB は混合ガス（酸素 95% + 二酸化炭素 5%）の送気により酸素化した。回路チャンバー温度は 37 °C に設定した。

3. 実験プロトコール

実験プロトコールを図 4 に示す。全ての摘出した心臓は KHB で 30 分間灌流したのち、虚血前の心機能 (baseline) を測定した。その後冠灌流を一旦停止し、上行大動脈から順行性に冠動脈へ下記の溶液を 10mL 投与した。投与終了後直ちに 30 分間の常温全虚血 (37°C) とした。

ランゲンドルフ回路による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しては既報がないため、確立された投与濃度設定はない。CQ の over dose による臨床報告によると、COVID の治療の最大用量では血中濃度は 20 μ M 程度であり、その濃度では中毒による死亡例は少ない。一方、血中濃度が 100 μ M になると中毒による死亡率が高くなるとされている (Watson et al., 2020)。そこで本実験では CQ の投与濃度は 0 μ M , 50 μ M (約 0.83 mg/kg) , 75 μ M (約 1.25 mg/kg) , 100 μ M (約 1.67 mg/kg) で検討を行うこととした。

投与した溶液により 4 群 (各群 n = 4) 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)。溶液は 37°C, pH 7.4 に調製し、60 mmHg 定圧で冠動脈へ投与した。CQ は、クロロキンニリン酸塩 (和光純薬工業) を用いた。

30 分間の全虚血後に KHB で再灌流を行い、再灌流後 60 分の時点で心機能測定を行なった。

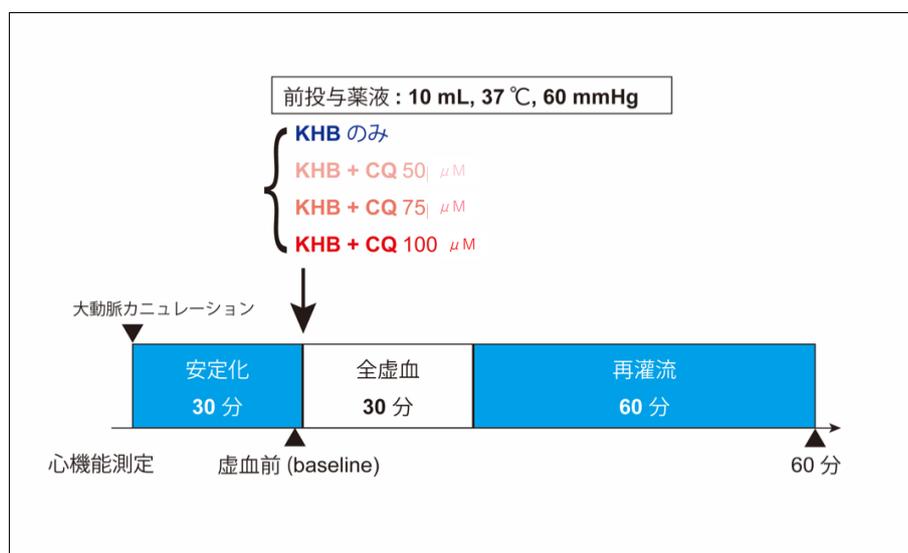


図 4. 実験①のプロトコール

CQ, chloroquine ; KHB, Klebs-Henseleit buffer.

4. 心機能測定

ランゲンドルフ回路で灌流している心臓の左心房を切開し，左心房から左心室内へラテックスバルーン（ADInstruments）付き 14G ダブルルーメンカテーテル（Argyle）を挿入して圧波形を計測した（図 5）．左心室拡張末期圧が 5～10 mmHg になるようにバルーンの拡張期圧を調整した．圧波形は PowerLab（ADInstruments）を用いて記録し，LabChart

（ADInstruments）で波形の解析を行なった．心機能評価は，心拍数と左室最大圧の積である Rate pressure product（RPP）（mmHg・bpm）を用いて評価した．

Baseline の心機能において，冠灌流量 < 8 ml/min および LVDP < 100 mmHg の個体は本研究から除外した．再灌流 60 分時点における心機能の回復率は，baseline 値に対する割合（%）で示した．

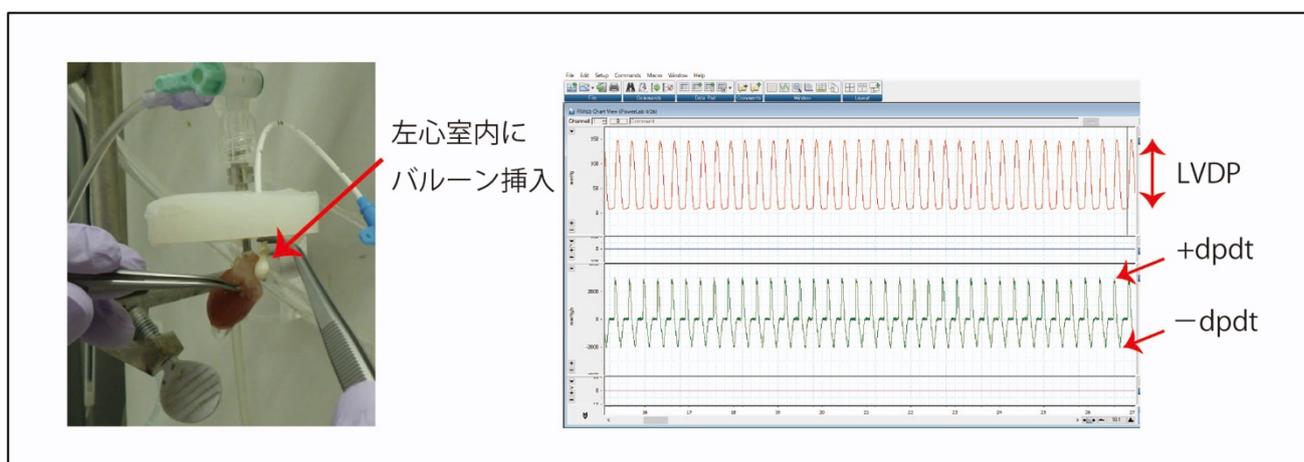


図 5. 左心室内へのバルーン挿入（左）と代表的な圧波形（右）

LVDP, left ventricular developed pressure

5. 統計解析

すべての連続変数は平均±標準誤差で示した．群間比較は one-way analysis of variance で検定し，Tukey 検定で多重比較を行なった．統計解析には GraphPad Prism（version 9.0, GraphPad Software）を用いた．

結果

各 CQ の濃度ごとの RPP の回復率を図 6 に示す. 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 $75 \mu\text{M}$ 群 ($P = .048$) および KHB + CQ $100 \mu\text{M}$ 群 ($P = .002$) において RPP 回復率が有意に KHB 群より高かった. 前述の通り既報ではヒトにおける CQ 全身投与において, 血中濃度が $100 \mu\text{M}$ 以上になると死亡例が報告されている. しかしながら本モデルのような心筋への局所投与モデルの報告はなく, 本実験では CQ の効果を調べるために最大効果が得られる濃度で検討することとした. 従って以後の実験②および実験③では, 実験①で最も高い回復率が認められた CQ の濃度である $100 \mu\text{M}$ を用いることとした.

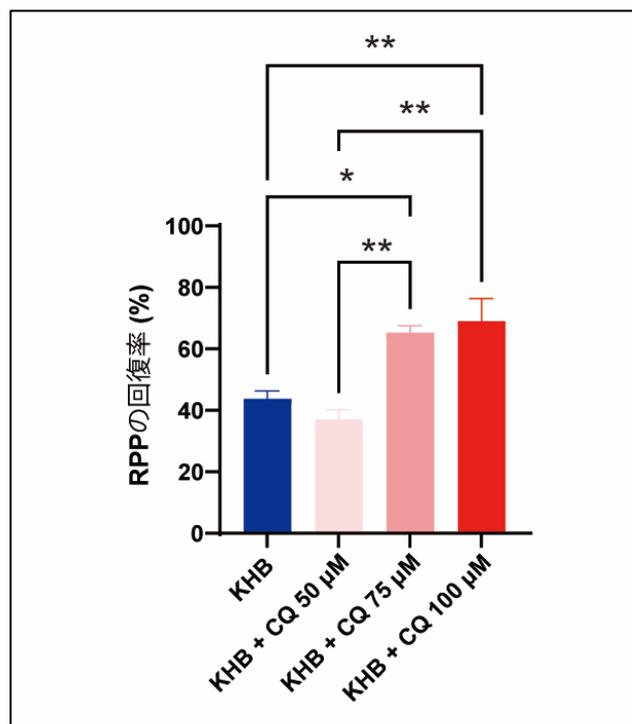


図 6 . CQ の濃度変化と RPP の回復率

CQ, chloroquine ; KHB, Klebs-Henseleit buffer

RPP, rate pressure product

* P 値 $< .05$, ** P 値 $< .01$

実験②

方法

目的：

100 μ M の CQ 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複数のパラメーターを測定して検証する．さらに心機能障害抑制効果の機序として RISK pathway，オートファジー，抗炎症作用のマーカー変化を検討する．

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. 実験動物と飼育環境管理方法

実験①と同様.

2. 安楽死と心臓摘出方法

実験①と同様.

3. 実験プロトコール

実験プロトコールを図7に示す. 全ての摘出した心臓はKHBで30分間灌流したのち, 虚血前の心機能(baseline)を測定した. その後冠灌流を一旦停止し, 上行大動脈から順行性に冠動脈へ下記の溶液を投与した. 投与終了後直ちに30分間の常温全虚血(37°C)とした. 投与した溶液により2群(各群n = 4)に分けた(KHB群: KHBのみ, KHB + CQ群: KHB + CQ 100 μM). 溶液は37°C, pH 7.4に調製し, 60 mmHg定圧で冠動脈へ投与した.

30分間の全虚血後にKHBで再灌流を行い, 再灌流後5分, 10分, 20分, 30分, 40分, 50分, 60分で心機能測定を行なった. 再灌流60分後に心臓を採取し, 心尖部を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)に保存して後日組織検査に使用した. それ以外の左室心筋は速やかに液体窒素で凍結させて-80°Cで保管し, 後日ウェスタンブロッティングとELISAに使用した.

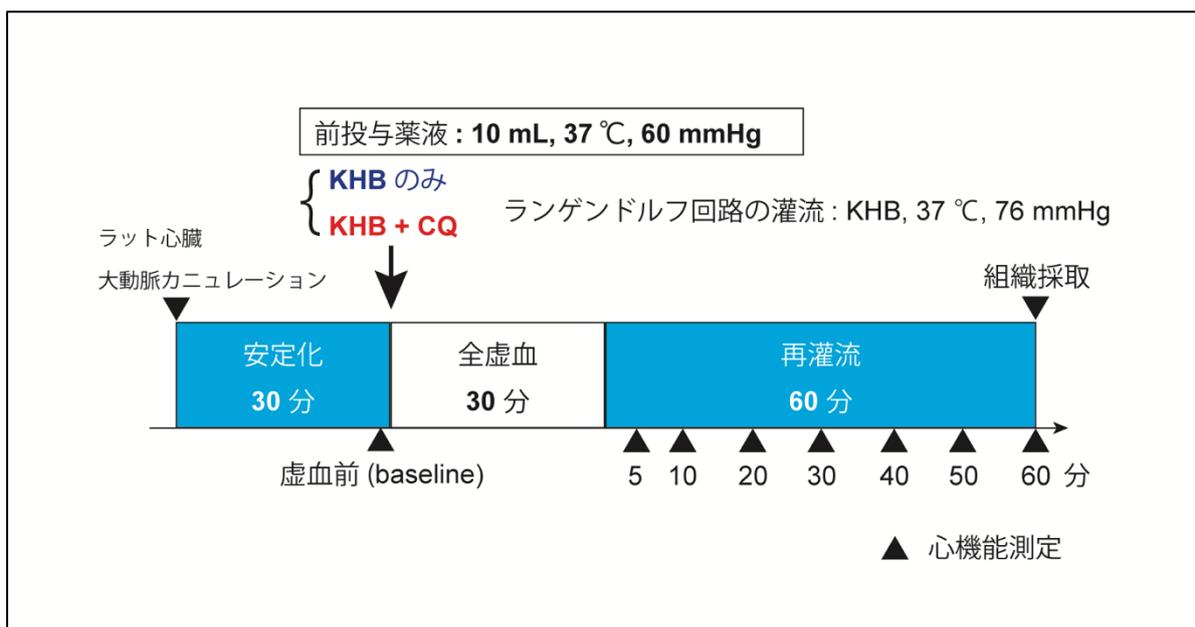


図7. 実験②のプロトコール

CQ, chloroquine; KHB, Klebs-Henseleit buffer.

4. 心機能測定

ランゲンドルフ回路で灌流している心臓の左心房を切開し、左心房から左心室内へラテックスバルーン (ADInstruments) 付き 1.4 G ダブルルーメンカテーテル (Argyle) を挿入して圧波形を計測した (実験①の図 5 参照)。左心室拡張末期圧が 5~10 mmHg になるようにバルーンの拡張期圧を調整した。圧波形は PowerLab (ADInstruments) を用いて記録し、LabChart (ADInstruments) で波形の解析を行なった。心機能評価のために測定した項目を以下に示す。

- 1) 冠灌流量 (mL/min) : 1 分間で冠静脈洞からドレナージされた灌流液の量
- 2) 心拍数 (bpm)
- 3) Left ventricular developed pressure:
LVDP (mmHg) = (左室最大圧) - (左室最小圧)
- 4) +dp/dt (mmHg/s) (左室圧一次微分最大陽性値) : 左室収縮能の指標
- 5) -dp/dt (mmHg/s) (左室圧一次微分最大陰性値) : 左室拡張能の指標
- 6) Rate pressure product:
RPP (mmHg · bpm) = (心拍数) × (左室最大圧)

Baseline の心機能において、冠灌流量 < 8 ml/min および LVDP < 100 mmHg の個体は本研究から除外した。各計測時点における心機能の回復率は、各パラメーターの baseline 値に対する割合 (%) で示した。

5. 組織学的検査

心筋のアポトーシスを評価するため、TUNEL 染色を行なった。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) で固定した左室心尖部心筋を、パラフィン包埋し、単軸方向に 5mm 厚で切り出した。切片はエタノールの濃度勾配により脱パラフィン処理と再水和を行った。切片はプロテインナーゼ K (TaKaRa) で透過処理を 15 分間行なった後、3%過酸化水素水で 5 分間、TdT buffer (TaKaRa) で 70 分間、anti-FITC horseradish peroxidase (HRP)-conjugated solution (TaKaRa) で 30 分間のインキュベーションを行なった。発色アッセイにはジアミノベンジジン (Agilent Technologies) を使用した。核の対比染色はヘマトキシリンを用いた。無作為に 10 視野を抽出し、TUNEL 陽性細胞をカウントした。TUNEL index は 1 視野内の核の総数に対する、TUNEL 陽性細胞数の割合 (%) で算出した。核のカウントは Image J software (NIH) を用いて行なった。

6. 酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA 法)

心筋の炎症反応を評価するため、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA 法) にて tumor necrosis factor (TNF)- α の定量を行なった。凍結心筋組織中の TNF- α は、ELISA キット (BioVision) を使用して定量した。TNF- α の定量値は pg/mg protein で表示した。

7. ウェスタンブロッティング

虚血再灌流に重要とされる cell survival kinase である RISK pathway には PI3K-AKT 経路および MEK1/2-ERK1/2 経路という 2 つのカスケードがあり、本実験では AKT および ERK1/2 のリン酸化をウェスタンブロッティングで測定した。

またオートファジーを評価するために、オートファゴソームのマーカである microtubule-associated light chain 3-II (LC3-II) と、p62/SQSTM1 (p62) のタンパク発現を測定した (図 8)。通常オートファジーが活性化されるとオートファゴソームが増加するため、LC3-II の発現量は増加する。また p62 はオートファゴソームにより選択的に分解され減少する (Mizushima and Levine, 2010)。CQ はライソソーム阻害によりオートファゴソームの分解を抑制するため、CQ の作用により LC3-II および p62 の増加を招く可能性があると考えた。

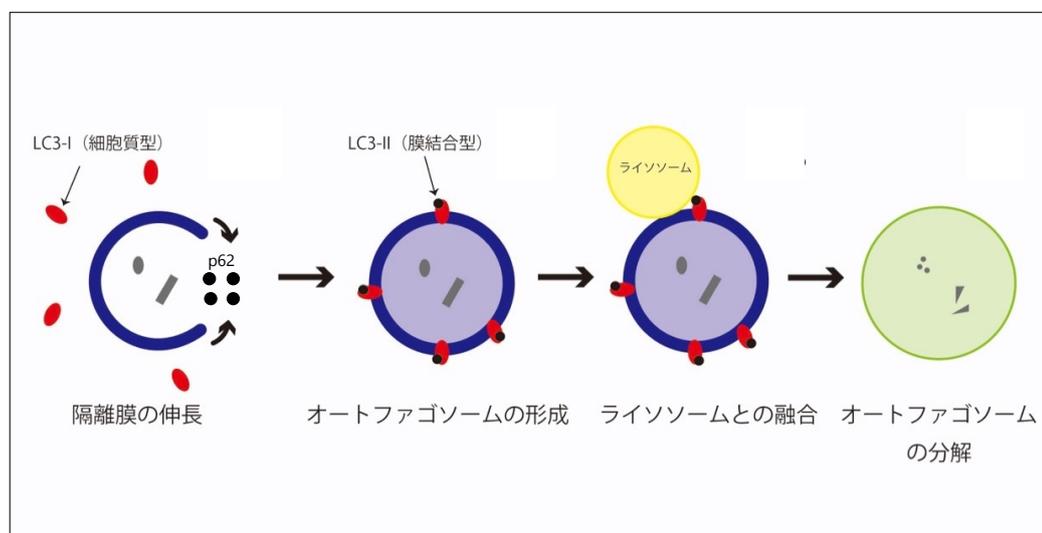


図 8. オートファジーと関連タンパク

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

電気泳動とブロッキングは、セミドライ式ウェスタンブロッキング装置である Mini-PROTEAN Tetra System (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の 10% Mini-PROTEANTGX (会社名: Bio-Rad) で電気泳動の後に、タンパクをポリビニデンジフルオリド膜 (会社名: Millipore) にブロットした。ブロッキングには ECL blocking agent (Cytiva) を用いた。一次抗体はそれぞれ Anti-LC3B (1:500; abcam), anti-p62 (1:10000; Cell Signaling), anti-ERK1/2 (1:2000; Cell Signaling), anti-pERK1/2 (Thr202/Tyr204) (1:2000; Cell Signaling), anti-AKT (1:1500; Cell Signaling), anti-pAKT (Ser473) (1:1500; Cell Signaling), anti-GAPDH (1:1000; Cell Signaling) を使用し、4°C overnight でインキュベーションした。二次抗体は Anti-rabbit IgG (1:2000; Cell Signaling) を使用し、常温で 1 時間インキュベーションした。detection reagent (Cytiva) を膜に反応させて化学発光させた。バンドは JustTLC (Sweday) を用いて定量した。バンド強度は GAPDH (Cell Signaling) の発現で補正した。

8. 統計解析

すべての連続変数は平均±標準誤差で示した。2 群間の差の検定は Student の t 検定を用いて行った。差の程度を評価するために、Cohen の d を算出した (d が 0.8 以上を効果大と判断した)。サンプルサイズ設定は、実験①の結果から、CQ による 20% の RPP 回復率変化を見込み有意水準を .05、検出力を 80 % として、G*POWER 3.1.9.3 (Heinrich Heine Universität Dusseldorf) を用いて行い、各群 $n=4$ とした。統計解析には GraphPad Prism (version 9.0, GraphPad Software) を用いた。

結果

1. 心機能パラメータ

表 1 に KH 群および KH + CQ 群の虚血前 (baseline) の心機能を示す。両群に有意差を認めなかった。

表 1. Baseline の心機能

| | KHB | KHB + CQ | P 値 |
|-------------------------------|-----------|------------|-----|
| 冠血流量 (ml/min) | 8.8 ± 0.9 | 10.1 ± 1.4 | .15 |
| 心拍数 (bpm) | 186 ± 34 | 187 ± 7.5 | .96 |
| LVDP (mmHg) | 132 ± 18 | 122 ± 12 | .38 |
| +dpdt ($\times 10^3$ mmHg/s) | 3.0 ± 0.4 | 2.6 ± 0.1 | .11 |
| -dpdt ($\times 10^3$ mmHg/s) | 2.2 ± 0.6 | 2.0 ± 0.1 | .45 |
| RPP ($\times 10^4$ mmHg/min) | 2.4 ± 0.4 | 2.3 ± 0.3 | .58 |

値 ± 標準誤差. 各群 n = 4.

CQ, chloroquine; KHB, Klebs-Heseleit buffer;

LVDP, left ventricular developed pressure;

RPP, rate pressure product

再灌流後の心機能回復率を図 9 に示す。再灌流 60 分後において、冠灌流量 (KHB, 43 ± 6% *vs.* KHB + CQ, 61 ± 10%; P = .16) および心拍数 (KHB, 67 ± 6% *vs.* KHB + CQ, 75 ± 6%; P = .37) には群間差を認めなかった。一方、LVDP (KHB, 68 ± 8% *vs.* KHB + CQ, 91 ± 3%; P = .034, *d* = 1.9), +dp/dt (KHB, 52 ± 3% *vs.* KHB + CQ, 91 ± 7%; P = .002, *d* = 3.7), -dp/dt (KHB, 47 ± 4% *vs.* KHB + CQ, 74 ± 8%; P = .019, *d* = 2.3), RPP (KHB, 44 ± 3% *vs.* KHB + CQ, 69 ± 7%; P = .019, *d* = 2.2) の回復率は、KHB + CQ 群で有意に高かった。

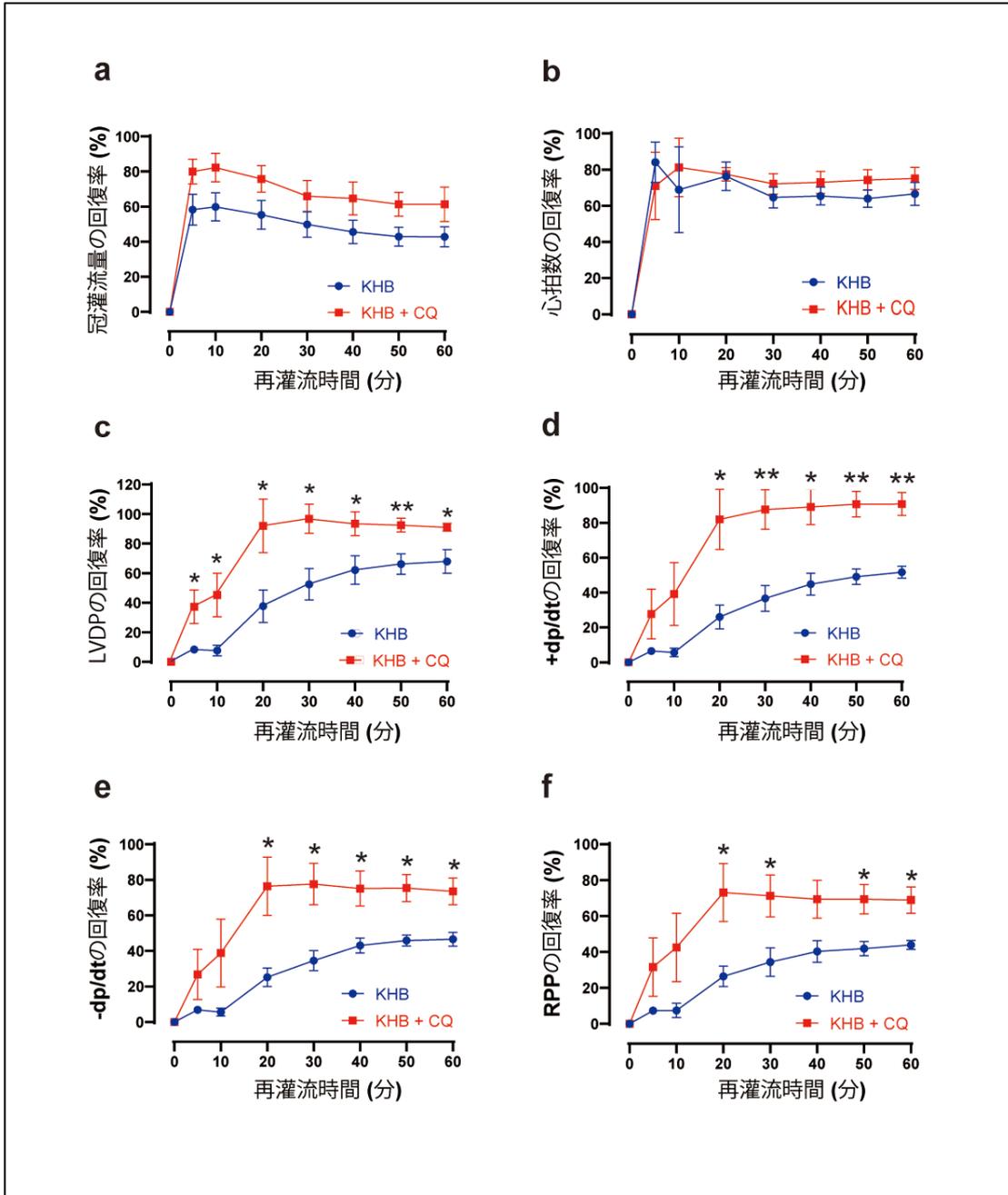


図 9. 再灌流後の心機能回復率

a. 冠灌流量, b. 心拍数, c. LVDP, d. +dp/dt, e. -dp/dt, f. RPP

CQ, chloroquine; KHB, Klebs-Henseleit buffer

LVDP, left ventricular developed pressure

RPP, rate pressure product

各群 n = 4

*P 値 < .05, **P 値 < .01 (各時点での群間比較)

2. 心筋細胞アポトーシス

再灌流後の左室心筋組織の TUNEL 染色の結果を図 10 に示す。TUNEL index は KHB + CQ 群で有意に低かった (KHB, $8.3 \pm 1.2\%$ *vs.* KHB + CQ, $4.8 \pm 0.6\%$; $P = .044$, $d = 1.8$)。

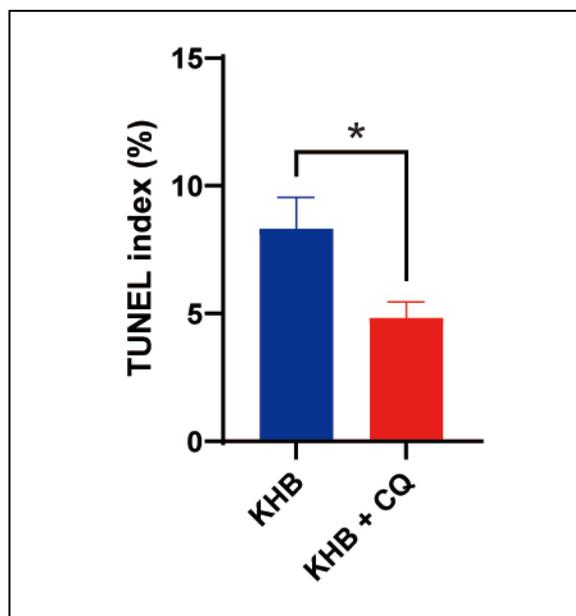


図 10. 再灌流後の左心室心筋細胞の TUNEL index
CQ, chloroquine; KHB, Klebs-Henseleit buffer
各群 $n = 4$
* P 値 < .05

3. RISK pathway (AKT, ERK1/2)

再灌流後の左室心筋組織における AKT および ERK1/2 のタンパク発現を図 11 に示す。AKT のリン酸化率には群間差が見られなかった (KHB, 0.24 ± 0.01 *vs.* KHB + CQ, 0.24 ± 0.01 ; $P = .72$)。

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 ; $P = .029$, $d = 2.0$)。以上の結果から, CQ 虚血前投与により ERK の活性化を認めた。

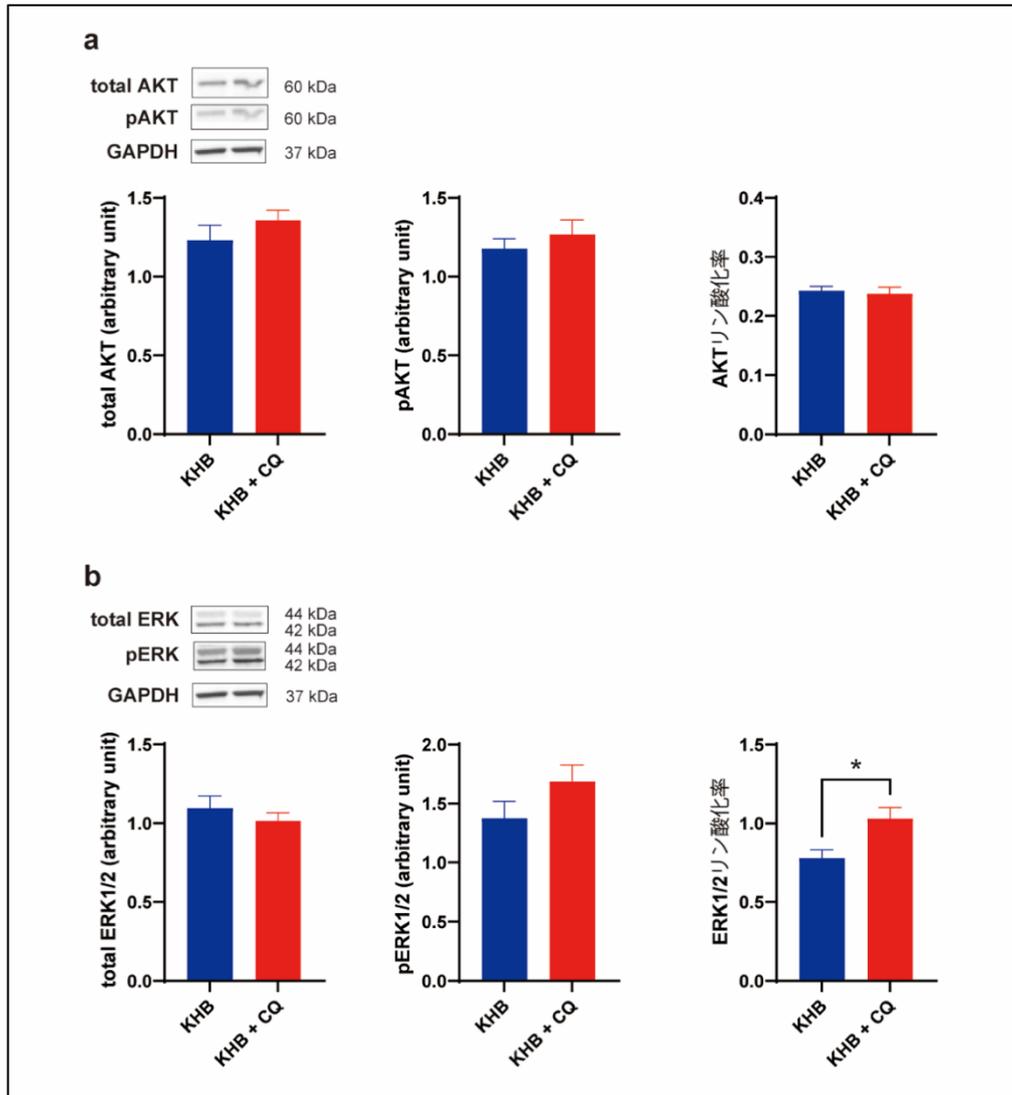


図 1 1. 再灌流後の AKT (a) および ERK (b) のタンパク発現
 CQ, chloroquine; ERK, extracellular signal-regulated
 kinase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate
 dehydrogenase; KHB, Klebs-Henseleit buffer
 各群 n = 4
 *P 値 < .05

4. オートファジーマーカー (LC3-II, p62)

再灌流後の左室心筋組織における LC3-II および p62 のタンパク発現を図 1 2 に示す. 再灌流後の LC3-II (KHB, 1.1 ± 0.1 vs. KHB + CQ, 1.1 ± 0.1 arbitrary unit; $P = .77$) および p62 (KHB, 0.18 ± 0.02 vs. KHB + CQ, 0.20 ± 0.03 arbitrary unit; $P = .54$) のタンパク発現には群間差を認めなかった.

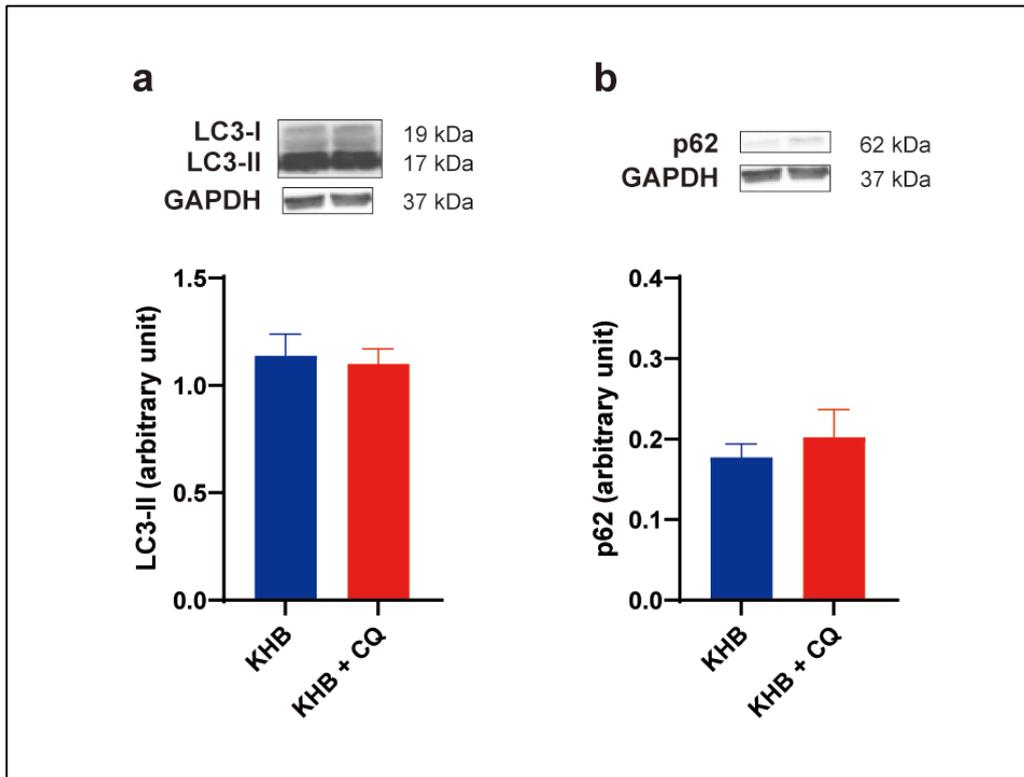


図 1 2. 再灌流後左室心筋の LC3-II (a) と p62 (b) のタンパク発現
CQ, chloroquine; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; KHB, Klebs-Henseleit buffer
LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3
各群 n = 4

5. 炎症性マーカー (TNF- α)

再灌流後の左室心筋組織における TNF- α の発現量を図 1 3 に示す. TNF- α の発現量には群間差を認めなかった (KHB, 70 ± 7 vs. KHB + CQ, 61 ± 6 pg/mg protein; $P = .32$).

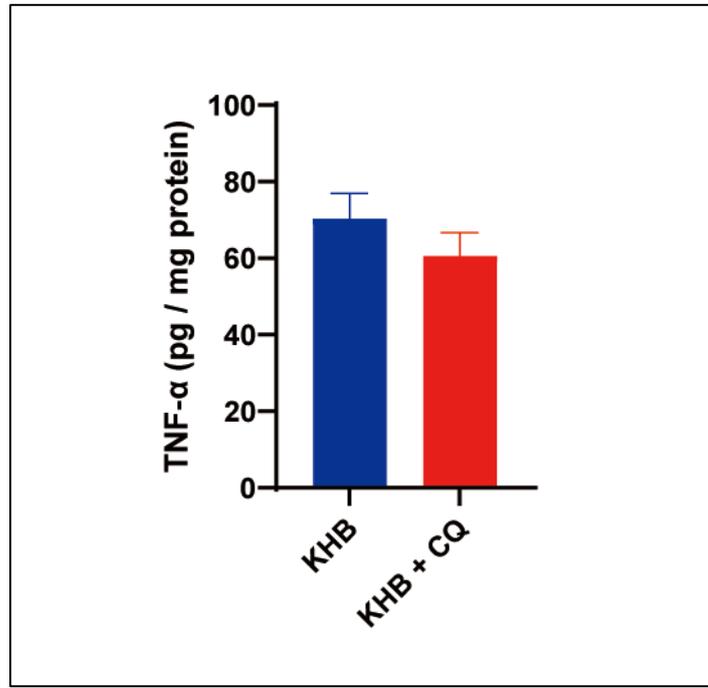


図 1 3 . 再灌流後の左室心筋の TNF- α の発現量

CQ, chloroquine ; KHB, Klebs-Henseleit buffer

TNF, tumor necrosis factor

各群 n = 4

実験③

方法

目的：

実験②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．また CQ 虚血前投与により，RISK pathway の一つである ERK1/2 が活性化していた．

この結果を踏まえて，実験③の目的は CQ の虚血前投与による虚血再灌流後の心機能障害抑制効果が，ERK1/2 の活性化に依存しているかどうかを検証することとした．

仮説：

CQ に選択的 ERK 阻害薬（SCH772984）を添加することにより，CQ による虚血再灌流後の心機能障害抑制効果が消失する．

1. 実験動物と飼育環境管理方法

実験①と同様

2. 安楽死と心臓摘出方法

実験①と同様

3. 実験プロトコール

図14に実験プロトコールを示す。実験③ではKHBおよびKHB + CQのそれぞれに選択的ERK阻害薬であるSCH772984を添加した、KHB + SCH群：KHB + 100nM SCH772984およびKHB + CQ + SCH群：KHB + CQ 100 μ M + 100nM SCH772984の2群で同様に追加実験を4例ずつ行い、実験②の2群とともに4群で再灌流60分後の心機能を比較した。

ランゲンドルフの灌流および心機能測定は実験②と同様に行った。SCH772984(Cayman Chemical)の濃度設定は、ChaikuadらのSCH772984によるERK抑制効果の文献に基づいて100 nMとした(Chaikuad et al., 2014)。再灌流60分後に心臓を採取し、心尖部を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)に保存して後日組織検査に使用した。それ以外の左室心筋は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に使用した。

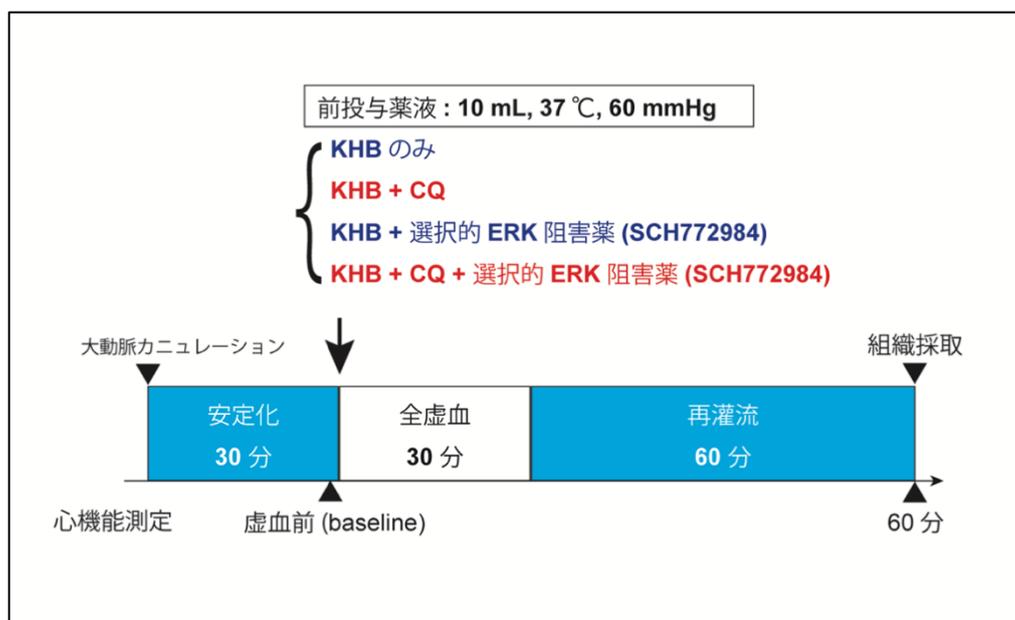


図14. 実験②のプロトコール

CQ, chloroquine; ERK, extracellular signal-regulated kinase; KHB, Klebs-Henseleit buffer.

4. 組織学的検査

実験②と同様に KHB + SCH 群および KHB + CQ + SCH 群の 2 群で TUNEL 染色を行い、TUNEL 陽性細胞率を実験②の 2 群とともに計 4 群で比較した。

5. ウェスタンブロッティング

実験②で凍結保存していた左室心筋も用いて改めて 4 群でタンパク定量を行い、ウェスタンブロッティングを行った。実験③では ERK1/2 のタンパク発現のみをウェスタンブロッティングで定量した。

6. 統計解析

すべての連続変数は平均±標準誤差で示した。群間比較は two-way analysis of variance で検定し、CQ と SCH772984 の交互作用に有意差を認めた場合には、4 群それぞれが独立した水準であるにとらえ、Tukey 検定で多重比較を行なった。さらに差の程度を評価するために、 η^2 を算出した (η^2 が .14 以上を効果大と判断した)。統計解析には GraphPad Prism (version 9.0, GraphPad Software) を用いた。

結果

1. 選択的 ERK1/2 阻害薬の ERK1/2 タンパク発現に対する影響

再灌流後の左室心筋組織における ERK1/2 のタンパク発現を図 15 に示す。ERK1/2 の総発現量 (total ERK1/2) は 4 群で差を認めなかった。一方、ERK1/2 のリン酸化率は、KHB + CQ 群に比べ KHB + CQ + SCH 群で有意に小さかった (KHB + CQ, 3.19 ± 1.70 vs. KHB + CQ + SCH, 0.66 ± 0.11 ; $P = .014$)。KHB 群と KHB + SCH 群では、リン酸化率に差を認めなかった (KHB, 1.36 ± 0.44 vs. KHB + SCH, 1.57 ± 0.82 ; $P = .99$)。

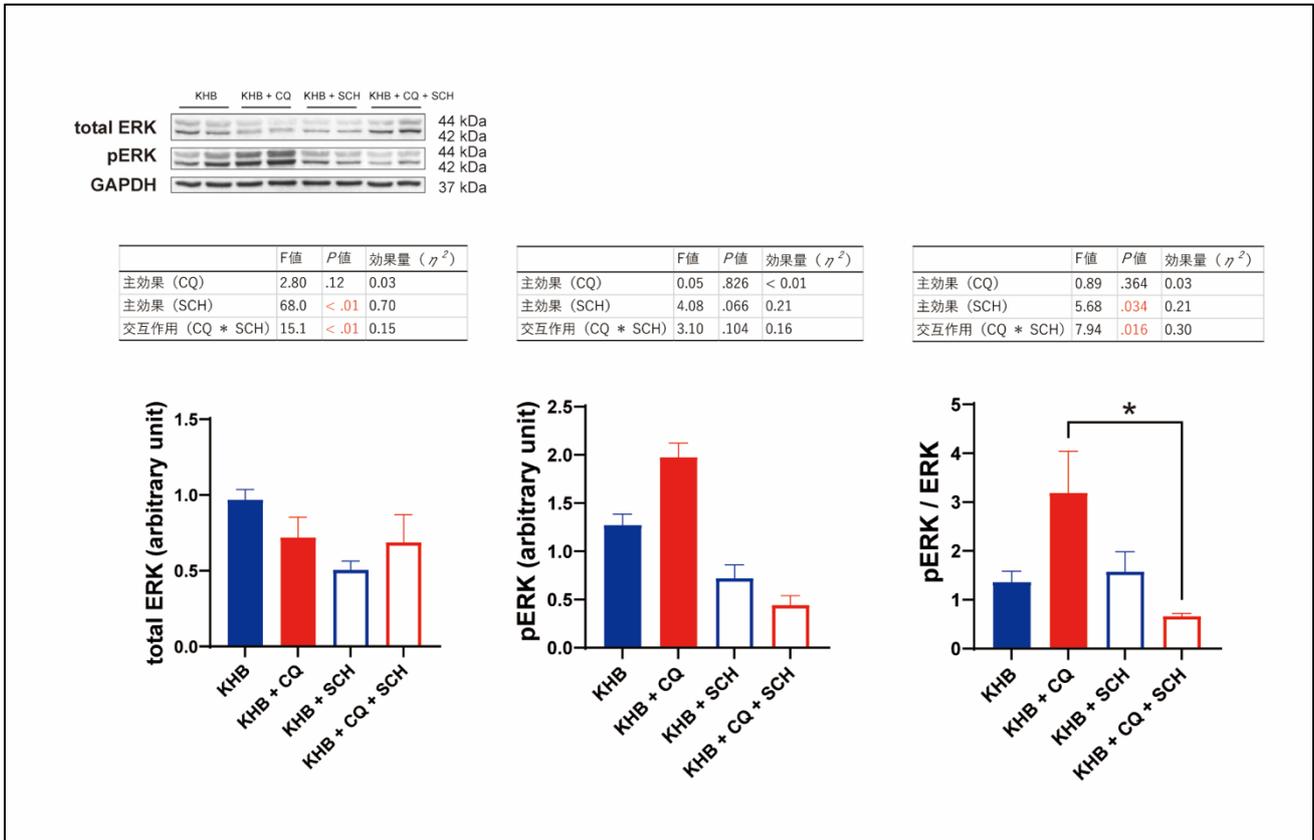


図 15. 選択的 ERK1/2 阻害剤による ERK1/2 タンパク発現の変化

CQ, chloroquine ; ERK, extracellular signal-regulated kinase ; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; KHB, Klebs-Henseleit buffer ; SCH, SCH772984 (選択的 ERK1/2 阻害薬) .

各群 n = 4, *P 値 < .05

2. 心機能パラメータ

表2にKH群, KH + CQ群, KH + SCH群, KH + CQ + SCH群の虚血前 (baseline) の心機能を示す. 各群の baseline の心機能に差を認めなかった.

表2. Baseline 心機能

| | KHB | KHB + CQ | KHB + SCH | KHB + CQ + SCH | P 値 |
|-------------------------------------|-----------|------------|-----------|----------------|-----|
| 冠血流量 (ml/min) | 8.8 ± 0.9 | 10.1 ± 1.4 | 7.5 ± 1.3 | 9.5 ± 3.7 | .38 |
| 心拍数 (bpm) | 186 ± 34 | 187 ± 7.5 | 181 ± 20 | 199 ± 21 | .72 |
| LVDP (mmHg) | 132 ± 18 | 122 ± 12 | 151 ± 23 | 134 ± 26 | .31 |
| + dpdt (×10 ³ mmHg/s) | 3.0 ± 0.4 | 2.6 ± 0.1 | 3.2 ± 0.4 | 2.8 ± 0.6 | .32 |
| - dpdt (×10 ³ mmHg/s) | 2.2 ± 0.6 | 2.0 ± 0.1 | 2.2 ± 0.3 | 2.1 ± 0.5 | .75 |
| RPP (×10 ⁴ mmHg/min) | 2.4 ± 0.4 | 2.3 ± 0.3 | 2.7 ± 0.3 | 2.7 ± 0.7 | .52 |

値 ± 標準誤差. 各群 n=4.

CQ, chloroquine; KHB, Klebs-Heseleit buffer;

LVDP, left ventricular developed pressure;

RPP, rate pressure product; SCH, SCH772984 (選択的 ERK1/2 阻害薬).

再灌流 60 分後の心機能回復率を図 1 6 に示す。冠灌流量および心拍数は 4 群間で有意な差を認めなかった。LVDP は実験②との統計手法の違いにより KHB 群と KHB + CQ 群の有意差が消失したが、KHB + CQ + SCH 群では KH + CQ 群より有意に LVDP が低値であった (KHB + CQ, $91 \pm 3\%$ *vs.* KHB + CQ + SCH, $44 \pm 8\%$; $P = .002$)。+dp/dt は KHB + CQ 群で KHB 群より有意に高く (KHB, $52 \pm 3\%$ *vs.* KHB + CQ, $91 \pm 7\%$; $P = .001$)、KHB + CQ + SCH 群では KH + CQ 群より有意に低値であった (KHB + CQ, $91 \pm 7\%$ *vs.* KHB + CQ + SCH, $34 \pm 1\%$; $P < .001$)。-dp/dt は KHB + CQ 群で KHB 群より有意に高く (KHB, $47 \pm 4\%$ *vs.* KHB + CQ, $74 \pm 8\%$; $P = .016$)、KHB + CQ + SCH 群では KH + CQ 群より有意に低値であった (KHB + CQ, $74 \pm 8\%$ *vs.* KHB + CQ + SCH, $30 \pm 1\%$; $P < .001$)。RPP は KHB + CQ 群で KHB 群より有意に高く (KHB, $44 \pm 3\%$ *vs.* KHB + CQ, $69 \pm 7\%$; $P = .008$)、KHB + CQ + SCH 群では KH + CQ 群より有意に低値であった (KHB + CQ, $69 \pm 7\%$ *vs.* KHB + CQ + SCH, $42 \pm 5\%$; $P < .001$)。すべてのパラメータにおいて、KHB+ SCH 群と KHB + CQ+ SCH 群に有意差を認めなかった。

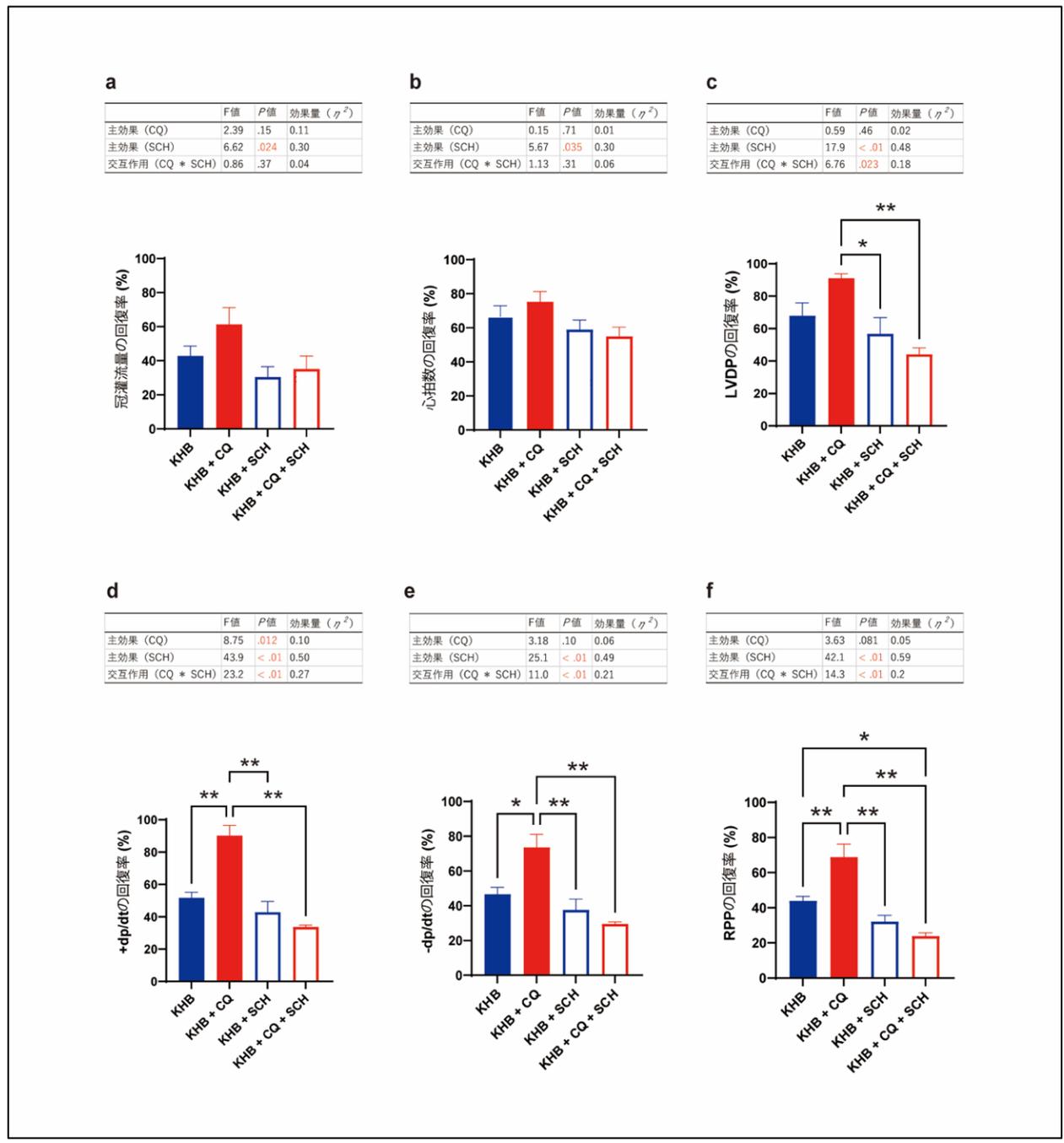


図16. 再灌流60分後の心機能回復率

a. 冠灌流量, b. 心拍数, c. LVDP, d. +dp/dt, e. -dp/dt, f. RPP

CQ, chloroquine; KHB, Klebs-Henseleit buffer

LVDP, left ventricular developed pressure

RPP, rate pressure product; SCH, SCH772984 (選択的 ERK1/2 阻害薬)

各群 n = 4

*P値 < .05, **P値 < .01

3. 心筋アポトーシス

再灌流後の心筋組織の TUNEL 染色の結果を図 17 に示す。TUNEL 陽性細胞率は実験②との統計手法の違いにより KHB 群と KHB + CQ 群の有意差が消失したが、KHB + CQ + SCH 群は KHB + CQ 群より有意に TUNEL 陽性細胞率が高かった (KHB + CQ, $4.8 \pm 0.6\%$ vs. KHB + CQ + SCH, $8.8 \pm 1.0\%$; $P = .0495$)。

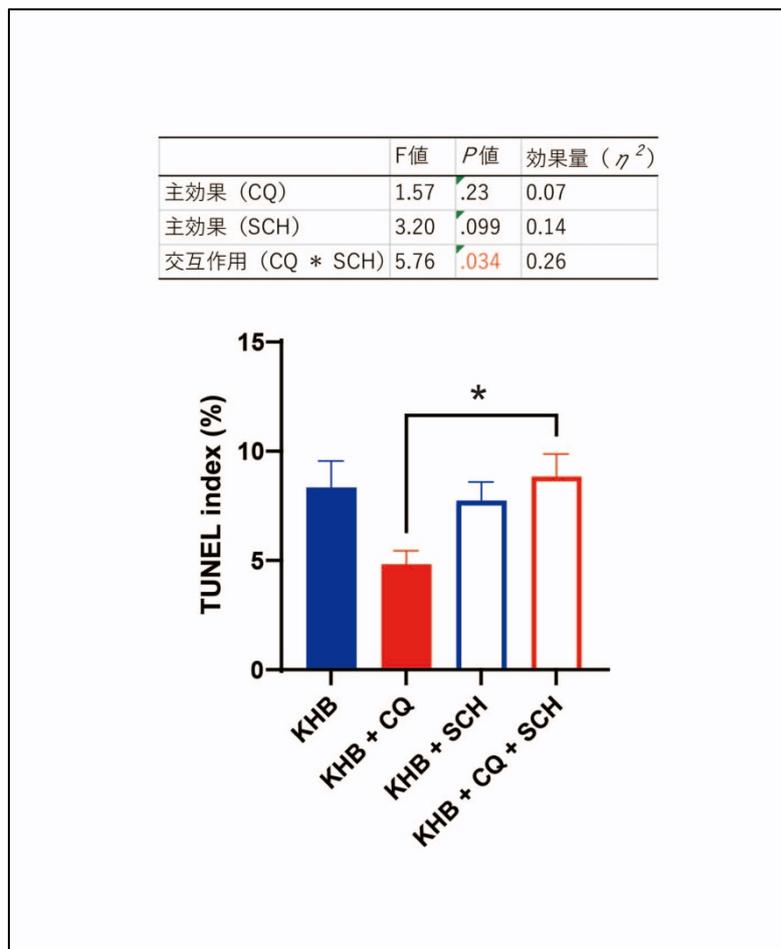


図 17. CQ と ERK 阻害薬の TUNEL index に対する影響
CQ, chloroquine ; KHB, Klebs-Henseleit buffer
SCH, SCH772984 (選択的 ERK1/2 阻害薬)

各群 $n = 4$

* P 値 $< .05$,

考察

1. 本研究で得られた新知見

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。

2. 新知見に至った根拠

1) CQ 虚血前投与による虚血再灌流障害抑制効果

実験②において、KHB + CQ 投与群では KHB 群に比べ、再灌流後の LVDP, +dp/dt, -dp/dt, RPP の回復率が有意に高かった。さらに、再灌流後の左室心筋組織の TUNEL 染色では、KHB + CQ 群で有意に TUNEL 陽性細胞数が少なく、CQ 虚血前投与によるアポトーシス抑制効果が示唆された。以上の結果から、ラットの心臓における 30 分間の全虚血モデルにおいて、CQ の虚血前投与により再灌流障害抑制効果が得られたと考えられた。

2) CQ の心機能障害抑制効果の機序 (ERK1/2 の活性化)

実験②において、KHB + CQ 投与群では KHB 群に比べ、ERK1/2 の活性が有意に高かった。さらに実験③において、KHB + CQ + SCH 群では KHB + CQ 群に比べ、ERK1/2 リン酸化率の抑制を認めると同時に、CQ 投与による再灌流後の心機能障害抑制効果が消失した。以上の結果から、CQ 虚血前投与による再灌流後の心機能障害抑制効果は、ERK1/2 の活性化を介していると考えられた。

3. 文献的考察

1) ERK1/2 活性化による虚血再灌流障害抑制効果

虚血再灌流に対する cell survival に関与する重要なカスケードとして RISK pathway が知られている。RISK pathway は、MEK1/2 - ERK1/2 と PI3K - AKT という 2 つのカスケードより成り立っている (Hausenloy and Yellon, 2004)。ERK1/2 と AKT は mitogen-activated protein (MAP) kinase の一種であり、チロシンキナーゼと G タンパク共役型受容体の相互作用に反応して細胞生存と細胞分化を調整しているタンパクである (Widmann et al., 1999)。

ERK1/2 が虚血再灌流障害において心保護効果を示すという報告がいくつかある。ラットの心臓の間欠的低酸素プレコンディショニングモデルでは、ERK1/2 活性化を介した梗塞サイズの減少を認めた一方、AKT の活性化は認めなかった (Beguín et al., 2007)。これは本研究と同様の結果である。また、ラットにおける *in vivo* の心筋梗塞モデルにおいて、虚血前 3 日間の経口投与による CQ プレコンディショニングが、ERK1/2 活性化を介して梗塞サイズを減少したという報告もある (Bourke et al., 2015)。これは本研究と類似した研究であるが、いくつかの相違点もある。1つ目の相違点は実験モデルである。Bourke らの実験は冠動脈左前下行枝結紮による梗塞モデルであり、全虚血再灌流モデルではない。2つ目の相違点は CQ の投与方法である。Bourke らの実験では虚血前 3 日前からの経口投与したのに対し、我々の実験では虚血直前に上行大動脈から冠動脈に直接注入した。これは、心臓の外科的治療や心臓移植における心筋保護液や保存液の投与方法に則したものである。3つ目の相違点は再灌流後の心機能評価の有無である。Bourke らの実験では心筋梗塞サイズのみの評価であり、心機能測定は行われていない。4つ目の相違点は ERK1/2 阻害薬の種類である。Bourke らの実験では ERK1/2 の上流である MEK1/2 の阻害薬を使用している。一方、我々は ERK1/2 の選択的阻害薬である SCH772984 を使用したため、直接的な ERK1/2 の関与を証明できたと考える。

2) ERK1/2 活性化とアポトーシス

ERK1/2 が心保護効果を示す機序は未だ明らかではないが、アポトーシスと関連した報告がある。Baxter らは、ラットの心筋細胞の低酸素モデルにおいて、Transforming growth factor $\beta 1$ が ERK1/2 の活性化を介して心筋細胞のアポトーシスを抑制したと報告している (Baxter et al., 2001)。我々の実験においても、KHB + CQ 群では KHB 群に比べて心筋細胞のアポトーシスが有意に少なかった。また CQ によるアポトーシス抑制効果は、選択的 ERK 阻害薬の添加により打ち消された。つまり、CQ 虚血前投与による再灌流後のアポトーシス抑制効果には、ERK1/2 が関与していたと言える。本研究では左心室心尖部の切片のみでアポトーシスの評価を行なっているため、今回の投与方法で心筋全体にわたって同様の変化が起きているかは検討していない。これに関しては今後の検討を要する。

3) CQ 虚血前投与の再灌流後の炎症性マーカーへの影響

CQ は抗炎症作用をもつため、CQ 虚血前投与が再灌流後の炎症性マーカーを低下させる可能性がある。マウスの心筋細胞において、CQ 投与が様々なサイトカイン産生を減らし、TNF- α の抑制による抗炎症作用を示すという報告がある (Thome et al., 2013)。我々の研究において CQ 虚血前投与は、虚血再灌流後の炎症性マーカー (TNF- α) に影響を与えなかった。これには全身投与と局所投与の違いや、in vivo と ex vivo の実験モデルの違いなどが影響していると考えられる。また、30 分間の虚血時間が、炎症性マーカーに影響を与えるには不十分であった可能性も考えられる。しかしながら予備実験において、虚血時間を延長すると心機能の回復が十分に得られず、心機能評価ができなかったため本実験では虚血時間を 30 分と設定した。

4) ERK1/2 リン酸化に対するオートファジーの関与

オートファゴソームマーカーである LC3-II の増加が ERK1/2 のリン酸化を促進するという報告がある (Martinez-Lopez et al., 2013)。CQ はオートファゴソームとライソソームの融合を阻害するため、オートファジー阻害薬として知られている。一般的にオートファジーが阻害されるとライソソームと融合できないオートファゴソームが細胞内に貯留するため、LC3-II は増加する。一方、肝細胞を用いた研究では増加した LC3-II が足場となって、ERK1/2 のリン酸化を促進することが報告されている (Martinez-Lopez et al., 2013)。我々の実験②では CQ 虚血前投与により ERK1/2 のリン酸化率は増加したが、LC3-II のタンパク発現は増加していなかった。従って、我々の実験モデルでは ERK1/2 リン酸化にオートファジーは関与していないと考えられる。しかしながら今回の実験では心機能測定を行う必要があったため、再灌流 60 分後の検体でのみしかオートファジーマーカーの評価をしていない。CQ 投与直後や虚血直後などの別の時点で評価するとオートファジーマーカーが変動している可能性があるため、今後さらなる検討が必要である。

5) ERK1/2 選択的阻害薬(SCH772984)の効果と機序

本実験では ERK1/2 の活性を抑制する目的で SCH772984(Cayman Chemical)を用いた。ERK1/2 のリン酸化はヌクレオポリンのリン酸化を介して ERK1/2 の核移行を誘導し、核内での転写因子の活性化に役立っている。SCH772984 は ERK1/2 に特異的に結合し、そのリン酸化を阻害する薬剤(Chaikuad *et al.*, 2014)であるため、ERK1/2 リン酸化の構造的な抑制を介して、ERK1/2 の活性を選択的に阻害する薬剤と考えられる。SCH772984 の濃度設定に関しては、Chaikuad らの SCH772984 による ERK 抑制効果の文献に基づいて 100 nM とした(Chaikuad *et al.*, 2014)。本実験の結果では ERK1/2 リン酸化の抑制効果が得られたが、本実験のような心筋虚血再灌流における心臓への局所投与モデルにおいて SCH772984 が使用された報告はないため、適正な濃度検討のためのさらなる追加実験は検討が必要である。

4. 本研究の問題点

1) CQ の各種イオンチャネルへの影響

本研究では、心筋細胞における CQ のイオンチャネルへの影響を検討していない。CQ は内向き整流性カリウムチャネル、ナトリウムチャネル、L 型カルシウムチャネルなど、さまざまなイオンチャネルを阻害することが報告されている (Sanchez-Chapula *et al.*, 2001)。これらのイオンチャネルへの影響は、カルシウム過負荷などによる再灌流障害の抑制に関与しうる。細胞内イオン動態を含めたさらなる研究が必要である。

2) CQ の血管内皮への影響

CQ は一酸化窒素合成を介した血管内皮細胞保護効果もあるとの報告がある (Ghigo *et al.*, 1998)。実際に本実験②の心機能測定結果でも、CQ 投与群において冠灌流量の増加傾向がみられた。有意差が見られなかったため冠動脈の血管内皮に対する CQ の影響について追加実験をしなかったが、今後の検討課題である。

3) 臨床応用にむけての課題 (CQ 投与による副作用)

CQ は自己免疫性疾患を有する患者に対して使用されており、長期投与による QT 延長症候群や致死性不整脈 (White, 2007)、網膜症 (Marmor *et al.*, 2016) 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。我々の実験は CQ 単回投与であるため、長期投与で報告されているような副作用が出現するかどうかは不明であり、実臨床に応用するためには *in vivo* モデルでのさらなる研究が必要である。しかしながら *in vivo* での実験には人工心肺装置などが必要となるため、実験系の確立にはまだ技術的な課題も多い。

結論

1. 本研究で得られた新知見

- ・ラットの心筋全虚血モデルにおいて，CQ 虚血前投与は再灌流後の心機能障害を抑制する．
- ・CQ 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．

2. 本研究で得られた新知見の意義

本研究では，ラット心筋全虚血モデルにおいて，CQ を虚血前に投与することにより再灌流後の心機能障害抑制効果が得られ，CQ の効果は 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考えられる．

3. 新知見から今後どのような研究が展開されうるか．

CQ を虚血再灌流障害抑制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) 虚血再灌流障害における CQ のカルシウム過負荷に対する影響の研究
- 2) 大動物を含めた in vivo モデルにおける CQ の虚血再灌流後心機能障害抑制効果に関する研究
- 3) 臨床における CQ の適正な投与量や心毒性に関する研究

4. 今後の課題

本研究はランゲンドルフ回路を用いたラットの心臓虚血再灌流モデルであるが，臨床応用を見据えた大動物を含めての in vivo モデルでのさらなる検証が必要である．

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 心臓血管外科学教室 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 心臓血管外科学教室 新宮康栄講師に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり，技術的な補助を賜りました株式会社 札幌総合病理研究所，北海道大学病院 東亮太医師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心臓血管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

Baxter, G.F., Mocanu, M.M., Brar, B.K., Latchman, D.S., and Yellon, D.M. (2001). Cardioprotective effects of transforming growth factor-beta1 during early reoxygenation or reperfusion are mediated by p42/p44 MAPK. *J Cardiovasc Pharmacol* 38, 930-939. 10.1097/00005344-200112000-00015.

Beguin, P.C., Belaidi, E., Godin-Ribuot, D., Levy, P., and Ribuot, C. (2007). Intermittent hypoxia-induced delayed cardioprotection is mediated by PKC and triggered by p38 MAP kinase and Erk1/2. *J Mol Cell Cardiol* 42, 343-351. 10.1016/j.yjmcc.2006.11.008.

Bourke, L., McCormick, J., Taylor, V., Pericleous, C., Blanchet, B., Costedoat-Chalumeau, N., Stuckey, D., Lythgoe, M.F., Stephanou, A., and Ioannou, Y. (2015). Hydroxychloroquine Protects against Cardiac Ischaemia/Reperfusion Injury In Vivo via Enhancement of ERK1/2 Phosphorylation. *PLoS One* 10, e0143771. 10.1371/journal.pone.0143771.

Chaikuad, A., Tacconi, E.M., Zimmer, J., Liang, Y., Gray, N.S., Tarsounas, M., and Knapp, S. (2014). A unique inhibitor binding site in ERK1/2 is associated with slow binding kinetics. *Nat Chem Biol* 10, 853-860. 10.1038/nchembio.1629.

Doenst, T., Borger, M.A., Weisel, R.D., Yau, T.M., Maganti, M., and Rao, V. (2008). Relation between aortic cross-clamp time and mortality--not as straightforward as expected. *Eur J Cardiothorac Surg* 33, 660-665. 10.1016/j.ejcts.2008.01.001.

Eltzschig, H.K., and Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med* 17, 1391-1401. 10.1038/nm.2507.

Ghigo, D., Aldieri, E., Todde, R., Costamagna, C., Garbarino, G., Pescarmona, G., and Bosia, A. (1998). Chloroquine stimulates nitric oxide synthesis in murine, porcine, and human endothelial cells. *J Clin Invest* 102, 595-605. 10.1172/JCI1052.

Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2004). New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 61, 448-460. 10.1016/j.cardiores.2003.09.024.

Iino, K., Miyata, H., Motomura, N., Watanabe, G., Tomita, S., Takemura, H., and Takamoto, S. (2017). Prolonged Cross-Clamping During Aortic Valve Replacement Is an Independent Predictor of Postoperative Morbidity and Mortality: Analysis of the Japan Cardiovascular Surgery Database. *Ann Thorac Surg* 103, 602-609. 10.1016/j.athoracsur.2016.06.060.

Kato, R., and Foex, P. (2002). Myocardial protection by anesthetic agents against ischemia-reperfusion injury: an update for anesthesiologists. *Can J Anaesth* 49, 777-791. 10.1007/BF03017409.

Marmor, M.F., Kellner, U., Lai, T.Y., Melles, R.B., Mieler, W.F., and American Academy of, O. (2016). Recommendations on Screening for Chloroquine and Hydroxychloroquine Retinopathy (2016 Revision). *Ophthalmology* 123, 1386-1394. 10.1016/j.opthta.2016.01.058.

Martinez-Lopez, N., Athonvarangkul, D., Mishall, P., Sahu, S., and Singh, R. (2013). Autophagy proteins regulate ERK phosphorylation. *Nat Commun* 4, 2799. 10.1038/ncomms3799.

McCord, J.M. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312, 159-163. 10.1056/NEJM198501173120305.

Mizushima, N., and Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol* 12, 823-830. 10.1038/ncb0910-823.

Sanchez-Chapula, J.A., Salinas-Stefanon, E., Torres-Jacome, J., Benavides-Haro, D.E., and Navarro-Polanco, R.A. (2001). Blockade of currents by the antimalarial drug chloroquine in feline ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 297, 437-445.

Schrezenmeier, E., and Dorner, T. (2020). Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology. *Nat Rev Rheumatol* *16*, 155-166. 10.1038/s41584-020-0372-x.

Sciarretta, S., Maejima, Y., Zablocki, D., and Sadoshima, J. (2018). The Role of Autophagy in the Heart. *Annu Rev Physiol* *80*, 1-26. 10.1146/annurev-physiol-021317-121427.

Smith, P.K., Carrier, M., Chen, J.C., Haverich, A., Levy, J.H., Menasche, P., Shernan, S.K., Van de Werf, F., Adams, P.X., Todaro, T.G., and Verrier, E. (2006). Effect of pexelizumab in coronary artery bypass graft surgery with extended aortic cross-clamp time. *Ann Thorac Surg* *82*, 781-788; discussion 788-789. 10.1016/j.athoracsur.2006.02.024.

Takarabe, K., Okazaki, Y., Higuchi, S., Murayama, J., Natsuaki, M., and Itoh, T. (2007). Nicorandil attenuates reperfusion injury after long cardioplegic arrest. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* *15*, 204-209. 10.1177/021849230701500306.

Thome, R., Moraes, A.S., Bombeiro, A.L., Farias Ados, S., Francelin, C., da Costa, T.A., Di Gangi, R., dos Santos, L.M., de Oliveira, A.L., and Verinaud, L. (2013). Chloroquine treatment enhances regulatory T cells and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* *8*, e65913. 10.1371/journal.pone.0065913.

Todorovic, Z., Medic, B., Basta-Jovanovic, G., Radojevic Skodric, S., Stojanovic, R., Rovcanin, B., and Prostran, M. (2014). Acute pretreatment with chloroquine attenuates renal I/R injury in rats. *PLoS One* *9*, e92673. 10.1371/journal.pone.0092673.

Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., Shi, Z., Hu, Z., Zhong, W., and Xiao, G. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res* *30*, 269-271. 10.1038/s41422-020-0282-0.

Watson, J.A., Tarning, J., Hoglund, R.M., Baud, F.J., Megarbane, B., Clemessy, J.L., and White, N.J. (2020). Concentration-dependent mortality of chloroquine in overdose. *Elife* 9. 10.7554/eLife.58631.

White, N.J. (2007). Cardiotoxicity of antimalarial drugs. *Lancet Infect Dis* 7, 549-558. 10.1016/S1473-3099(07)70187-1.

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-180. 10.1152/physrev.1999.79.1.143.

Xiong, J., Xue, F.S., Yuan, Y.J., Wang, Q., Liao, X., and Wang, W.L. (2010). Cholinergic anti-inflammatory pathway: a possible approach to protect against myocardial ischemia reperfusion injury. *Chin Med J (Engl)* 123, 2720-2726.

Zhang, Y.P., Cui, Q.Y., Zhang, T.M., Yi, Y., Nie, J.J., Xie, G.H., and Wu, J.H. (2020). Chloroquine pretreatment attenuates ischemia-reperfusion injury in the brain of ob/ob diabetic mice as well as wildtype mice. *Brain Res* 1726, 146518. 10.1016/j.brainres.2019.146518.