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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16057
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92779
Type	doctoral thesis
File Information	SUNO_Kenichiro.pdf, この論文の全文

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

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)

2024 年 6 月

北海道大学

須野　賢一郎

学位論文

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)

2024 年 6 月

北海道大学

須野　賢一郎

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

実験①

方法 …… 12 頁

結果 …… 19 頁

実験②

方法 …… 27 頁

結果 …… 31 頁

実験③

方法 …… 37 頁

結果 …… 41 頁

考察 …… 44 頁

結論 …… 49 頁

謝辞 …… 50 頁

利益相反…… 51 頁

引用文献 …… 52 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. Kenichiro Suno, Yasushige Shingu, Satoru Wakasa.
   Protective effects of trehalose preconditioning on cardiac and coronary endothelial function through eNOS signaling pathway in a rat model of ischemia-reperfusion injury. Molecular Cellular Biochemistry (2022). https://doi.org/10.1007/s11010-022-04451-y.

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. 須野賢一郎, 新宮康栄, 若狭哲
   Cardioprotective effect of trehalose in ischemia-reperfusion model of isolated rat heart
   第 51 回日本心臓血管外科学会学術総会, 2021 年 2 月 19 日・京都
2. 須野賢一郎, 新宮康栄, 若狭哲
   Protective effects of trehalose preconditioning on cardiac and coronary endothelial function through eNOS signaling pathway in a rat model of ischemia-reperfusion injury
   第 75 回日本胸部外科学会学術総会, 2022 年 10 月 6 日・横浜

要旨

【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の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，同様に虚血時間の延長に伴う 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，これまで実用化されるには至っていない．

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ている，一部の生物や植物に見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 後の冠動脈内皮機能に対する 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は未だ解明されていない．

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障害抑制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障害抑制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，組織学的検査およびウエスタンブロッティング法に使用した．心筋の酸化ストレスおよびアポトーシスを評価するため，4-HNE 免疫染色および TUNEL 染色を行った．さらに，eNOS 活性を評価するため，eNOS の二量体化を，オートファジー活性を評価するため，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 の心機能障害抑制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．

実験①において TRE 群で変化していた eNOS およびオートファジーに対するそれぞれの阻害薬［N^G-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，さらに 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障害抑制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 液を冠注し速やかに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 で再灌流を行った．再灌流中は実験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). また, 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). 一方, 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. 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 群で高い傾向にあった(Celsior, 37 ± 4% vs. TRE, 50 ± 5%; P = .078). 再灌流後の心筋組織の梗塞領域は 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障害抑制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.

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.

AMPK	: AMP-activated protein kinase
a.u.	: arbitrary unit
CON	: control
CQ	: chloroquine
eNOS	: endothelial nitric oxide synthase
ERK	: extracellular signal-regulated kinase
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H&E	: hematoxylin and eosin
I/R	: ischemia-reperfusion
KHB	: Krebs-Henseleit buffer
LC3	: microtubule-associated light chain 3
L-NAME	: N^G-nitro-L-arginine methyl ester
LVDP	: left ventricular developed pressure
NO	: nitric oxide
p62	: p62/SQSTM1
ROS	: reactive oxygen species
RPP	: rate pressure product
TNF	: tumor necrosis factor
TUNEL	: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling
TRE	: trehalose
TTC	: triphenyl tetrazolium chloride
4-HNE	: 4-hydroxynonenal

緒言

①論文の背景

心臓外科領域における虚血再灌流障害の重要性

虚血再灌流(ischemia-reperfusion: I/R)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る障害のことである(McCord, 1985). 心筋 I/R 障害は障害の程度により可逆性と不可逆性に分類され，可逆性の障害には，不整脈，浮腫，血管機能障害，心収縮不全があり，不可逆性の障害には，心筋壊死とアポトーシスがある(Dobson et al., 2013). 虚血時間が 20 分未満では可逆的な障害，すなわち，再灌流中に緩徐ではあるが完全に回復する収縮障害が生じ，これはいわゆる気絶心筋と呼ばれる状態である. 一方，虚血時間が 20～40 分以上持続する場合，梗塞がまず心内膜下層で発生し，その後時間の経過とともに心外膜下層に広がっていく(Heusch, 2016).

心臓手術では，周術期の虚血と再灌流は，人工心肺装着下での大動脈遮断による心停止や遮断解除による心拍再開，あるいは心筋梗塞のような急性虚血状態に対する手術など，通常の手術中に発生する. 1972 年には，Cooley らが，虚血後の再灌流を制御しないことによる有害な影響に関する初期の報告として，I/R 障害の極端な形態である ″ストーンハート ″を報告しているが(Cooley et al., 1972)，1990 年代以前は I/R 障害の臨床的意義は懐疑的なところが多かった. しかしながら，この 30 年間で，I/R 障害は心臓手術患者の死亡率と術後合併症の重大な要因であることが認識されるようになった(Beyersdorf, 2009). 長時間の大動脈遮断は術中の心筋虚血時間の延長を来たし，術後の心拍出量減少や手術死亡の増加をもたらす(Doenst et al., 2008).

さらに，我が国で 1999 年に臓器移植法に基づき開始された心臓移植においても，I/R 障害は重要な課題である. 心臓移植では，ドナー心は一般的に氷冷した臓器保護液を用いて搬送しているが，冷却保存中の虚血タイムリミットは約 4 時間と他の臓器にくらべ極端に短く(Khush et al., 2020)，搬送地の制限やコスト増が問題となっている. 特に北海道では，関西以南からの臓器搬送には地理的な困難があり，また冬季には天候の影響から虚血タイムリミットを超えることがしばしばあり，レシピエントの生存率への悪影響が懸念される. したがって，I/R 障害を抑制する臓器保存法を開発できれば，心臓移植成績のさらなる向上につながる可能性がある.

虚血再灌流障害に対する治療戦略

以前より急性心筋梗塞症例にて発症に先行して短い狭心発作が存在した例では急性期経過および遠隔期・心臓運動機能予後が比較的良好なことが経験的に知られ,「Warm up 現象」と呼ばれていた(Kloner and Jennings, 2001). この現象が 1986 年に Murry らによって急性心筋梗塞の in vivo 動物モデルで始めて実験的に報告され，短時間の虚血イベントの先行により，引き続く長時間の虚血・再灌流に伴う障害が抑制される現象として「虚血プレコンディショニング」という概念が提唱された(Murry et al., 1986). しかしながら，心臓手術における虚血プレコンディショニングの付加的心筋保護効果はいまだ確立されておらず，また複数回の大動脈遮断により組織損傷や塞栓症というリスクを伴うため,心臓手術への応用は限られている(Heusch, 2013).

一方，虚血前に薬剤を使用する「薬剤プレコンディショニング」は基礎研究において以前から多くの報告があり(Wu et al., 2021)，複数回の大動脈遮断を必要としない簡便な方法であり，将来的な心臓手術への応用が期待されているが，こちらもまだ実用化されるには至っていない. 臨床応用がうまくいかない理由のひとつとして，多くの研究が心筋細胞に焦点を当て，他の種類の細胞を軽視してきたという事実に関係していると考えられる(Hausenloy et al., 2019). 血管内皮細胞はそのような細胞の一つであり，細胞間の保護バリアとして機能するだけでなく，冠血流，炎症反応，心筋機能の調節にも寄与している(Singhal et al., 2010). そこでわれわれは，I/R に対する薬剤プレコンディショニングの標的として冠動脈内皮細胞に着目した.

トレハロース(trehalose: TRE)は，2 つの D-グルコース分子からなる非還元性二糖類であり(図 1)，ユニークな物理的・化学的性質を持ち，細菌，酵母，植物，昆虫などの自然界に広く存在する. TRE は多くの生物学メカニズムにおいて重要であり，非常に強力な生体防御物質であり，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(Hosseinpour-Moghaddam et al., 2018). また天然のオートファジー誘導物質としても知られている. これまでの研究で，TRE は心筋リモデリング，高血圧，心不全，脳卒中，動脈硬化などの多くの心血管疾患に保護的に作用することが示されている(Zahedi et al., 2023). また，TRE は内皮型一酸化窒素合成酵素（endothelial nitric oxide synthase: eNOS）を活性化することでにより，加齢や金属毒性による内皮機能障害を抑制することが示されている(Kumar et al., 2021; Larocca et al., 2012). したがって，TRE が心筋細胞および冠動脈内皮細胞の I/R 障害を抑制する薬剤となる可能性がある.

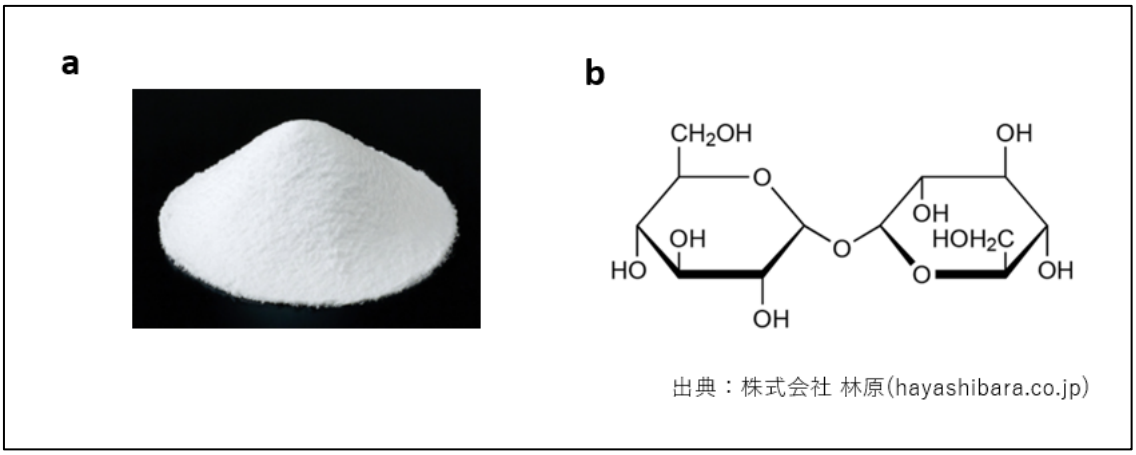

図１．トレハロースの外観(a)と構造式(b)

虚血再灌流障害とその抑制のための分子機構

I/R 障害は，酸化ストレス，アポトーシス，オートファジー，炎症を含む多くのメカニズムが関与する複雑なプロセスである(Wu et al., 2018)．また，血管内皮機能には eNOS が重要な役割を果たす(Förstermann and Sessa, 2012a)．

１）酸化ストレス

酸化ストレスは，I/R 障害などの様々な原因により，活性酸素の産生が過剰となり，それを消去する抗酸化能とのバランスが崩れた状態である．酸化ストレスによって生体膜，生体内分子の酸化傷害に起因した臓器障害が進行し，多くの疾病の発症，増悪の原因となることが知られている(Münzel et al., 2017)(図２)．

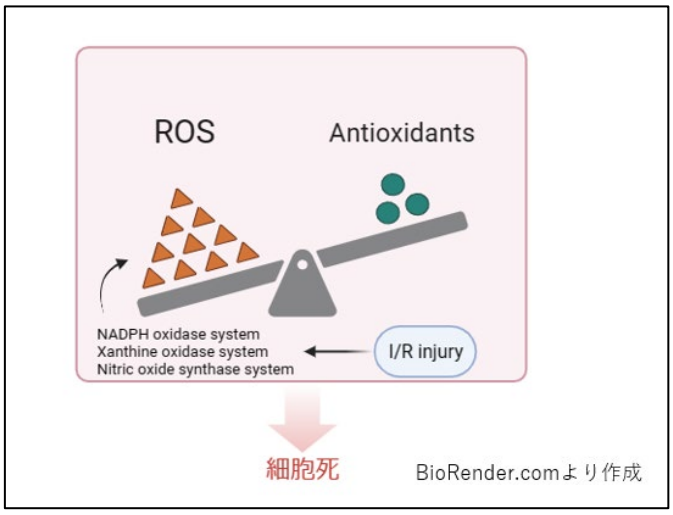

図２．酸化ストレスの概要

ROS, reactive oxygen species；I/R, ischemia-reperfusion

２）アポトーシス

アポトーシスは，プログラム細胞死の最も一般的な形態であり，様々な物理的，化学的，および生物学的因子を介して誘発される．アポトーシスシグナル伝達はカスパーゼカスケードで調整される(図３)．

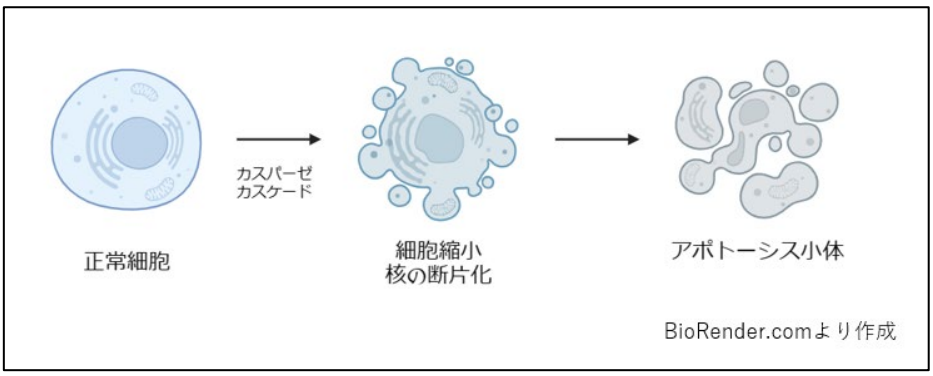

図３．アポトーシスの概要

３）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，ライソソームと融合することで最終的に内容物が分解される(図４)．虚血中におけるオートファジーはエネルギー基質の利用効率を上げ，酸化ストレスを軽減する(Delbridge et al., 2017)．

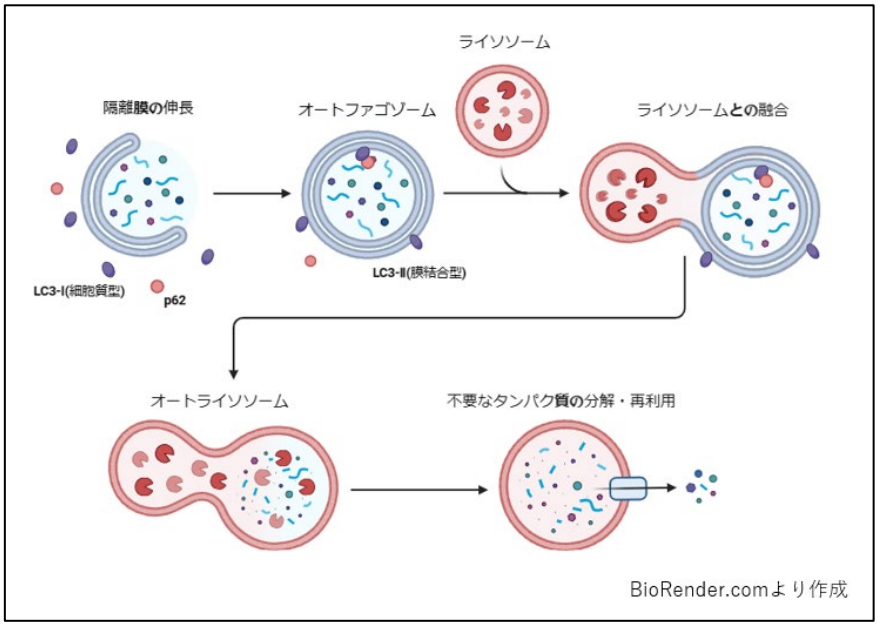

図４．オートファジーの概要

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

４）抗炎症作用

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．tumor necrosis factor(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り，重要な指標と考えられている(Meldrum, 1998)．

５）血管内皮機能

血管内皮は血管の内側表面に並んだ単層の扁平細胞からなり，内皮機能に重要な役割を担う酵素である eNOS を高発現している．eNOS の活性化には二量体化(coupling)が必要であり，eNOS から産生される一酸化窒素(nitric oxide: NO)は，血管弛緩，細胞増殖，接着分子発現などの調節に重要な役割を果たす．また，酸化ストレス時には単量体(uncoupling)となり，スーパーオキシド等の活性酸素種を産生し，多くの心血管疾患の病態に関与している(Daiber et al., 2019)(図５)．

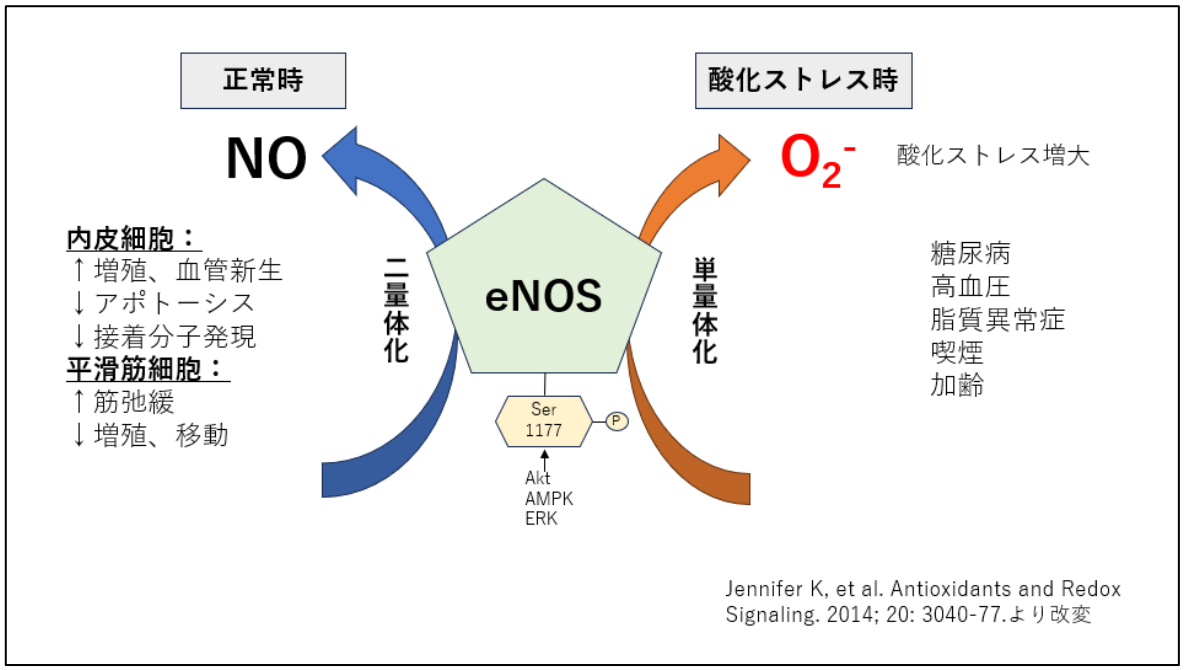

図５． eNOS の概要

NO, nitric oxide; O_2^-, superoxide; Ser, serine; AMPK, AMP-activated protein kinase; ERK, extracellular signal regulated kinase; eNOS, endothelial nitric oxide synthase

②何がわかっていて，何がわかっていないのか

当教室の安東らは,ラット摘出心を用いた短時間の虚血(気絶心筋モデル)において，TRE を虚血前に投与すること（プレコンディショニング）によって，再灌流後の心収縮力が増強することを明らかにした(Ando et al., 2021). また，TRE 投与により再灌流中の冠灌流量が増大する可能性を示した．さらに，その機序としてオートファジーが関与している可能性を指摘した．しかしながら，長時間の虚血(梗塞心筋モデル)における TRE の I/R 障害抑制効果は明らかとなっていない．また，冠動脈内皮機能に対する 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は未だ解明されていない．

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，TRE を用いたプレコンディショニングが I/R 障害抑制効果，すなわち再灌流後の心機能および内皮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．最初に，ラットを用いた心筋常温全虚血モデル（梗塞心筋モデル）を用いて，通常の心臓手術を想定した下記実験①，②を行った。次に，より低い温度で虚血状態にする心臓冷却保存モデルを用いて，心臓移植を想定した実験③を行った．

実験①：心臓の全虚血再灌流モデル(梗塞心筋モデル)を作製し，TRE プレコンディショニングが,再灌流後の心機能障害抑制効果を有するかを検討する．さらにその効果の機序として，酸化ストレス，アポトーシス，オートファジー，抗炎症作用，血管内皮機能のマーカー変化について検討する．

実験②：実験①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③:心臓の冷却併用のより長時間の全虚血再灌流モデル(心臓冷却保存モデル)を作製し，TRE プレコンディショニングが，再灌流後の心機能障害抑制効果を有するかを検討する．さらに心筋壊死の程度について検討する．

実験①
方法

目的：

心臓の全虚血再灌流モデル(梗塞心筋モデル)を作製し，TRE プレコンディショニングが，再灌流後の心機能障害抑制効果を持つかどうかを検討する．さらに心機能障害抑制効果の機序として，酸化ストレス，アポトーシス，オートファジー，抗炎症作用，血管内皮機能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

10 週齢の雄の Sprague-Dawley ラット(三共ラボサービス)(体重 290 ～340 g)を使用した．飼育環境は，温度 22.0～24.0℃，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

ラットを安楽死させるために，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摘出し，直ちに氷冷の Krebs-Henseleit buffer(KHB)の中で冷却した．余剰組織を切除後，上行大動脈を速やかにランゲンドルフ回路(LaboSupport)（図６）に接続し，逆行性灌流を開始した．

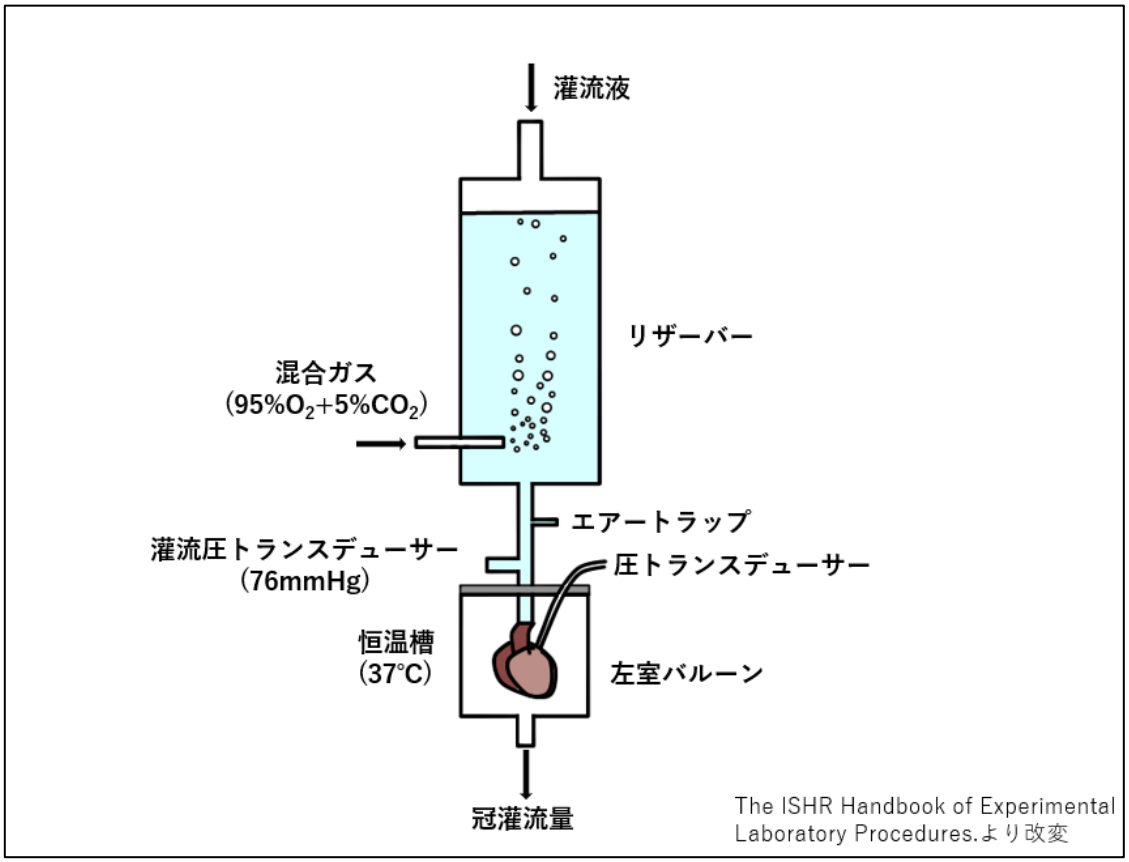

図６．ランゲンドルフ回路

灌流液である 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. 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, pH7.4 に調整した. 灌流液および恒温槽の温度は 37℃に設定した.

３．実験プロトコール

ランゲンドルフ法による摘出心灌流モデルの review 論文によると, 心筋梗塞を誘発する虚血の最適な温度と時間は 37℃（体温）で 30～35 分と報告されており(Bell et al., 2011), 本研究においてもそれに準じたプロトコールを用いた.

まず, 梗塞心筋モデル作製のための予備実験を行った. 予備実験のプロトコールを図 7 に示す. 全ての摘出した心臓は KHB で 20 分間灌流し安定化させたのち, 虚血前の心機能(baseline)を測定した. その後灌流液を一旦停止し, 全虚血とした. 虚血中の温度は 21℃（室温）あるいは 37℃（体温）に設定した. また, 虚血時間は 20 分, 30 分, 40 分にそれぞれ設定した. 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再度行い, baseline 値に対する割合（%）を計算した.

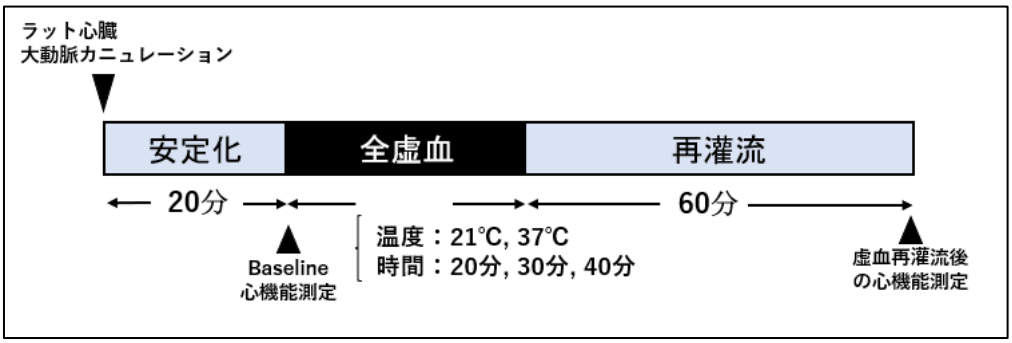

図７．実験①の予備実験のプロトコール

上記予備実験をもとに作成した本実験のプロトコールを図８に示す.TRE（林原）の投与濃度は多くの細胞において浸透圧毒性を来たさないとされる 2% に設定した. 全ての摘出した心臓は KHB で 20 分間灌流し安定化させたのち, 虚血前の心機能(baseline)を測定した. その後, 30 分間のプレコンディショニングを行った. 投与した灌流液により 2 群（各群 n = 4）に分けた（CON 群：KHB のみ, TRE 群：KHB＋2% TRE). TRE の心機能への直接的な影響を評価

するため，プレコンディショニング中は 10 分毎に心機能測定を行った．プレコンディショニング後，30 分間の全虚血（37℃）とした．30 分間の全虚血後に KHB で再灌流を行い，再灌流中は 10 分毎に心機能測定を行った．再灌流 80 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，後日組織学的検査に使用した．それ以外の心筋は速やかに液体窒素で凍結させて-80℃で保管し,後日ウエスタンブロッティング法と ELISA 法に使用した．

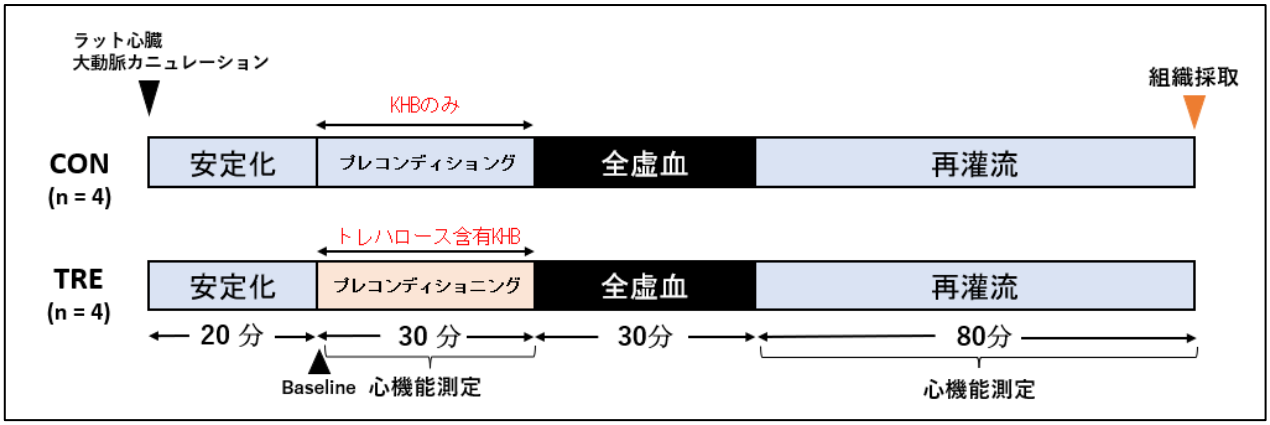

図８．実験①の本実験のプロトコール

CON, control; TRE, trehalose ; KHB, Krebs-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９）．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 分間に冠静脈洞から排出される灌流液の量
2) 心拍数（beat/min）
3) 左室圧（Left ventricular pressure: LVP）（mmHg）
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,心拍数＜180 beat/min,冠灌流量＜8 ml/min,左室圧＜90 mmHg の個体は本研究から除外した．再灌流中における心機能の回復率は，baseline 値に対する割合（%）で示した．

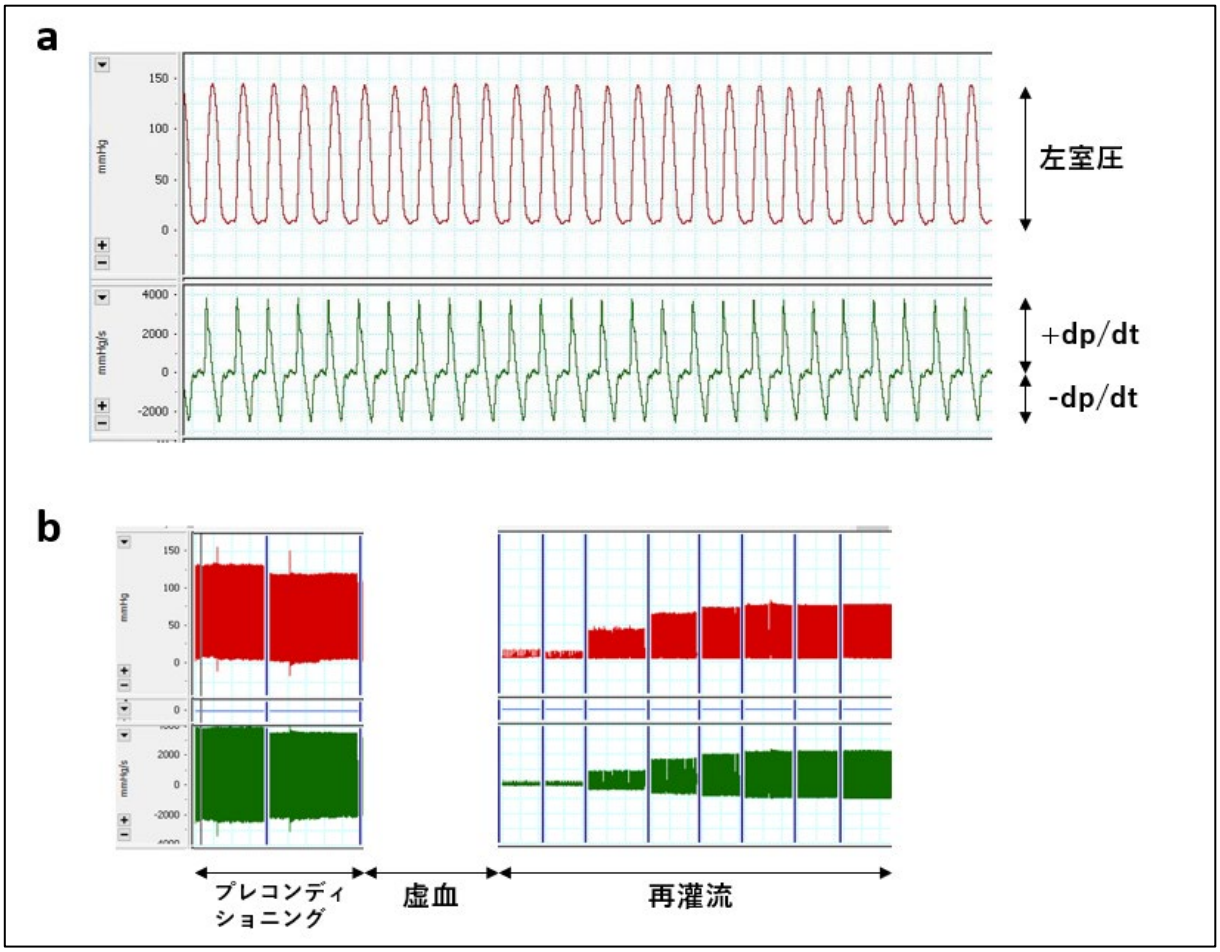

図９．代表的な圧波形(a)と虚血再灌流後の圧波形の縮小図(b)

５．組織学的検査

1) 酸化ストレス

心筋の酸化ストレスを評価するため,4-hydroxynonenal(4-HNE)免疫染色を行った．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 5 mm 厚で切り出し，抗 4-HNE 抗体 (R&D system)用いて免疫染色を行った.弱拡大で無作為に 5 視野を抽出し，4-HNE 陽性領域の面積を測定し，全組織の面積の割合（%）で算出した．画像の解析は Image J software (NIH)を用いて行った.

2)アポトーシス

心筋のアポトーシスを評価するため，TUNEL 染色を行った．ホルマリン固定した左室心尖部心筋のパラフィン包埋切片で，TUNEL 染色を行った．強拡大で無作為に 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 を用いて行った.

６．酵素結合免疫吸着測定法（ELISA 法）

心筋の炎症反応の評価のために，酵素結合免疫吸着測定法（ELISA 法）にて TNF-α の定量を行った．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 の定量値を pg/mg protein で表示した．

７．ウエスタンブロッティング法

血管内皮機能を評価するために，eNOS の二量体化と，リン酸化をウエスタンブロッティングで測定した．また，eNOS リン酸化に関与する Akt，extracellular signal-regulated kinase(ERK)1/2，AMP-activated protein kinase(AMPK)のタンパク発現もそれぞれ測定した(Förstermann and Sessa, 2012b)．

アポトーシスを評価するために，cleaved caspase-3 のタンパク発現を測定した(Saraste and Pulkki, 2000)．

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ーである microtubule-associated light chain 3-Ⅱ（LC3-Ⅱ）と，p62/SQSTM1（p62）のタンパク発現を測定した．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の増加により LC3-Ⅱの発現量は増加し，p62 はオートファゴソームにより選択的に分解されるため減少する(Klionsky et al., n.d.)．

電気泳動とブロッティングを，セミドライ式ウエスタンブロッティング装置である 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（Bio-Rad)で電気泳動の後に,タンパクをポリフッ化ビニリデン膜(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 eNOS(Cell Signaling)，p-eNOS［Ser1177］(Cell Signaling)，caspase-3(Cell Signaling),LC3(abcam),p62(Cell Signaling),Akt(Cell Signaling)，p-Akt［Ser473］(Cell Signaling)，ERK1/2(Cell Signaling)，p-ERK1/2［Tyr202/Tyr204］(Cell Signaling),AMPK(Cell Signaling),p-AMPK[Thr172](Cell Signaling),を使用し,二次抗体は Anti-rabbit IgG（Cell Signaling）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．eNOS の二量体化の評価は“low temperature SDS-PAGE 法”を用いて行った(Yang et al., 2009)．

８．組織水分含有量分析

心筋組織の再灌流後の浮腫の評価のために，加熱乾燥法を行った．粉末状の凍結された心筋組織の重量を測定し（湿潤重量），オートクレーブを用いて70℃で６時間乾燥後に再度重量を測定した（乾燥重量）．組織水分含有量は，湿潤重量と乾燥重量の比で算出した(Méndez-Carmona et al., 2019)．

９．統計解析

すべての連続変数を平均±標準誤差で示した．２群間の平均の比較はStudentのｔ検定を用いて行った.群間と時間の交互作用はtwo-way repeated analysis of varianceで検定した．サンプルサイズ設定は，予備実験の結果を基に，TRE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(Heinrich Heine Universität Dusseldorf)を用いて行い,各群ｎ＝４とした.統計解析はGraphPad Prism,version 9.0(GraphPad Software)を使用して行われた.

結果

予備実験の結果

虚血時の温度と時間ごとの RPP の回復率を図１０に示す．RPP の回復率は 21℃，30 分の場合は 106%であり，37℃，20 分の場合は 97%であった．また，37℃，30 分の場合は 45%であり，37℃，40 分の場合は 11%だった．

21℃，30 分および 37℃，20 分の場合は，再灌流後に心機能がほぼ全回復しており気絶心筋モデルと考えられた．37℃，40 分の場合は，再灌流後に著明な心機能低下を来たしており，研究薬剤である TRE の心筋保護効果を検討するには適切ではないと考えられた.従って以後の実験①および実験②では，梗塞心筋モデルとして適切な心機能回復率を示した 37℃，30 分の全虚血で行うこととした．

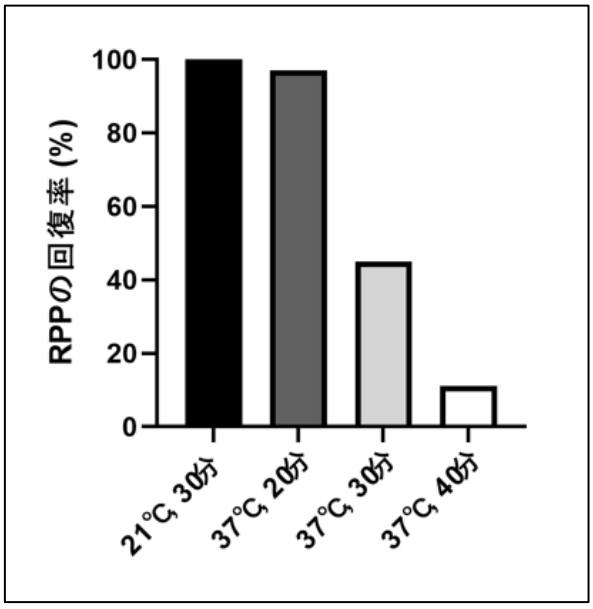

図１０．全虚血中の温度と時間の RPP の回復率への影響

RPP, rate pressure product

各群 n = 1

本実験の結果

1．心機能パラメータ

表１に CON 群および TRE 群のベースラインおよびプレコンディショニング中の心機能を示す．両群に有意差を認めなかった．また，群間と時間の相互作用は認めず，TRE 投与による直接的な心機能への影響はなかった．

表１． ベースラインおよびプレコンディショニング中の心機能

		ベースライン	プレコンディショニング		
			10 min	20 min	30 min
心拍数 (回/min)	CON	212 ± 9	199 ± 5	190 ± 6	189 ± 6
	TRE	225 ± 8	206 ± 7	189 ± 5	175 ± 6
冠灌流量 (ml/min)	CON	13 ± 2	11 ± 2	10 ± 2	10 ± 2
	TRE	12 ± 2	12 ± 2	11 ± 2	11 ± 2
左室圧 (mmHg)	CON	108 ± 5	110 ± 6	99 ± 9	102 ± 8
	TRE	105 ± 6	109 ± 6	106 ± 3	98 ± 3
+dp/dt(×10^3 mmHg/s)	CON	2.9 ± 0.3	2.9 ± 0.2	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.2
	TRE	2.8 ± 0.3	3.3 ± 0.2	3.1 ± 0.2	2.8 ± 0.2
-dp/dt(×10^3 mmHg/s)	CON	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.2
	TRE	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1
RPP(×10^4mmHg×回/min)	CON	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1	1.9 ± 0.2	1.9 ± 0.1
	TRE	2.4 ± 0.2	2.2 ± 0.2	2.0 ± 0.1	1.7 ± 0.1

平均値 ± 標準誤差．各群 n = 4.

CON, control; TRE, trehalose ; RPP, rate pressure product

再灌流後の心機能回復率を図１１に示す．再灌流 80 分後において，心拍数(CON, 61 ± 5% vs. TRE, 60 ± 2%; P = .79)には群間差を認めなかった．一方，冠灌流量(CON, 35 ± 10% vs. TRE, 55 ± 9%; P = .025)，左室圧(CON, 45 ± 6% vs. TRE, 77 ± 13%; P = .004)，+dp/dt(CON, 54 ± 4% vs. TRE, 74 ± 8%; P = .004)，-dp/dt(CON, 44 ± 21% vs. TRE, 81 ± 8%; P = .015)，RPP (CON, 28 ± 6% vs. TRE, 46 ± 9%; P = .017)の回復率は，TRE 群で有意に高かった．

以上より，TRE プレコンディショニングによって，虚血再灌流後の心機能障害が抑制され，内皮機能が保護されたことが示唆された．

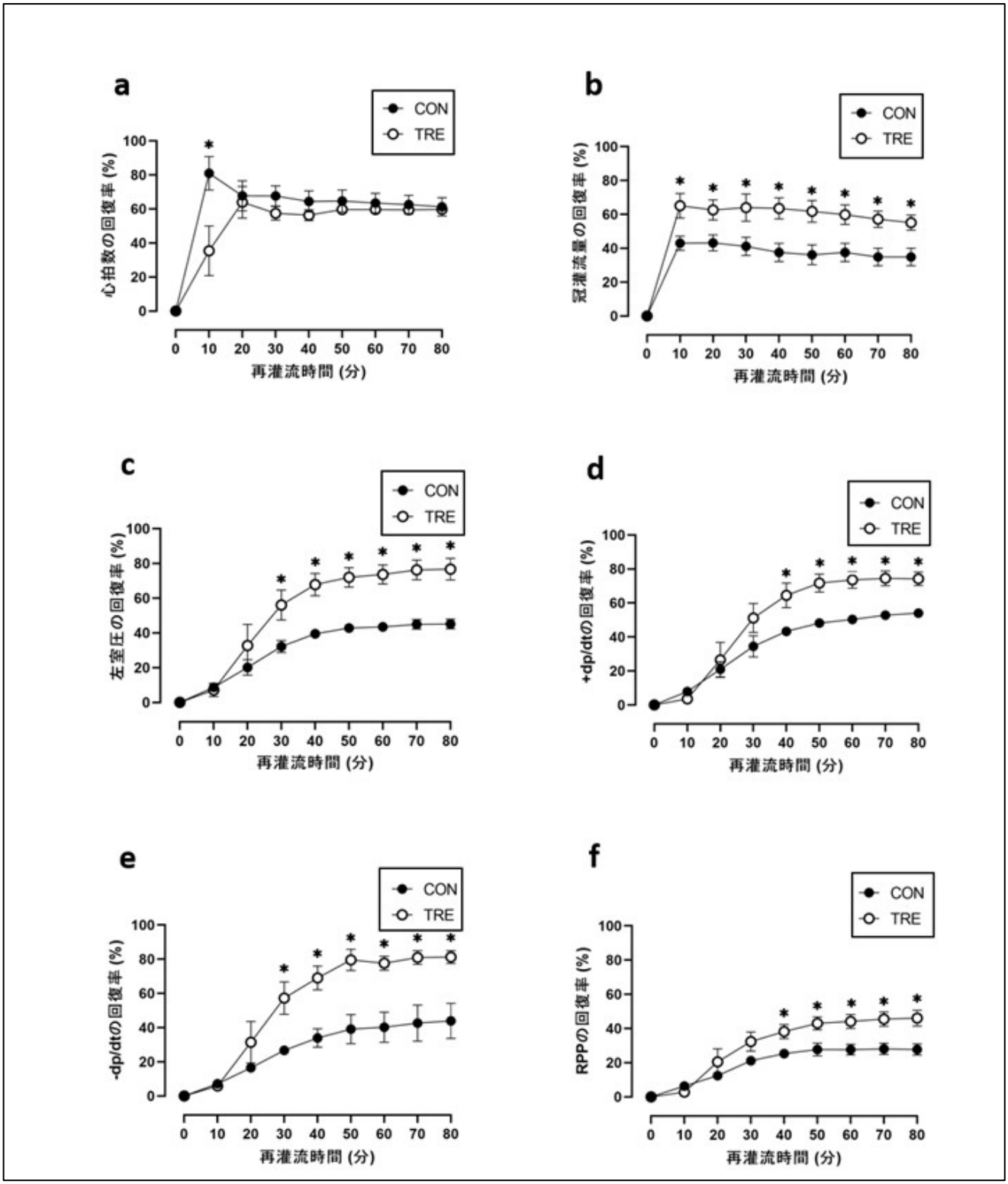

図１１．再灌流後の心機能回復率

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

CON，control；TRE，trehalose；RPP，rate pressure product

各群 n = 4，*P 値＜ .05，（各時点での群間比較）

２．心筋の酸化ストレス

再灌流後の心筋組織の 4-HNE 免疫染色の結果を図１２に示す．4-HNE 陽性領域は TRE 群で有意に低かった(CON, 12.0 ± 2.7% vs. TRE, 5.6 ± 1.6%; P = .011)．

以上より，TRE プレコンディショニングによって，虚血再灌流後の酸化ストレスが抑制されたことが示唆された．

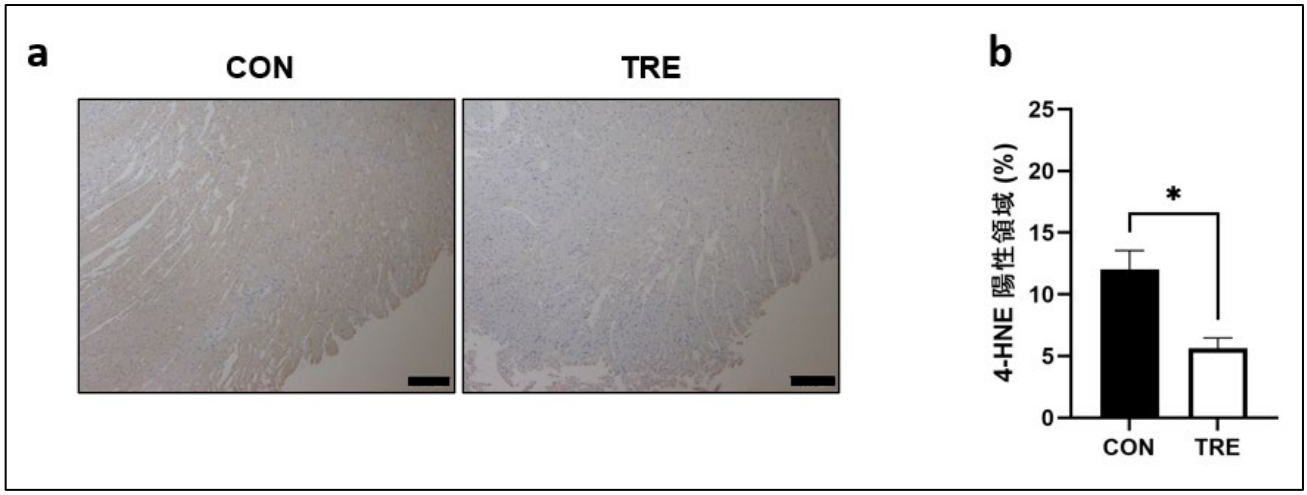

図１２．再灌流後の心筋組織の 4-HNE 免疫染色

CON, control; TRE, trehalose；4-HNE, 4-hydroxynonenal

各群 n = 4, *P 値＜ .05, スケールバー, 200 μm

３．心筋のアポトーシス

再灌流後の心筋組織の TUNEL 染色の結果と cleaved caspase-3 の発現量を図１３に示す．TUNEL index は TRE 群で有意に低かった(CON, 57 ± 7% vs. TRE, 21 ± 11%; P = .004)．また，cleaved caspase-3 の発現量は TRE 群で有意に低かった(CON, 0.11 ± 0.03 vs. TRE, 0.06 ± 0.02 arbitrary unit ［a.u.］; P = .045)．

以上より，TRE プレコンディショニングによって，虚血再灌流後のアポトーシスが抑制されたことが示唆された．

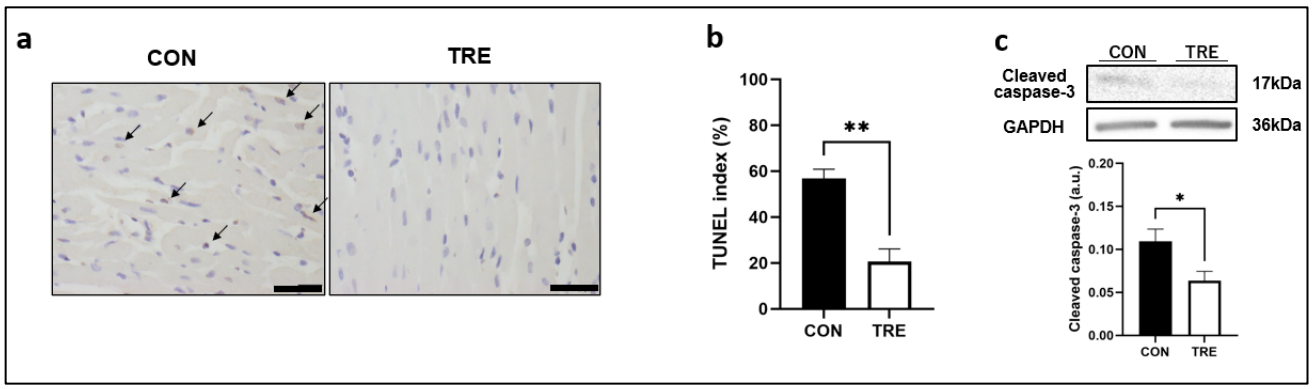

図１３．再灌流後の心筋細胞の TUNEL 染色(a, b)と cleaved caspase-3 のタンパク発現(c)

CON, control; TRE, trehalose ; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling

各群 n = 4, **P 値＜ .01, *P 値＜ .05, 矢印, TUNEL 陽性細胞；スケールバー, 20 μm

５．心筋の炎症マーカー

再灌流後の心筋組織における TNF-α の発現量を図１４に示す. TNF-α の発現量には群間差を認めなかった(CON, 66 ± 8 vs. TRE, 57 ± 6 pg/mg protein; P = .12).

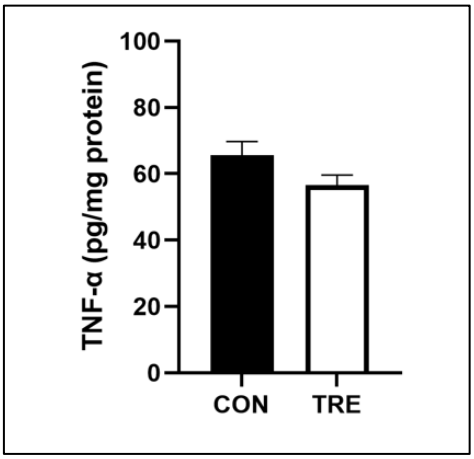

図１４．再灌流後の心筋組織の TNF-α の発現量

CON, control; TRE, trehalose; TNF, tumor necrosis factor

各群 n = 4

６．血管内皮機能（eNOS 活性）

再灌流後の心筋組織における eNOS のリン酸化および二量体化（dimer と monomer の比）を図１５に示す． eNOS のリン酸化率には群間差が見られなかった(CON, 0.46 ± 0.05 vs. TRE, 0.34 ± 0.03 a.u.; P = .12)．一方，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)．

以上より，TRE プレコンディショニングによって，eNOS の活性化が示唆された．

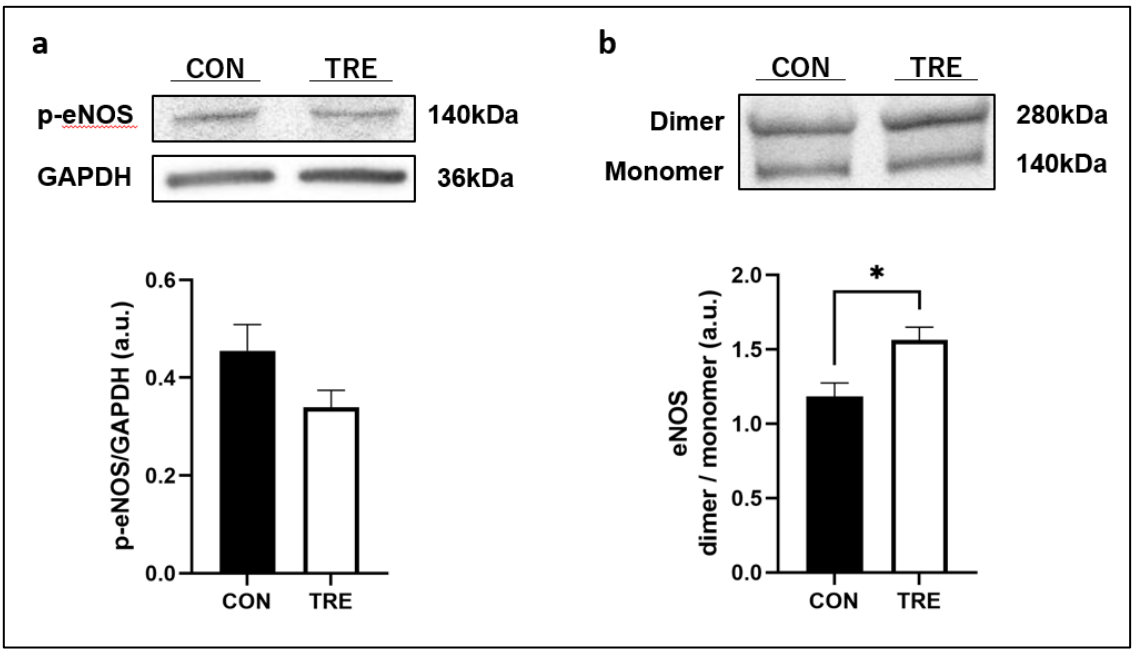

図１５．再灌流後の eNOS のリン酸化(a)および二量体化(b)

CON, control; TRE, trehalose; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; eNOS, endothelial nitric oxide synthase

各群 n = 4, *P 値＜ .05

eNOS のリン酸化の調節因子である Akt, ERK1/2, AMPK の総タンパク発現に群間差が見られなかった. Akt のリン酸化タンパク発現は TRE で有意に低かった(CON, 0.62 ± 0.04 vs. TRE, 0.42 ± 0.07 a.u.; P = .039). 一方, ERK1/2, AMPK のリン酸化タンパク発現に群間差は見られなかった.

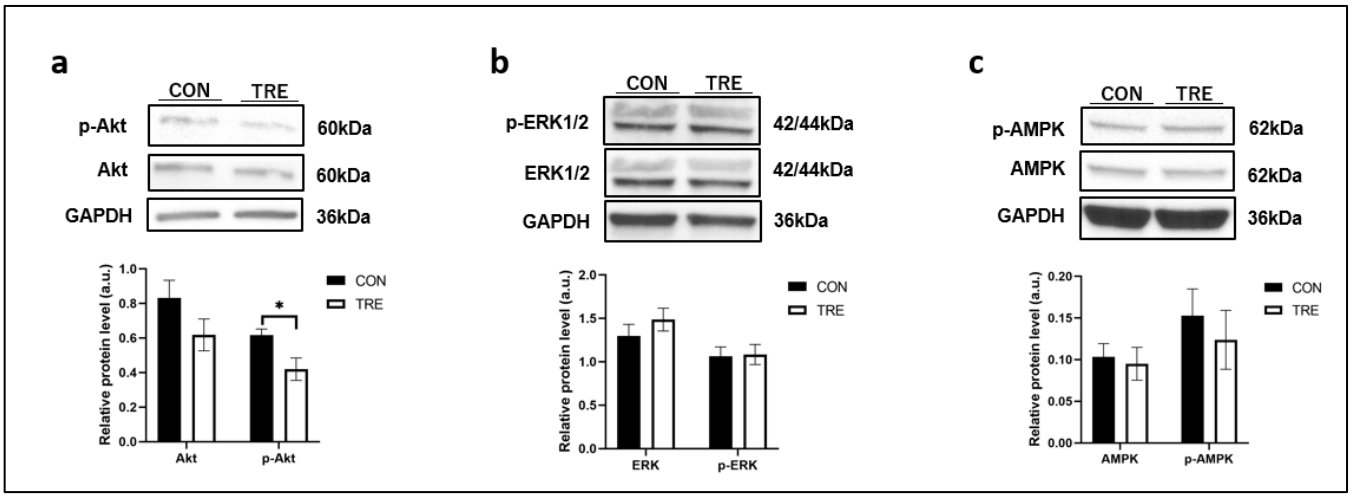

図１６. 再灌流後の AKT(a), ERK1/2(b), AMPK(c)の総タンパク発現量およびそれぞれのリン酸化のタンパク発現量

CON, control; TRE, trehalose; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; AMPK, AMP-activated protein kinase; ERK, extracellular signal regulated kinase

各群 n = 4, *P 値＜ .05

７. オートファジーマーカー

再灌流後の心筋組織における LC3-Ⅱおよび p62 のタンパク発現を図１７に示す. 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). 一方, p62 の発現量には群間差を認めなかった(CON, 0.11 ± 0.01 vs. TRE, 0.09 ± 0.01 a.u.; P = .37).

以上より, TRE プレコンディショニングによる, 虚血再灌流後のオートファゴゾームの増加が示唆された.

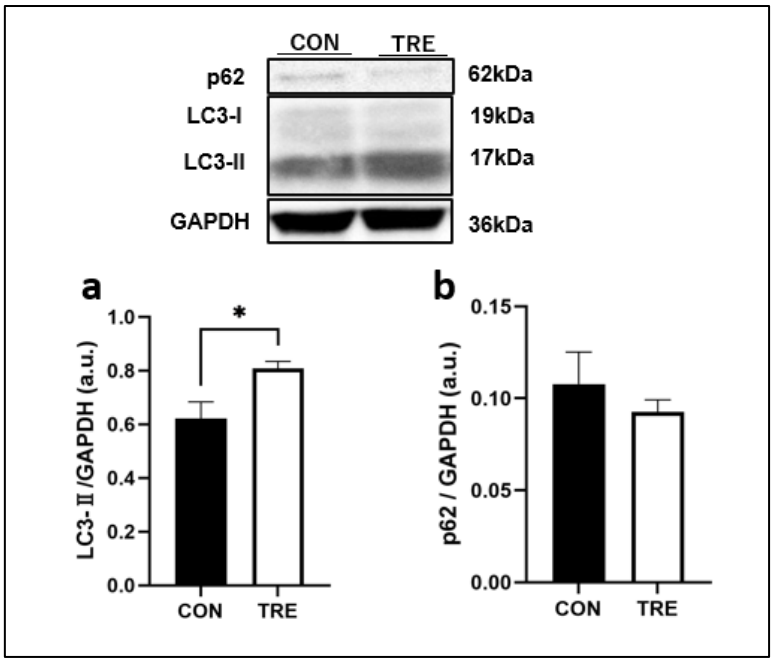

図１７．再灌流後の心筋の LC3-Ⅱ(a)と p62 (b)のタンパク発現

CON, control; TRE, trehalose; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; LC-3, microtubule-associated protein 1 light chain 3
各群 n = 4, *P 値＜ .05

８．心筋組織の浮腫

再灌流後の心筋組織の水分含有量を図１８に示す. 心筋組織の湿潤重量・乾燥重量比 (CON, 7.1 ± 0.1 vs. TRE, 7.3 ± 0.2 a.u.; P = .33)には群間差を認めなかった.

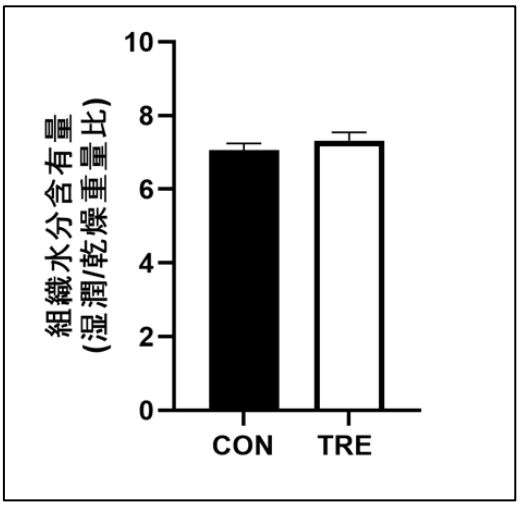

図１８．再灌流後の心筋組織の水分含有量

CON, control; TRE, trehalose
各群 n = 4

実験②
方法

目的：

実験①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障害抑制効果が得られた．また TRE プレコンディショニングにより，血管内皮機能に重要な eNOS が活性化していた．さらに，オートファジーマーカーである LC3-Ⅱが増加していた．

この結果を踏まえて，実験②の目的は TRE プレコンディショニングによる虚血再灌流後の心機能障害抑制効果が，eNOS やオートファジー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．

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

図１９に実験②のプロトコールを示す. 実験②ではCONおよびTREのそれぞれに選択的eNOS阻害剤であるN^G-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)およびオートファジー阻害薬（ライソソーム阻害）であるクロロキン二リン酸塩(chloroquine diphosphate: CQ)を添加した.すなわち,L-NAME群,TRE+L-NAME群, CQ群, TRE+CQ群の新規4群で同様に追加実験を4例ずつ行い, 実験①の2群と共にそれぞれ以下の4群ずつで再灌流80分後の心機能を比較した.

(A) eNOSの意義の検討（CON群, TRE群, L-NAME群, TRE+L-NAME群）

(B) オートファジーの意義の検討（CON群, TRE群, CQ群, TRE+CQ群）

ランゲンドルフの灌流および心機能測定は実験①と同様に行った. L-NAME(富士フィルム和光純薬)の投与方法および濃度設定は, 過去の文献に基づいて行い(González Arbeláez et al., 2018), 0.1 mMのL-NAMEをプレコンディショニング中および再灌流中にKHBに混注した. また, CQ(富士フィルム和光純薬)の投与方法および濃度設定は, 過去の文献に基づいて行い(Xiao et al., 2018), 50 mg/kgのCQを安楽死の1時間前に腹腔内投与した.

再灌流80分後に心臓を採取し, 実験①と同様に組織学的検査およびウエスタンブロッティング法に使用した.

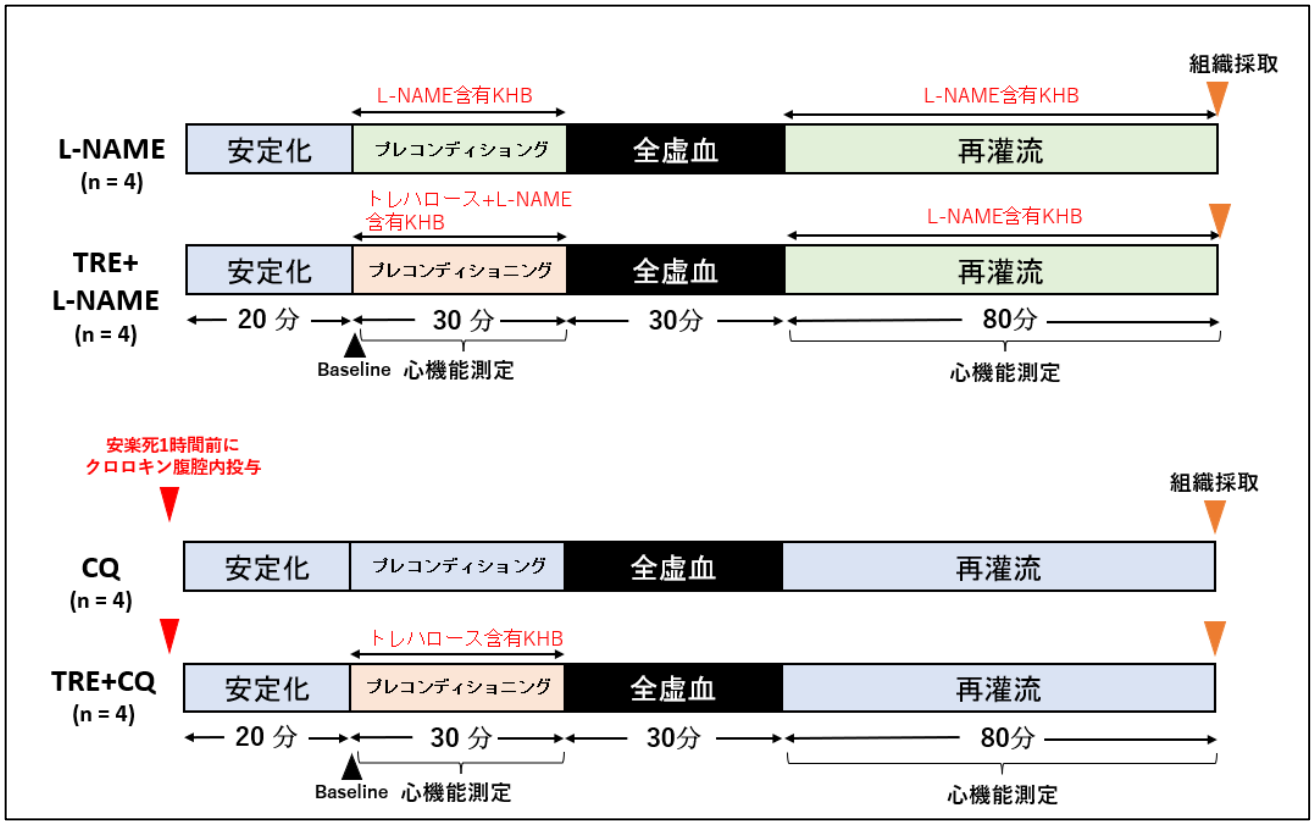

図１９．実験②のプロトコール

CON, control; TRE, trehalose; L-NAME, N^G-nitro-L-arginine methyl ester; CQ, chloroquine; KHB, Krebs-Henseleit buffer

４．組織学的検査

実験①と同様に L-NAME 群および TRE+L-NAME 群の 2 群で TUNEL 染色および 4-HNE 免疫染色を行い，TUNEL 陽性細胞率および 4-HNE 陽性領域を実験①の 2 群とともに計 4 群で比較した．

さらに，血管周囲の浮腫を評価するため，CON 群，TRE 群，L-NAME 群，TRE+L-NAME 群の 4 群にヘマトキシリン・エオジン(hematoxylin and eosin: H&E)染色を行った(Que et al., 2020)．ホルマリン固定した左室心尖部心筋のパラフィン包埋切片で，H&E 染色を行ない，1 切片中の心筋組織の中から，無作為に 3 つの冠動脈を抽出し，血管および周囲の浮腫の面積を測定した．血管周囲浮腫は，血管面積に対する周囲の浮腫面積の比で算出した．画像の解析は Image J software を用いて行った．

５．ウエスタンブロッティング

実験①で凍結保存していた左室心筋も用いて改めて（CON 群，TRE 群，CQ 群，TRE+CQ 群の 4 群でタンパク定量を行い，ウエスタンブロッティングを行

った．実験②では LC3-Ⅱおよび p62 のタンパク発現をウエスタンブロッティングで定量した．

６．統計解析

すべての連続変数を平均±標準誤差で示した．群間比較は two-way analysis of variance で検定し，TRE と各種阻害剤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ととらえ，Tukey 検定で多重比較を行った．統計解析には GraphPad Prism, version 9.0 を用いた．

結果

(A)eNOS の意義の検討

1．心機能パラメータ

L-NAME の投与群を加えた 4 群での再灌流 80 分後の心機能回復率の比較を図２０に示す.心拍数は 4 群間で有意な差を認めなかった.冠灌流量は TRE+L-NAME 群では TRE 群より有意に低値であった(TRE, 55 ± 4% vs. TRE+L-NAME, 33 ± 7%; P = .028). 左室圧は TRE+L-NAME 群と TRE 群の群間差はなかった(TRE, 77 ± 8% vs. TRE+L-NAME, 64 ± 5%; P = .42). +dp/dt は TRE+L-NAME 群では TRE 群より低い傾向にあった(TRE, 74 ± 4% vs. TRE+L-NAME, 57 ± 6%; P = .052). -dp/dt は TRE+L-NAME 群では TRE 群より有意に低値であった(TRE, 81 ± 4% vs. TRE+L-NAME, 41 ± 2%; P = .002). RPP は TRE+L-NAME 群では TRE 群より低い傾向にあった(TRE, 46 ± 5% vs. TRE+L-NAME, 34 ± 3%; P = .12). すべてのパラメータにおいて, L-NAME 群と TRE+L-NAME 群に有意差を認めなかった.

以上より, eNOS 阻害により, TRE プレコンディショニングによって得られた虚血再灌流後の心機能障害抑制効果の大部分が消失し, 内皮機能保護効果も消失した.

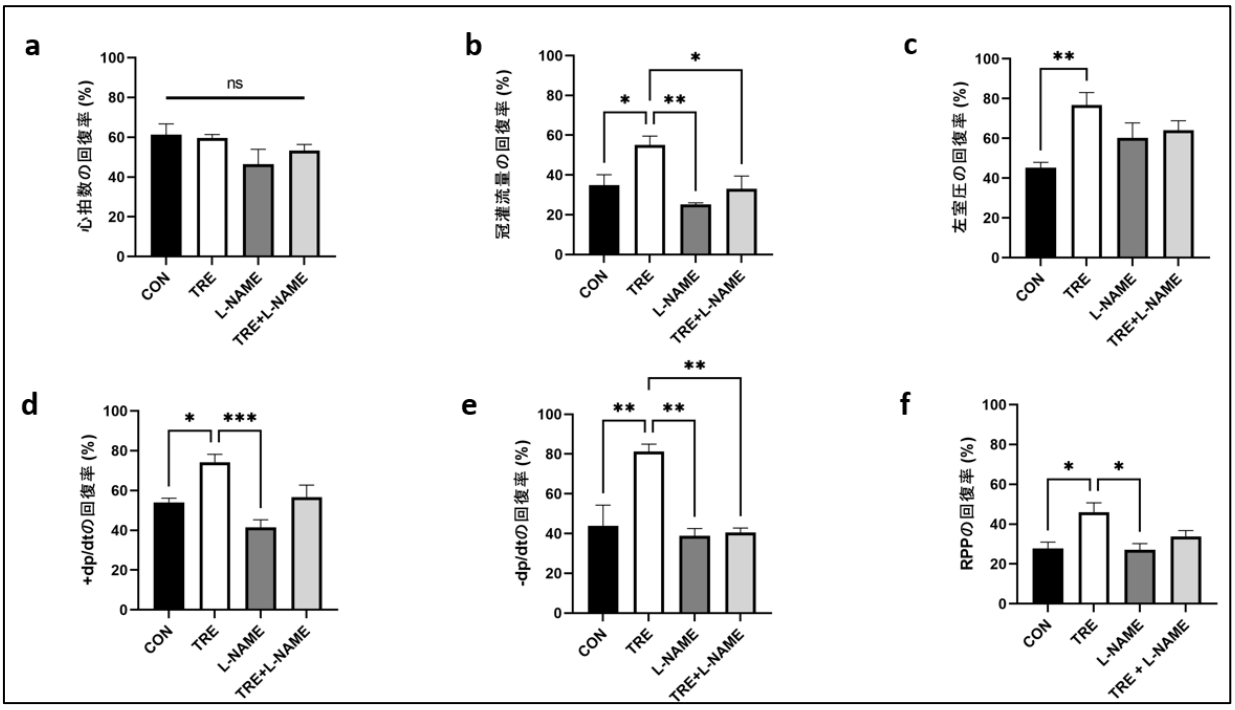

図２０．L-NAME 投与群含めた 4 群の再灌流 80 分後の心機能回復率

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

CON, control; TRE, trehalose; L-NAME, N^G-nitro-L-arginine methyl ester; RPP, rate pressure product

各群 n = 4, *P 値＜ .05, **P 値＜ .01, ***P 値＜ .001（各時点での群間比較）

２．心筋のアポトーシスと酸化ストレス

L-NAME の投与群を加えた 4 群での心筋組織の TUNEL と 4-HNE 染色の結果を図２１に示す. TRE+L-NAME 群と TRE 群に有意差は認めなかった(TRE, 21 ± 6% vs. TRE+L-NAME, 17 ± 3%; P = .89). 4-HNE 陽性領域は TRE+L-NAME 群では TRE 群より有意に高値であった(TRE, 5.6 ± 0.1% vs. TRE+L-NAME, 16.7 ± 0.2%; P ＜ .001).

以上より，eNOS 阻害により，TRE プレコンディショニングによる虚血再灌流後の酸化ストレス抑制効果が消失した. 一方で, eNOS を阻害しても, TRE プレコンディショニングによる虚血再灌流後のアポトーシス抑制効果は消失しなかった.

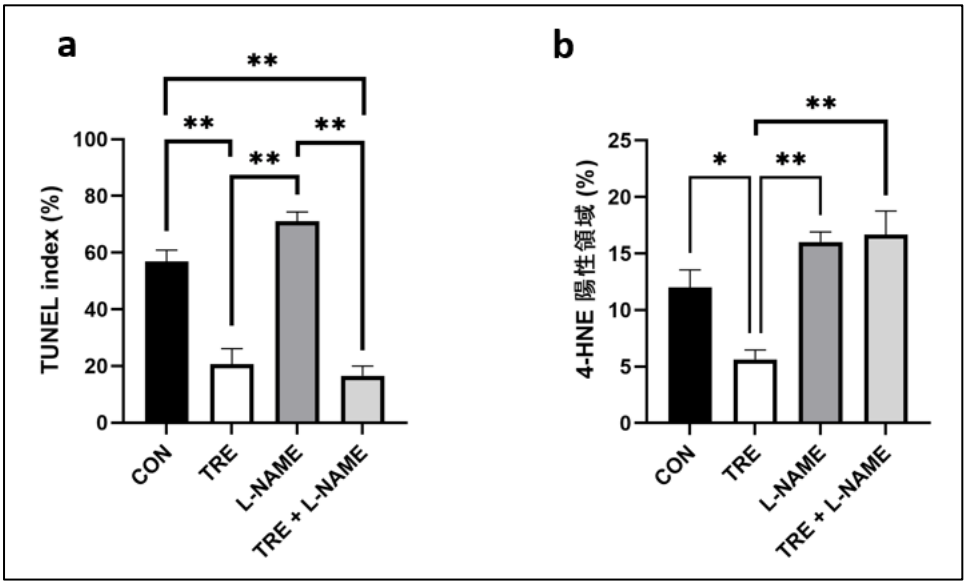

図２１．L-NAME 投与群含めた 4 群の心筋組織の TUNEL index(a)および 4-HNE 陽性領域(b)

CON, control; TRE, trehalose; L-NAME, N^G-nitro-L-arginine methyl ester

TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling; 4-HNE, 4-hydroxynonenal

各群 n = 4, *P 値＜ .05, **P 値＜ .01,

３．血管周囲浮腫

L-NAME の投与群を加えた 4 群での冠動脈周囲組織の H&E 染色と血管周囲浮腫を図２２に示す．血管周囲浮腫は CON 群では TRE 群より有意に高値であった(CON, 2.2 ± 0.3 vs. TRE, 0.4 ± 0.1 a.u.; P = .002)．さらに，TRE+L-NAME 群では TRE 群より有意に高値であった(TRE, 0.4 ± 0.1 vs. TRE+L-NAME, 1.7 ± 0.2 a.u.; P = .003)．

以上より，TRE プレコンディショニングによって，虚血再灌流後の血管周囲浮腫は抑制された．さらに，eNOS 阻害により，TRE プレコンディショニングによる血管周囲浮腫の抑制効果が消失した．

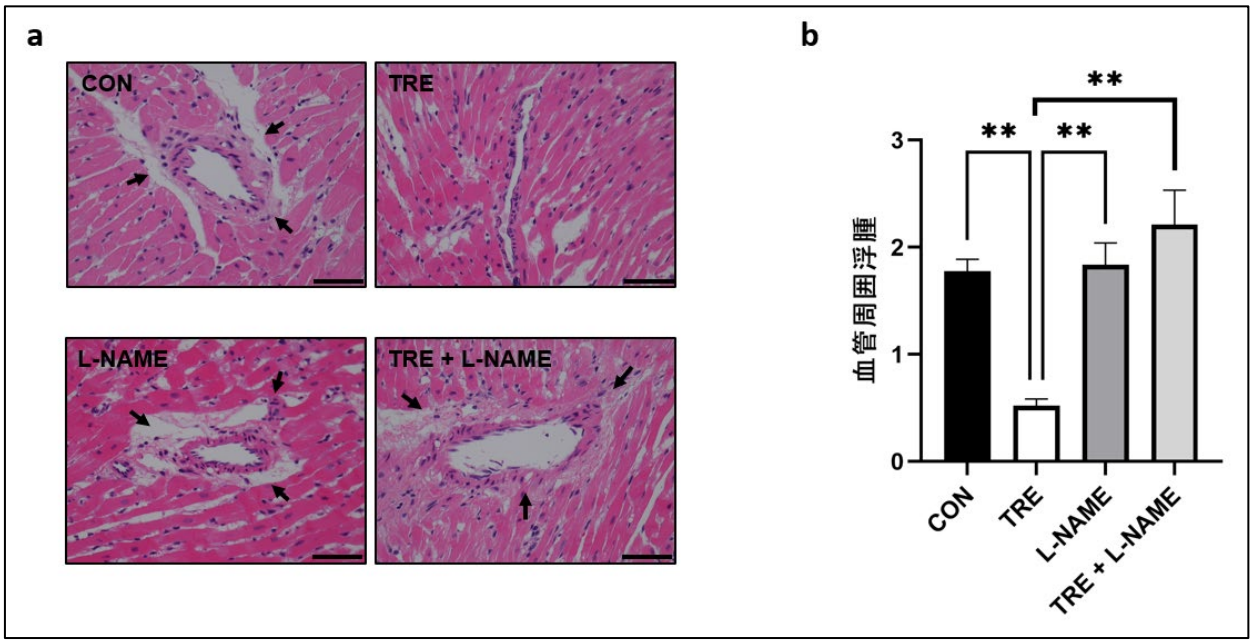

図２２．再灌流後の心筋組織の H&E 染色(a)と血管周囲浮腫(b)

CON, control; TRE, trehalose; L-NAME, N^G-nitro-L-arginine methyl ester
各群 n = 4, **P 値＜ .01； 矢印，血管周囲浮腫；スケールバー，20 μm

(B)オートファジーの意義の検討

1．心機能パラメータ

CQ の投与群を加えた 4 群での再灌流 80 分後の心機能回復率の比較を図２３に示す．冠灌流量，-dp/dt，RPP は実験①との統計手法に違いにより CON 群と TRE 群の有意差は消失したが，すべてのパラメータにおいて，TRE 群と TRE+CQ 群に有意差を認めなかった．

以上より，オートファジーを阻害しても，TRE プレコンディショニングによる虚血再灌流後の心機能障害抑制効果および内皮機能保護効果は消失しないことが示唆された．

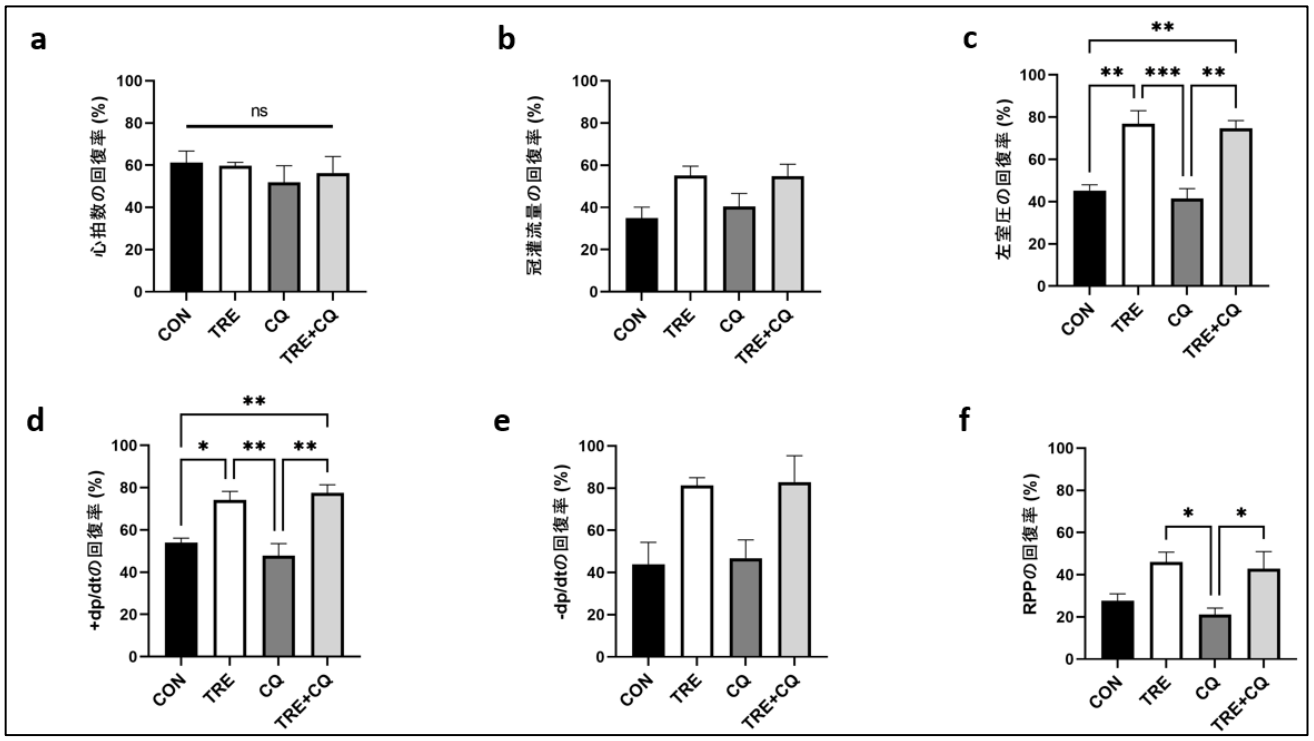

図２３．CQ 投与群含めた 4 群の再灌流 80 分後の心機能回復率

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

CON，control；TRE，trehalose；CQ，chloroquine；RPP，rate pressure product

各群 n = 4，*P 値＜ .05，**P 値＜ .01，***P 値＜ .001（各時点での群間比較）

２．オートファジーマーカー

CQ の投与群を加えた 4 群の心筋組織における LC3-Ⅱおよび p62 のタンパク発現を図２４に示す．LC3-Ⅱの発現量は TRE 群で CON 群より有意に高値であった(CON, 0.69 ± 0.02 vs. TRE, 0.89 ± 0.07 a.u.; P = .017)．さらに，LC3-Ⅱの発現量は TRE+CQ 群では TRE 群より低い傾向にあった(TRE, 0.89 ± 0.07 vs. TRE+CQ, 0.73 ± 0.03 a.u.; P = .061)．p62 の発現量は 4 群間で有意な差を認めなかった．

オートファジーの活性（フラックス）は「CQ なし」に対する「CQ あり」の LC3-Ⅱの増加分として評価することが一般的である（図２５）．CON 群と TRE 群いずれにおいても CQ 投与により LC3-Ⅱの増加がみられないことから，少なくとも再灌流後の最終段階ではオートファジーの活性化は高度に抑制されていることを示唆する．また，TRE 群における LC3-Ⅱの増加は活性（フラックス）の増加に起因するものではないことを示唆する．

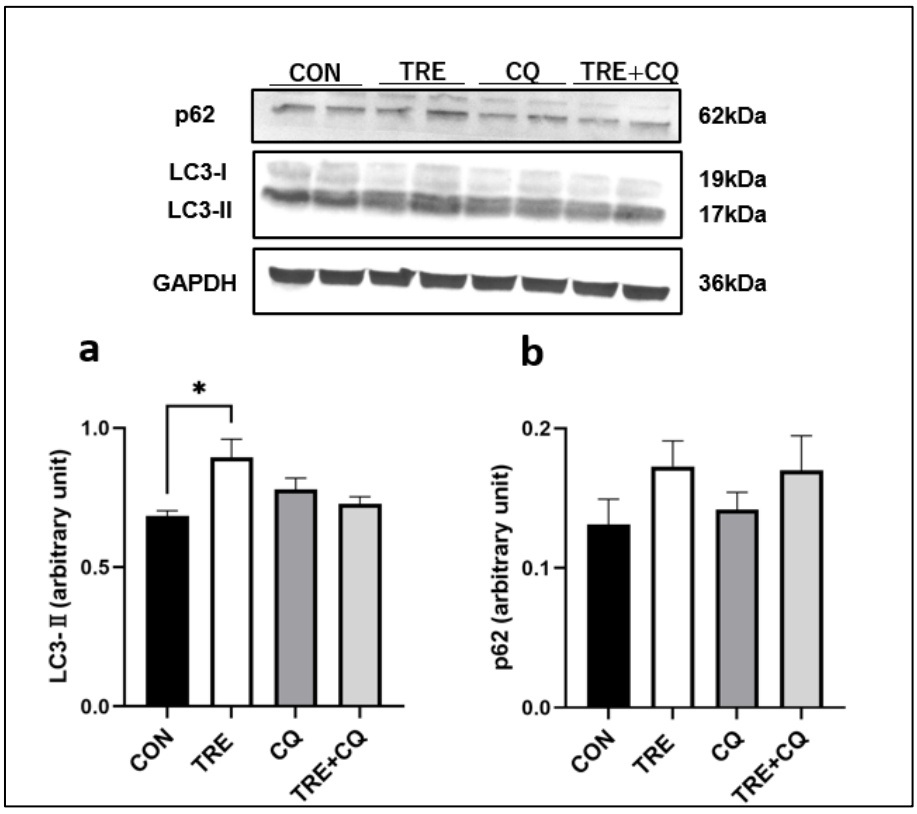

図２４．CQ 投与群含めた 4 群の心筋の LC3-Ⅱ(a)と p62 (b)のタンパク発現

CON, control; TRE, trehalose; CQ, chloroquine

LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3

各群 n = 4, *P 値＜ .05

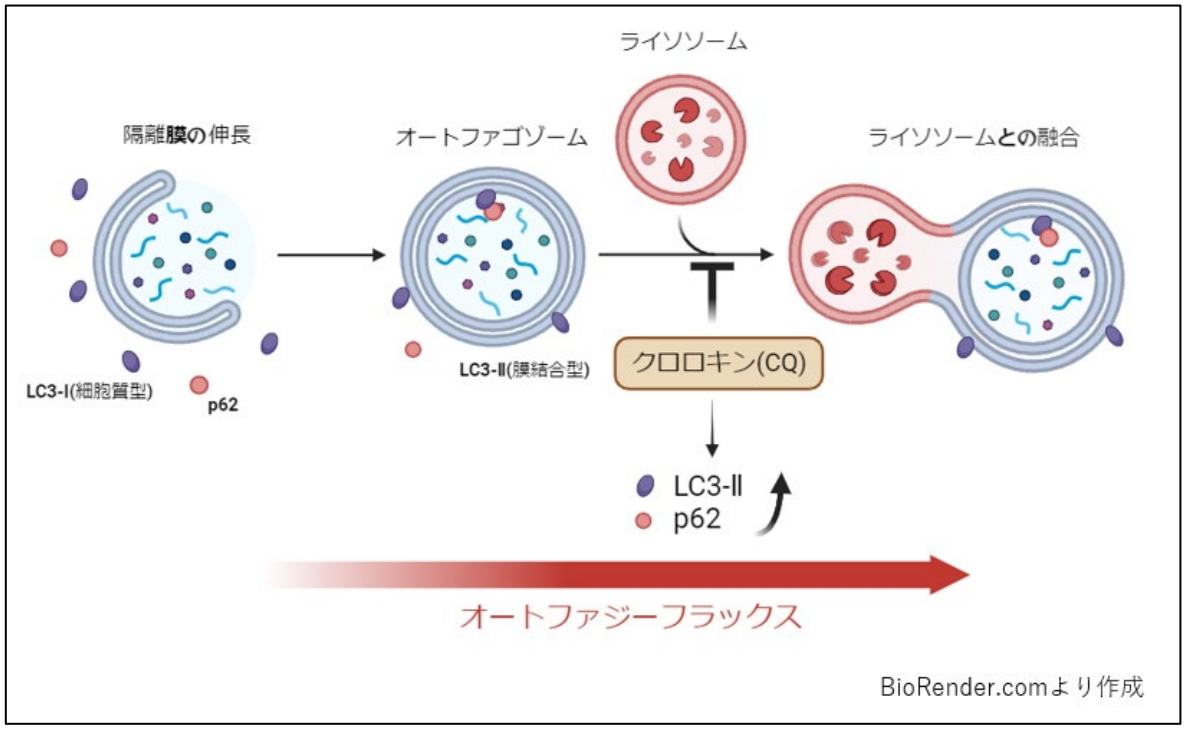

図２５．CQの作用機序とオートファジーフラックス

実験③
方法

目的：

実験①，②の梗塞心筋モデルにおいて，TRE プレコンディショニングにより再灌流後の心機能障害抑制および内皮機能保護効果を示すことが明らかになった．

この結果を踏まえて，冷却保存でも TRE プレコンディショニングが有効である可能性を考慮し，実験③の目的は心臓移植を想定した冷却併用のより長時間の全虚血再灌流モデル(心臓冷却保存モデル)において，TRE プレコンディショニングが，再灌流後の心機能障害および内皮機能障害抑制効果を有するかを検討することとした．

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③では，臓器保存液として Celsior 液を用いた．Celsior 液は，1990 年代前半に Menasche らによって心臓移植のために開発された臓器保存液であり(Menasche et al., 1994)，現在の日本の心臓移植において薬事承認はされていないながらも広く一般的に使用されている保存液である．

まず，心臓冷却保存モデル作製における保存時間設定のための予備実験を行った．Celsior 液での冷却保存時間を 6 時間，10 時間，16 時間にそれぞれ設定し，再灌流後 60 分の時点での RPP の baseline 値に対する割合（%）を計算した．また，参考として KHB 液で 8 時間冷却保存した場合についても検討した．図２６に示すように，予備実験の結果，冷却保存時間は RPP の回復率が約 40%となる 16 時間に設定した．

図２７に実験③のプロトコールを示す.全ての摘出された心臓はまず 30 分間のプレコンディショニングを行った.投与した灌流液により 2 群（Celsior 群；n = 6, TRE 群 ；n = 4）に分けられた（Celsior 群：KHB のみ，TRE 群：KHB＋2% TRE)．プレコンディショニング後に，基準となる心機能(baseline)を測定した．続いて，4℃に冷却した Celsior 液 10 ml を冠注し速やかに心停止を得た後，一旦ランゲンドルフ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．その後に再度ランゲンドルフ回路に心臓を取り付け，KHB で再灌流を行った．再灌流中は 10 分毎に心機能測定を行った.再灌流中における心機能の回復率は，実験①と同様に baseline 値に対する割合（％）で示した．再灌流 60 分後に心臓を採取し，ただちに左室心筋の triphenyl tetrazolium chloride(TTC)染色を行った．なお，TTC 染色を行うにあたって心臓の組織全体が必要となるため，実験①，②のように心筋組織のホルマリン検体および凍結検体は得られなかった．

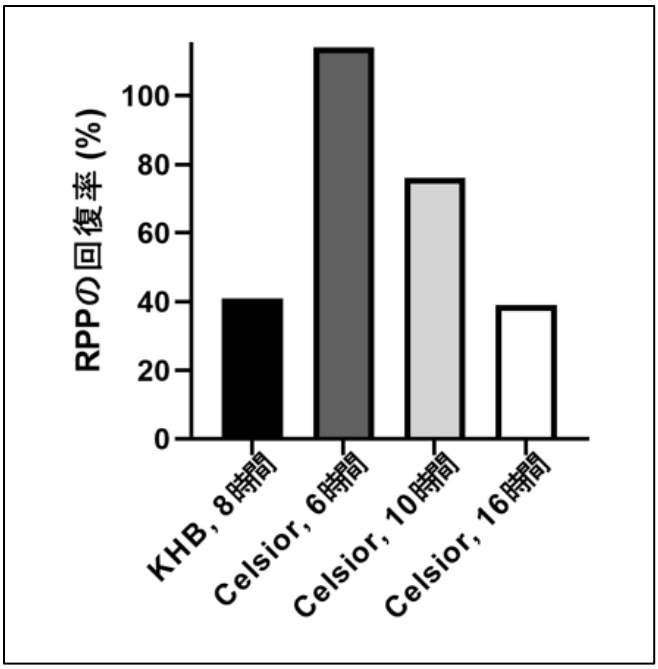

図２６．冷却保存中の保存液と時間の RPP の回復率への影響

RPP, rate pressure product ; KHB, Krebs-Henseleit buffer

各群 n = 1

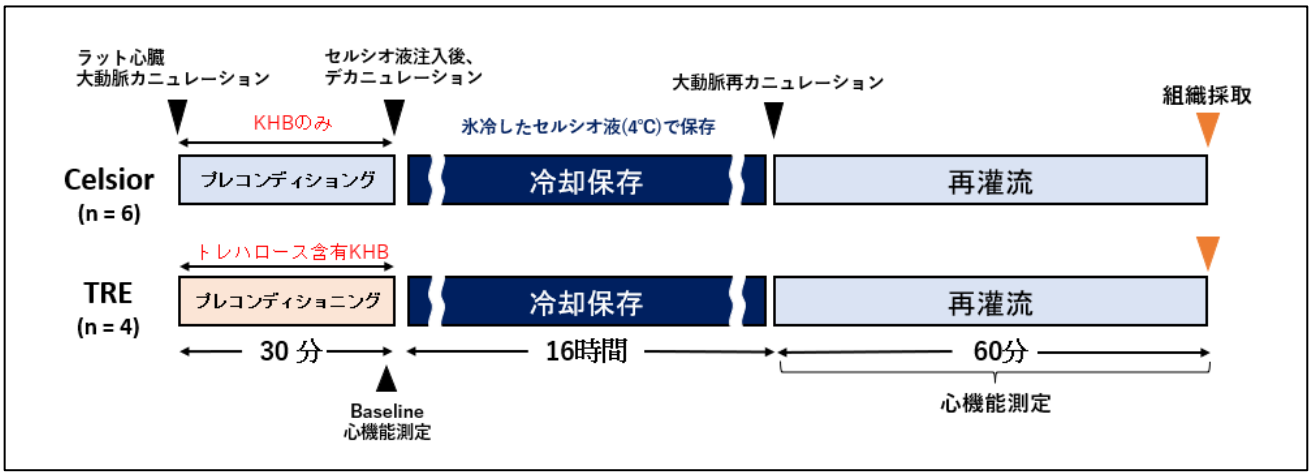

図２７．実験③のプロトコール

CON, control; TRE, trehalose ; KHB, Krebs-Henseleit buffer

４．TTC アッセイ

冷却保存後の不可逆的なグラフト不全の一因として心筋の壊死が挙げられる．心筋の壊死を評価するため，TTC 染色を行った．左室心筋を長軸に垂直に 2 mm のスライス厚で切り出し，37℃に加温したリン酸緩衝液中 1% TTC 溶液（BD Difco）で 30 分間インキュベーションを行った．その後 4℃の 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液（Wako）中に 1 晩置いた．固定された心臓切片をスライドグラスに置いてカバーグラスをかけ，デジタル撮影し，画像解析を行った．梗塞領域として，TTC 非染色領域の面積を測定し，全組織の面積の割合（%）で算出した．画像の解析は Image J software を用いて行った．

５．統計解析

すべての連続変数を平均±標準誤差で示した．2 群間の平均の比較は Student の t 検定を用いて行った．統計解析には GraphPad Prism, version 9.0 を用いた．

結果

1．心機能パラメータ

再灌流後の心機能回復率を図２８に示す．再灌流 60 分後において，心拍数(Celsior, 76 ± 6% vs. TRE, 71 ± 5%; P = .56)，冠灌流量(Celsior, 42 ± 3% vs. TRE, 30 ± 5%; P = .10)，+dp/dt(Celsior, 48 ± 2% vs. TRE, 58 ± 13%; P = .38)，-dp/dt(Celsior, 41 ± 2% vs. TRE, 46 ± 3%; P = .23)には群間差を認めなかった．一方，左室圧(Celsior, 50 ± 4% vs. TRE, 71 ± 5%; P = .012)の回復率は，TRE 群で有意に高かった．また，RPP (Celsior, 37 ± 4% vs. TRE, 50 ± 5%; P = .078)の回復率は，TRE 群で高い傾向にあった．

以上より，TRE プレコンディショニングによって，冷却保存後の心機能障害が一部抑制された．一方，TRE プレコンディショニングによって，冷却保存後の冠灌流量に差はなく内皮機能は保護されなかった．

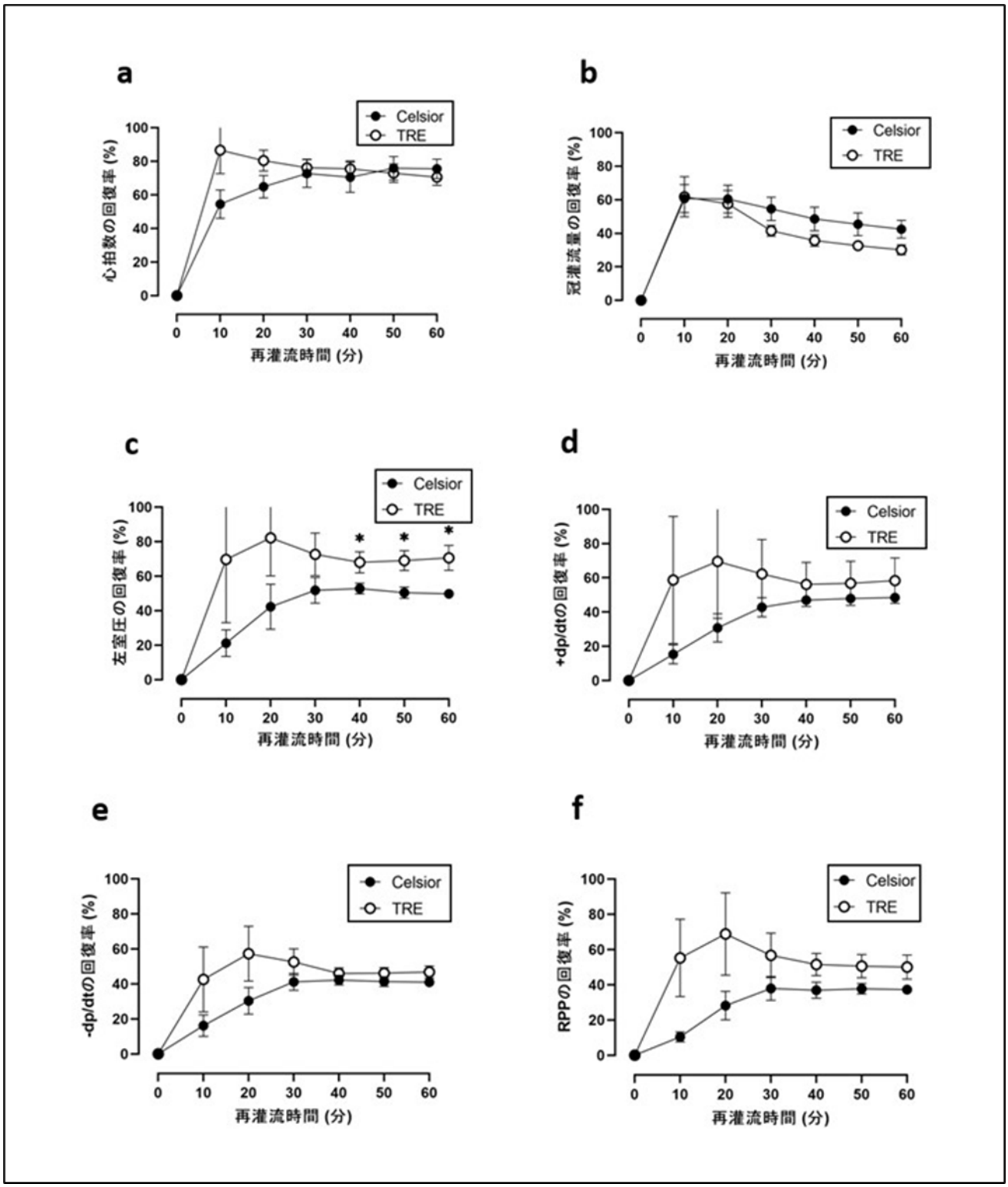

図２８．再灌流 60 分後の心機能回復率

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

TRE, trehalose; RPP, rate pressure product

Celsior 群,n = 6, TRE 群, n = 4, *P 値＜ .05

２．心筋の壊死

再灌流後の左室心筋の TTC 染色の結果を図２９に示す.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 = .0006).

以上より，TRE プレコンディショニングによって，冷却保存後の心筋壊死が抑制されたことが示唆された.

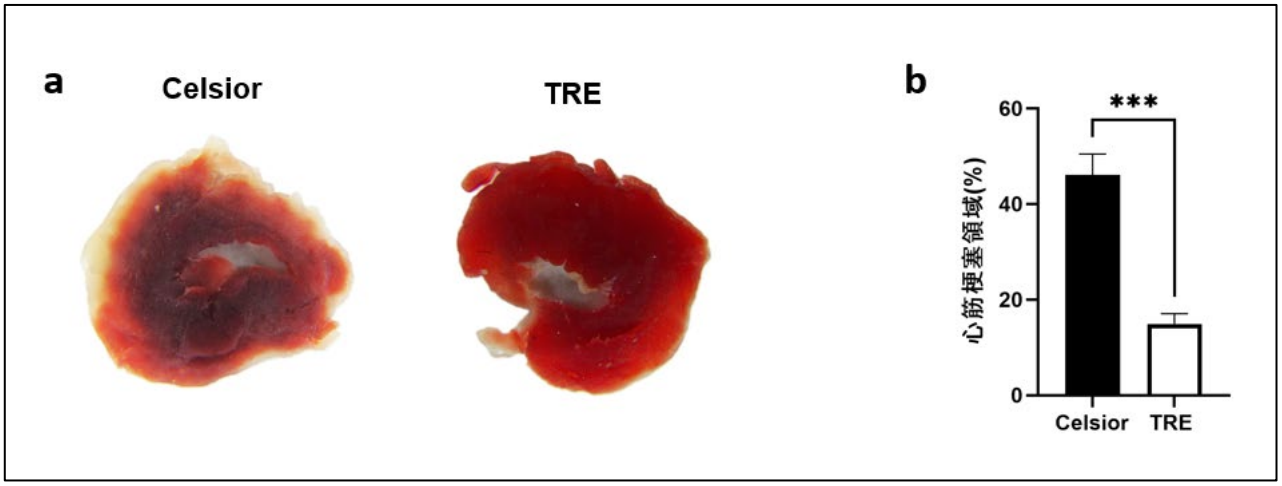

図２９．再灌流後の心筋組織の TTC 染色(a)と心筋梗塞領域(b)

TRE, trehalose

Celsior 群, n = 6, TRE 群, n = 4, ***P 値＜ .001

考察

１．本研究で得られた新知見

ラットの梗塞心筋モデルにおいて，TRE プレコンディショニングにより再灌流後の心機能障害抑制および内皮機能保護効果が得られた．その保護効果の大部分は，eNOS の活性化に依存していた．また，ラットの心臓冷却保存モデルにおいては，TRE プレコンディショニングにより再灌流後の心機能障害抑制効果は一部認めたが，内皮機能保護効果は認めなかった．

２．新知見に至った根拠

1)TRE プレコンディショニングによる虚血再灌流障害抑制効果

実験①において，TRE 群では CON 群に比べ，再灌流後の冠灌流量，左室圧，+dp/dt，-dp/dt，RPP の回復率が有意に高かった．さらに，再灌流後の心筋組織の 4-HNE 免疫染色および TUNEL 染色では，TRE 群で有意に 4-HNE 陽性領域が小さく，また TUNEL 陽性細胞数が少ないことから，TRE プレコンディショニングによる心筋の酸化ストレスおよびアポトーシス抑制効果が示唆された．さらに TRE 群では有意に eNOS の二量体化が増加しており，内皮機能の活性化が示唆された．以上の結果から，ラットの心臓における梗塞心筋モデルにおいて，TRE プレコンディショニングにより心機能障害抑制および内皮機能保護効果が得られたと考えられた．（図３０）

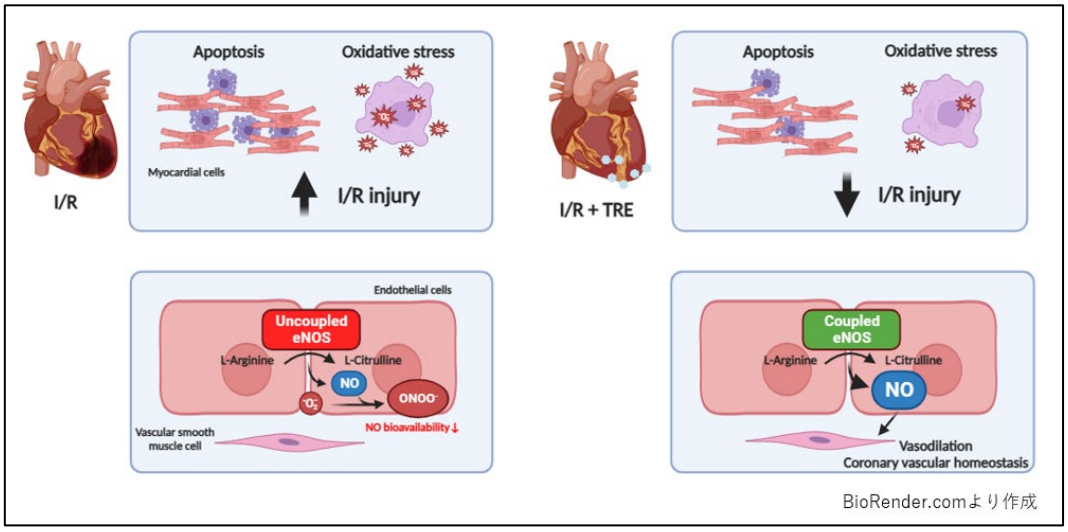

図３０．心筋虚血再灌流障害へのトレハロースの保護効果の概要

I/R, ischemia-reperfusion；TRE, trehalose；eNOS, endothelial nitric oxide synthase；NO, nitric oxide

2)TREプレコンディショニングの心機能障害抑制効果の機序

実験①において，TRE群ではCON群に比べ，eNOS二量体化およびLC3-Ⅱが増加しており，TREプレコンディショニングによるeNOSの活性化，オートファゴゾームの増加が示唆された．

実験②(A)において，eNOS阻害によりTREプレコンディショニングの冠動脈内皮機能保護効果は消失した．また，eNOS阻害によりTREプレコンディショニングの心機能障害抑制効果の大部分が減弱した．さらに，eNOS阻害によりTREプレコンディショニングの心筋の酸化ストレス抑制効果は消失した．一方，eNOS阻害によりTREプレコンディショニングの心筋のアポトーシス抑制効果は消失しなかった．実験②(B)において，TRE+CQ群ではTRE群に比べ，冠灌流量，左室圧，+dp/dt，-dp/dt，RPPのいずれも差がなく，オートファジー阻害（ライソソーム阻害）によりTREプレコンディショニングの心機能障害抑制効果および内皮機能保護効果は消失しなかった．以上の結果から，梗塞心筋モデルにおいて，TREプレコンディショニングによる再灌流後の心機能障害抑制および内皮機能保護効果は，eNOSの活性化が重要な役割を担っていることが明らかとなった．

実験③において，TRE群ではCelsior群に比べ，左室圧が有意に高かったが，冠灌流量に差はなかった．また，TRE群ではCelsior群に比べ，心筋壊死が有意に少なかった．以上の結果から，心臓冷却保存モデルにおいては，TREプレコンディショニングによる再灌流後の心機能障害抑制は，梗塞心筋モデルとは別の機序，すなわちeNOS活性化以外の機序を介していることが示唆された．

３．文献的考察

１)eNOS活性化による虚血再灌流障害抑制効果

eNOSは内皮機能に重要なホモ二量体酵素であり，内皮細胞に高発現している．生理的条件下では，eNOSはL-アルギニンと酸素からNOとL-シトルリンを合成する．eNOSの活性は，複数の補酵素と複数のアミノ酸のリン酸化を含む多くの因子に依存するが，eNOSの正常な機能には二量体化が必須であることが明らかとなっている(Förstermann and Sessa, 2012)．これまでの研究で，eNOSの二量体化の制限が，心不全，心房細動，高血圧，動脈硬化などの多くの心血管系疾患と関連するという証拠が得られている(Daiber et al., 2019)．I/R障害においても，eNOSの二量体化は内皮依存性の冠血管反応性に重要な因子であるとされ，いくつかのプレコンディショニング法（例えば，運動トレーニングや吸入麻酔）が，eNOSの二量体化を介して内皮機能障害を

抑制することが報告されている(Santana et al., 2018; Wang et al., 2020). 我々の実験においても, TRE プレコンディショニングにより eNOS の二量体化が促進され, 心機能および内皮機能の保護効果を呈したが, TRE がどのように eNOS の二量体化を促進したかについては今後さらなる検討が必要である.

２)TRE の酸化ストレスおよびアポトーシス抑制効果

TRE は, 物理的な性質として一種のケミカルシャペロンとして働き, タンパク質の変性抑制作用があることが知られている(Ohtake and Wang, 2011). 高用量の TRE は非晶質・高粘度のガラス化状態となり, 生体分子を繭のように包み込みこむことによって, 分子の動きを制限し構造変化を抑制するとされる(Crowe et al., 1998). また, p62 の発現を増加させ, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 を活性化し, その下流の抗酸化因子の発現を増強することで, 活性酸素種の量を減少させることが示されている(Mizunoe et al., 2018). 以上のように, TRE は複数の機序で細胞の酸化ストレスを軽減させることが報告されている.我々の実験においては,eNOS 阻害により TRE プレコンディショニングの心筋酸化ストレス抑制効果が消失したことから, NO バイオアベイラビリティ増大による心筋組織の活性窒素種の減少, NO 産生増大による冠血流保持による二次的な心筋再灌流障害の抑制などが TRE の効果発現機序として考えられる.

TRE は, 腎臓の虚血再灌流障害においてアポトーシスを抑制することが報告されている(Liu et al., 2020). 我々の実験においては, eNOS 活性に依存せず, TRE プレコンディショニングによって心筋のアポトーシス抑制効果を認めた. この詳細な機序については, 今後さらなる検討が必要である.

３)TRE プレコンディショニングにおけるオートファジーの関与

TRE は, mammalian target of rapamycin(mTOR)非依存的なオートファジー活性化剤として知られている. TRE は, Akt のリン酸化を抑制し, リソソーム経路のマスターレギュレーターである転写因子 EB の核内移行を促進することでオートファジーを活性化する(Palmieri et al., 2017; Wang and Ren, 2016). オートファジーの活性化は, 心筋虚血時のエネルギー基質の利用可能性を確保し, 損傷したミトコンドリアを除去し, 酸化ストレスを軽減させる生存促進メカニズムである. また, オートファジーは虚血領域におけるアポトーシスと拮抗する可能性があり,オートファジーを刺激するような介入は, 心筋虚血時に保護的である可能性がある(Delbridge et al., 2017). Jiang らは, ラット心筋細胞を用いた酸素-グルコース欠乏モデルにおいて, TRE の

オートファジーを介した細胞保護効果を報告している(Jiang and Xu, 2020). 我々の実験①ではTREプレコンディショニングにより，LC3-Ⅱのタンパク発現（オートファゴゾームの数を反映）が増加したが，実験②ではオートファジー阻害薬（ライソソーム阻害薬）であるCQ投与でもTREプレコンディショニングの心機能障害抑制効果は消失しなかった．また，CQ投与によりLC3-Ⅱの増加がみられないことから，本モデルにおいて少なくとも再灌流後の最終段階では高度のライソソーム障害が起こっており，TRE の本来のオートファジー活性化作用は発揮できていない可能性がある．一方，実験①でTREプレコンディショニングによって，Aktのリン酸化の抑制やLC3-Ⅱの増加を認めており，オートファジーが何らかの形で関与している可能性もあるため，今後さらなる検討が必要である．

４)心臓冷却保存におけるトレハロースの役割

常温虚血でみられたTREの内皮機能保護効果は冷却保存では認めなかった理由としては，低温により eNOS の酵素酵素活性が消失した可能性が考えられる．また，心臓冷却保存中のドナー心の障害には，I/R 障害のみならず細胞の低温障害も関与している（Ughetto, A et al, 2023). TREは天然の凍結保護物質としても知られており，水和を促進し水素結合を形成することで氷の形成を抑制し，低温障害を抑制する(Tie Chang and Cang Zhao, 2021). 一方でTREの細胞内への移行性は低く一般的に細胞外の氷形成阻害剤として作用するとされる．今回の実験においては保存液中にTREは含まれておらず，細胞内へTREがどの程度取り込まれたかは不明である．心臓冷却保存におけるTREの心機能障害抑制や心筋壊死抑制効果の詳細な機序については，今後さらなる検討が必要である．

４．本研究の問題点

１)NOのバイオアベイラビリティの評価と内皮細胞の役割

本研究では，直接的な NO の測定や活性窒素種の発生については検討しておらず,今後こうしたNOのバイオアベイラビリティを調べることで,eNOSの役割に関するより多くの証拠が得られると考えられる．また，本研究では心筋細胞と内皮細胞を独立して検討していないため，今後これらの相互関係をさらに検討することが，TRE プレコンディショニングの詳細な機序を明らかにする上で重要と考えられる．

２）臨床応用にむけての課題

本研究のランゲンドルフ回路を用いた ex vivo モデルでは，TRE の投与法は我々の過去の研究に基づいて選択されたが，TRE のプレコンディショニングに最も適した濃度および投与時間については検討できていない．特に心臓移植においてプレコンディショニングを適用するには，ドナーの死亡前に薬剤を投与する必要があるが，これは倫理的，法的観点から現在禁止されている．こうした理由からも，臨床応用へ向けてさらに簡便かつ有効な投与方法の開発が必要である．

また最近の研究において，ラットの in vivo の心筋梗塞モデルにおいても，TRE が I/R 障害を抑制し，抗アポトーシス作用，抗酸化作用を示すことが明らかとなった(Wang et al., 2023)．ヒトへの臨床応用へ向けて，今後はブタ等の大動物による in vivo モデルでのさらなる検討が必要である．

結論

１．本研究で得られた新知見

・ラットの梗塞心筋モデルにおいて，TRE プレコンディショニングは再灌流後の心機能障害および内皮機能障害を抑制する．
・これらの保護効果の大部分は，eNOS 活性化に依存している．
・ラットの心臓冷却保存モデルにおいて，TRE プレコンディショニングは再灌流後の心機能障害および心筋壊死を抑制する．

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障害抑制効果および内皮機能保護効果が得られ，TRE の効果は eNOS の活性に大部分が依存していたが，抗アポトーシス作用など複数の機序の関与が考えられた．この研究結果は，一般的な心臓手術および心臓移植における新たな心筋保護法あるいは臓器保護法への開発に向けた，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．

TRE 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)常温虚血再灌流障害における TRE の心筋細胞および内皮細胞それぞれに対する影響の研究

2)大動物 in vivo モデルにおける TRE の虚血再灌流後の心機能障害抑制効果に関する研究

3)心臓冷却保存モデルにおける TRE の冷却保存後の心機能障害抑制効果の機序に関する研究

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の in vivo モデルでのさらなる検証や詳細な作用機序の解明が必要である．

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

Ando, N., Shingu, Y., Suno, K., Wakasa, S., 2021. Trehalose preconditioning for transient global myocardial ischemia in rats. Biochem Biophys Res Commun 548, 14-19.

Aurore, U., François R., Adrien M., Pascal B., Philippe G.,Roland D.,Julien G., Alain L. and Clément D., 2023. Heart graft preservation technics and limits: an update and perspectives. Front Cardiovasc Med 10.

Bell, R.M., Mocanu, M.M., Yellon, D.M., 2011. Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. J Mol Cell Cardiol 50, 940-950.

Beyersdorf, F., 2009. The use of controlled reperfusion strategies in cardiac surgery to minimize ischaemia/reperfusion damage. Cardiovasc Res 83, 262-268.

Cooley, D.A., George Reul, F.J., Wukasch, D.C., 1972. lschemic Contracture of the Heart: “Stone Heart.”. Am J Cardiol 4, 575-577.

Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M., 1998. THE ROLE OF VITRIFICATION IN ANHYDROBIOSIS, Annu. Rev. Physiol 60, 73-103.

Daiber, A., Xia, N., Steven, S., Oelze, M., Hanf, A., Kröller-Schön, S., Münzel, T., Li, H., 2019. New therapeutic implications of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function/dysfunction in cardiovascular disease. Int J Mol Sci 20, 187.

Delbridge, L.M.D., Mellor, K.M., Taylor, D.J., Gottlieb, R.A., 2017. Myocardial stress and autophagy: Mechanisms and potential therapies. Nat Rev Cardiol 14, 412-425.

Dobson, G.P., Faggian, G., Onorati, F., Vinten-Johansen, J., 2013. Hyperkalemic cardioplegia for adult and pediatric surgery: end of an era? Front Physiol 4, 228.

Doenst, T., Borger, M.A., Weisel, R.D., Yau, T.M., Maganti, M., Rao, V., 2008. Relation between aortic cross-clamp time and mortality - not as straightforward as expected. European Journal of Cardio-thoracic Surgery 33, 660-665.

Förstermann, U., Sessa, W.C., 2012. Nitric oxide synthases: Regulation and function. Eur Heart J 33, 829-837.

González Arbeláez, L.F., Ciocci Pardo, A., Swenson, E.R., Álvarez, B. V., Mosca, S.M., Fantinelli, J.C., 2018. Cardioprotection of benzolamide in a regional ischemia model: Role of eNOS/NO. Exp Mol Pathol 105, 345-351.

Hausenloy, D.J., Chilian, W., Crea, F., Davidson, S.M., Ferdinandy, P., Garcia-Dorado, D., Van Royen, N., Schulz, R., Heusch, G., 2019. The coronary circulation in acute myocardial ischaemia/reperfusion injury: A target for cardioprotection. Cardiovasc Res 115, 1143-1155.

Heusch, G., 2016. The Coronary Circulation as a Target of Cardioprotection. Circ Res 118, 1643-1658.

Heusch, G., 2013. Cardioprotection: Chances and challenges of its translation to the clinic. The Lancet 381, 166-175.

Hosseinpour-Moghaddam, K., Caraglia, M., Sahebkar, A., 2018. Autophagy induction by trehalose: Molecular mechanisms and therapeutic impacts. J Cell Physiol 233, 6524-6543.

Jiang, J., Xu, H., 2020. Trehalose alleviates oxygen-glucose deprivation induced myocardial injury through the autophagy-lysosome pathway, Int J Clin Exp Med 13, 6606-6615.

Khush, K.K., Potena, L., Cherikh, W.S., Chambers, D.C., Harhay, M.O., Hayes, D., Hsich, E., Sadavarte, A., Singh, T.P., Zuckermann, A., Stehlik, J., 2020. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 37th adult heart transplantation report-2020; focus on deceased donor characteristics. Journal of Heart and Lung Transplantation 39, 1003-1015.

Klionsky, D.J., Kamal Abdel-Aziz, A., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M.H., Princely Abudu, Y., Acevedo-Arozena, A., et al, 2020. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition).

Kloner, R.A., Jennings, R.B., 2001. Consequences of Brief Ischemia: Stunning, Preconditioning,and Their Clinical Implications,

Circulation 104, 2981-2989.

Kumar, S.K., Prakash, T., Vetriselvan, M., Mani, K.P., 2021. Trehalose protects the endothelium from cadmium-induced dysfunction. Cell Biol Int 45, 957-964.

Larocca, T.J., Henson, G.D., Thorburn, A., Sindler, A.L., Pierce, G.L., Seals, D.R., 2012. Translational evidence that impaired autophagy contributes to arterial ageing. Journal of Physiology 590, 3305-3316.

Liu, S., Yang, Y., Gao, H., Zhou, N., Wang, P., Zhang, Y., Zhang, A., Jia, Z., Huang, S., Trehalose, H.S., 2020. Trehalose attenuates renal ischemia-reperfusion injury by enhancing autophagy and inhibiting oxidative stress and inflammation. Am J Physiol Renal Physiol 318, 994-1005.

McCord, J.M., 1985. Oxygen-Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury. New England Journal of Medicine 312, 159-163.

Meldrum, D.R., 1998. Tumor necrosis factor in the heart. Am J Physiol 274, 577-595.

Menasche, P.I., Termignon, J.L., Pradier, E., Grousset, C., Mouas, C., Alberici, G., Weiss, M., Piwnica, A., Bloch, G., 1994. CaMi%horacic swrgery Experimental evaluation of Celsior@, a new heart preservation solution, European Journal Cardio-thirac Surg 8, 207-213.

Méndez-Carmona, N., Wyss, R.K., Arnold, M., Joachimbauer, A., Segiser, A., Fiedler, G.M., Carrel, T.P., Tevaearai Stahel, H.T., Longnus, S.L., 2019. Differential effects of ischemia/reperfusion on endothelial function and contractility in donation after circulatory death. Journal of Heart and Lung Transplantation 38, 767-777.

Mizunoe, Y., Kobayashi, M., Sudo, Y., Watanabe, S., Yasukawa, H., Natori, D., Hoshino, A., Negishi, A., Okita, N., Komatsu, M., Higami, Y., 2018. Trehalose protects against oxidative stress by regulating the Keap1-Nrf2 and autophagy pathways. Redox Biol 15, 115-124.

Münzel, T., Camici, G.G., Maack, C., Bonetti, N.R., Fuster, V., Kovacic, J.C., 2017. Impact of Oxidative Stress on the Heart and

Vasculature Part 2 of a 3-Part Series. J Am Coll Cardiol 70, 212-229.

Murry, C.E., Jennings, R.B., Reimer, K.A., 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 74,1124-1136.

Ohtake, S., Wang, Y.J., 2011. Trehalose: Current use and future applications. J Pharm Sci 100, 2020-2053.

Palmieri, M., Pal, R., Nelvagal, H.R., Lotfi, P., Stinnett, G.R., Seymour, M.L., Chaudhury, A., Bajaj, L., Bondar, V. V., Bremner, L., Saleem, U., Tse, D.Y., Sanagasetti, D., Wu, S.M., Neilson, J.R., Pereira, F.A., Pautler, R.G., Rodney, G.G., Cooper, J.D., Sardiello, M., 2017. MTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases. Nat Commun 8, 14338.

Que, W., Hu, X., Fujino, M., Terayama, H., Sakabe, K., Fukunishi, N., Zhu, P., Yi, S.Q., Yamada, Y., Zhong, L., Li, X.K., 2020. Prolonged Cold Ischemia Time in Mouse Heart Transplantation Using Supercooling Preservation. Transplantation 1879-1889.

Santana, M.N.S., Souza, D.S., Miguel-dos-Santos, R., Rabelo, T.K., Vasconcelos, C.M.L. de, Navia-Pelaez, J.M., Jesus, I.C.G. de, Silva-Neto, J.A. da, Lauton-Santos, S., Capettini, L. dos S.A., Guatimosim, S., Rogers, R.G., Santos, M.R.V. dos, Santana-Filho, V.J., Mesquita, T.R.R., 2018. Resistance exercise mediates remote ischemic preconditioning by limiting cardiac eNOS uncoupling. J Mol Cell Cardiol 125, 61-72.

Saraste, A., Pulkki, K., 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, Cardiovascular Research 45, 528-537.

Singhal, A.K., Symons, J.D., Boudina, S., Jaishy, B., Shiu, Y.-T., 2010. Role of Endothelial Cells in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. Vasc Dis Prev 7, 1-14.

Tie C., and Gang Z., 2021. Ice Inhibition for Cryopreservation: Materials, Strategies, and Challenges. Adv Sci 8.

Wang, C., Qiao, S., Hong, L., Sun, J., Che, T., An, J., Camara, A.K.S., 2020. NOS cofactor tetrahydrobiopterin contributes to anesthetic preconditioning induced myocardial protection in the isolated ex

vivo rat heart. Int J Mol Med 45, 615-622.
Wang, Q., Ren, J., 2016. mTOR-Independent autophagy inducer trehalose rescues against insulin resistance-induced myocardial contractile anomalies: Role of p38 MAPK and Foxo1. Pharmacol Res 111, 357-373.
Wang, S., Chen, Y., Wu, C., Wang, Y., Lin, W., Bu, R., 2023. Trehalose Alleviates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting NLRP3-Mediated Pyroptosis. Appl Biochem Biotechnol.
Wu, M.Y., Yiang, G.T., Liao, W.T., Tsai, A.P.Y., Cheng, Y.L., Cheng, P.W., Li, C.Y., Li, C.J., 2018. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. Cellular Physiology and Biochemistry 46, 1650-1667.
Wu, Y., Liu, H., Wang, X., 2021. Cardioprotection of pharmacological postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury. Life Sci 264.
Xiao, J., Ke, Z.P., Shi, Y., Zeng, Q., Cao, Z., 2018. The cardioprotective effect of thymoquinone on ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart via regulation of apoptosis and autophagy. J Cell Biochem 119, 7212-7217.
Yang, Y.-M., Huang, A., Kaley, G., Sun, D., 2009. eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. Am J Physiol Heart Circ Physiol 297, 1829-1836.
Zahedi, N., Pourajam, S., Zaker, E., Kouhpayeh, S., Mirbod, S.M., Tavangar, M., Boshtam, Mohsen, Hatami Kahkesh, K., Qian, Q., Zhang, F., Shariati, L., Khanahmad, H., Boshtam, Maryam, 2023. The potential therapeutic impacts of trehalose on cardiovascular diseases as the environmental-influenced disorders: An overview of contemporary findings. Environ Res 226.