HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ラット心臓虚血再灌流障害モデルにおけるトレハロース・プレコンディショニングの心機能および内皮機能に対する保護効果の検討［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	須野, 賢一郎
Description	配架番号：2866
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16057号
Issue Date	2024-06-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92778
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SUNO_Kenichiro_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　須野　賢一郎

学 位 論 文 題 名

ラット心臓虚血再灌流障害モデルにおけるトレハロース・プレコンディショニングの
心機能および内皮機能に対する保護効果の検討
(Protective effects of trehalose preconditioning on cardiac and endothelial function
in a rat model of ischemia-reperfusion injury)

【背景と目的】

虚血再灌流(I/R)障害とは，虚血状態にあった臓器に血液が再灌流された際に惹起される障害であり，一般的な心臓手術において周術期死亡や合併症に関連する重要な因子として認識されている．また，心臓移植では保存液を用いた冷却保存により通常よりも長い虚血時間が許容されるが，同様にI/R障害が移植後死亡率に関連するとされている．心臓手術の成績は近年著しく向上し，本邦の心臓移植の成績は世界的に見ても優れているが，I/R障害に対する心筋保護戦略を改善することで心臓手術や移植のさらなる成績向上が期待される．I/R障害には，酸化ストレス，アポトーシス，オートファジーなど，多くのメカニズムが関与する．I/R障害を軽減するために，虚血前に薬剤を投与する薬剤プレコンディショニングという方法が知られているが，これまで実用化には至っていない．

トレハロース（TRE）は，オートファジー誘導剤としても知られる天然の二糖類である．TREは，熱，凍結，乾燥，脱水，酸化などの様々なストレス条件に対して細胞保護的な役割を果たす．また，TREは，内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）を活性化し，内皮機能障害を改善することが示されている．しかしながら，これまでI/R後の内皮機能障害に対するTREの効果は検討されておらず，eNOSやオートファジーの役割も不明である．

本研究の目的は，ラット摘出心モデルにおいて，I/R障害に対するTREの心機能および内皮機能への影響を評価し，それらの効果におけるeNOSやオートファジーの関与を明らかにすることである．

【対象と方法】

実験を計画するにあたり，「ラット心筋全虚血モデルにおいて，TREプレコンディショニングにより再灌流後の心機能および内皮機能保護効果が得られる．」という仮説のもと，以下の３つの実験を行った．
実験①：常温全虚血再灌流モデル(梗塞心筋モデル)を作製し，TREが再灌流後の心機能および内皮機能保護効果を有するかを検討した．さらにその機序として，酸化ストレス，アポトーシス，オートファジー，血管内皮機能のマーカー変化について検討した．

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，ランゲンドルフ回路に接続し，Klebs-Henseleit buffer（KHB)で20分間灌流したのち，30分間のプレコンディショニングを行った(CON群：KHBのみ，TRE群：KHB ＋ 2% TRE)．再灌流中は心機能および内皮機能パラメータとしてrate pressure product（RPP)，冠灌流量の回復率を測定した．再灌流80分後の心臓を採取し，心筋の酸化ストレスおよびアポトーシスを評価のため，4-HNE免疫染色およびTUNEL染色を行った．さらに，eNOS活性とオートファジー活性の評価のため，eNOSの二量体化と，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．

実験②：TRE の心機能および内皮機能保護効果に対する eNOS やオートファジーの関与を検討した.

eNOS およびオートファジーに対するそれぞれの阻害薬［NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), クロロキン二リン酸塩(CQ)］を使用し, 再灌流後の心機能および心筋の酸化ストレスやアポトーシスを再評価し, H&E 染色で血管周囲の浮腫を評価した.

実験③：冷却全虚血再灌流モデル(心臓冷却保存モデル)を作製し, TRE が冷却保存後の心機能および内皮機能保護効果を有するかを検討した.

実験①と同様に, ラットの心臓をランゲンドルフ回路に接続し, 30 分間のプレコンディショニングを行った（Celsior 群：KHB のみ, TRE 群：KHB ＋ 2% TRE). Celsior 液を冠注し心停止を得た後に一旦回路から心臓を取り外し, 両群とも氷冷した Celsior 液で 16 時間保存した. その後再び回路に心臓を取り付け, KHB で再灌流を行い, 実験①と同様に心機能パラメータの回復率を測定した. 再灌流 60 分後の心臓を採取し, triphenyltetrazolium chloride(TTC)染色を行った.

【結果】

実験①：再灌流後の冠灌流量, RPP の回復率は, いずれも TRE 群で有意に高かった：冠灌流量(CON, 35 ± 10% vs. TRE, 55 ± 9%; P = .025), RPP (CON, 28 ± 6% vs. TRE, 46 ± 9%; P = .017). 心筋組織の 4-HNE 陽性領域は TRE 群で有意に低く(CON, 12.0 ± 2.7% vs. TRE, 5.6 ± 1.6%; P = .011), TUNEL 陽性細胞率は TRE 群で有意に低かった(CON, 57 ± 7% vs. TRE, 21 ± 11%; P = .004). eNOS の二量体化は TRE 群で有意に高かった(CON, 1.28 ± 0.09 vs. TRE, 1.56 ± 0.09 a.u.; P = .023). LC3-Ⅱの発現量は TRE 群で有意に高かった(CON, 0.62 ± 0.06 vs. TRE, 0.81 ± 0.03 a.u.; P = .032)が, p62 の発現量に群間差を認めなかった.

実験②：L-NAME の添加により, TRE 群で上昇した冠灌流量, RPP は低下し CON 群と同等となった. また, TRE 群の 4-HNE 陽性領域は, L-NAME の添加により増加し CON 群と同等となったが, TUNEL 陽性細胞率は変化しなかった. さらに, TRE 群で減少した血管周囲浮腫は, L-NAME の添加により増加し CON 群と同等となった. 一方, CQ の添加により, TRE 群で上昇した冠灌流量, RPP はいずれも変化しなかった.

実験③：再灌流後の冠灌流量の回復率に群間差を認めなかった. 再灌流後の RPP の回復率は TRE 群で高い傾向にあり(Celsior, 37 ± 4% vs. TRE, 50 ± 5%; P = .078), 心筋梗塞領域は TRE 群で有意に低かった(Celsior, 46 ± 4% vs. TRE, 15 ± 5%; P < .001).

【考察】

これまでの研究では, eNOS 活性が, 心不全, 心房細動, 高血圧, 動脈硬化などの多くの心臓血管疾患と関連していることが報告されている. 本研究は, 常温虚血再灌流において, TRE が eNOS 活性を促進し, I/R 後の冠血流の維持と血管周囲浮腫を減弱させ, 心筋の酸化ストレスとアポトーシスを抑制し, 心機能障害を抑制することを明らかにした. eNOS 阻害によってこの保護効果の大部分が消失したことから, eNOS は TRE プレコンディショニングに重要な役割を担っていると考えられた. 一方, オートファジーの関与については今後さらなる検討が必要である. さらに, 心臓冷却保存においても, TRE が心筋の壊死を抑制し, 心機能障害を抑制することを明らかにしたが, 内皮機能保護効果は認めなかった.

【結論】

ラットの心筋全虚血モデルにおいて, TRE プレコンディショニングにより再灌流後の心機能および内皮機能保護効果が得られた. その効果には, 常温虚血においては eNOS の活性化が重要な役割を担っていたが, 冷却虚血においては別の機序の関与が推察された. この研究結果は, 一般的な心臓手術や心臓移植における新たな心筋保護法の開発へつながる可能性がある.