



Title	ラット急性心筋梗塞モデルにおける心機能, 心不全マーカーおよびタンパク分解に対する左室負荷軽減の効果の検討
Author(s)	東, 亮太
Description	配架番号 : 2966
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16691号
Issue Date	2025-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16691
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98665
Type	doctoral thesis
File Information	AZUMA_Ryota.pdf, 全文



学位論文

ラット急性心筋梗塞モデルにおける 心機能，心不全マーカーおよびタンパク分解に 対する左室負荷軽減の効果の検討

(Effects of left ventricular unloading on cardiac function, heart failure markers,
and protein degradation in rat hearts with acute myocardial infarction)

2025 年 12 月

北海道大学

東 亮太

学位論文

ラット急性心筋梗塞モデルにおける
心機能，心不全マーカーおよびタンパク分解に
対する左室負荷軽減の効果の検討

(Effects of left ventricular unloading on cardiac function, heart failure markers,
and protein degradation in rat hearts with acute myocardial infarction)

2025 年 12 月

北海道大学

東 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	5 頁
緒言	7 頁
方法	13 頁
結果	24 頁
考察	43 頁
結論	48 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. Ryota Azuma, Yasushige Shingu, Jingwen Gao, Satoru Wakasa. (2025)
Effects of left ventricular unloading on cardiac function, heart failure markers, and autophagy in rat hearts with acute myocardial infarction.
International Journal of Molecular Sciences, 26, 4422

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 東亮太，新宮康栄，若狭哲
ラットを用いた AMI-Unloading model の開発と心機能および心不全関連遺伝子発現の検討
第 77 回日本胸部外科学会定期学術総会，2024 年 11 月 2 日・金沢
2. 東亮太，新宮康栄，若狭哲
ラット心肺移植モデルでの AMI-Unloading 後のオートファジー関連タンパク発現の検討
第 55 回日本心臓血管外科学会学術総会，2025 年 2 月 22 日・下関

要旨

【背景と目的】

急性心筋梗塞（AMI）後の心原性ショック症例に対して、大動脈内バルーンポンピングや経皮的心肺補助装置などの機械的補助循環装置が使用されているが、死亡率の減少には至っていない。

近年、カテーテル型の経皮的左室補助装置（Impella）が使用されるようになり、左室負荷軽減（unloading）を行いながら全身へ送血することが可能となった。動物実験では心筋酸素消費量を減らし、梗塞サイズを減少させたと報告されているが、AMI後の心原性ショックへのImpellaの使用による入院死亡率の低下などの臨床的意義に関しては不明である。またこれらの研究では、AMI後の再灌流における急性期でのImpellaの影響しか検討しておらず、長期間の左室unloadingや、再灌流不成功のような重症例での左室unloadingの影響は不明である。

AMIの発症後は、非梗塞部の心筋細胞の肥大化や左室内腔の拡大を伴う左室心筋のリモデリングが起こる。一方、左室unloadingは、正常心臓の心筋細胞サイズを縮小させたり、リモデリングを抑制することが報告されている。

このリモデリングには、オートファジー（自食作用）とユビキチン-プロテアソーム系（UPS）の2つのタンパク分解システムが関与するとされているが、AMI後の左室unloadingにおける両者の役割に関する研究はない。そのため我々は、この2つのシステムがAMI後の左室unloadingの効果に関与する重要な分子機構ではないかと考えた。

本研究の目的は、ラットを用いたAMIモデルにおいて、異所性心肺移植による左室unloadingがAMI後の心機能、オートファジーおよびUPSに与える影響を検討することである。

【対象と方法】

9週齢の雄のLewisラットを用い、4群（non-AMI群、AMI群、non-AMI+unloading群、AMI+unloading群、各群：n = 4-6）を作成した。AMIは左前下行枝を結紮して作製し、unloadingには異所性心肺移植モデルを用いた。このモデルでは、レシピエント・ラットの腹部大動脈の血液がドナー・ラットの上行大動脈・冠動脈を灌流し、冠血流のみが右心系・肺循環・左心系へと流れることで、冠血流のみが左心室の前負荷となる。術後2日目および14日目に心臓を摘出し、ランゲンドルフ回路にてKrebs-Henseleit bufferで30分灌流後、rate pressure product（RPP）を含む心機能パラメーターを測定した。その後左室心筋を採取し、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。心筋細胞面積および線維化の評価のために、

ヘマトキシリン・エオジン染色，マッソン・トリクローム染色を行った．代表的なオートファジーマーカーである microtubule-associated light chain 3 (LC3) -II および p62/SQSTM1 (p62) をウエスタンブロッティングで定量した．UPS 系の評価のために，ユビキチンリガーゼ E3 である F-box protein 32 (*Atrogin1*) と tripartite motif containing 63 (*MuRF1*) の遺伝子発現を，RT-qPCR で測定した．統計解析は two-way ANOVA で検定を行い，AMI と左室 unloading に交互作用を認めた場合，左室 unloading は AMI の経過に影響を与えていると解釈した．事後検定は Bonferroni 法を用いて，non-AMI 群と AMI 群および non-AMI+unloading 群と AMI+unloading 群の 2 群間のみで行った．交互作用において p 値が 0.2 未満であったパラメーターについては，効果量 (partial η^2) も算出した．

【結果】

RPP は，2 日間・14 日間モデルともに交互作用を認めなかったが，14 日間モデルでは効果量は中程度と判定された (2 日間: $p = 0.79$, 14 日間: $p = 0.14$, partial $\eta^2 = 0.085$)．心筋細胞面積は，2 日間・14 日間モデルともに交互作用を認めず，14 日間モデルでは効果量も小さいと判定された (2 日間: $p = 0.86$, 14 日間: $p = 0.12$, partial $\eta^2 = 0.018$)．線維化は，2 日間・14 日間モデルともに交互作用を認めなかった (2 日間: $p = 0.45$, 14 日間: $p = 0.44$)．

LC3-II のタンパク発現量は，2 日間・14 日間モデルともに交互作用を認めなかった (2 日間: $p = 0.92$, 14 日間: $p = 0.30$)．p62 のタンパク発現量は，2 日間・14 日間モデルともに交互作用を認め，いずれも効果量は大きいと判定された (2 日間: $p = 0.001$, partial $\eta^2 = 0.25$, 14 日間: $p = 0.039$, partial $\eta^2 = 0.20$)．事後検定では，2 日間モデルで AMI+unloading 群は non-AMI+unloading 群より有意に低値であったが，non-AMI 群と AMI 群の間には有意差を認めなかった．一方，14 日間モデルでは AMI 群は non-AMI 群より有意に高値であったが，non-AMI+unloading 群と AMI 群+unloading 群の間には有意差を認めなかった．つまり，急性期，亜急性期ともに左室 unloading は AMI 後のオートファジー活性の減弱を抑制していることが示唆された．

Atrogin1 の遺伝子発現量は，2 日間・14 日間モデルともに交互作用を認めなかった (2 日間: $p = 0.29$, 14 日間: $p = 0.34$)．*MuRF1* の遺伝子発現量は，2 日間・14 日間モデルともに交互作用を認めなかったが，14 日間モデルでは効果量は中程度と判定された (2 日間: $p = 0.63$, 14 日間: $p = 0.10$, partial $\eta^2 = 0.11$)．

【考察】

既報では、AMI 後にオートファジー活性が低下し、オートファジー活性剤の使用により心機能障害やリモデリングを抑制すると報告されている。しかし、左室 unloading によるオートファジー活性の変化については不明である。

本研究では、AMI 後に左室 unloading を行うことで、オートファジー活性の低下を抑制し、心機能パラメーターを改善させる傾向を認めた。つまり、左室 unloading により AMI 後のオートファジー活性の低下を抑制することが、心機能の保持に關与している可能性が示唆された。薬剤投与などによりオートファジー活性をさらに高めた場合に、心機能のさらなる改善を得られるかどうかを含め、今後検討が必要である。

【結論】

ラットを用いた AMI モデルにおいて、異所性心肺移植による左室 unloading は、亜急性期において AMI 後の心機能の増悪を抑制する傾向が認められた。その機序として、心筋におけるオートファジー活性の改善が關与している可能性が示唆された。本研究は、AMI 後の心原性ショックに対して経皮的左室補助装置を使用時に、オートファジー活性を制御することで心機能のさらなる改善が期待され、今後の治療戦略の検討に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.

AKT	: AKT serine/threonine kinase
AMI	: acute myocardial infarction
AMPK	: AMP-activated protein kinase
α MHC	: α -myosin heavy chain
ANF	: atrial natriuretic factor
ANOVA	: Analysis of Variance
<i>Atrogin1</i>	: F-box protein 32
a.u.	: arbitrary unit
β MHC	: β -myosin heavy chain
BNP	: brain natriuretic peptide
BW	: body weight
cDNA	: complementary deoxyribonucleic acid
CF	: coronary flow
CO	: cardiac output
FHL1	: four and a half LIM domains 1
FHL2	: four and a half LIM domains 2
FS	: fractional shortening
<i>GAPDH</i>	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HE	: hematoxylin and eosin
HR	: heart rate
IABP	: intra aortic balloon pumping
KHB	: Krebs–Henseleit buffer
LC3	: microtubule-associated light chain 3
LVAD	: left ventricular assist device
LVDP	: left ventricular developed pressure
LVEDD	: left ventricular end-diastolic dimension
LVESD	: left ventricular end-systolic dimension
MT	: Masson's trichrome staining
<i>MuRF1</i>	: tripartite motif containing 63
PCR	: polymerase chain reaction

p62	: p62/SQSTM1
RNA	: ribonucleic acid
RPP	: rate pressure product
RT-qPCR	: reverse transcription quantitative PCR
<i>SERCA2a</i>	: sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase
ST-II	: St. Thomas' Hospital cardioplegic solution No.2
SV	: stroke volume
Ub	: ubiquitin
UL	: unloading
UPS	: ubiquitin-proteasome system
V-A ECMO	: veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation

緒言

1. 論文の背景

1-1. 急性心筋梗塞によるショックと治療

急性心筋梗塞（AMI）とは，冠動脈の閉塞により血液の供給が途絶し，心筋壊死を引き起こす病態である．日本では2018年から2022年のデータによると，毎年7万人以上がAMIを発症し，6000人以上が死亡している（循環器疾患診療実態調査報告書，2022）．また，米国でも2017年から2020年の間に930万人がAMIを発症し，2020年には10万人が死亡している（Tsao et al, 2023）．AMI後には冠動脈の血流支配に一致して様々な程度の心筋壊死が起こり，左室壁運動が低下あるいは消失する．さらに，左室壁運動の低下が広範囲に及ぶ場合，心原性ショックをきたす．AMI症例のうち，心原性ショックは4.4%に発症すると報告されており（Masoudi et al, 2017），心原性ショックを発症すると，死亡率は40～50%であると報告されている（Thiele et al, 2019）．このような症例に対しては，大動脈内バルーンパンピング（IABP）や経皮的心肺補助装置（V-A ECMO）などの機械的補助循環装置が使用されているものの，死亡率の有意な低下には至っていない（McDonagh et al, 2021）．

1-2. 機械的補助循環装置の種類と効果

従来，AMIによる心原性ショックに対して，IABPやV-A ECMOが使用されてきた．IABPは，下行大動脈内に留置したバルーンが心拡張期に拡張することで，AMIによる心原性ショックなどで微小血管の循環予備能が高度に低下した状態においても，冠血流量を増加させることが可能である．一方，心収縮期では急速にバルーンが収縮することで後負荷が軽減し，結果として心拍出量の増加をもたらす（Scheidt et al, 1973；De Silva et al, 2014）．このような機序によって，心筋への酸素供給は増え，かつ酸素需要を減らすことができる．そのため，近年まではAMIによる心原性ショックにおいてIABPがクラスIとして推奨され，広く使用されていた．しかしながら，IABPの予後改善効果を検討したランダム化比較試験（IABP-SHOCK II試験）では予後改善効果を認めなかった（Thiele et al, 2012）．さらに，IABPの使用は心筋梗塞サイズの縮小につながらないとするデータが示されたため（Patel et al, 2011），欧米や日本のガイドラインでIABPを常習的に使用することは推奨されなくなった（急性冠症候群ガイドライン，2018）．

V-A ECMOは強力な循環補助作用と呼吸補助の機能を持ち，右心系からの脱血により間接的に左室前負荷を軽減し，末梢動脈から全身に送血することで循環を担保する．しかしながら，虚血性心疾患や心機能障害の治療という観点では，左室の後負荷

を増大することから心機能の回復を阻害する可能性がある (Ostadal et al, 2015). 実際、欧州心臓学会 (European Society of Cardiology; ESC) のガイドラインでは、心原性ショックに対する機械的補助の使用は Class II a で推奨されているものの、エビデンスレベルは C であり、低いのが現状である (McDonagh et al, 2021).

しかしながら近年、左室内に留置されたカテーテルの先端より血液を吸い込み、上行大動脈へ送血をすることで左室補助を行う、カテーテル型の経皮的左室補助装置が開発され、注目されている。

1-3. カテーテル型の経皮的左室補助装置の原理と AMI における有用性

カテーテル型の経皮的左室補助装置である Impella (Abiomed Inc. Danvers, MA, USA) が、本邦でも AMI 後の心原性ショックに使用されるようになってきた。本邦において Impella は 2016 年に認可され、2020 年から 2022 年の間では AMI 症例に対して 3000 例程度使用されている (補助循環用ポンプカテーテルに関するレジストリ事業 J-PVAD 年次報告, 2023)。この装置は、左室内に留置されたカテーテルの先端より血液を吸い込み、上行大動脈へ送血をすることで左室のポンプ機能の補助を行う。左室内の血液の吸い込みにより左室の前負荷は軽減される、すなわち左室は “unloading” (左室負荷軽減) されることとなる (図 1)。この機序により、左室の機械的仕事量と心筋酸素需要量は低下し (Saku et al, 2018)、心機能が改善すると考えられている (Meyns et al, 2003)。

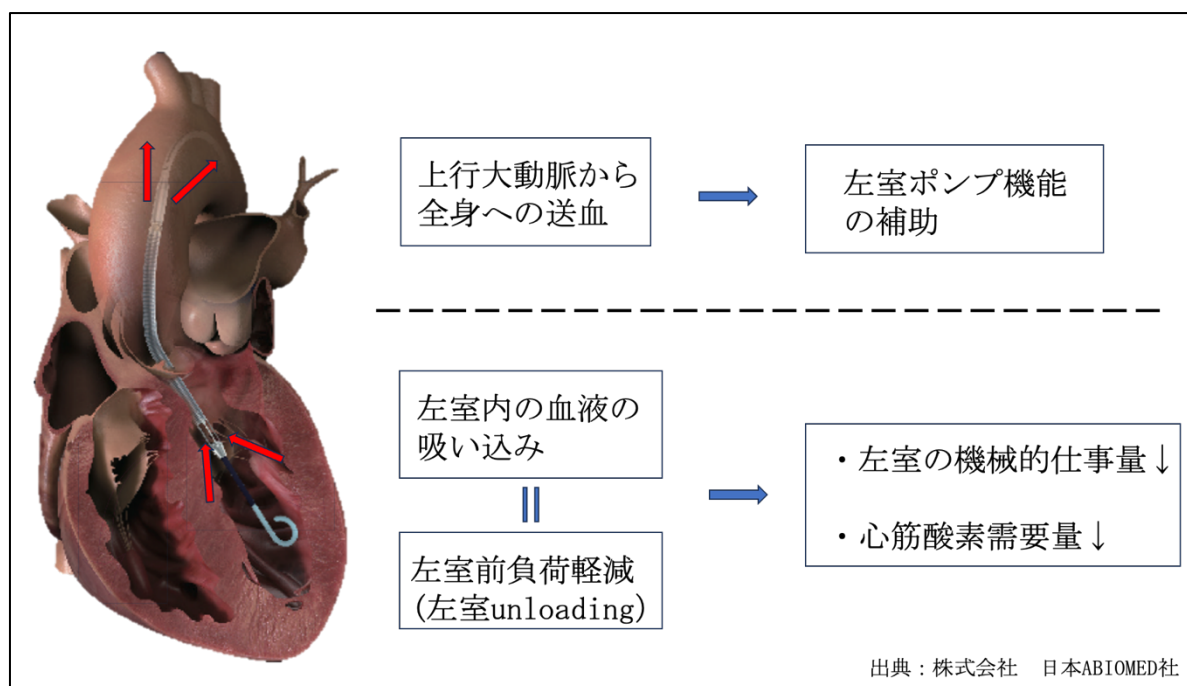


図 1. Impella の機能と効果

上行大動脈から左室へ Impella が挿入されている図を左に示す。赤矢印は血流を示す。右に Impella の機序を示す。

動物実験において、Meyns B. らはブタの AMI モデルを用いて、60 分間の虚血および 120 分間の再灌流の間に Impella でフルサポートを行うことで、心筋酸素消費量を低下させ、梗塞サイズを 75%減少させたと報告している (Meyns et al, 2003). 同様に Saku K. らはイヌの AMI モデルを用いて、60 分間の虚血および 60 分間の再灌流の間に Impella で最大限の補助を行うことで、梗塞サイズを 80%減少させ、心機能が保持されていたと報告している (Saku et al, 2018). しかしながら、AMI 後の心原性ショックに対して Impella を使用することにより死亡率の低下を示した研究は 1 つのみ (The Danger trail) であり (Tavazzi and Morrow, 2024), Impella の使用が入院中死亡率の低下に寄与するかといった臨床的意義については、依然として不明である (De Luca et al, 2023). さらに、動物実験も含めたこれらの研究は、AMI 後の再灌流における急性期での Impella の影響に限定されており、長期間にわたる左室 unloading の影響や、広範な梗塞・再灌流不成功といった重症例における影響は明らかではない. そのため我々は、Impella の最適な使用法を判断するためには、重症 AMI 症例における左室 unloading の効果発現機序を解明する必要があると考えた.

1-4. 心筋リモデリングとタンパク分解システム

AMI を発症すると、左室心筋においてリモデリングが生じる. AMI 発症後数時間から数日の急性期には、梗塞部位の心筋細胞壊死により炎症細胞が惹起され、左室の形態を維持しているコラーゲンの支持構造を破壊し、心筋細胞の菲薄化および拡張を引き起こす. さらに、数週間から数ヶ月後には、心拍出量を維持するために非梗塞部の心筋細胞の肥大化が起こり、左室内腔のさらなる拡大を引き起こす (Marc and Braunwald, 1990). しかしながら、これらの変化は壁ストレスを増加させ、さらなる左室の拡大を引き起こすとともに、左室形態は楕円形から球形へと変化する (Bhatt et al, 2017). この一連の左室形態の変化は、「リモデリング」として知られており、予後不良の因子であることが報告されている (Marc and Braunwald, 1990).

一方、左室 unloading は心筋細胞サイズの縮小をもたらすことが知られている. ラットを用いた左室 unloading の実験では、正常心臓に対して unloading を行くと、左室重量は低下および心筋細胞サイズの縮小が認められたと報告されている (Welsh et al, 2001). ヒトにおいても、左室補助装置 (LVAD) による左室 unloading によって、心筋リモデリングが抑制されると報告されている (Pamias-Lopez et al, 2023).

心筋リモデリングの抑制には、オートファジー (自食作用) およびユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) という、2 つの主要なタンパク質分解システムが関与していると報告されている (Wang and Robbins, 2014). オートファジーは、老化または損傷したタンパク質や細胞小器官をアミノ酸や脂肪酸へと分解し、エネルギー産生や基質再利用を促進する主要な代謝機構である (Hale et al, 2013). 障害を受けた細胞内タン

タンパク質は隔離膜によって取り囲まれ、オートファゴソームを形成し、さらにリソソームと融合することで内容物が分解される（図 2）。オートファジーは正常な心機能の維持に不可欠な機構であるとされている (Nishida and Otsu, 2016)。

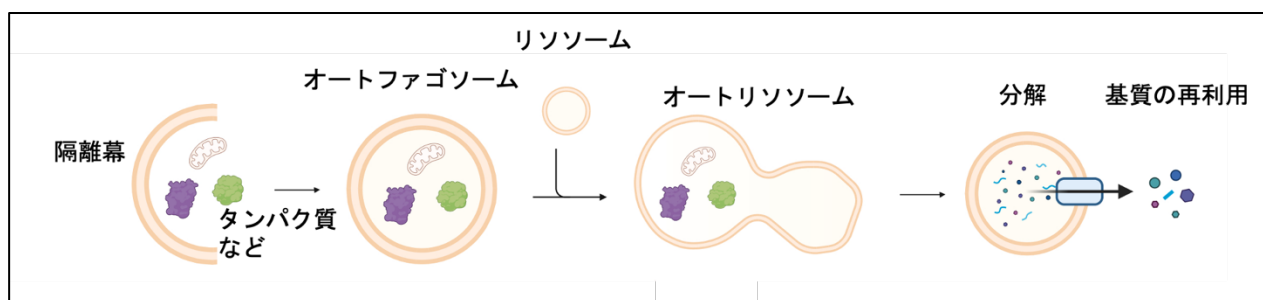


図 2. オートファジーの概要

タンパク質などを隔離膜が取り囲み、オートファゴソームを形成する。その後リソソームと融合してオートリソソームとなり、分解産物はエネルギー基質となり細胞内で再利用される。

UPS によるタンパク分解は、まず 3 種類のユビキチン化酵素（E1 ユビキチン活性化酵素，E2 ユビキチン結合酵素，E3 ユビキチンリガーゼ）により，ユビキチンが標的タンパク質に共有結合されることで開始される。その後，ユビキチンが付加されたタンパク質は 26S プロテアソームにより分解される (Barac et al, 2017)（図 3）。

我々は，この 2 つの主要なシステムが AMI に対する左室 unloading の効果に関与する重要な分子機構ではないかと考えた。

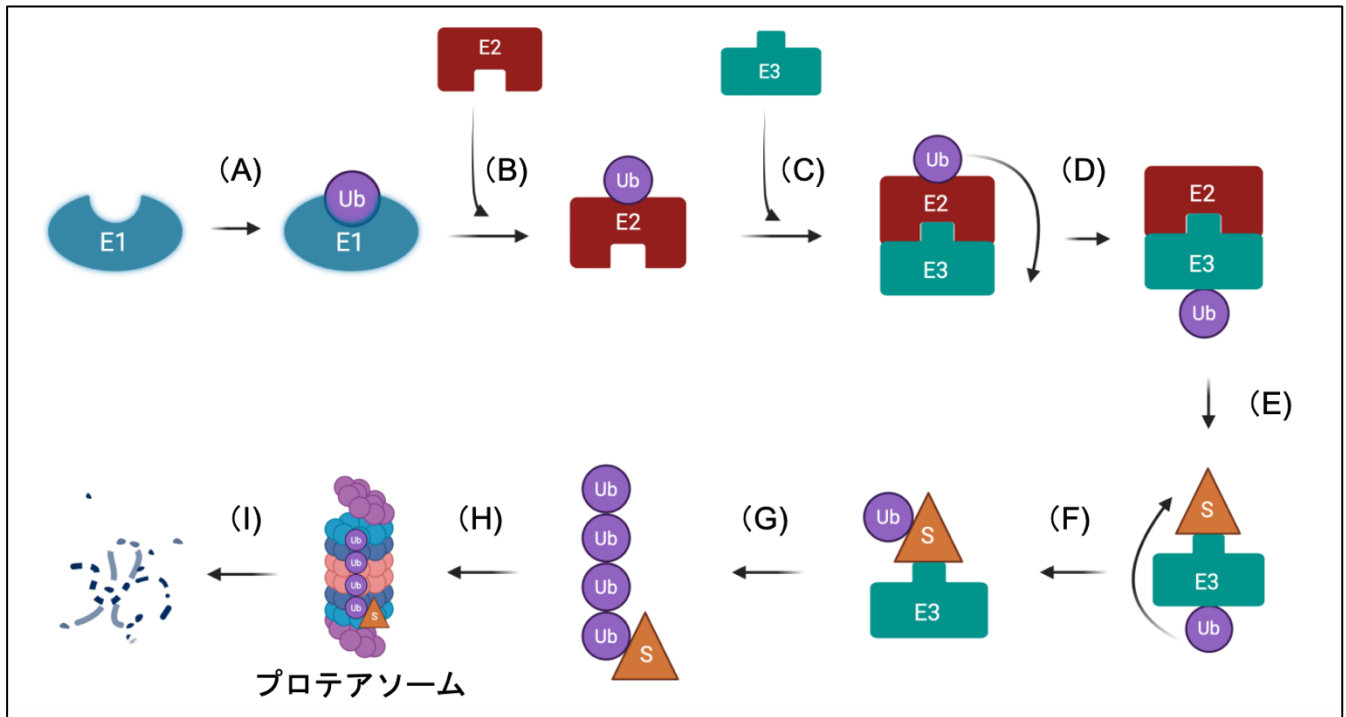


図 3. ユビキチンプロテアソーム系の概要

(A) E1 ユビキチン活性酵素とユビキチンが結合. (B) ユビキチンが E1 ユビキチン活性酵素から E2 ユビキチン結合酵素へ移動. (C) E2 ユビキチン結合酵素と E3 ユビキチンリガーゼが結合. (D) ユビキチンが E2 ユビキチン結合酵素から E3 ユビキチンリガーゼへ移動. (E) E3 ユビキチンリガーゼに標的タンパクが結合. (F) ユビキチンが E3 ユビキチンリガーゼからタンパクへ移動. (G) ユビキチン同士が共有結合してポリユビキチン化. (H) プロテアソームへ移動. (I) プロテアソーム内でペプチドに分解. E1, ユビキチン活性酵素; E2, ユビキチン活性酵素; E3, ユビキチンリガーゼ; Ub, ユビキチン; S, 標的タンパク.

2. 何がわかっていて、何がわかっていないのか

ラットの正常心を用いた左室 unloading においては、左室 unloading により左室重量は低下し、心筋細胞サイズは縮小する一方で (Welsh et al, 2001), 心機能は維持されることがわかっている (Brinks et al, 2009). また、大動物を用いた超急性期の左室 unloading の研究では、AMI 後の心筋梗塞サイズが減少することが示されている (Briceno et al, 2019). しかしながら、より長期間にわたる左室 unloading が心筋リモデリングに及ぼす影響については、依然として明らかではない. さらに、AMI 後における左室 unloading に関連したオートファジーおよび UPS の役割に関する研究はない.

3. この研究では何を明らかにしようとするのか

本研究の目的は、ラットを用いた心筋梗塞モデル（左前下行枝結紮）において、異所性心肺移植を用いた左室 unloading が、AMI 後の心機能、心不全マーカー、オートファジーおよび UPS に与える影響を検討し、AMI に対する左室 unloading の効果発現機序を解明することである.

方法

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に基づき、同大学動物実験委員会により承認されたプロトコル（承認番号：22-0126）に従って実施した。また、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

9 週齢の雄の近交系 Lewis（ラット日本エスエルシー株式会社，浜松，日本）（体重 250～320 g）を使用した。飼育環境は，温度を 22.0～24.0 °C，湿度を 40～60% とし，照明の明暗は 12 時間サイクル（7-19 時）とした。飼料は MF（オリエンタル酵母工業株式会社，東京，日本）を使用し，水分は自由飲水とした。飼育には個別換気ケージシステムを使用した。すべてのラットは，北海道大学大学院医学研究院附属動物実験施設に実験開始日の 1 週間前に搬送され，飼育下で馴化された。

術後から安楽死に至るまでの飼育環境は，飲水以外は術前と同様とし，経過観察を行なった。術後 5 日目までは，鎮痛目的でアスピリン（富士フィルム和光純薬株式会社，大阪，日本）を添加した水（アスピリン 500 mg + 水 500 ml）を自由飲水とし，その後は通常水とした。

2. 実験プロトコール

4 つのグループ（各群 $n = 4 \sim 6$ ）を作成して実験を行った。それぞれ，non-AMI 群，AMI 群，non-AMI + unloading 群，AMI + unloading 群とした。すべての群において，全身麻酔は 90 mg/kg のケタミン（第一三共株式会社，東京，日本）と 10 mg/kg のキシラジン（バイエル薬品株式会社，大阪，日本）を筋肉内投与することで行った。気管挿管後，人工呼吸器を装着して呼吸管理を行い，呼吸回数は 70 回/分，一回換気量は 3 ml に設定した。手術開始直前に，15 mg/kg のアモキシシリン（富士フィルム和光純薬株式会社）と 3 ml の生理食塩水を皮下投与した。ラットの安楽死は，術後 2 日目（急性期）および 14 日目（亜急性期）に，150 mg/kg のセコバルビタールナトリウム（日医工株式会社，富山，日本）を腹腔内投与することで行った。2 日および 14 日という日数設定の根拠は，今回使用した下記で説明する左室の partial unloading モデルにおいて，左室 unloading 後 14 日で左室心筋の萎縮の進行が概ね停止することが報告されているためである (Didie et al, 2013)。

In-vivo 心機能評価のための心エコー検査は，全身麻酔下において術前（ベースライン）および安楽死直前に行った。しかしながら，心肺移植群では左室負荷条件が他

群と大きく異なるため、心機能の正確な評価が困難である。従って、全群において安楽死後に摘出した心臓をランゲンドルフ回路に接続し、ex-vivoでの心機能評価も行った。その後、左室心筋組織を用いて組織学的検査、RT-qPCR、およびウェスタンブロッティングを施行した（図4）。

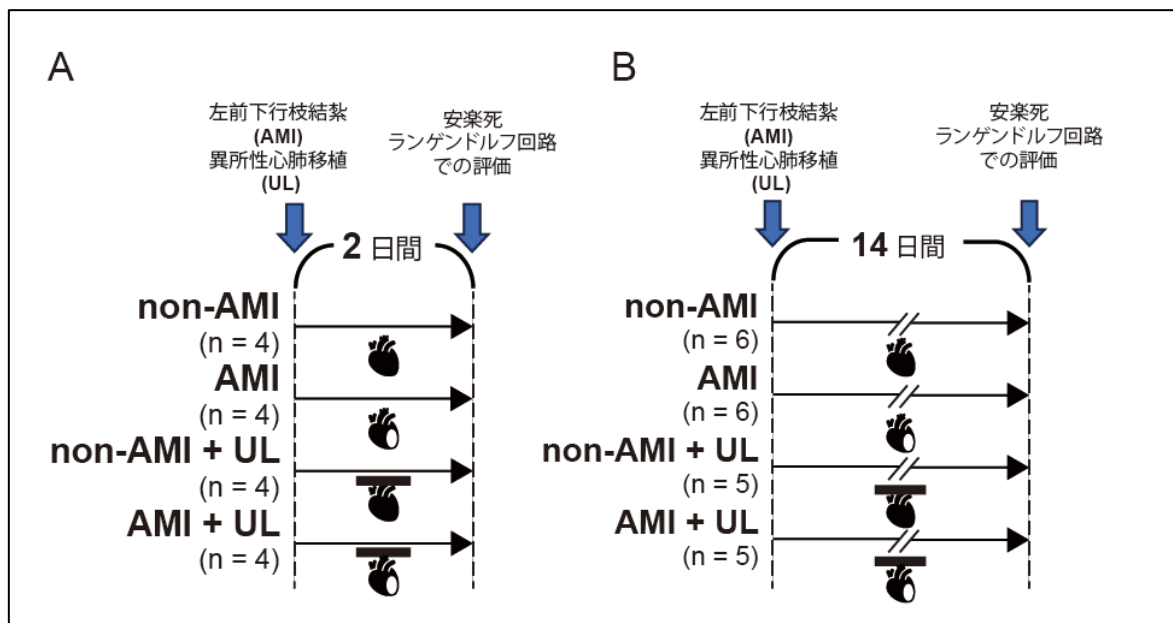


図4. 実験プロトコールと動物

2日間モデル（A）と14日間モデル（B）の実験プロトコールと動物数を示す。AMI, acute myocardial infarction; UL, unloading.

3. 心筋梗塞モデルの作成

ベースラインの心エコー検査を施行した後、左側開胸を行い、心臓を露出した。左前下行枝を同定して、7-0 ポリプロピレン糸（Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, USA）により結紮した。結紮部位より末梢の心筋に色調変化が認められたこと、ならびに心エコー検査において左室前壁の壁運動異常を確認できたことにより、心筋梗塞モデルが作成されたと判断した。

なお、non-AMI 群においては左側開胸のみを行い、左前下行枝の結紮は実施しなかった。

4. 左室 unloading モデルの作成

ラットの心臓を用いた左室 unloading モデルは、既報の異所性心肺移植モデルを用いて作成した (Ibrahim et al, 2013)。従来、左室 unloading モデルはドナー・ラットの心臓を摘出し、レシピエント・ラットの腹部大動脈にドナー・ラットの上行大動脈、レシピエント・ラットの下大静脈にドナー・ラットの肺動脈を吻合する事で作成され

ていた (Ono and Lindsey, 1969). このモデルでは, レシピエント・ラットの腹部大動脈の血液がドナー・ラットの上行大動脈・冠動脈を灌流し, その後右心系・肺動脈を経て, レシピエント・ラットの下大静脈に戻る流れとなる. したがって, 左心室には血液が流入せず, **complete unloading** モデルとされている.

一方, Ibrahim らにより報告された左室 **unloading** モデルは, ドナー・ラットの心臓および上行大動脈を一塊として摘出し, レシピエント・ラットの腹部大動脈とドナー・ラットの上行大動脈を吻合する手法で作成された (図 5). このモデルでは, レシピエント・ラットの腹部大動脈の血液がドナー・ラットの上行大動脈・冠動脈を灌流し, その冠血流のみが右心系・肺循環・左心系を経て, 最終的に左室から上行大動脈へと拍出される. すなわち, 冠血流のみが左心室の前負荷となることから, **partial unloading** モデルとされている.

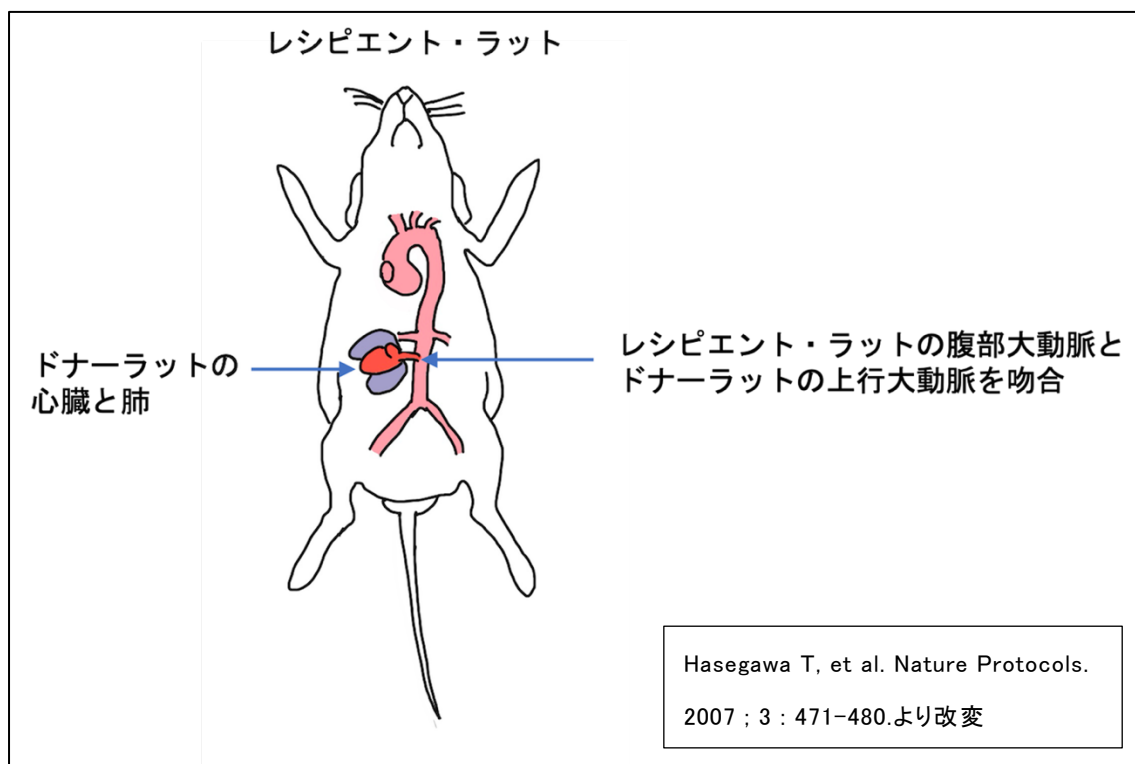


図 5. ラットを用いた左室 **unloading** の模式図

ラットを用いた左室 **unloading** の模式図を示す. レシピエント・ラットの腹部大動脈にドナー・ラットの上行大動脈を吻合することでモデルを作成する.

臨床において用いられている左室補助装置では, 左室に完全な **unloading** が生じることはないため, 今回我々はより臨床的条件に近い **partial unloading** モデルを採用した (図 6) .

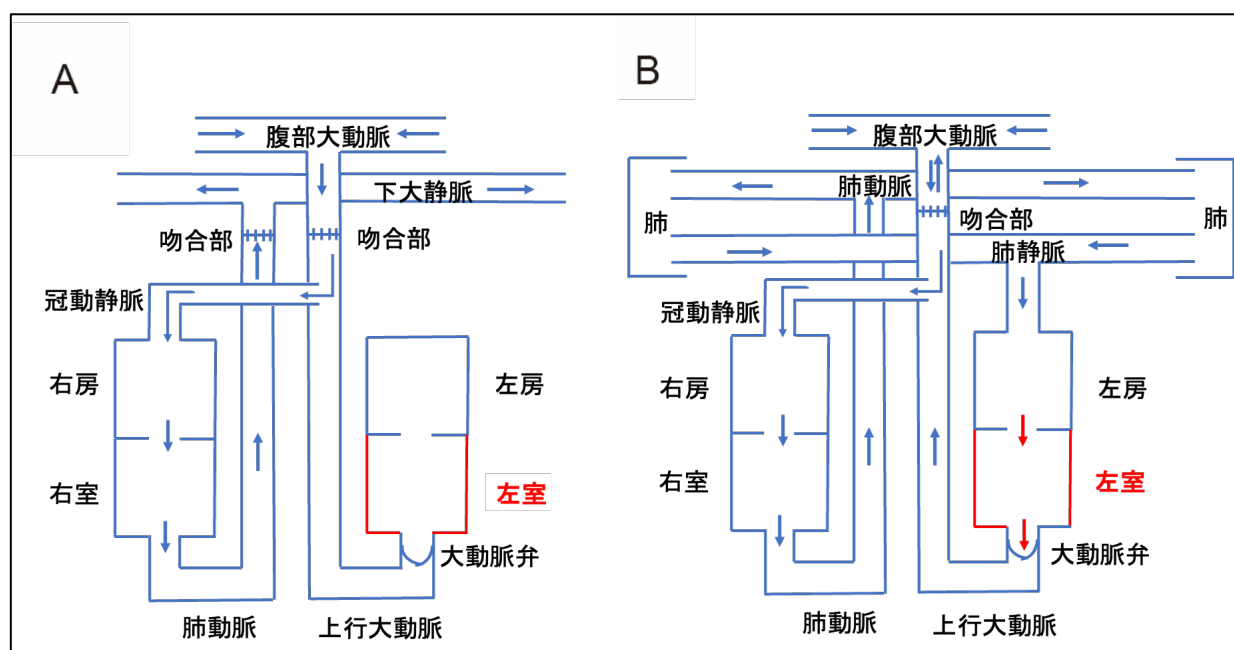


図 6. complete unloading と partial unloading の模式図

A: complete unloading モデルの模式図を示す．上行大動脈と腹部大動脈，下大静脈と肺動脈が吻合されており，冠血流は右心系のみを流れるため，左心室への血液流入がない．B: partial unloading モデルの模式図を示す．上行大動脈と腹部大動脈のみが吻合されており，肺動静脈は肺と連続している．そのため，冠血流は右心系および肺循環を経て左心系へと流入する．すなわち，左室への前負荷は冠灌流由来の血流に限定される．

手術はドナー心の準備から開始した．non-AMI+unloading 群は左側開胸のみを行なったドナー心を，AMI+unloading 群では左前下行枝を結紮したドナー心をそれぞれ使用した．レシピエント・ラットには，15 mg/kg のアモキシシリン（富士フィルム和光純薬）を皮下投与したのち，腹部を縦切開し，腹部大動脈を露出した．続いて，ドナー・ラットの腹部を縦切開，胸部を横切開して，下大静脈および胸部大動脈を同定した．次に，ドナー・ラットの腹腔内に 150 mg/kg のセコバルビタールナトリウム（日医工株式会社）を投与し，1000 単位のヘパリンナトリウム（持田製薬株式会社，東京，日本）を下大静脈から投与し，全身ヘパリン化を行った．ドナー・ラットの胸部下行大動脈より逆行性に，4 °C に冷却した St. Thomas' Hospital cardioplegic solution No. 2 (ST-II) を 50 ml 注入し，心停止を得た．ST-II は，心臓を虚血状態にした際の心筋障害を軽減するために，心拍動を停止させる作用のある心筋保護液であり，臨床現場でも広く用いられている．ST-II の組成は以下の通りである：塩化ナトリウム 110 mM，塩化カリウム 16 mM，硫酸マグネシウム 16 mM，塩化カルシウム 1.2 mM，重炭酸ナトリウム 10 mM，pH 7.8 (Ledingham et al,

1987). いずれの試薬もSigma-Aldrich社 (St.Louis, MO, USA) 製を使用した. ドナー・ラットの上行大動脈, 上下大静脈, 左上大静脈を結紮切離して, 心臓と肺を一塊として摘出した.

次に, レシピエント・ラットの腹部大動脈を腎動脈下で遮断し, 4 mm の縦切開を加えて吻合口を作成した. 吻合には 8-0 ポリプロピレン糸 (Johnson & Johnson) を使用し, ドナー・ラットの上行大動脈とレシピエント・ラットの腹部大動脈を端側吻合した. 吻合後, 腹部大動脈の遮断を解除し, ドナー心の色調が改善し, 拍動が再開することを確認したうえで, 腹部を閉創して手術を終了とした (図 7).

なお, ST-II 投与から腹部大動脈遮断解除までの虚血時間はすべての個体で 35 分以内であり, 先行研究において虚血時間は 40 分以内が許容されるとの報告 (Ibrahim et al, 2013) を踏まえ, 本実験においても虚血の影響はないと判断した.

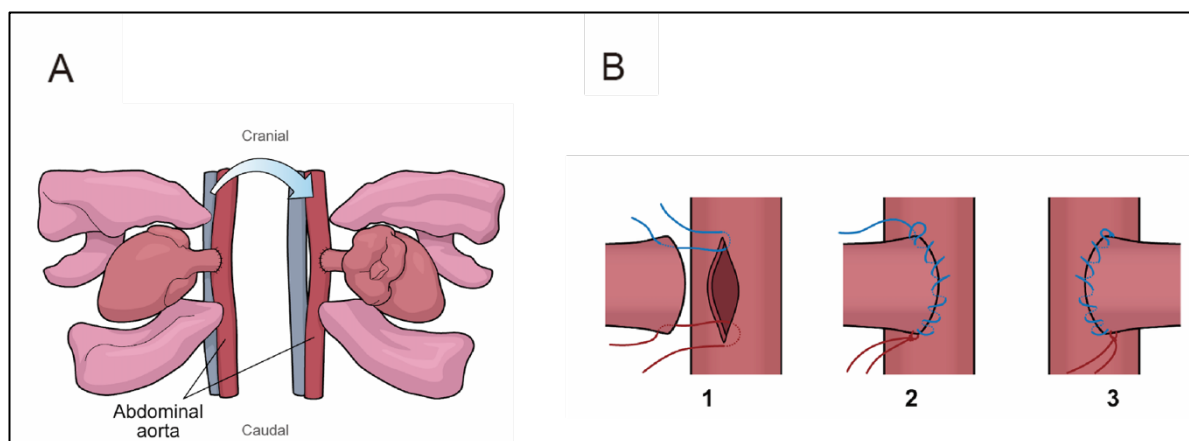


図 7. Partial unloading モデルの手術図

A: 手術全体の概略図を示す. レシピエント・ラットの腹部大動脈に, 心臓および肺を一塊として摘出したドナー・ラットの上行大動脈を吻合した. 最初に吻合口の右側を縫合したのち, 心臓と肺を反対側に移動させて吻合口の左側を縫合した. B: 吻合操作の詳細手順を示す. はじめに, 腹部大動脈の切開線の上下端に 7-0 ポリプロピレン糸を使用して支持縫合を行った. 次に, 頭側の針糸を使用して吻合口右側を縫合し, 最後に同じく頭側の残りの針糸を使用して左側を縫合・結紮して吻合を完了した.

5. 心臓エコー検査

In-vivo での心機能評価として, 心エコー検査を行った. 検査は, 90 mg/kg のケタミン (第一三共株式会社) と 10 mg/kg のキシラジン (バイエル薬品株式会社) を筋肉内投与して麻酔下に施行した. 心エコー検査は, 左室 unloading された心臓 (移植心) は経腹壁から, それ以外の群に対しては経胸壁から行った. 心エコー装置は 12-MHz のフェーズドアレイ探触子を付属した Sonos 5500 ultrasound system (Philips,

Amsterdam, Netherlands) を使用した。左室長軸像の M モードを用いて、心拍数 (beat/min)、左室拡張末期径 : left ventricular end-diastolic dimension : LVEDD (mm)、左室収縮末期径 : left ventricular end-systolic dimension : LVESD (mm) を測定した。左室内径短縮率 : fractional shortening : FS (%) は、LVEDD と LVESD から計算した ($[LVEDD - LVESD] / LVEDD \times 100$)。一回拍出量 : stroke volume : SV (ml) は、左室流出路の部位でパルスドップラー法を用いて測定した。心拍出量 : cardiac output : CO (ml/min) は、HR と SV から計算した ($HR \times SV$)。左室 unloading された心臓はパルスドップラー描出不良であり、HR, LVEDD, LVESD のみ測定を行った。

6. ランゲンドルフ回路を用いた心機能評価

6-1. ランゲンドルフ回路の準備と条件設定

心エコー検査終了後、ラットの腹部を横切開し、安楽死のために 150 mg/kg のセコバルビタールナトリウム（日医工株式会社）を腹腔内投与した。ラットに痛み刺激を与え完全に反応が消失したことを確認し、心臓摘出を行った。non-AMI 群および AMI 群においては、胸部正中を胸骨の上端まで切開し、心臓を摘出した。non-AMI + unloading 群および AMI + unloading 群においては、移植心の上行大動脈とレシピエント・ラットの腹部大動脈との吻合部を切離し、移植心のみを摘出した。すべての群において、摘出された心臓は直ちに氷冷の Krebs-Henseleit buffer (KHB) に浸漬し冷却した。余剰組織を切除したのち、ランゲンドルフ回路（図 8）に上行大動脈を素早く接続し、逆行性灌流を開始した。

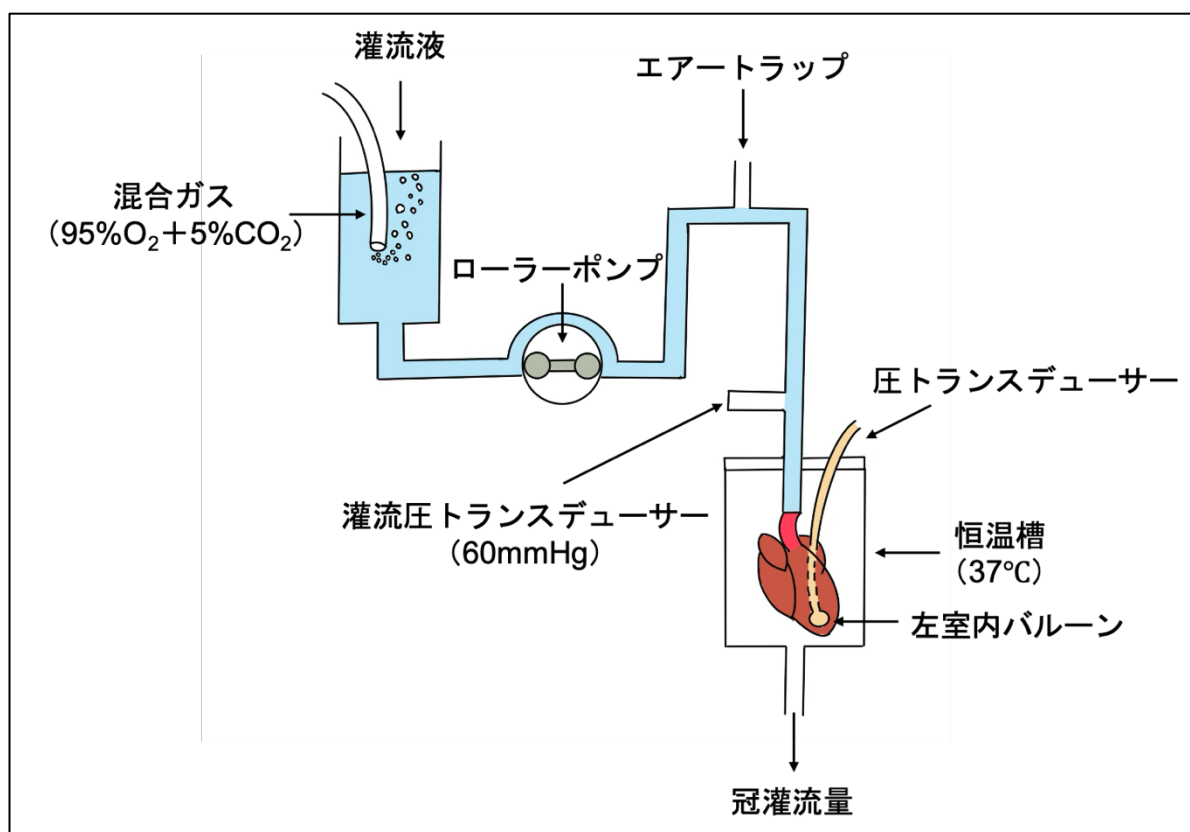


図 8. ランゲンドルフ回路の模式図

灌流液（Krebs-Henseleit buffer）に混合ガスを送気して酸素化し、ローラーポンプで灌流液を循環させた。灌流圧は 60 mmHg に設定した。左室内の圧は、左房から左室に挿入したバルーンで測定した。冠動脈を流れた灌流液を冠灌流量として計測した。

pH7.4 に調整した灌流液である KHB の組成を次に示す：塩化ナトリウム 128 mM, 塩化カリウム 5.0 mM, 硫酸二水素カリウム 1.0 mM, 硫酸マグネシウム 1.3 mM, 塩化カルシウム 2.5 mM, D-グルコース 5.0 mM, 炭酸ナトリウム 15 mM (いずれの試薬も Sigma-Aldrich 社)．灌流圧は 60 mmHg で一定とし, KHB は混合ガス (酸素 95% と二酸化炭素 5%) の送気により常に酸素化した．灌流液および恒温槽の温度は 37 °C に設定した．

6-2. 心機能測定

KHB により 5 分間灌流後, 左心房を切開し, 僧帽弁輪を通して左室内にラテックスバルーン (ADInstruments, Dunedin, New Zealand) 付きの 14G ダブルルーメンカテーテル (Cardinal Health, Dublin, OH, USA) を挿入した．バルーンは, 左室拡張末期圧が 5~10 mmHg となるように拡張し, 圧の調整を行った．KHB で 30 分間灌流後, 左室圧波形は PowerLab (ADInstruments) を使用して記録し, LabChart ソフトウェア (ADInstruments) を用いて波形の解析を行った．以下の項目を心機能パラメーターとした．

- ・冠灌流量 (mL/min) : 1分間に冠静脈洞より排出される灌流液の量
- ・心拍数 (beat/min)
- ・左室圧 : left ventricular developed pressure : LVDP (mmHg)
- ・maximum dP/dt (mmHg/s) (左室圧一次微分最大陽性値) : 収縮能の指標
- ・minimum dP/dt (mmHg/s) (左室圧一次微分最大陰性値) : 拡張能の指標
- ・rate pressure product : RPP (mmHg · bpm) = (心拍数) × (左室最大圧)

7. 左室重量の測定

ランゲンドルフ回路での心機能測定終了後, 心房と右室を切除して, 左室重量を計測した．

8. 組織学的検査

ランゲンドルフ回路での心機能測定終了後, 乳頭筋レベルの左室心筋を採取し, 3.5%ホルムアルデヒド含有中性緩衝ホルマリン液 (武藤化学株式会社, 東京, 日本) で固定し, パラフィンに包埋し, 短軸方向に 5 μm 厚で切り出した．その後以下の検査を行った．

8-1. 心筋細胞面積

心筋細胞面積を評価するため、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行った。心筋細胞の断面積は、非梗塞領域の核を含む楕円形の心筋細胞を弱拡大（40×）で無作為に 100 個抽出し、面積の平均値を測定した。画像の解析は Image J software 1.54f（National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA）を使用して行った。

8-2. 線維化

心筋組織の線維化率を評価するため、マッソン・トリクローム（MT）染色を行った。弱拡大（40×）で無作為に 10 視野を抽出し、線維化の面積を測定し、全組織の面積の割合（%）で算出した。画像の解析は Image J software 1.54f（National Institutes of Health）を使用して行った。

9. RT-qPCR 検査

組織学的検査に使用した部位を除き、かつ梗塞領域を含まない心筋組織を採取したのち、迅速に液体窒素に浸漬して凍結させ、-80℃で保存した。Total RNA は、凍結された心筋組織から High Pure RNA tissue kit（Roche Diagnostics, Basel, Switzerland）を用いて抽出した。cDNA は total RNA から Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit（Roche Diagnostics）を用いて転写した。定量的逆転写 PCR は、FastStart Essential DNA Probes Master（Roche Diagnostics）と RealTime ready assay（Roche Diagnostics）を使用して行った。PCR 増幅は、反応液量 20 μ L にて LightCycler Nano（Roche Diagnostics）を用い、添付文書に従って実施した。

以下の遺伝子の評価を行った

- α -myosin heavy chain (α MHC) : 心筋のストレス下で減少
- β -myosin heavy chain (β MHC) : 心筋のストレス下で増加
- atrial natriuretic factor (ANF) : 胎児性遺伝子
- brain natriuretic peptide (BNP) : 心室負荷を反映
- sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) :
筋小胞体におけるカルシウムハンドリングに関連
- F-box protein 32 (Atrogin1) : ユビキチンリガーゼ E3 の一種
- tripartite motif containing 63 (MuRF1) : ユビキチンリガーゼ E3 の一種

10. ウェスタンブロッティング法

10-1. オートファジーマーカー

心筋細胞におけるオートファジーの評価のため、オートファゴソームのマーカーとされる microtubule-associated light chain 3-II (LC3-II) および、オートファジーによる一連の分解過程（オートファジーフラックス）の評価指標となる

p62/SQSTM1 (p62) のタンパク発現量を測定した．一般に、オートファジーが活性化されると細胞質に隔離膜が出現し、細胞質成分を取り込みながら伸長してオートファゴソームを形成する．その後、リソソームと融合することで、取り込まれた細胞質成分が分解される．LC3-IIはオートファゴソームや隔離膜に局在するタンパク質であり、オートファジーの活性化に伴いオートファゴソームが増加すると、その発現量も増加する．しかしながら、オートファジー活性が低下し、オートファゴソームが過剰に蓄積した場合においても LC3-IIの発現量は増加するため、LC3-II単独ではオートファジーの動態を正確に反映しない可能性がある．一方、p62はユビキチン化されたタンパク質を LC3-IIに結合させるオートファジー受容体であり、オートファジーの活性化に伴い、オートファゴソームを介して選択的に分解されることから、p62 の発現量は減少する (Klionsky et al, 2016) (図 9)．

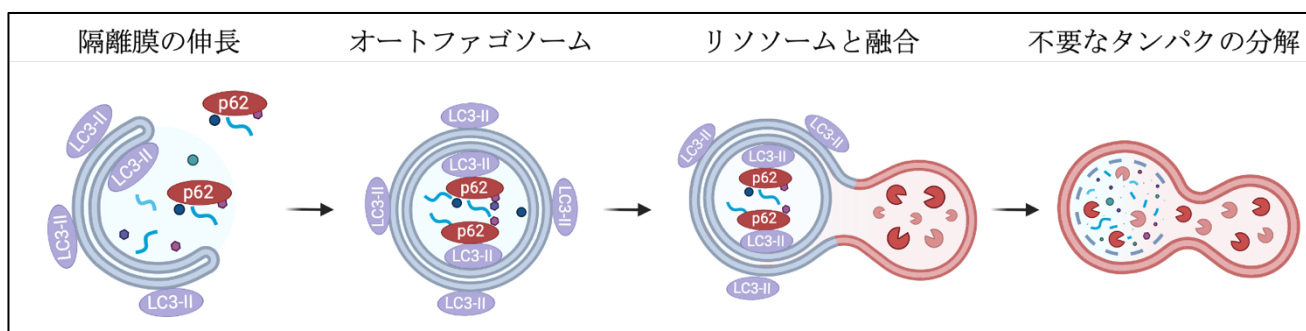


図 9. オートファジーマーカーとオートファジーフラックス

LC3-IIはオートファゴソームと隔離膜に局在している．p62 は不要なタンパク質と結合し、LC3-IIと結合する．最終的にオートファゴソームとリソソームが融合し、不要なタンパク質とともに LC3-II, p62 は分解される．LC3-II, microtubule-associated light chain 3-II; p62, p62/SQSTM1

10-2. ウェスタンブロッティング法の手順と抗体

電気泳動とブロッティングは、Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 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12% Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad) で電気泳動をした後に、タンパク質をポリフッ化ビニリデン膜 (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) にブロットした。ブロッキングにはECL blocking agent (Cytiva, Indianapolis, IN, USA) を用いた。一次抗体にはLC3B (1:500, Abcam, Cambridge, UK) , p62 (1:2000, Abcam) , AMP-activated protein kinase (AMPK) (1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) , p-AMPK [Thr172] (1:1000, Cell Signaling) , K48 (1:1000, Cell Signaling) , Akt (1:1000, Cell Signaling) , p-Akt [Ser473] (1:1500, Cell Signaling) を使用し、二次抗体はAnti-rabbit IgG (1:2000, Cell Signaling) を使用し、detection reagent (Cytiva) を膜に反応させて化学発光をさせた。バンド強度は Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) (1:1000, Cell Signaling) の発現で補正し、JustTLC (Sweday, Sodra Sandby, Switzerland) で定量した。

11. 統計解析

すべての連続変数は、平均値±標準誤差で示した。ベースラインの心エコー検査値は、one-way ANOVA で検定した。ベースライン以外の全ての検査値は、two-way ANOVA で検定を行った。AMI または左室 unloading のいずれかに主効果が認められた場合には、両因子 (AMI と左室 unloading) が独立して検査項目に影響したと解釈した。一方、AMI と左室 unloading に交互作用 (interaction) が認められた場合には、左室 unloading が AMI の経過に影響を与えていると解釈した。事後検定は Bonferroni 法を用い、non-AMI 群と AMI 群、および non-AMI+unloading 群と AMI+unloading 群の2群間のみに対して行った。統計学的有意水準は $p < 0.05$ と定めた。統計解析は GraphPad Prism, version 9.5.1 (GraphPad Software, LLC, BOS, MA, USA) を使用して行った。さらに、交互作用において p 値が 0.2 未満であったパラメーターについては、Python を用いて効果量 (partial η^2) を算出した。効果量の程度は既報に基づき、partial $\eta^2 \geq 0.14$ を「大」、 $0.06 \leq \text{partial } \eta^2 < 0.14$ を「中」、 $0.01 \leq \text{partial } \eta^2 < 0.06$ を「小」と定義した (Cohen, 1988)。

結果

1. ベースラインの心エコー検査値

手術前に測定した心エコー検査値を表 1 および表 2 に示す．2 日間モデルおよび 14 日間モデルにおいて，すべての項目で有意差は認めなかった．

表 1. 2 日間モデルにおけるベースラインの心エコー検査値

	non-AMI (n = 4)	AMI (n = 4)	non-AMI + UL (n = 4)	AMI + UL (n = 4)	<i>p</i> values
BW (g)	273 ± 3	275 ± 5	275 ± 3	278 ± 5	0.85
HR (bpm)	262 ± 3	281 ± 4	266 ± 14	270 ± 7	0.43
LVEDD (mm)	7.5 ± 0.1	7.4 ± 0.1	7.4 ± 0.1	7.4 ± 0.1	0.71
LVESD (mm)	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.2	4.1 ± 0.1	4.3 ± 0.1	0.61
FS (%)	43 ± 1	41 ± 2	45 ± 1	42 ± 1	0.24
CO (ml/min)	58 ± 3	53 ± 5	56 ± 5	52 ± 2	0.67
SV (ml/beat)	0.22 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.30

数値は平均値 ± 標準誤差で示す．AMI, acute myocardial infarction; BW, body weight; CO, cardiac output; FS, fractional shortening; HR, heart rate; LVEDD, left ventricular end-diastolic dimension; LVESD, left ventricular end-systolic dimension; SV, stroke volume; UL, unloading

表 2.14 日間モデルにおけるベースラインの心エコー検査値

	non-AMI (n = 6)	AMI (n = 6)	non-AMI + UL (n = 5)	AMI + UL (n = 5)	<i>p</i> values
BW (g)	278 ± 8	280 ± 3	274 ± 2	286 ± 9	0.62
HR (bpm)	260 ± 7	265 ± 3	276 ± 5	273 ± 5	0.13
LVEDD (mm)	7.3 ± 0.1	7.5 ± 0.1	7.3 ± 0.1	7.1 ± 0.4	0.50
LVEDS (mm)	4.3 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.3 ± 0.2	3.8 ± 0.5	0.40
FS (%)	41 ± 1	42 ± 2	43 ± 1	48 ± 5	0.26
CO (ml/min)	56 ± 3	54 ± 5	53 ± 4	50 ± 2	0.75
SV (ml/beat)	0.22 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.50

数値は平均値±標準誤差で示す．AMI, acute myocardial infarction; BW, body weight; CO, cardiac output; FS, fractional shortening; HR, heart rate; LVEDD, left ventricular end-diastolic dimension; LVEDS, left ventricular end-systolic dimension; SV, stroke volume; UL, unloading

2. 安楽死直前の心エコー検査値

安楽死直前に行った心エコー検査値を表 3 および表 4 に示す．2 日間モデルでは、AMI の主効果を認め、LVEDS は拡大、FS は低下した．また、左室 unloading の主効果も認め、LVEDD は縮小、FS は低下した．一方、すべてのパラメーターにおいて AMI と左室 unloading の交互作用は認めなかった．14 日間モデルでは、AMI の主効果を認め、HR は増加、LVEDD は拡大、FS は低下した．また、左室 unloading の主効果も認め、LVEDD は縮小、FS は低下した．一方、すべてのパラメーターにおいて AMI と左室 unloading の交互作用は認めなかった．

以上から、AMI は急性期および亜急性期において左室サイズの拡大を引き起こすのに対し、左室 unloading は両期において左室サイズの縮小をもたらすことが示された．ただし、急性期および亜急性期における左室サイズに関しては、左室 unloading は AMI 後の経過に影響を与えなかった．

表 3.2 日間モデルにおける安楽死の直前に行った心エコー検査値

	non-AMI (n = 4)	AMI (n = 4)	non-AMI + UL (n = 4)	AMI + UL (n = 4)	F values		
					Main effect		Interaction
					AMI	UL	AMI×UL
BW (g)	263 ± 3	255 ± 6	250 ± 0.0	253 ± 5	0.4	3.2	1.41
HR (bpm)	250 ± 7	210 ± 32	218 ± 12	237 ± 12	0.4	0	2.51
LVEDD (mm)	7.5 ± 0.2	7.3 ± 0.2	4.1 ± 0.4	5.1 ± 0.4	1.3	70.1**	3.37
LVESD (mm)	4.5 ± 0.2	4.3 ± 0.2	3.5 ± 0.3	4.9 ± 0.5	5.24*	1.9	1.7
FS (%)	40 ± 1	33 ± 5	13 ± 1	5.7 ± 1	6.4*	96.4**	0.01

数値は平均値±標準誤差で示す． AMI, acute myocardial infarction; BW, body weight; FS, fractional shortening; HR, heart rate; LVEDD, left ventricular end-diastolic dimension; LVESD, left ventricular end-systolic dimension; UL, unloading

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

表 4.14 日間モデルにおける安楽死の直前に行った心エコー検査値

	non-AMI (n = 6)	AMI (n = 6)	non-AMI + UL (n = 5)	AMI + UL (n = 5)	F values		
					Main effect		Interaction
					AMI	UL	AMI×UL
BW (g)	291 ± 5	298 ± 5	310 ± 6	306 ± 9	0	4.3	0.72
HR (bpm)	245 ± 8	255 ± 5	230 ± 7	255 ± 6	6.74*	1.3	1.12
LVEDD (mm)	7.4 ± 0.1	9.0 ± 0.3	4.5 ± 0.4	5.0 ± 0.5	9.14**	98.2**	2.12
LVEDS (mm)	2.5 ± 0.1	2.4 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.0 ± 0.3	0.3	3.9	0
FS (%)	40 ± 1	27 ± 2	25 ± 4	15 ± 3	24**	35.5**	0.33

数値は平均値±標準誤差で示す．AMI, acute myocardial infarction; BW, body weight; FS, fractional shortening; HR, heart rate; LVEDD, left ventricular end-diastolic dimension; LVEDS, left ventricular end-systolic dimension; UL, unloading
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3. ランゲンドルフ回路での心機能パラメーター

ランゲンドルフ回路での心機能パラメーターを図 10 に示す．2 日間モデルでは，AMI の主効果を認め，CF, maximum dP/dt, minimum dP/dt, RPP は低下した．一方，左室 unloading の主効果，AMI と左室 unloading の交互作用は認めなかった．14 日間モデルでは，AMI の主効果を認め，maximum dP/dt, minimum dP/dt, RPP は低下した．一方，左室 unloading の主効果，AMI と左室 unloading の交互作用は認めなかった．しかしながら，maximum dP/dt と RPP に関しては，交互作用の効果量はそれぞれ中程度と判定された ($p = 0.18$, partial $\eta^2 = 0.067$; $p = 0.14$, partial $\eta^2 = 0.085$)．事後検定では，AMI 群は non-AMI 群と比較して maximum dP/dt, minimum dP/dt, RPP は有意に低下していた．一方で，non-AMI+unloading 群と AMI+unloading 群の間に有意差は認めなかった．以上から，AMI 後に左室 unloading を行うことで，亜急性期には心筋梗塞に伴う心機能の増悪を抑制している可能性が示唆された．

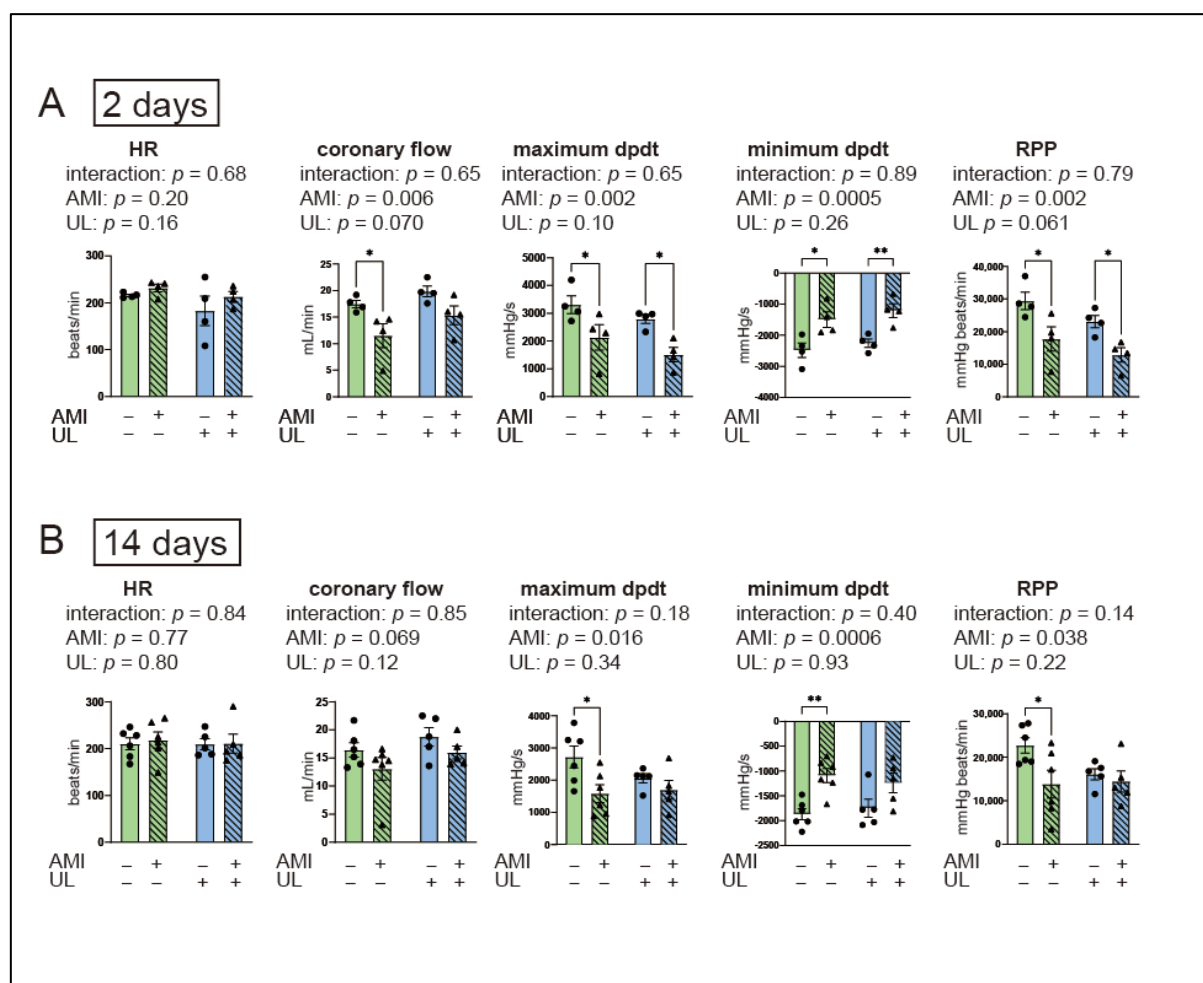


図 10. ランゲンドルフ回路での心機能パラメーター

2 日間モデル (A) および 14 日間モデル (B) における各種心機能パラメーターを示す。データは平均値±標準誤差で示す。各グラフ上に示した p 値は、AMI と左室 unloading の交互作用、ならびに AMI または unloading の主効果に対する解析結果を示す。グラフ内のアスタリスクは事後検定の結果に基づくものであり、 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ とする。AMI, acute myocardial infarction; HR, heart rate; RPP, rate pressure product; UL, unloading.

4. 左室重量

左室重量を図 11 に示す．2 日間モデルでは，AMI の主効果を認め，左室重量は増加した．一方，左室 unloading の主効果，AMI と左室 unloading の交互作用は認めなかった．14 日間モデルでは，AMI の主効果を認め，左室重量は増加した．また，左室 unloading の主効果も認め，左室重量は低下した．一方，AMI と左室 unloading の交互作用は認めず，効果量も小さいと判定された ($p = 0.18$, partial $\eta^2 = 0.0092$) ．

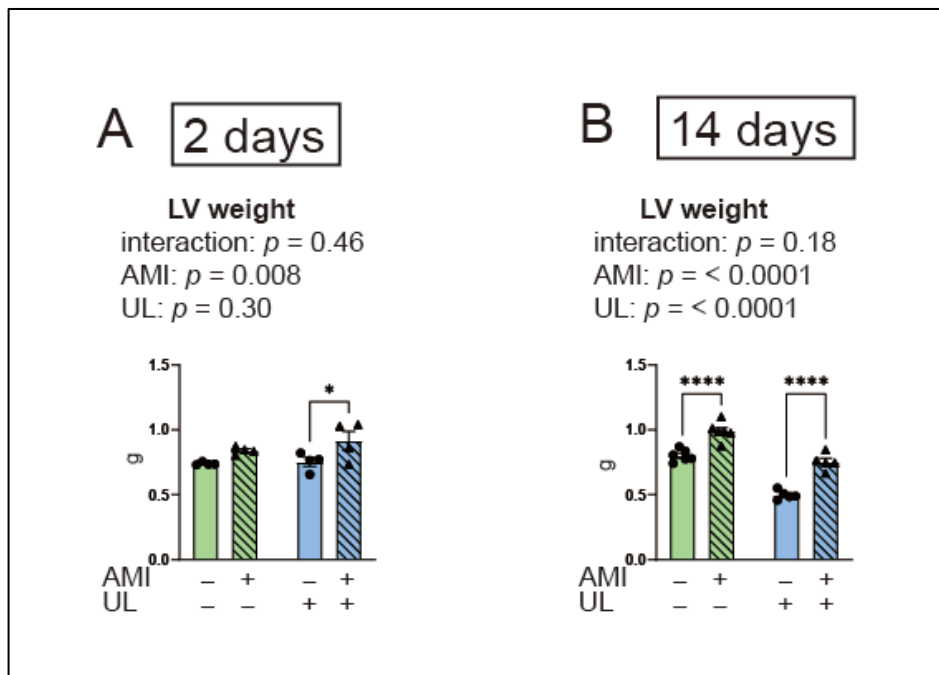


図 11. 左室重量

2 日間モデル (A) および 14 日間モデル (B) における左室重量を示す．データは平均値±標準誤差で示す．各グラフ上に示した p 値は，AMI と左室 unloading の交互作用，ならびに AMI または unloading の主効果に対する解析結果を示す．グラフ内のアスタリスクは事後検定の結果に基づくものであり， $*p < 0.05$ ， $****p < 0.0001$ とする．AMI, acute myocardial infarction; LV, left ventricular; UL, unloading.

5. 組織学的検査

5-1. 心筋細胞面積

左室心筋細胞面積および左室乳頭筋レベルの HE 染色像を図 12 に示す．左室重量と同様に，2 日間モデルでは，AMI の主効果を認め，左室心筋細胞面積は増加した．一方，左室 unloading の主効果，AMI と unloading の交互作用は認めなかった．14 日間モデルでは，AMI の主効果を認め，左室心筋細胞面積は増加した．また，左室 unloading の主効果も認め，左室心筋細胞面積は低下した．しかしながら，AMI と左室 unloading の交互作用は認めず，効果量も小さいと判定された ($p = 0.12$, partial $\eta^2 = 0.018$) ．

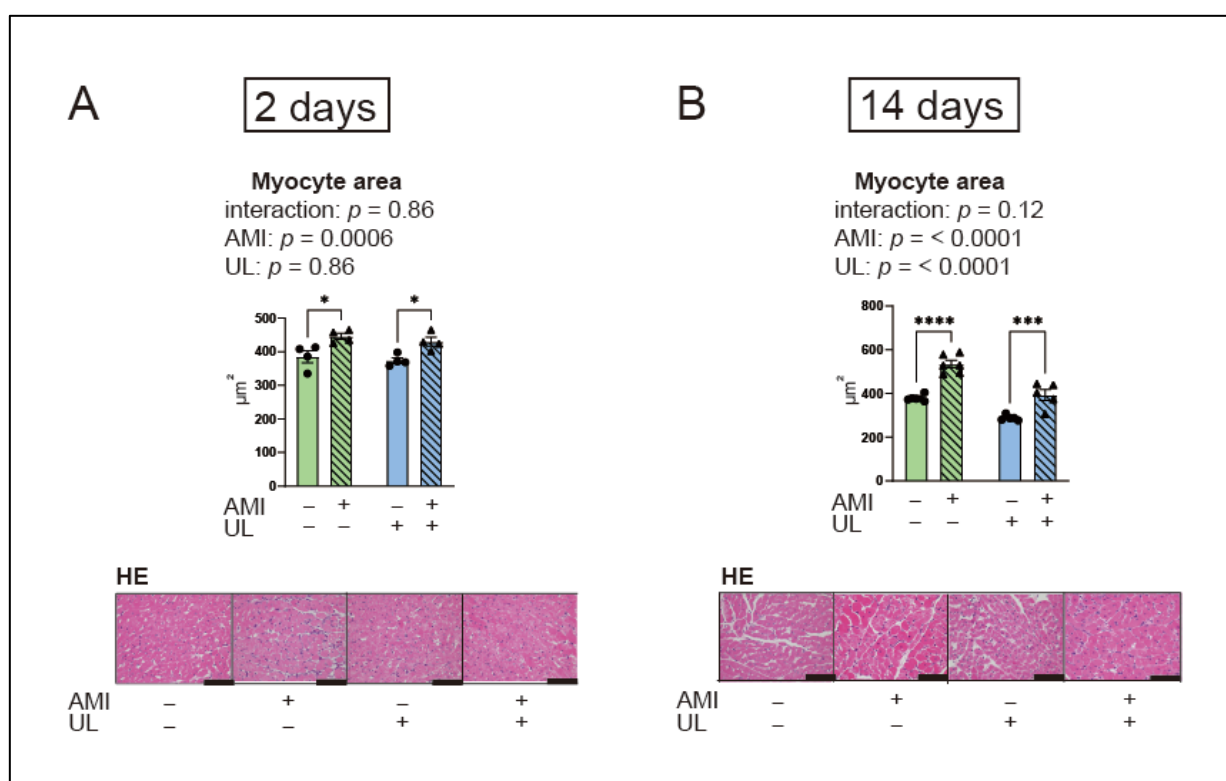


図 12. 左室心筋細胞面積

2 日間モデル (A) および 14 日間モデル (B) における左室心筋細胞面積 (上段) と左室乳頭筋レベルの HE 染色 (下段) を示す．データは平均値±標準誤差で示す．各グラフ上に示した p 値は，AMI と左室 unloading の交互作用，ならびに AMI または unloading の主効果に対する解析結果を示す．グラフ内のアスタリスクは事後検定の結果に基づくものであり， $*p < 0.05$ ， $***p < 0.001$ ， $****p < 0.0001$ とする．HE 染色像内のスケールバーは， $100 \mu\text{m}$ とする．AMI, acute myocardial infarction; HE, hematoxylin eosin; UL, unloading.

5-2. 線維化

左室心筋の線維化率および左室心筋組織の MT 染色像を図 13 に示す．2 日間モデルでは，AMI および左室 unloading の主効果，AMI と左室 unloading の交互作用を認めなかった．一方，14 日間モデルでは，AMI の主効果は認めなかったが，左室 unloading の主効果を認め，左室線維化率は増加した．AMI と左室 unloading の交互作用は認めなかった．

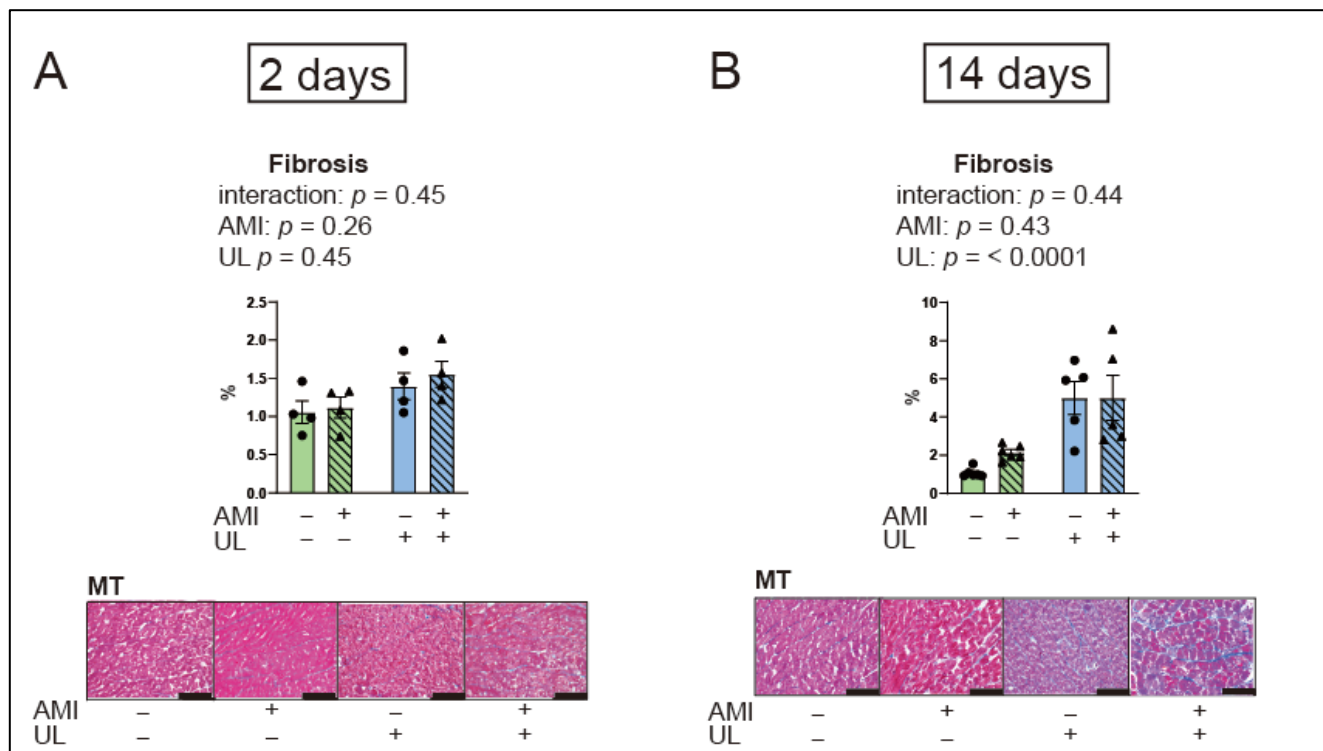


図 13. 左室心筋の線維化

2 日間モデル (A) および 14 日間モデル (B) における左室心筋組織の線維化率 (上段) と左室心筋組織の MT 染色 (下段) を示す．データは平均値±標準誤差で示す．各グラフ上に示した p 値は，AMI と左室 unloading の交互作用，ならびに AMI または unloading の主効果に対する解析結果を示す．MT 染色像内のスケールバーは，100 μm とする．AMI, acute myocardial infarction; MT, Masson's trichrome; UL, unloading.

以上から，AMI 後は急性期より左室肥大が進行し，左室 unloading 自体は亜急性期で左室心筋細胞面積を縮小させることが示された．また，亜急性期では左室 unloading は左室心筋の線維化を増加させることが示された．しかしながら，予想に反して，左室 unloading は AMI 後の左室心筋リモデリング (細胞面積) および線維化には影響を与えていないことが示唆された．

6. 心不全関連遺伝子マーカーの発現量

胎児性遺伝子である *ANF* の遺伝子発現量を図 14 に示す。2 日間モデルでは、AMI の主効果を認め発現量は増加した。一方、左室 unloading の主効果、AMI と左室 unloading の交互作用は認めなかった。14 日間モデルでは、AMI の主効果を認め、発現量は増加した。一方、左室 unloading の主効果、AMI と左室 unloading の交互作用は認めなかったが、効果量は中程度と判定された ($p = 0.080$, partial $\eta^2 = 0.10$)。事後検定では、AMI 群は non-AMI 群より有意に高値であったが、non-AMI+unloading 群と AMI+unloading 群の間に有意差は認めなかった。

以上から、AMI は急性期、亜急性期ともに *ANF* の発現量を増加することが示された。また、亜急性期において AMI 後の左室 unloading により、*ANF* の過剰発現は抑制されることが示唆された。

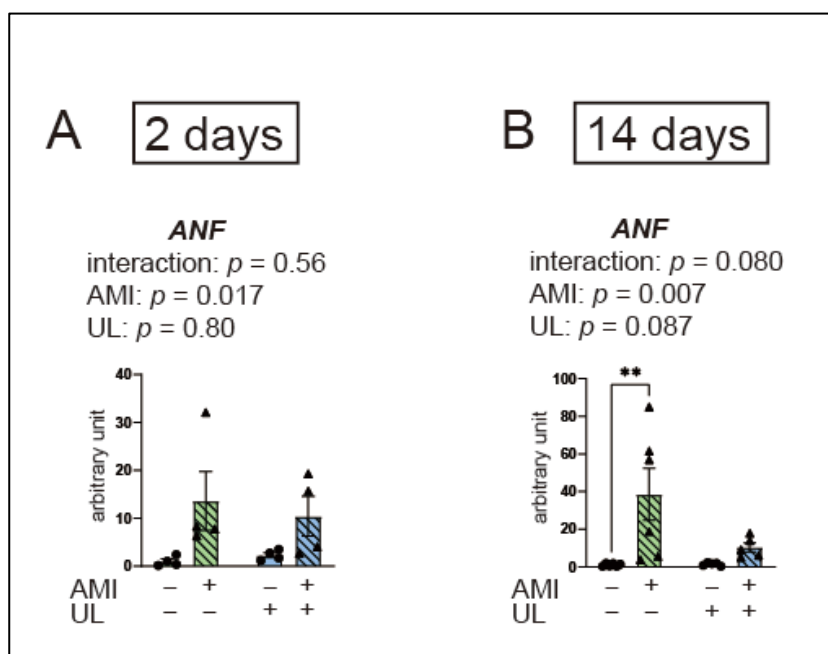


図 14. 左室心筋の *ANF* 発現量

2 日間モデル (A) および 14 日間モデル (B) における *ANF* の遺伝子発現量を示す。データは平均値±標準誤差で示す。各グラフ上に示した p 値は、AMI と左室 unloading の交互作用、ならびに AMI または unloading の主効果に対する解析結果を示す。グラフ内のアスタリスクは事後検定の結果に基づくものであり、** $p < 0.01$ とする。*ANF*, atrial natriuretic factor; AMI, acute myocardial infarction; UL, unloading.

BNP の遺伝子発現量を図 15 に示す。2 日間モデルでは、AMI の主効果を認め発現量は増加した。一方、左室 unloading の主効果、AMI と左室 unloading の交互作用は認めなかった。14 日間モデルでは 2 日間モデルと同様に、AMI の主効果を認め発現量は増加した。一方、左室 unloading の主効果、AMI と左室 unloading の交互作用は認めなかった。

以上から、AMI は急性期、亜急性期ともに *BNP* の発現量を増加させることが示された。

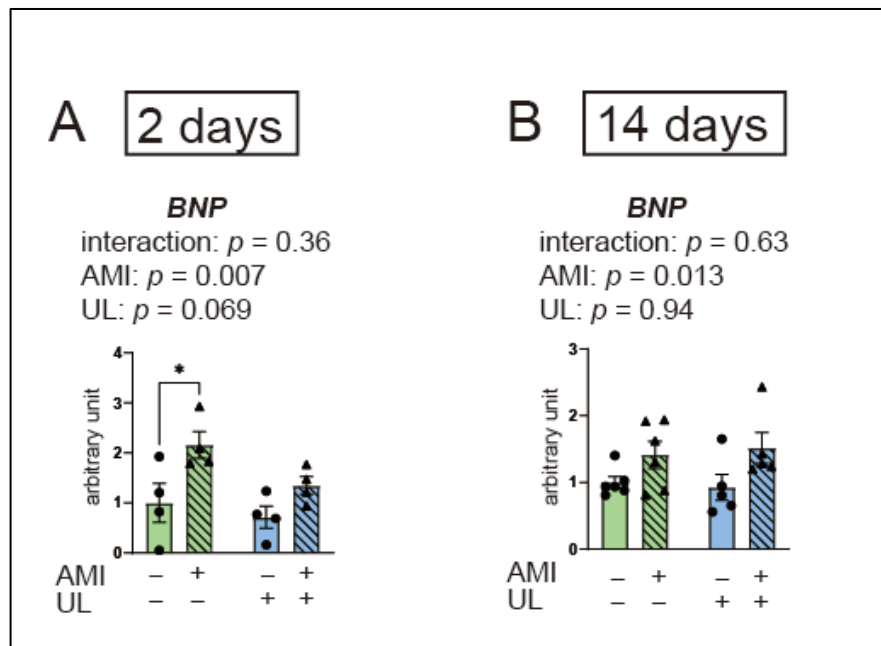


図 15. 左室心筋の *BNP* 発現量

2 日間モデル (A) および 14 日間モデル (B) における *BNP* の遺伝子発現量を示す。データは平均値±標準誤差で示す。各グラフ上に示した p 値は、AMI と左室 unloading の交互作用、ならびに AMI または unloading の主効果に対する解析結果を示す。グラフ内のアスタリスクは事後検定の結果に基づくものであり、 $*p < 0.05$ とする。AMI, acute myocardial infarction; *BNP*, brain natriuretic peptide; UL, unloading.

心筋のストレス下で減少するとされる αMHC および、増加するとされる βMHC の遺伝子発現量を図 16 に示す。2 日間モデルおよび 14 日間モデルのいずれにおいても、 αMHC および βMHC の発現量に対して AMI および左室 unloading の主効果を認めなかった。AMI と左室 unloading の交互作用も認めなかった。しかしながら、14 日間モデルの αMHC に関しては、AMI と左室 unloading の交互作用の効果量は中程度と判定された ($p = 0.19$, partial $\eta^2 = 0.08$)。

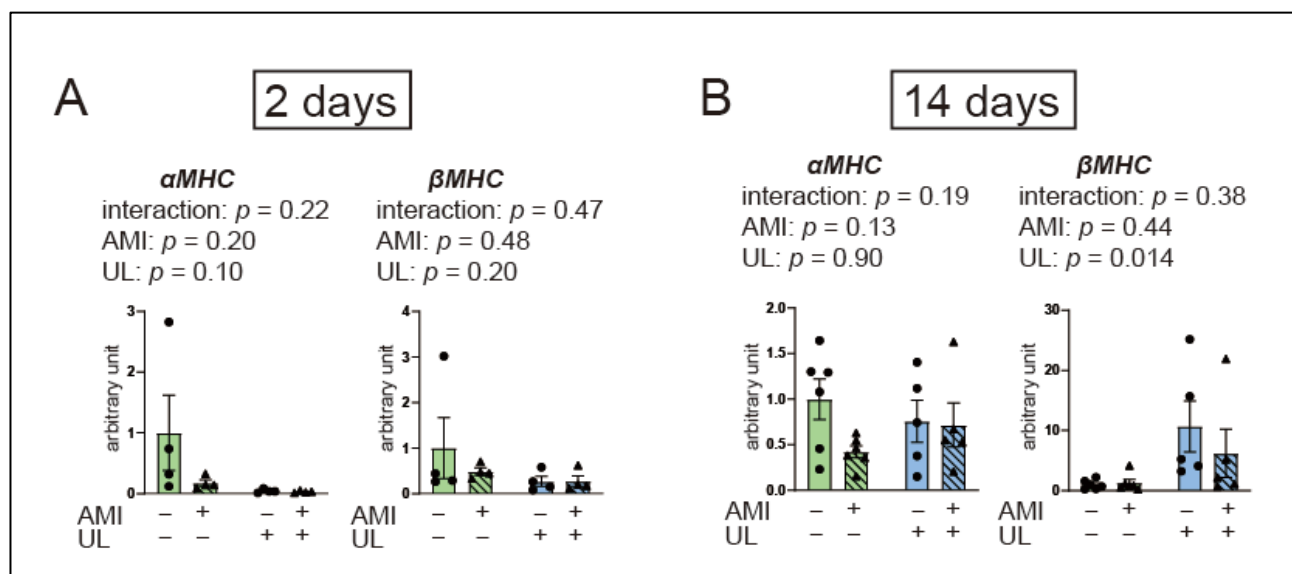


図 16. 左室心筋の αMHC と βMHC 発現量

2 日間モデル (A) および 14 日間モデル (B) における αMHC と βMHC の遺伝子発現量を示す。データは平均値±標準誤差で示す。各グラフ上に示した p 値は、AMI と左室 unloading の交互作用、ならびに AMI または unloading の主効果に対する解析結果を示す。AMI, acute myocardial infarction; UL, unloading; αMHC , α -myosin heavy chain; βMHC , β -myosin heavy chain.

筋小胞体におけるカルシウムハンドリングに関与する *SERCA2a* の遺伝子発現量を図 17 に示す。2 日間モデルでは，AMI および左室 unloading の主効果を認めず，AMI と左室 unloading の交互作用も認めなかった。しかしながら，AMI と左室 unloading の交互作用の効果量は大きいと判定された ($p = 0.071$, $\text{partial } \eta^2 = 0.17$)。事後検定では，AMI 群は non-AMI 群より有意に高値であったが，non-AMI + unloading 群と AMI + unloading 群との間に有意差はなかった。一方，14 日間モデルでは，AMI および左室 unloading の主効果を認めず，AMI と左室 unloading の交互作用も認めなかった。

以上から，AMI 後の左室 unloading により，急性期では *SERCA2a* の発現を抑制する可能性が示唆された。

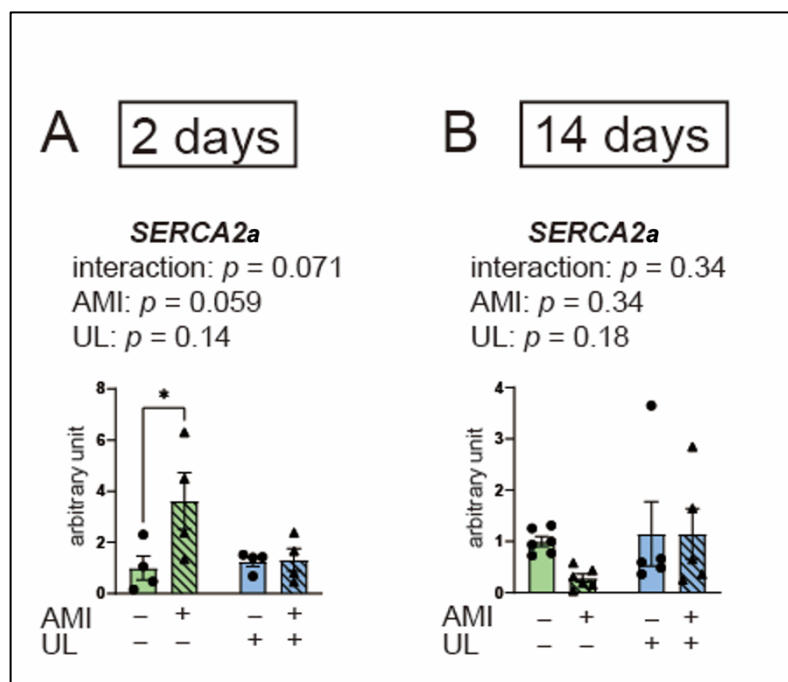


図 17. 左室心筋の *SERCA2a* 発現量

2 日間モデル (A) および 14 日間モデル (B) における *SERCA2a* の遺伝子発現量を示す。データは平均値±標準誤差で示す。各グラフ上に示した p 値は，AMI と左室 unloading の交互作用，ならびに AMI または unloading の主効果に対する解析結果を示す。グラフ内のアスタリスクは事後検定の結果に基づくものであり， $*p < 0.05$ とする。AMI, acute myocardial infarction; *SERCA2a*, sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; UL, unloading.

7. オートファジー関連タンパクの発現量

LC3-II のタンパク発現量を図 18 に示す．2 日間モデルおよび 14 日間モデルいずれにおいても，AMI および左室 unloading の主効果を認めず，AMI と左室 unloading の交互作用も認めなかった．

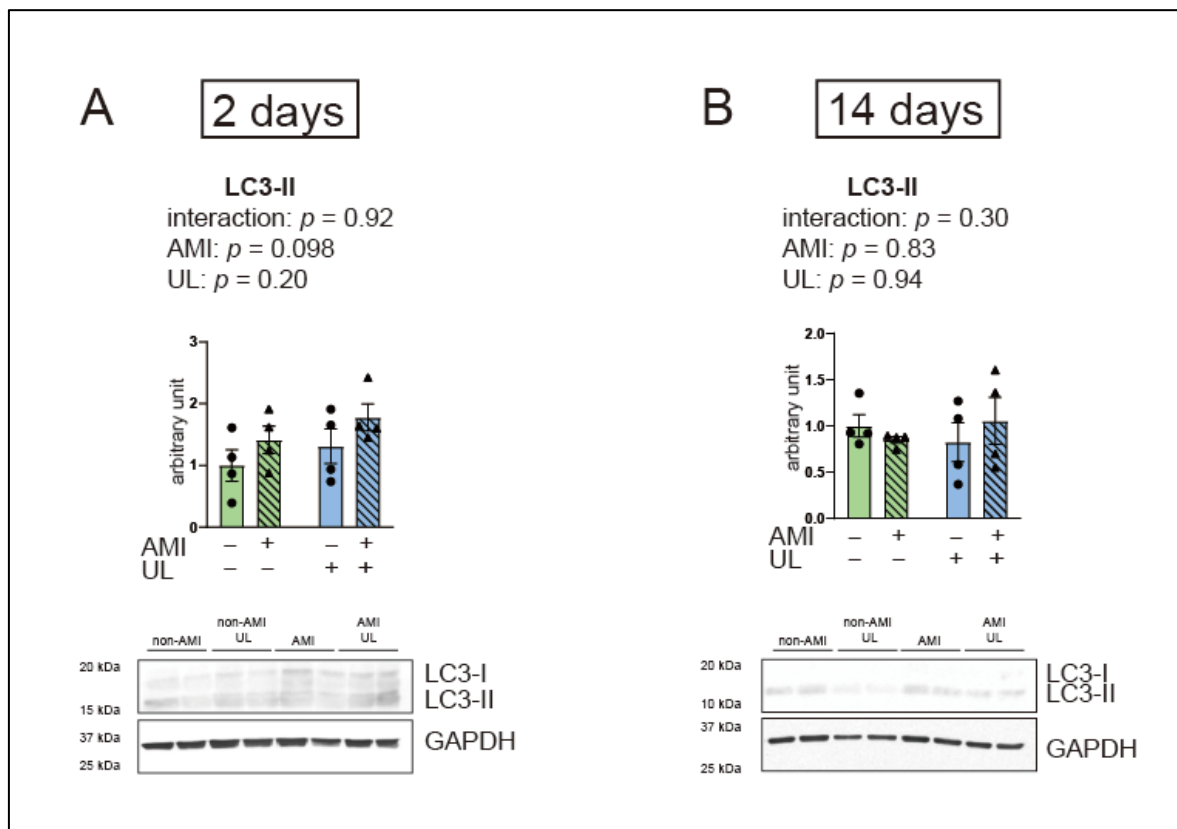


図 18. 左室心筋の LC3-II 発現量

2 日間モデル（A）および 14 日間モデル（B）における LC3-II のタンパク発現量（上段）と代表的なバンド（下段）を示す．データは平均値±標準誤差で示す．各グラフ上に示した p 値は，AMI と左室 unloading の交互作用，ならびに AMI または unloading の主効果に対する解析結果を示す．AMI, acute myocardial infarction; GAPDH, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; LC3-II, microtubule-associated light chain 3-II; UL, unloading.

p62 のタンパク発現量を図 19 に示す．2 日間モデルでは，AMI の主効果を認めなかった．一方，左室 unloading の主効果を認め，発現量は増加した．また，AMI と左室 unloading の交互作用も認め，効果量も大きいと判定された（ $p = 0.001$, partial $\eta^2 = 0.25$ ）．事後検定では，AMI 群+unloading 群は non-AMI+unloading 群より有意に低値であったのに対し，non-AMI 群と AMI 群の間に有意差は認めなかった．14 日間モデルにおいても 2 日間モデルと同様に，AMI の主効果を認めなかった．一

方，左室 unloading の主効果を認め，発現量は増加した．また，AMI と左室 unloading の交互作用も認め，効果量は大きいと判定された ($p = 0.039$, $\text{partial } \eta^2 = 0.20$)．事後検定では，AMI 群は non-AMI 群より有意に高値であったのに対し，non-AMI+unloading 群と AMI+unloading 群の間に有意差は認めなかった．

以上から，急性期，亜急性期のいずれにおいても，左室 unloading により AMI 後のオートファジーフラックスの低下を抑制していることが示唆された．しかしながら，左室 unloading 自体は，オートファジーフラックスを抑制していることが示された．

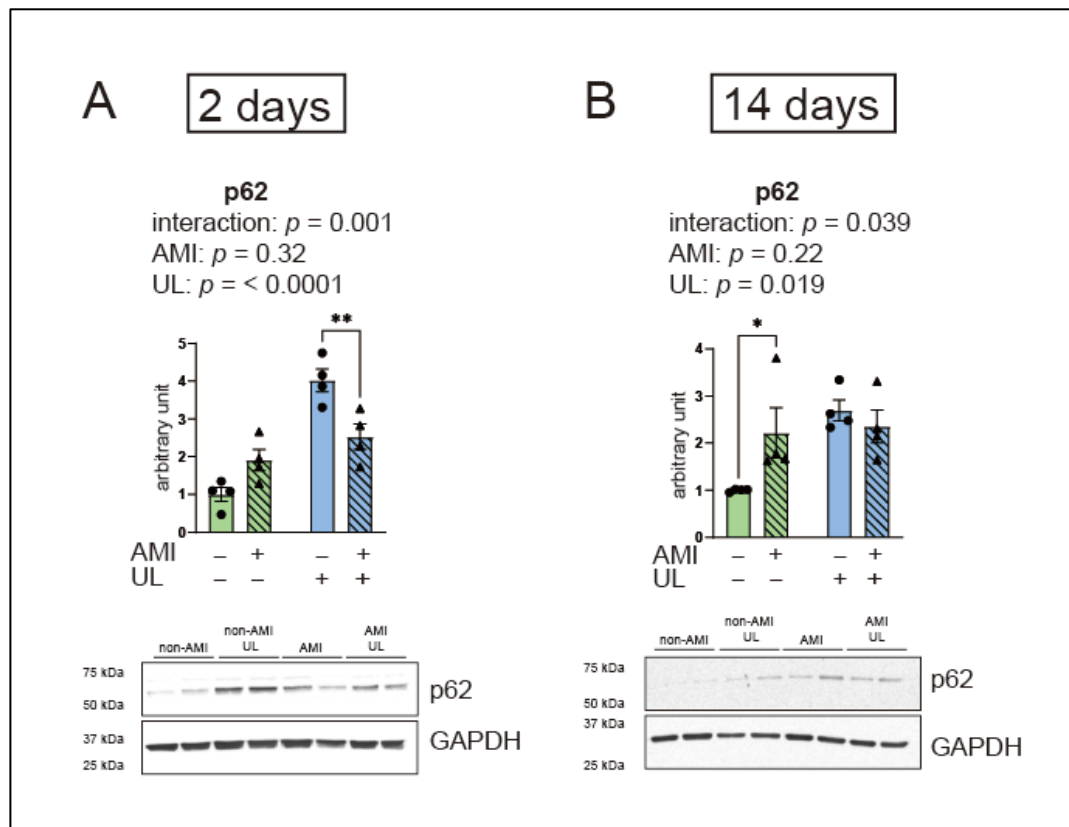


図 19. 左室心筋の p62 発現量

2 日間モデル (A) および 14 日間モデル (B) における p62 のタンパク発現量 (上段) と代表的なバンド (下段) を示す．データは平均値±標準誤差で示す．各グラフ上に示した p 値は，AMI と左室 unloading の交互作用，ならびに AMI または unloading の主効果に対する解析結果を示す．グラフ内のアスタリスクは事後検定の結果に基づくものであり， $*p < 0.05$ ， $**p < 0.01$ とする．AMI, acute myocardial infarction; GAPDH, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; UL, unloading.

エネルギーセンサーとされる pAMPK/AMPK を図 20 に示す．2 日間モデルでは，AMI の主効果を認めなかった．一方，左室 unloading の主効果を認め，pAMPK/AMPK は増加した．また，AMI と左室 unloading の交互作用を認めたが，効果量は小さいと判定された ($p = 0.037$, partial $\eta^2 = 0.038$)．14 日間モデルでは，AMI の主効果を認め，発現量は増加した．また，左室 unloading の主効果を認め，発現量は減少した．一方，AMI と左室 unloading の交互作用は認めなかった．事後検定では，AMI 群は non-AMI 群より有意に高値であったのに対し，non-AMI+unloading 群と AMI+unloading 群の間に有意差は認めなかった．

以上から，急性期，亜急性期ともに，AMI 後の左室 unloading は，相対的にエネルギー代謝に対して有利に作用していることが示唆された．

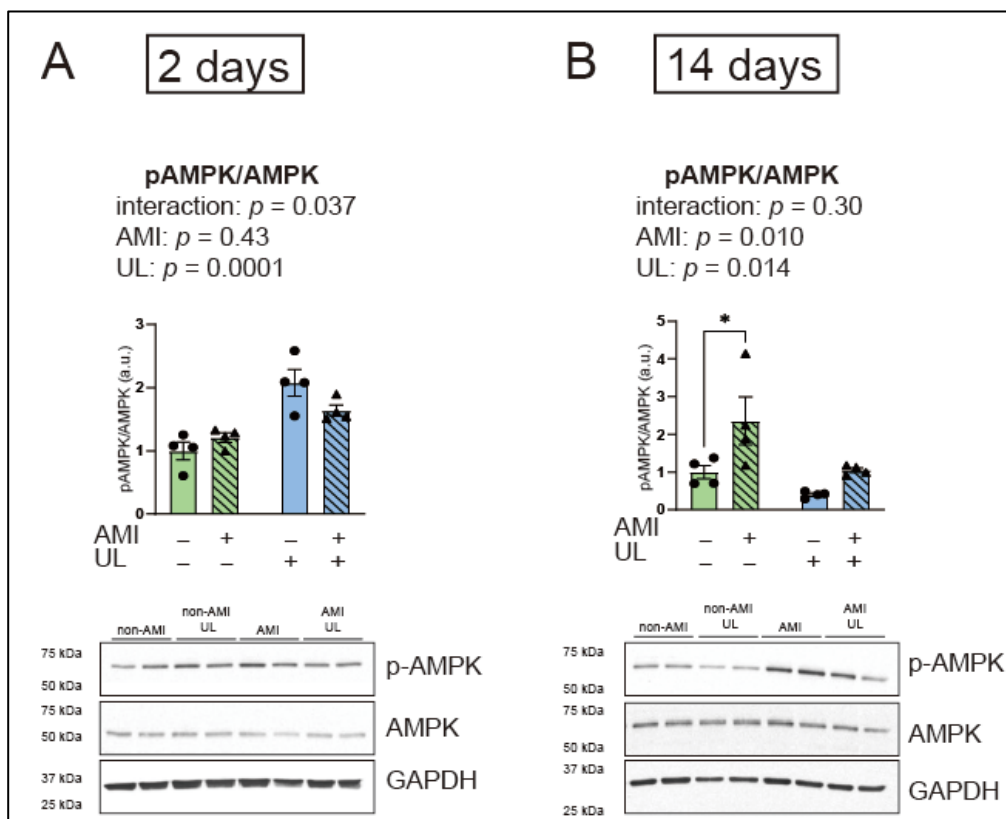


図 20. 左室心筋の pAMPK/AMPK

2 日間モデル (A) および 14 日間モデル (B) における pAMPK/AMPK (上段) と代表的なバンド (下段) を示す．データは平均値±標準誤差で示す．各グラフ上に示した p 値は，AMI と左室 unloading の交互作用，ならびに AMI または unloading の主効果に対する解析結果を示す．グラフ内のアスタリスクは事後検定の結果に基づくものであり， $*p < 0.05$ とする．AMI, acute myocardial infarction; AMPK, AMP-activated protein kinase; GAPDH, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; UL, unloading.

8. ユビキチン系とタンパク新生

ユビキチンリガーゼ E3 の一種である *Atrogin1* の遺伝子発現量を図 21 に示す。*Atrogin1* は 2 日間モデルおよび 14 日間モデルともに，AMI および左室 unloading の主効果，AMI と左室 unloading の交互作用を認めなかった。

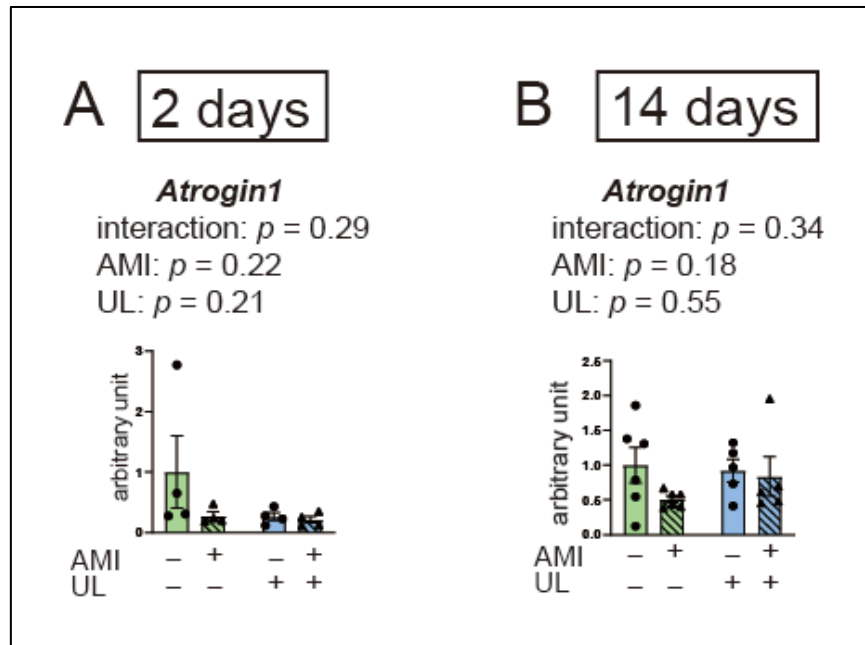


図 21. 左室心筋の *Atrogin1* 発現量

2 日間モデル (A) および 14 日間モデル (B) における *Atrogin1* の遺伝子発現量を示す。データは平均値±標準誤差で示す。各グラフ上に示した p 値は，AMI と左室 unloading の交互作用，ならびに AMI または unloading の主効果に対する解析結果を示す。AMI, acute myocardial infarction; UL, unloading.

同じくユビキチンリガーゼ E3 の一種である *MuRF1* の遺伝子発現量を図 22 に示す。2 日間モデルでは、AMI および左室 unloading の主効果、AMI と左室 unloading の交互作用を認めなかった。14 日間モデルでは、AMI の主効果を認め、発現量は低下した。一方、左室 unloading の主効果、AMI と左室 unloading の交互作用は認めなかったが、交互作用の効果量は中程度と判定された ($p = 0.10$, partial $\eta^2 = 0.11$)。事後検定では、AMI 群は non-AMI 群より有意に低値を示したが、non-AMI + unloading 群と AMI + unloading 群の間に有意差は認めなかった。

以上から、亜急性期において AMI 後の左室 unloading は *MuRF1* に対して発現量の低下を抑制していることが示唆された。

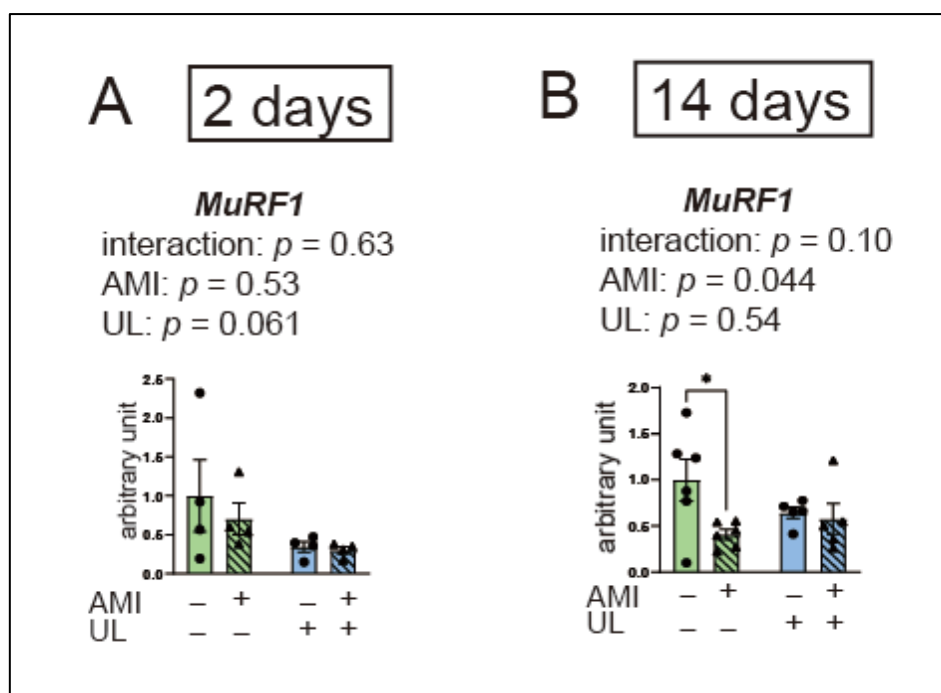


図 22. 左室心筋の *MuRF1* 発現量

2 日間モデル (A) および 14 日間モデル (B) における *MuRF1* の遺伝子発現量を示す。データは平均値±標準誤差で示す。各グラフ上に示した p 値は、AMI と左室 unloading の交互作用、ならびに AMI または unloading の主効果に対する解析結果を示す。グラフ内のアスタリスクは事後検定の結果に基づくものであり、 $*p < 0.05$ とした。AMI, acute myocardial infarction; UL, unloading.

タンパク分解の主要なシグナルである K48 のタンパク発現量を図 23 に示す。2 日間モデルおよび 14 日間モデルいずれにおいても、AMI, 左室 unloading の主効果, AMI と左室 unloading の交互作用を認めなかった。

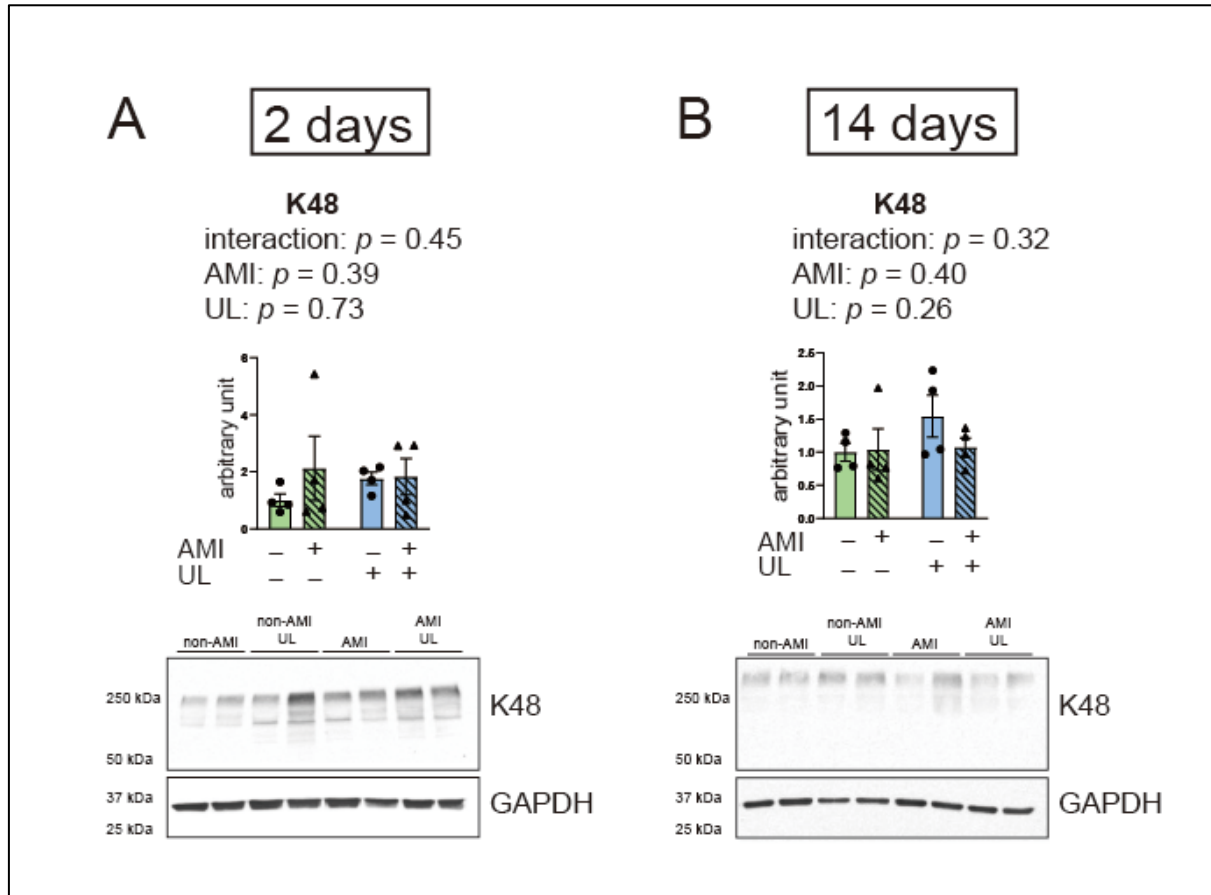


図 23. 左室心筋の K48 発現量

2 日間モデル (A) および 14 日間モデル (B) における K48 のタンパク発現量 (上段) と代表的なバンド (下段) を示す。データは平均値±標準誤差で示す。各グラフ上に示した p 値は、AMI と左室 unloading の交互作用, ならびに AMI または unloading の主効果に対する解析結果を示す。AMI, acute myocardial infarction; GAPDH, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; UL, unloading.

タンパク新生の主要なシグナルである pAKT/AKT を図 24 に示す. 2 日間モデルでは AMI および左室 unloading の主効果, AMI と左室 unloading の交互作用を認めなかった. 14 日間モデルでは AMI の主効果を認めなかった. 一方, 左室 unloading の主効果を認め, pAKT/AKT は増加した. しかしながら, AMI と左室 unloading の交互作用は認めなかった.

以上から, 亜急性期で左室 unloading 自体はタンパク新生を活性化することが示唆された.

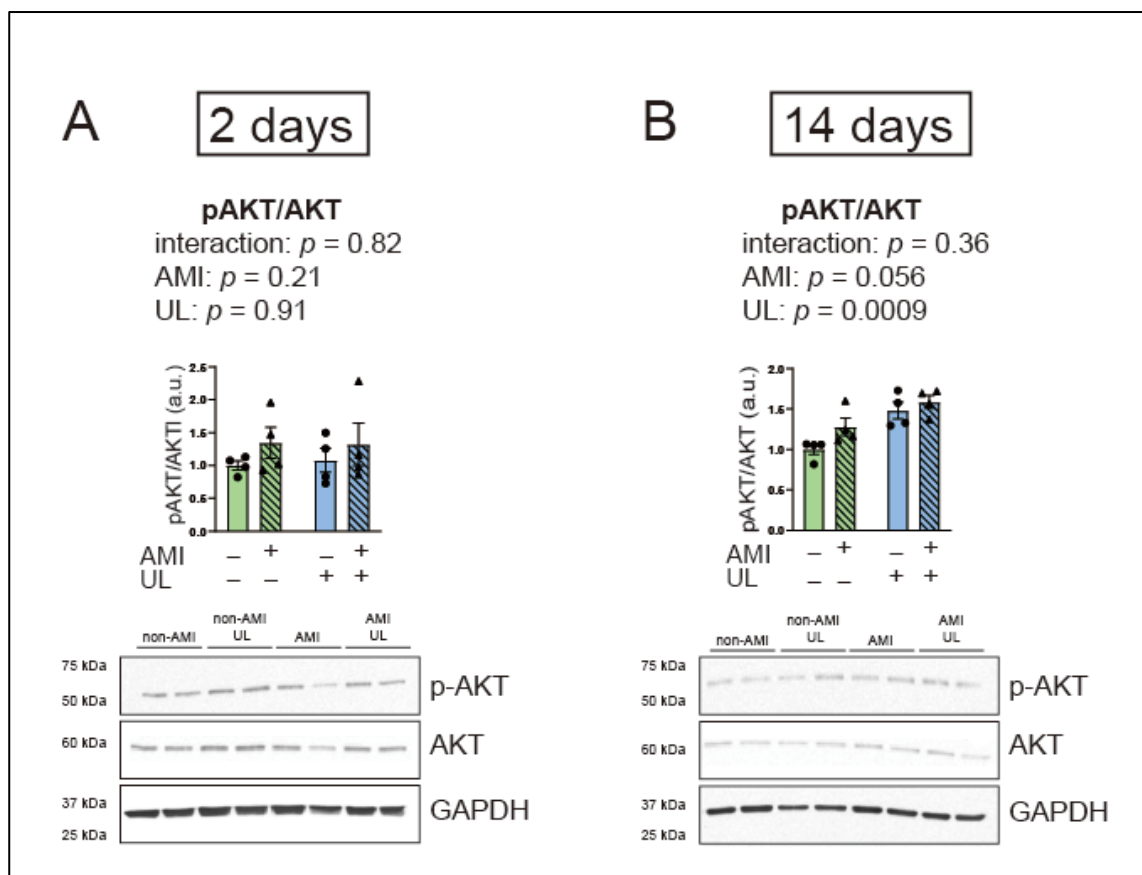


図 24. 左室心筋の pAKT/AKT

2 日間モデル (A) および 14 日間モデル (B) における pAKT/AKT (上段) と代表的なバンド (下段) を示す. データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示す. 各グラフ上に示した p 値は, AMI と左室 unloading の交互作用, ならびに AMI または unloading の主効果に対する解析結果を示す. AMI, acute myocardial infarction; GAPDH, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; UL, unloading.

考察

1. 本研究で得られた新知見

ラットの心臓の左前下行枝を結紮することで作成した急性心筋梗塞モデルに対し，異所性心肺移植による partial unloading モデルを用いることで，左室 unloading は AMI 後の心機能の増悪および心不全マーカーの上昇を抑制する傾向が示された．さらに，AMI 後の左室 unloading は，心筋のオートファジーフラックスの低下を抑制していることが示唆された．

2. 新知見に至った根拠

2-1. 左室 unloading による AMI 後の心機能障害抑制効果

左室 unloading された心臓では，左室 unloading されていない心臓と左室負荷条件が異なるため，経胸壁心エコーによる心機能評価は不適切である．本研究では，負荷条件を統一したランゲンドルフ回路による心機能パラメーターの測定も行った．急性期および亜急性期ともに，maximum dP/dt，minimum dP/dt，RPP は AMI と左室 unloading の交互作用は認めなかったが，亜急性期の maximum dP/dt と RPP に関しては，交互作用の効果量は中程度と判定されたため，左室 unloading の影響が示唆された．また，心不全マーカーである ANF の発現量においても，亜急性期で AMI と左室 unloading の交互作用は認めなかったが，効果量は中程度と判定された．これらの結果から，亜急性期において，左室 unloading は再灌流を伴わない AMI 後の心機能障害を抑制する効果を持つことが示唆された．

2-2. 左室 unloading による AMI 後の心筋のオートファジー活性の低下の抑制効果

心筋組織を用いたオートファジー関連タンパク発現の測定で，オートファジーマーカーである LC3-II の AMI 後の発現量は，急性期および亜急性期ともに左室 unloading の影響を受けなかった．一方，オートファジーにより選択的に分解されるためにオートファジーフラックスの指標とされている p62 のタンパク発現量には，急性期および亜急性期共に AMI と左室 unloading の交互作用を認めた．すなわち，AMI によって上昇する p62 の発現が，左室 unloading により抑制された．これらの結果より，左室 unloading は AMI 後の心筋のオートファジーフラックスの低下を抑制する事が示唆された．

3. 文献的考察

3-1. AMI と左室 unloading におけるオートファジーの変化

ラットにおいて左前下行枝を結紮して作成された AMI モデルでは、AMI 作成後 4 時間でオートファジーは一時的に活性化されるものの、24 時間後にはその活性は低下することが報告されている。一方、飢餓状態にしたラットで同様の実験を行うとオートファジーは活性化され、結果として梗塞サイズを縮小すると報告されている (Kanamori et al, 2011)。また、ラットを用いた慢性虚血モデルではオートファジーフラックスは低下するとされているが、AMI 後 4 週間にオートファジーの活性化作用を有するトレハロースを使用することで、心機能障害や心筋リモデリングが減少すると報告されている (Sciarretta et al, 2018)。

左室 unloading によるオートファジーの変化については、現時点で明確な結論には至っていない。非虚血性心筋症に対して LVAD による治療を受けた患者の心筋では、オートファジーは活性化していたと報告されているが (Martin et al, 2023)、別の報告ではオートファジーの活性は減弱したと報告されており (Kassiotis et al, 2009)、統一の見解は得られていない。ラットを用いた complete unloading モデルにおいては (Ono and Lindsey, 1969)、左室 unloading 後 60 日間ではオートファジーマーカーとされる LC3-II/LC3-I や Beclin-1 の発現量は変化しなかったと報告されている (Brinks et al, 2014)。一方、別の報告では、complete unloading 後 4 日目、7 日目、14 日目において LC3-II の発現は増加したと報告されている (Cao et al, 2013)。しかしながら、これらの報告ではオートファジーフラックスに関しては評価しておらず、正常心臓における左室 unloading がオートファジーを活性化させるか否かは未だ不明である。

今回の実験では、以前の報告と同様に (Sciarretta et al, 2018)、AMI では亜急性期で p62 の増加を認め、オートファジーフラックスは低下したと考えられたが、左室 unloading を行うことでオートファジーフラックスの減弱を抑制した。さらに、AMI 後の左室 unloading は心機能パラメーターである dP/dt および RPP を改善させる傾向を認めた。そのため我々は、左室 unloading により AMI 後のオートファジーの低下を抑制することが、心機能の保持に関与しているのではないかと考える。

一方で、左室 unloading 自体は、p62 の増加が示すようにオートファジーフラックスの減弱に関与していた。そのため、薬剤投与などによりオートファジーをより活性化させた場合に、AMI 後に左室 unloading を行うことでさらなる心機能の改善を得られるかどうかを含めて、今後さらなる検討が必要である。

3-2. 心筋リモデリングとユビキチンリガーゼ

左室 unloading において、いくつかの文献で心筋リモデリングと、ユビキチンリガーゼや萎縮遺伝子として知られている *Atrogin1* と *MuRF1* に関して検討されている。左室の complete unloading モデルでは、7 日後に正常心筋の萎縮が認められ、*MuRF1* ではなく *Atrogin1* ノックアウトマウスでは心筋が肥大したと報告されている (Baskin et al, 2014)。この結果より、*Atrogin1* は左室 unloading が引き起こす心筋萎縮に不可欠と結論づけている。一方、ヒトの左室心筋症に対する左室 unloading 後の心筋では、*Atrogin1* および *MuRF1* の遺伝子発現は変化がなかったと報告されている (Diakos et al, 2014)。

今回の実験では、左室 unloading は AMI 後の心筋細胞のリモデリングに影響をもたらさなかった。また、AMI 後の左室 unloading は、*Atrogin1* には影響を及ぼさず、*MuRF1* の発現量の低下を抑制している可能性が示唆された。この既報との相違は、動物の種別、方法 (complete unloading か partial unloading)、unloading の期間によるものと考えられた。また、我々のモデルで *Atrogin1* や *MuRF1* が心筋細胞のリモデリングに影響を及ぼしているかどうかをさらに検討するために、*Atrogin1* や *MuRF1* のノックアウトマウスを使った実験を行う必要があると考えられる。また、萎縮に関連しているユビキチンリガーゼは *Atrogin1* や *MuRF1* 以外にも多数報告されており (Nakao et al, 2009)、それらの発現についても我々のモデルで検討を行う価値があると考えられた。

3-3. 左室 unloading 後の心筋の線維化

既報では、左室 unloading により心筋の線維化が起こると報告されている。LVAD 治療を受けていた患者の心筋は、6 ヶ月で心筋の線維化が増加したと報告されている (Bruggink et al, 2006)。同様に、ラットの異所性心肺移植モデルによる左室 unloading では、ストレスレギュレーターである four and a half LIM domains 1 (FHL1) と four and a half LIM domains 2 (FHL2) の抑制が心筋の線維化に関与していると報告されている (Schaefer et al, 2019)。しかしながら、詳細な機序は不明である。

今回の実験では、左室 unloading 自体は既報と同様に心筋の線維化を引き起こした。この結果は、左室 unloading を行った群の心機能悪化に関与している可能性が考えられた。しかしながら、関与していると考えられる遺伝子、タンパク質、または分子経路を検討していないため、今後左室 unloading による心筋線維化の機序の解明のためさらなる検討が必要である。

3-4. 左室 unloading モデルと心機能評価

心機能評価に関しては、様々な方法がある。既報では、ラットの異所性心移植モデルでの心機能評価は経腹部エコー、ドナー心の心尖部からカテーテルを挿入して行う左室圧容量カテーテル検査、磁気共鳴画像診断で行われている (Didie et al, 2013)。これらの評価方法では、前負荷や後負荷が個体によって循環補助下では非循環補助下とは異なるため、正確な心機能評価を行うことは不可能と考えられる。今回の実験では初めて、ランゲンドルフ回路を用いてすべての群の前負荷と後負荷、冠灌流圧、灌流液組成（エネルギー基質濃度）を統一した条件下で心機能評価を行った点に意義がある。

また、大動物において Impella を使用した実験も行われている。Impella 駆動下で心機能評価が行われている報告もある (Ko et al, 2020) が、Saku らは、Impella を抜去後 4 週間で心機能評価を行い、Impella 使用群では非使用群より左室駆出率が改善していると報告している (Saku et al, 2018)。

4. 本研究の問題点

4-1. 心臓除神経 (cardiac denervation) の影響

今回の実験で使用した異所性心移植による左室 unloading モデルは、ドナー・ラットから心臓を摘出することで心臓が除神経される。既報では、心臓への除神経は心筋の萎縮や心機能障害を引き起こすことが報告されている (Zaglia et al, 2013 ; Poormasjedi-Meibod et al, 2019)。しかしながら、ヒトにおける心臓移植後では、除神経状態にもかかわらず心筋の萎縮は認めていない (Zheng et al, 2022)。そのため、今回の実験モデルでの除神経が心筋に与える影響は限定的であると考えられる。除神経の影響を完全に排除するためには、大動物を用いたモデルにおいて、左室補助デバイスを挿入する実験を行う必要があると考えられる。

また、異所性心移植による左室 unloading モデルでは、除神経の影響により徐脈傾向になるため、心機能評価を行う際にはこの点も考慮が必要であると報告されている (Fu et al, 2016)。しかしながら、今回の我々の実験では心拍数に有意な変化は認められなかったことから、得られた心機能評価の結果に徐脈の影響はないと考えられる。

4-2. 左室 unloading の至適期間

今回の実験では評価のタイムポイントを左室 unloading 後 2 日目と 14 日目に設定した。設定根拠としては、正常心臓の左室の partial unloading モデルは、左室 unloading 後 14 日目で左室心筋の萎縮の進行が概ね終息すると報告されていること (Didie et al, 2013)、ならびに亜急性期における左室 unloading の効果を検討する目的

があったためである。しかしながら，AMI 後の左室 unloading の至適期間に関しては不明であるため，別なタイムポイントでの評価により新たな知見を得られる可能性がある。我々の実験室では，萎縮が進行している途中段階とされる 7 日間モデルを作成した経験があるが，14 日間モデルとの間に心機能において顕著な差は認めなかった。

4-3. 実験動物種

今回の実験ではラットを用いて評価を行ったが，この結果が大動物やヒトでも同様の結果を得られるかどうかは不明である。

4-4. 異所性心肺移植手技自体の影響

レシピエント・ラットにおいて高度な侵襲を伴う実験手技であるため，手術自体に起因する炎症や心筋障害の影響を完全に否定することはできない。しかしながら，評価は治療後 2 日目および 14 日目に行っており，これらの影響は限定的であると考えている。

4-5. 冠動脈の完全閉塞モデルと虚血再灌流モデル

今回の実験では，左前下行枝を結紮した完全閉塞モデルを用いて実験を行ったが，実臨床においては多くの場合，経皮的冠動脈インターベンションにより再灌流療法が施行される。そのため，実臨床により近い条件での検討を行うためには，ラットの左前下行枝を一時的に結紮・解除する虚血再灌流モデルを用いる必要があり，また、今回とは異なる結果が得られる可能性がある。

結論

1. 本研究で得られた新知見

- ・ラットの心臓の左前下行枝を結紮することで作成した，再灌流を伴わない急性梗塞心筋を用いた異所性心肺移植による partial unloading モデルにおいて，亜急性期における左室 unloading は AMI 後の心機能の増悪および心不全マーカーの上昇を抑制する傾向を認めた．
- ・AMI 後の左室 unloading は，心筋におけるオートファジーフラックスの低下を抑制していることが示唆された．

2. 本研究で得られた新知見の意義

本研究では，ラットの AMI 後の左室 unloading において，AMI 後の心機能の増悪を抑制し，その機序としてオートファジーフラックスの改善が関与している可能性が示唆された．これらの知見は，AMI 後の心原性ショックに対して経皮的左室補助装置を使用した患者において，オートファジー活性をコントロールすることでさらなる心機能の改善が得られる可能性を示唆しており，将来的な臨床研究へとつながると考えられる．さらに臨床的観点からは，AMI 後のショックに対して経皮的左室補助装置を使用する患者において，より早期に心機能の改善を得られることにより，早期の補助装置離脱が可能となり，装置の使用に伴う種々の合併症を回避できる可能性がある．また，左室補助装置（LVAD）を装着した患者では一般的に離脱が困難とされているが，本研究の知見は，長期の左室 unloading 後の LVAD の離脱の可能性につながる．

3. 新知見から今後どのような研究が展開されうるか．

- ・より至適な左室 unloading 期間を検討するため，左室 unloading 期間を 2 日間および 14 日間以外（例：5 日間や 28 日間など）に設定し，各タイムポイントにおける心機能への影響を検討する研究が展開されうる．
- ・オートファジー活性のコントロールによるさらなる心機能改善の可能性を検証するため，左室 unloading にオートファジー阻害剤または活性化剤を併用し，心機能がさらに改善するか否かを明らかにする研究が展開される．

4. 今後の課題

- ・虚血再灌流モデルへの応用を行い，研究を継続する必要がある．
- ・臨床応用を見据え，大動物を用いた in-vivoモデルによるさらなる検証が求められる．
- ・今後実用化が期待されている血清オートファジーマーカーを活用し，AMI 後の左室 unloading とオートファジーの関連をより詳細に解明する必要がある．

謝辞

本研究の一部は，科研費 基盤研究（C）22K08909 の助成を受けたものである．

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北海道大学大学院医学研究院 心臓血管外科学教室 大学院生の高 靖雯さん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

Barac YD, Emrich F, Krutzwald-Josefson E, Schrepfer S, Sampaio LC, Willerson JT, Robbins RC, Ciechanover A, Mohr FW, Aravot D, et al (2017) The ubiquitin-proteasome system: A potential therapeutic target for heart failure. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 36, 708-714.

Baskin KK, Rodriguez MR, Kansara S, Chen WH, Carranza S, Frazier OH, Glass DJ and Taegtmeyer H (2014) MAFbx/Atrogin-1 is required for atrophic remodeling of the unloaded heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 72, 168-176.

Bhatt AS, Ambrosy AP and Velazquez EJ (2017) Adverse remodeling and reverse remodeling after myocardial infarction. *Current Cardiology Reports* 19, 71.

Briceno N, Annamalai SK, Reyelt L, Crowley P, Qiao X, Swain L, Pedicini R, Foroutanjazi S, Jorde L, Yesodharan G, et al (2019) Left ventricular unloading increases the coronary collateral flow index before reperfusion and reduces infarct size in a swine model of acute myocardial infarction. *Journal of the American Heart Association* 8, e013586.

Brinks H, Giraud MN, Segiser A, Ferrie C, Longnus S, Ullrich ND, Koch WJ, Most P, Carrel TP and Tevæarai HT (2014) Dynamic patterns of ventricular remodeling and apoptosis in hearts unloaded by heterotopic transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 33, 203-210.

Brinks H, Tevæarai H, Muhlfeld C, Bertschi D, Gahl B, Carrel T and Giraud MN (2009) Contractile function is preserved in unloaded hearts despite atrophic remodeling. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 137, 742-746.

Bruggink AH, Van Oosterhout MF, De Jonge N, Ivangh B, Van Kuik J, Voorbij RH, Cleutjens JP, Gmelig-Meyling FH and De Weger RA (2006) Reverse remodeling of the myocardial extracellular matrix after prolonged left ventricular assist device support follows a biphasic pattern. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 25, 1091-1098.

Cao DJ, Jiang N, Blagg A, Johnstone JL, Gondalia R, Oh M, Luo X, Yang KC, Shelton JM, Rothermel BA, et al. (2013) Mechanical unloading activates FoxO3 to trigger Bnip3-dependent cardiomyocyte

atrophy. *Journal of the American Heart Association* 2, e000016.

Cohen J (1988) *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences Second Edition* (Lawrence Erlbaum Associates: Mahwah, NJ)

De Luca L, Mistrulli R, Scirpa R, Thiele H and De Luca G (2023) Contemporary management of cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction. *Journal of Clinical Medicine* 12, 2184.

De Silva K, Lumley M, Kailey B, Alastruey J, Guilcher A, Asrress KN, Plein S, Marber M, Redwood S and Perera D (2014) Coronary and microvascular physiology during intra-aortic balloon counterpulsation. *Journal of the American College of Cardiology: Cardiovascular Interventions* 7, 631-640.

Diakos NA, Selzman CH, Sachse FB, Stehlik J, Kfoury AG, Wever-Pinzon O, Catino A, Alharethi R, Reid BB, Miller DV, et al (2014) Myocardial atrophy and chronic mechanical unloading of the failing human heart. *Journal of the American College of Cardiology* 64, 1602-1612.

Didie M, Biermann D, Buchert R, Hess A, Wittkopper K, Christalla P, Doker S, Jebran F, Schondube F, Reichenspurner H, et al (2013) Preservation of left ventricular function and morphology in volume-loaded versus volume-unloaded heterotopic heart transplants. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 305, 533-541.

Fu XB, Segiser A, Carrel TP, Stahel HTT and Most H (2016) Rat heterotopic heart transplantation model to investigate unloading-induced myocardial remodeling. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 3, 34.

Hale AN, Ledbetter DJ, Gawriluk TR and Rucker EB (2013) Autophagy: regulation and role in development. *Autophagy* 9, 951-72.

Ibrahim M, Navaratnarajah M, Kukadia P, Rao C, Siedlecka U, Cartledge JE, Soppa GK, Van Doorn C, Yacoub MH and Terracciano CM (2013) Heterotopic abdominal heart transplantation in rats for functional studies of ventricular unloading. *Journal of Surgical Research* 179, 31-39.

Kanamori H, Takemura G, Goto K, Maruyama R, Ono K, Nagao K, Tsujimoto A, Ogino A, Takeyama T, Kawaguchi T, et al (2011) Autophagy limits acute myocardial infarction induced by permanent

coronary artery occlusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 300, 2261-2271.

Kassiotis C, Ballal K, Wellnitz K, Vela D, Gong M, Salazar R, Frazier OH and Taegtmeier H (2009) Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading. *Circulation* 120, 191-197.

Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, et al (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1-222.

Ko B, Drakos SG, Ibrahim H, Kang TS, Thodou A, Bonios M, Taleb I and Welt FG (2020) Percutaneous mechanical unloading simultaneously with reperfusion induces increased myocardial salvage in experimental acute myocardial infarction. *Circulation-Heart Failure* 13, e005893.

Ledingham SJM, Braimbridge MV and Hearse DJ (1987) The St. Thomas' Hospital cardioplegic solution. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 93, 240-246.

Marc AP and Braunwald E (1990) Ventricular remodeling after myocardial infarction experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81, 1161-1172.

Martin TG, Juarros MA, Cleveland JC Jr, Bristow MR, Ambardekar AV, Buttrick PM and Leinwand LA (2023) Assessment of autophagy markers suggests increased activity following LVAD therapy. *Journal of the American College of Cardiology: Basic to Translational Science* 8, 1043-1056.

Masoudi FA, Ponirakis A, De Lemos JA, Jollis JG, Kremers M, Messenger JC, Moore JWM, Moussa I, Oetgen WJ, Varosy PD, et al (2017) Trends in U.S. cardiovascular care: 2016 report from 4 ACC national cardiovascular data registries. *Journal of the American College of Cardiology* 69, 1427-1450.

Mcdonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Bohm M, Burri H, Butler J, Celutkiene J, Chioncel O, et al (2021) 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal* 42, 3599-3726.

Meyns B, Stolinski J, Leunens V, Verbeken E and Flameng W (2003) Left ventricular support by catheter-mounted axial flow pump reduces infarct size. *Journal of the American College of Cardiology*

41, 1087-1095.

Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, Ohno A, Okumura Y, Nonaka I, Yasutomo K, Baldwin KM, et al (2009) Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Molecular and Cellular Biology* 29, 4798-4811.

Nishida K and Otsu K (2016) Autophagy during cardiac remodeling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 95, 11-18.

Ono K and Lindsey ES (1969) Improved technique of heart transplantation in rats. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 57, 225-229.

Ostadal P, Mlcek M, Kruger A, Hala P, Lacko S, Mates M, Vondrakova D, Svoboda T, Hrachovina M, Janotka M, et al (2015) Increasing venoarterial extracorporeal membrane oxygenation flow negatively affects left ventricular performance in a porcine model of cardiogenic shock. *Journal of Translational Medicine* 13, 266.

Pamias-Lopez B, Ibrahim ME and Pitoulis FG (2023) Cardiac mechanics and reverse remodelling under mechanical support from left ventricular assist devices. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 10, 1212875.

Patel MR, Smalling RW, Thiele H, Barnhart HX, Zhou Y, Chandra P, Chew D, Cohen M, French J, Perera D, et al (2011) Intra-aortic balloon counterpulsation and infarct size in patients with acute anterior myocardial Infarction without shock the CRISP AMI randomized trial. *Jama-Journal of the American Medical Association* 306, 1329-1337.

Poormasjedi-Meibod MS, Mansouri M, Fossey M, Squair JW, Liu J, Mcneill JH and West CR (2019) Experimental spinal cord injury causes left-ventricular atrophy and is associated with an upregulation of proteolytic pathways. *Journal of Neurotrauma* 36, 950-961.

Saku K, Kakino T, Arimura T, Sunagawa G, Nishikawa T, Sakamoto T, Kishi T, Tsutsui H and Sunagawa K (2018) Left ventricular mechanical unloading by total support of Impella in myocardial infarction reduces infarct size, preserves left ventricular function, and prevents subsequent heart failure in dogs. *Circulation-Heart Failure* 11, e004397.

Schaefer A, Schneeberger Y, Schulz S, Krasemann S, Werner T, Piasecki A, Hoppner G, Muller C, Morhenn K, Lorenz K, et al (2019) Analysis of fibrosis in control or pressure overloaded rat hearts after mechanical unloading by heterotopic heart transplantation. *Scientific Reports* 9, 5710.

Scheidt S, Wilner G, Mueller H, Summers D, Lesch M, Wolff G, Krakauer J, Rubenfire M, Fleming P, Noon G, et al (1973) Intra-aortic balloon counterpulsation in cardiogenic shock. Report of a co-operative clinical trial. *New England Journal of Medicine* 288, 979-984.

Sciarretta S, Yee D, Nagarajan N, Bianchi F, Saito T, Valenti V, Tong M, Del Re DP, Vecchione C, Schirone L, et al (2018) Trehalose-induced activation of autophagy improves cardiac remodeling after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 71, 1999-2010.

Tavazzi G and Morrow DA (2024) Efficacy and safety of mechanical circulatory support in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock: DanGer trial in perspective. *European Heart Journal – Acute Cardiovascular Care* 13, 365-367.

Thiele H, Ohman EM, De Waha-Thiele S, Zeymer U and Desch S (2019) Management of cardiogenic shock complicating myocardial infarction: an update 2019. *European Heart Journal* 40, 2671-2683.

Thiele H, Zeymer U, Neumann FJ, Ferenc M, Olbrich HG, Hausleiter J, Richardt G, Hennersdorf M, Empen K, Fuernau G, et al (2012) Intraaortic balloon support for myocardial infarction with cardiogenic shock. *New England Journal of Medicine* 367, 1287-1296.

Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Anderson CM, Arora P, Avery CL, Baker-Smith CM, Beaton AZ, Boehme AK, Buxton AE, et al (2023) Heart disease and stroke statistics-2023 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 147, 93-621.

Wang X and Robbins J (2014) Proteasomal and lysosomal protein degradation and heart disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 71, 16-24.

Welsh DC, Dipla K, McNulty PH, Mu AB, Ojamaa KM, Klein I, Houser SR and Margulies KB (2001) Preserved contractile function despite atrophic remodeling in unloaded rat hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 281, 1131-1136.

Zaglia T, Milan G, Franzoso M, Bertaggia E, Pianca N, Piasentini E, Voltarelli VA, Chiavegato D, Brum

PC, Glass DJ, et al (2013) Cardiac sympathetic neurons provide trophic signal to the heart via β 2-adrenoceptor-dependent regulation of proteolysis. *Cardiovascular Research* 97, 240-50.

Zheng SX, Li L, Liu L, Liang S, Tao J, Wang JF and Zheng JM (2022) Changes in echocardiographic parameters of the donor's heart before and after heart transplantation and their relationship with post-transplant survival. *Annals of Translational Medicine* 10, 280.

木村一雄 (2018) 急性冠症候群ガイドライン. In 一般社団法人 日本循環器学会, https://www.j-circ.or.jp/cms/wp-content/uploads/2018/11/JCS2018_kimura.pdf (2025 年 8 月 12 日参照)

J-PVAD レジストリ事務局 (2023) 補助循環用ポンプカテーテルに関するレジストリ事業 J-PVAD 年次報告 (2020 年 2 月～2022 年 12 月) . In. J-PVAD, https://j-pvad.jp/document/【年次報告】J-PVAD_20231010.pdf?ver=20231010A (2025 年 8 月 12 日参照)

日本循環器学会 IT/DATABASE 部会 (2022) 2022 年循環器疾患診療実態調査報告書. In 一般社団法人 日本循環器学会, https://www.j-circ.or.jp/jittai_chosa/media/jittai_chosa2021web_ver2_revise20241015.pdf (2025 年 8 月 12 日参照)