

博士論文

ラットの心臓における間欠的低酸素に誘導される
オートファジーに関する研究

前田秀将

目次

略語一覧

I. 要旨	1
II. 序文	2
III. 方法		
1. 動物モデルと IH 曝露条件	10
2. オートファジー阻害剤	16
3. 心エコー解析	18
4. 心筋サンプリングとタンパク定量	19
5. Western blotting	20
6. 電子顕微鏡	22
7. 統計学的分析	23

IV. 結果

1. 血液学的検査、体重および心重量への影響	24
2. IH によるオートファジーの誘導	29
3. オートファジー経路の阻害による IH 曝露ラットの心収縮機能 への影響	33
4. 心筋障害と細胞死	38
5. オートファジー誘導のシグナリングパスウェイ	42

V. 考察

1. IH はオートファジーを誘導する	44
2. オートファジー阻害は IH 心臓の心収縮機能障害を誘導する	46
3. オートファジーによるネクロシスの抑制	47
4. 臨床的意義	50
5. IH でのオートファジーシグナルパスウェイ	51

VI. 本研究の限界と今後の課題 52

VII. 総括 53

VIII. 文献 · · · · · 55

IX. 謝辞 · · · · · 64

略字

SAS	sleep apnea syndrome
AHI	apnea hypoxia index: AHI
HF	heart failure
OSAS	obstructive SAS
IH	hypoxia
LC3	light chain 3
3-MA	3-metyladenine
CQ	chloroquine
FS	left ventricular fractional shortening
mTOR	mammalian target of rapamycin
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase
TSC2	tuberous sclerosis 2
i.p.	intraperitoneally
HR	heart rate
LV	left ventricular
LVAWd	LV anterior wall thickness in diastole
LVAWs	LVAW in systole
LVPWd	LV posterior wall thickness in diastole

LVPWs	LVPW in systole
LVDd	LV end-diastolic diameter
LVDs	LV end-systolic diameter
AST	aspartate aminotransferase
TAC	trans-aortic constriction
Hb	hemoglobin concentrations
Ht	hematocrit values
RBC	red blood cell count
BW	body weight
HW	heart weight

I. 要旨

睡眠時無呼吸症候群(以下 SAS)は睡眠時の低酸素発作が、心臓突然死を誘発すると言われている。これに関連した突然死事例を法医学解剖することもあり、SAS 患者の突然死メカニズムは重要な研究課題である。

オートファジーは様々な心臓病の中で誘導され、心臓に対し保護的に働くことが知られている。本研究は、SAS の重要な病因である間欠的低酸素によってオートファジーが誘導されることを確認し、オートファジー経路を2つの阻害剤を用いて心機能について検討したところ、心収縮機能障害を起こすことがわかった。また、mTOR を中心にオートファジーの経路を検討したところ、Akt の脱リン酸化によって mTOR が不活化され、オートファジーが誘導されることがわかった。

II. 序文

睡眠時無呼吸症候群 (sleep apnea syndrome: SAS) とは睡眠中 (1 晩 7 時間) に 30 回以上、10 秒以上の呼吸停止 (無呼吸) 発作を繰り返す、あるいは「無呼吸・低呼吸指数」 (apnea hypoxia index: AHI; 1 時間あたりの無呼吸および低呼吸数をあわせたもの) が 5 以上の場合に診断される症候群であり、肺高血圧、全身性高血圧、心不全、冠動脈疾患、そして不整脈などに関連しており、心血管系疾患の危険性を増加させると言われている [1-4]。そして、夜間低酸素発作が心機能を障害し、心臓突然死を誘発する可能性が指摘されている [5]。

法医学実務上、突然死した人の中に、SAS や心不全との関連性が疑われ、法医学解剖に付されることもあり、確かな診断根拠が求められることがある。そのため、SAS 患者の突然死のメカニズムは重要な研究課題である。

心不全患者の閉塞性睡眠時無呼吸症候群 (obstructive SAS: OSAS) の有病率は 15% から 50% であり、OSAS 患者の重度と死亡率が相関する [1-4]。それに加えて、重症な OSAS で肥満患者では左室肥大による左室機能不全が相関する [6]。

SAS による無呼吸は高炭酸ガス血症と低酸素血症をきたし、高炭酸ガス血症は血管拡張、中枢神経機能低下、睡眠中断を起こし、低酸素血症は不整脈および除脈、赤血球増加、血管収縮を起こす。そして血管拡張による頭痛、中枢機

能低下による人格変化、睡眠中断による日中の居眠り、これらの事象は、判断力・集中力や作業効率の低下を招き、交通事故をはじめ医療事故・産業事故などにもつながれば、莫大な経済損失を引き起こし、実際に大きな社会的問題となっている。また、不整脈および除脈による突然死、赤血球増加による心筋梗塞および脳梗塞、血管収縮による全身性高血圧そしてさらに心不全、これらも突然死につながる（図 1）。そこで SAS の突然死に関与する重要な病因である低酸素血症に着目した。

SAS の低酸素血症は低酸素と常酸素の短いサイクルからなる間歇的低酸素 (intermittent hypoxia: IH) からなり、SAS において、高血圧、心臓リモデリング、他の合併症が誘発される [7]。

しかしながら、IH に関連する心筋収縮機能に関する報告は希少で [8-10]、そのメカニズムに関しては、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger-1 が慢性 IH 曝露による左心収縮不全に寄与することを示した研究一つしかない [10]。

オートファジーは、栄養不足やその他の様々なストレスに対応して、細胞内のタンパク質を分解するための仕組みの一つである。また、生命維持のためのエネルギー源として作用する [11]。オートファジーは細胞質の一部が隔離膜によって取り囲まれ、オートファゴソームを形成する。次にオートファゴソームの外膜がリソソーム膜と融合し、リソソームのプロテアーゼ（カテプシン）に

よって内容物を分解し、アミノ酸、脂肪酸、糖質等を再生し、細胞機能や生命の維持のため利用される(図2)[11, 12]。この過程に関与する light chain 3(LC3)-II は、信頼できるオートファジーのマーカーとして、広く用いられている[11]。LC3 は、細胞質で合成され、直ちにシステインプロテアーゼにより切断されて LC3-I となり、細胞質に拡散している。ストレスに反応して、LC3-I にホスファチジルエタノールアミンが共有結合すると、LC3-II となりオートファゴソーム膜に組み込まれる。SDS-polyacrylamide gel 電気泳動に続く Western blotting によって、泳動速度の速い LC3-I、遅い LC3-II を区別することで、オートファジー活性を評価できる[11]。

病態におけるオートファジーの関与を示すために、オートファジー経路の阻害剤を用いた実験がしばしば行われる。オートファジー経路の阻害剤として頻用される Class III PI3 kinase 阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) とリソソーム酸性化剤である chloroquine (CQ) は、各々、オートファゴソームの構成の初期段階、及び、オートファゴソーム-リソソーム融合を阻害する。そのため、オートファジーの活性化状態において、3-MA は LC3-II を減少させ、CQ は LC3-II を増加させる[12] (図2)。

オートファジーは、圧負荷(高血圧)、虚血、心筋症等の心臓病モデルにおいて、長寿命タンパク質、ミスフォールド化タンパク質、ユビキチン化タンパク

質、及び傷害された細胞内小器官（ミトコンドリア等）の分解とリサイクルを通して、心機能を保護すると一般に考えられている[13-16]。オートファジーの薬理的阻害を使用して、オートファジーが飢餓により誘導されることで、心筋梗塞の心不全への進行を抑えることは以前に証明されている[17, 18]。同様に高血圧および他の心疾患のある齧歯類モデルではオートファジーの有益な役割を示唆するエビデンスが蓄積されているが[19]、いくつかの研究の結果では有害な結果を示している[20-21]。

哺乳類ラパマイシン標的タンパク質（mammalian target of rapamycin :mTOR）は mTOR 複合体 1 と 2（mTORC1 と mTORC2）からなるオートファジー制御因子である[22, 23]。オートファジーは、mTORC1 によって本質的に抑制される。ストレスのない恒常状態において、オートファジーは、mTORC1 が ULK1 に結合し、リン酸化することによって抑制されている。しかし、種々のストレスによって、PI3 kinase-Akt 系の活性阻害、または、アデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼ（adenosine monophosphate-activated protein kinase :AMPK）系の活性化によって、mTORC1 の活性阻害が解除されると、オートファジーの引き金が引かれる。AMPK は結節硬化（tuberous sclerosis: TSC）2 蛋白をリン酸化し、TSC2 による Rheb (mTOR 活性化剤タンパク質) 活性阻害を解除した結果として mTOR の不活化が生じる [22, 23]。また AMPK は、mTORC1 のトレオニン(Thr)

2446 を直接、または mTORC1 結合 partner である Raptor をリン酸化することにより、mTOR 活性を阻害する [24, 25]。対照的に、Akt は、mTOR のセリン (Ser) 2481・Ser2448 のリン酸化、または、TSC2 による Rheb 抑制の解除により、mTOR を活性化する [24]。したがって、mTOR-Thr2446、及び mTOR-Ser2481・Ser2448 のリン酸化は、各々、AMPK 経路、及び PI3 kinase-Akt 経路による mTOR 活性化とオートファジー開始の指標と考えられる [26] (図 3)。

過去の論文によると動物実験ではラットやマウスなどの齧歯類動物が IH 曝露実験やオートファジーの実験モデルとして世界的に使用されていることより [7-10, 15-18, 20-21, 25-29]、本実験ではラットを使用することが妥当であると判断した。

本研究の目的は、ラットを間欠的低酸素に曝露することによって、心筋にオートファジーが誘導されるか、誘導されるならば、Akt、AMPK のいずれの情報伝達系が関わるか、オートファジーは心機能を保護するのか、傷害するかについて、明らかにすることである。そして SAS による突然死のメカニズムの解明のきっかけとなることを期待する。

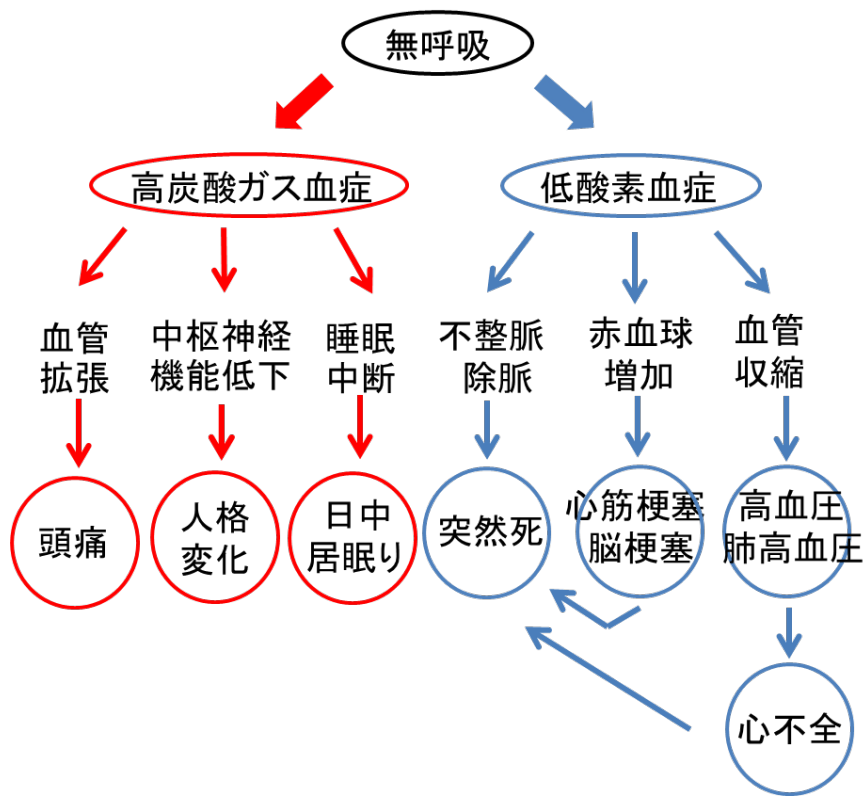


図1 SASによる合併症

SASによる無呼吸発作は高炭酸結晶と低酸素血症をひき起こす。高炭酸ガス血症は血管拡張、中枢神経機能低下、睡眠中断を著し、低酸素血症は不整脈および除脈、赤血球増加、血管収縮を起こす。

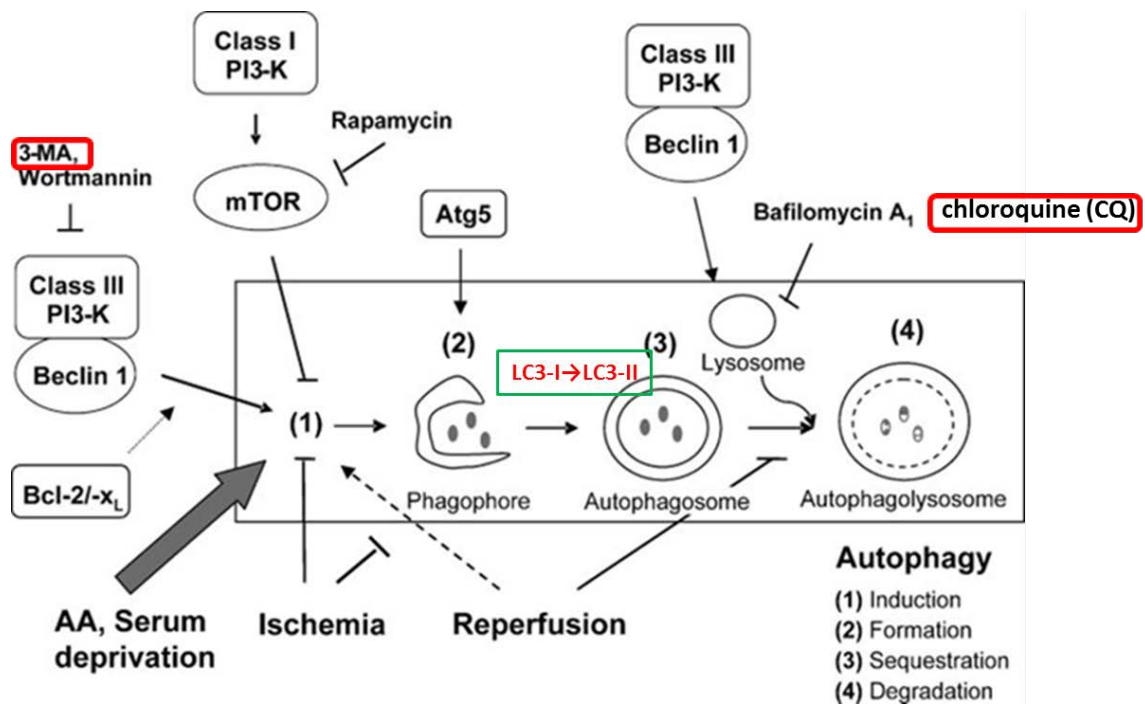


図2 オートファジーの概要

オートファジーはインダクション (1) されると、細胞質の一部が隔離膜によって取り囲まれ (2)、オートファゴソームを形成する (3)。次にオートファゴソームの外膜がリソソーム膜と融合し、内容物を分解する。赤枠は実験で使用したオートファジーの阻害剤である 3-MA と chloroquine (CQ)。この2つは図のように阻害部位が異なる。 *J. Bio. Chem.* 281(2006) 29776-29787 から引用[12]。

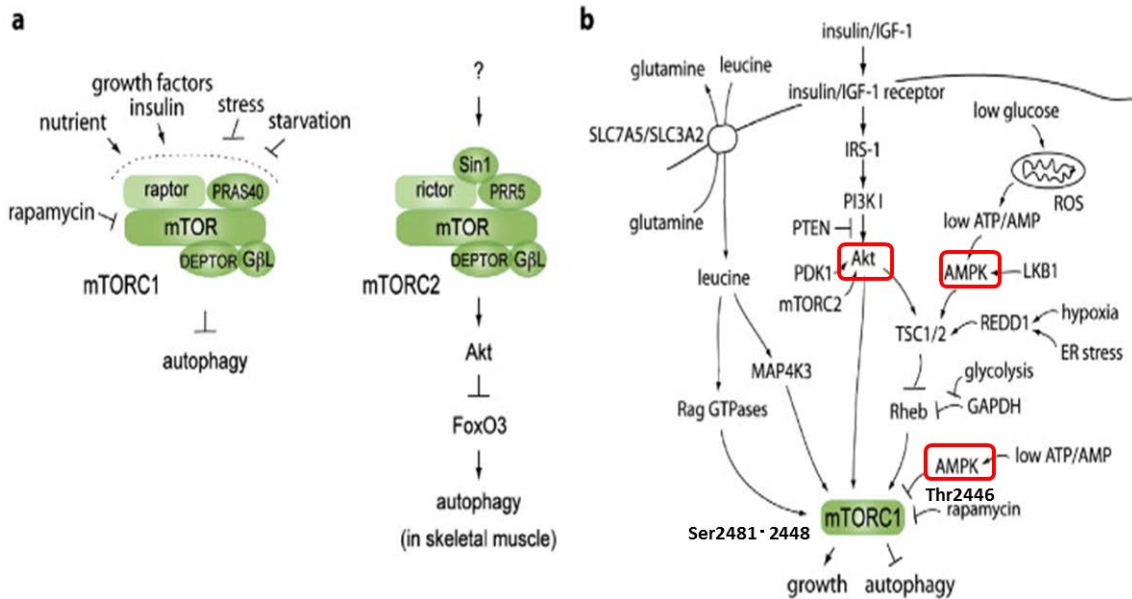


図3 mTORの経路

mTORはmTOR複合体1と2(mTORC1とmTORC2)からなる(a)。オートファジーは、mTORC1によって本質的に抑制される。種々の刺激あるいはストレスが、AMPK経路の活性化、あるいはAkt経路の不活化することによってmTORが不活化してオートファジーが生ずる。AMPKは結節硬化2(TSC2)をリン酸化し、RHEB(mTOR活性剤タンパク質)活性化を抑制し結果としてmTORの不活化が生じる(b)。

FEBS Lett. 584 (2010) 1287–1295 から引用[23]。

III. 方法

1. 動物モデルと IH 曝露条件

本研究は東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会の承認を受けたものである（承認番号：医-P10-P-132）。実験動物は6週齢の Sprague-Dawley(SD)系雄性ラット（系統 Cir:CD(SD),SPF）を Charles River Laboratories (Kanagawa, Japan) から購入し、1週間後の馴化後、本実験を開始した。動物飼育室は実験全期間を通じて、許容温度 21～25℃、許容湿度 40～75%、照明時間 12 時間（午前 6 時から午後 6 時まで点灯）に設定した。

従来型の IH 装置は、ラットやマウスを 1 匹ずつ、ボトルに容れ、窒素ガスを吹き込むため、動物が風圧及び身体拘束によるストレスに長期間曝された。また、多量の窒素ガスをボンベから供給するため、ボンベ交換の労力と多額の経費を要した。当教室で開発した IH 装置は、窒素ガス発生装置を使うことで、通常サイズの飼育箱で多数のラットを同時に IH 曝露できる利点があり、ストレスを最小限にして、多数のラットを同時に、低コストで IH 曝露することができ、実験の再現性も高い。この装置を用いた実験は本研究をはじめとして、論文も出始めている [30-33]。

IH 装置全体の経路図と外観を図 4 に示す。ラットを 4~6 匹、独自に作成した密閉式プラスチック製低酸素曝露チャンバー(440W×270D×190H mm)に、窒素ガスと空気をタイマー制御された電磁弁を介して交互に流入する IH 装置に收容した。対照群は、IH チャンバーの隣に設置した同じサイズの飼育チャンバーに入れ、電磁弁開閉や掃気による騒音ストレスが同等となるようにした。窒素ガス(N₂ 99.9%) は工業用窒素ガス発生装置(PSA type N₂ generator, ECOTS, Osaka, Japan)、空気(O₂ 21%) はスクロール式エアーコンプレッサー(Oil free scroll type, Smart Air SLP-15EBD, ANEST IWATA, Yokohama, Japan)から送気することで永続的にガスを供給した。

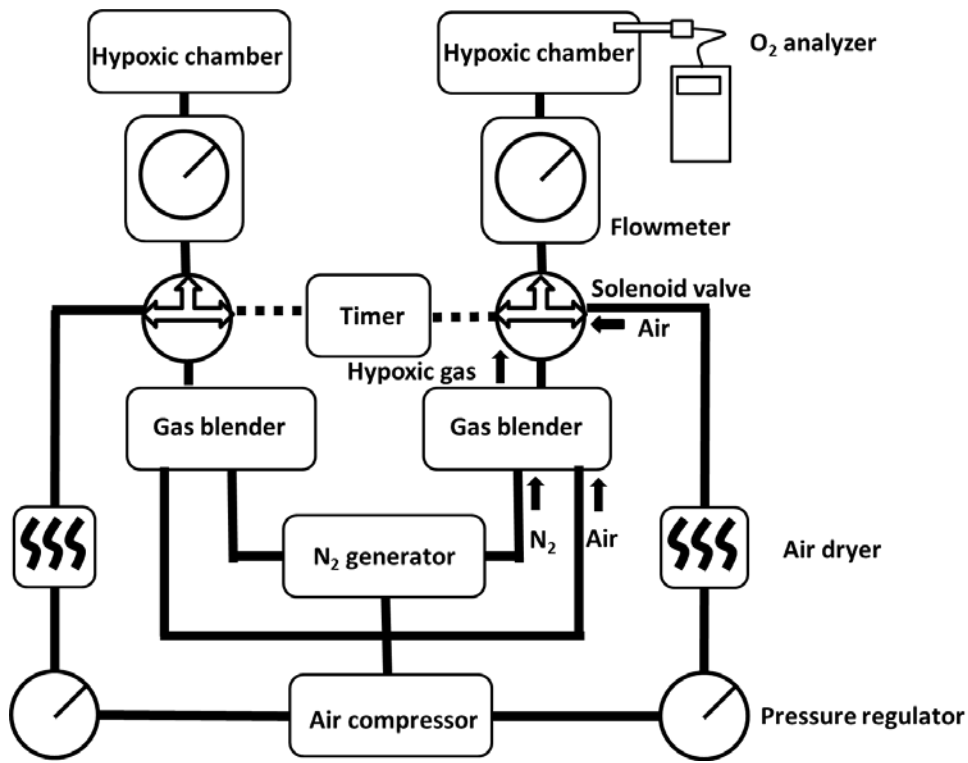
飼料は固形飼料(CRE-1, Oriental Yeast, Tokyo, Japan) および水道水を用い、IH 曝露(IH) 群には自由摂取させ、コントロール(C) 群は毎週、IH 群と同じように調節した。床敷き交換及び餌の補充・調整は IH が曝露していない時間帯に、速やかに行った。

過去のラットを用いた IH 論文を参考にすると、最も低い低酸素刺激条件は 3~5% O₂ であり、1 サイクルは 180 秒であった[27-29]。そこで、IH 装置でこの条件を参考にし、条件を満たすため窒素ガスと空気の流量を調整した。その結果、窒素ガス(N₂ 99.9%) を流量 14L/min、空気(O₂ 21%) を流量 54L/min で供給すると 90 秒毎に酸素濃度が最低 4%、最高 21%になることがわかった(図 5)。

それぞれの送気チューブは電磁弁に接続し、タイマーにより、90 秒毎に弁を切り替えることによって窒素ガスと空気が交互に密閉式チャンバー内へ流入するように設定した。

既存の文献によると IH 曝露時間は 7-12 時間であったので[27-29]、ラットの睡眠時間と想定される午前 9 時から午後 5 時の 8 時間、4~21% O₂ に 1 サイクル 180 秒、IH、または空気に曝露した。午後 5 時から翌日 9 時までは空気だけが、54L/min で流入するようにした。また、IH 曝露中のラットの状態を確認するために、上記の条件で、どの程度の低酸素血症となるかを検討した。大動脈にカテーテルを留置したラットに対して IH 曝露を行いながら、動脈血ガス分析を行ったところ 4%O₂ 曝露時に PaO₂ 25.4±1.7mmHg、PaCO₂ 17.8±0.7mmHg、pH7.58±0.020、21%O₂ 時 PaO₂ 83.3±8.6mmHg、PaCO₂ 32.4±5.4mmHg、pH7.410±0.017 であり、強い低酸素血症を起こしていた (図 6)。最終的に IH 条件は 4~21%O₂×180 秒サイクル×8 時間/日と決定した。

a



b



図4 IH曝露装置

IH曝露装置の全体経路図(a)。Air compressorとN₂ generatorから発生する空気と窒素はGas blenderで混合される。それぞれの流量調節によってHypoxic chamberに送気する低酸素ガス濃度を自由に設定できる。Hypoxic gasとAirはタイマーで制御された電磁弁に接続され、設定時間毎に交互にHypoxic chamberに送気される。IH曝露装置の実物(b)。写真左の左側がN₂ generator、右側がAir compressor。写真右の左側がGas blender、右側がHypoxic chamber。

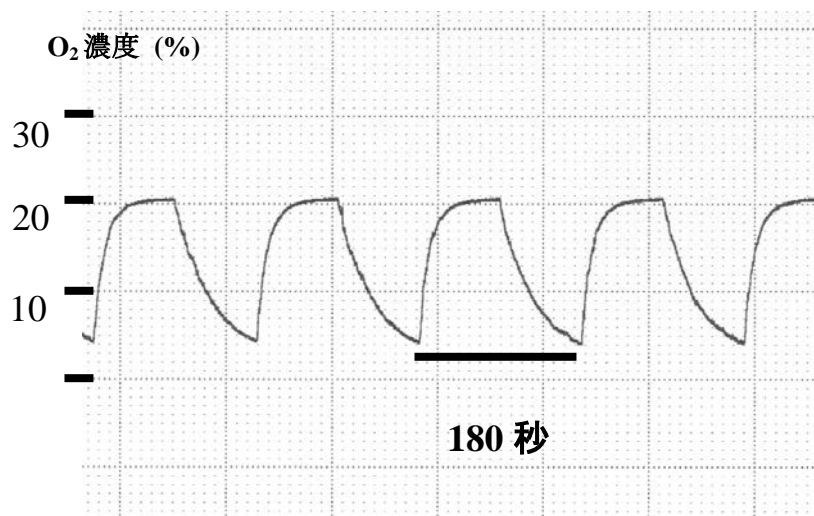


図5 IH 曝露中のチャンバー内 O₂ 濃度の変化

チャンバー内の O₂ 濃度は 1 サイクル 180 秒で、4% から 21% へ 90 秒ごとに繰り返すように調節した。

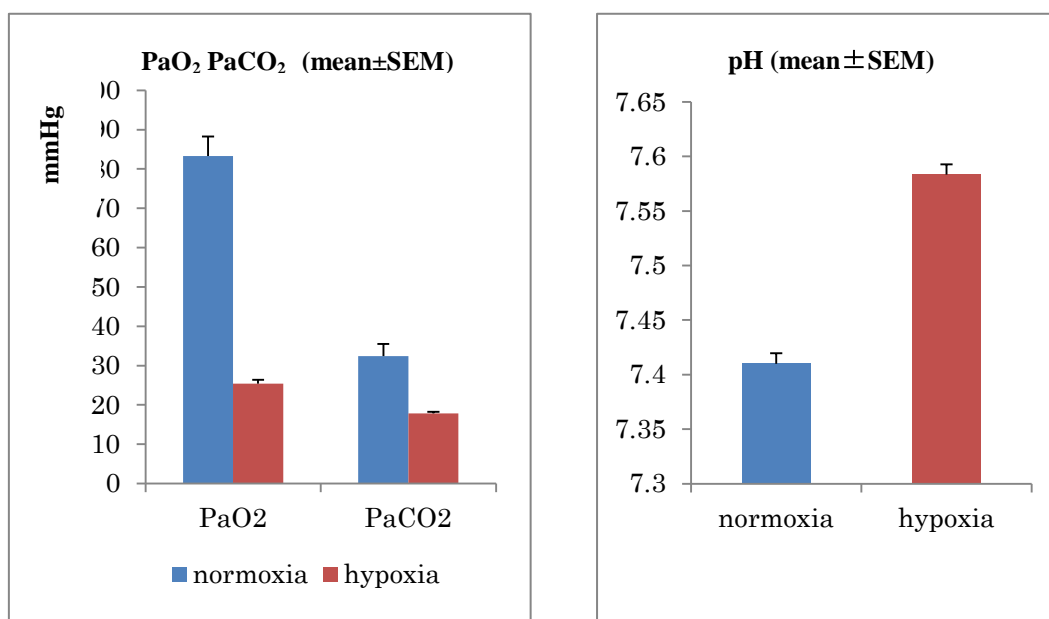


図6 IH曝露中のラット動脈血ガス分析結果

FiO₂が4%まで下がった状態ではPaO₂は25.43mmHgまで低下するが、FiO₂が21%に戻った状態では83.33mmHgまでに回復する。IH中は低酸素刺激になるためPaCO₂も低下し、pHは7.58と呼吸性アルカローシスを呈す(各n=3、mean±SEM)。

2. オートファジー阻害剤

IH で誘導されたオートファジー経路において阻害部位の異なる (図 2) 2 つの阻害剤、すなわちリソソーム酸化剤である chloroquine (CQ、20mg/kg/day、和光純薬工業株式会社、大阪) および Class III PI3kinase 阻害剤である。

3-methyladenine(3-MA、15mg/kg/day; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; USA) のいずれかを生食で溶解し、IH のかかっていない時間帯 (午後 9 時) に、イソフルランで麻酔し、IH 曝露前日より、実験終了日の前日まで毎日、腹腔内に投与した。

投与量については、既出の研究 [18, 21, 34-35] に基づいて検討した。

CQ についてはマウスへの投与量が 10mg/kg[21]および、60mg/kg[34]とばらっていた。投与方法はどちらも腹腔内投与であった。そこで SD ラットを用いて、C 群、CQ 群 (10mg/kg,20mg/kg,40mg/kg) と各群 2 匹ずつ、連日 3 週間投与し体重、心エコー、臓器重量 (心臓および肝臓) を検討した。CQ 40mg/kg 投与群は。他の群と比較し、体重減少があり、1 匹は 10 日目に死亡した。心エコーにおいて CQ 10mg/kg 投与群の 1 匹で左室駆出率において低下したものがあつたがその他、特記した変化はなかつた。CQ 20mg/kg の単独投与において薬剤の影響は見られなかつた。そこで C 群および CQ 20mg/kg 群をそれぞれ 5 匹とし同様に検証したところ、同様の結果が得られたので CQ の投与量を 20mg/kg と決定

した。この研究以降、齧歯類への CQ(20mg/kg)の腹腔内投与(SD ラット[36-38]、C57/BL6 マウス[39])を行っている論文が複数出ている。

3-MA については SD ラットへの投与量が 15mg/kg[35]とマウスへの投与量が 30mg/kg[34]のものがあつたが SD ラット例[35]を参考にし、15mg/kg と決定した。

以下では CQ 単独投与ラット群を CQ 群、3-MA 投与群を MA 群、IH 曝露に CQ を投与した群を IH+CQ 群、IH 曝露に 3-MA を投与した群を IH+MA 群と以下では表記する。

3. 心エコー解析

心エコー装置は Aloka prosound α10 (Hitachi-Aloka Medial Co. LTD, Japan)、probe は小動物用 (13MHz) を用いた。心エコーでは全てイソフルラン吸入麻酔下 (濃度 1.5%) で実施した。計測は左室 M モードおよびパルスドップラー法による左室流入波形を記録した。M モードの測定はすべてのモデルで心室中隔中部の乳頭筋の高さで行った。心拍数 (HR)、左室前壁厚の拡張期 (LVAWd) および収縮期 (LVAWs)、左室後壁厚の拡張期 (LVPWd) および収縮期 (LVPWs)、左室拡張末期径 (LVDd)、左室収縮末期径 (LVDs) を測定した。左室内径短縮率 (FS) = $(LVDd - LVDs) / LVDd \times 100$ で、計算し、左室収縮能の指標とした。

4. 心筋サンプリングとタンパク定量。

3週 of 最終エコー検査後、ラットはイソフルランの過麻酔後、安楽死させた。開胸し、心臓および血液は回収した。心臓は速やかに液体窒素で凍結した。0.1g に対し、1mL の抽出バッファー (320mM sucrose, 10mM Tris-HCl (pH7.4), 1mM Na₃VO₄) に Complete Protease Inhibitor Cocktail[®] (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を加えて氷上でポリトロン型ホモジェネータ (KINEMATICA AG, Lucerne, Switzerland) を用いてホモジェネートした。それぞれのサンプルを Coomassie Protein Assay Kit[®] (Pierce, Rockford, IL, USA) を用いた色素結合法によりタンパク定量を行った。各資料の濃度計算には、標準物質としてウシ血清アルブミンをスタンダードして、タンパク定量を行った。

5. Western blotting

Western blotting はサンプルに Laemmli のサンプルバッファー（添加後の最終濃度として 0.25 M Tris-HCl(pH 6.8)、5% sucrose、2% SDS、0.002% bromophenol blue、3% beta-mercaptoethanol) を添加した。泳動用のサンプルは 95°C で 5 分間加熱し、完全に可溶化した。アポトーシスの評価のためのポジティブコントロールとして、冠動脈結紮により作成された虚血 (30min) 後、再灌流 (6h) のラット心筋を使用した。タンパク量で 25 μ g に相当する量をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法により、ゲル内に注入し、泳動した後、PVDF 膜に転写した。

ゲル濃度は 15% (LC3B、Caspase-3、actin)、10% (AMPK、Akt、GAPDH)、5% (mTOR、N-cadherin) を用いた。一次抗体として、LC3B (#2775)、AMPK(#2532)、AMPK phospho-Thr172 (#2535)、Akt (#9272)、Akt phospho-Ser473 (#9271)、mTOR(#4517)、mTOR phospho-Ser2448 (#2971)、mTOR phospho-Ser2481(#2974) caspase-3 (#9665) (上記すべて Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、mTOR phospho-Thr2446、GAPDH(Abcam, Richmond, Canada)、actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、N-cadherin (BD Transduction Lab, Franklin Lakes, NJ) を用いた。二次抗体として、標識 anti-rabbit IgG、標識 anti-mouse IgG (Promega, Madison, WI, USA) を用いた (1:5000 希釈、室温 1 時間)。各タンパク質量は、増感化学発光法

(ECL)法で検出されたバンドを ImageQuantTM LAS4000 mini (GE healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England)を用いて検量した。

6. 電子顕微鏡

心組織は、右室、左室および中隔を速やかに 1mm^3 の立方体にスライスし、各部位 5 つ採取し、一昼夜、 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) 中の 2.5% グルタルアルデヒドで液浸固定した。その後、岐阜大学大学院医学研究科循環器内科教室に送って、試料作製と写真撮影を依頼した。標本をエタノールによって脱水し、エポキシ樹脂で包埋した。酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色した超薄切片 (90nm) を電子顕微鏡 (H-800; 日立、東京) で観察した。

7. 統計学的処理

各変数の測定結果は、すべて、平均値±平均誤差（mean±SEM）で示した。

統計解析は GraphPad Prism6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて行った。2 群間の検定には Student の t 検定を使用した。多群間の解析には ANOVA を用い、すべての対象との間の比較には Dunnett 検定あるいは Tukey-Kramer 検定を用いた。 $p<0.05$ を統計的有意差とした。すべての群の各項目において IH 曝露前には有意差はなかった。

IV. 結果

1. 血液学的検査、体重および心重量への影響

3週間、IH曝露したラットをコントロールラットと比較すると、全身の低酸素血症に起因する赤血球増多症を反映して、ヘモグロビン濃度 (hemoglobin concentrations: Hb)、ヘマトクリット値 (hematocrit values: Ht)、そして赤血球数 (red blood cell counts: RBC) の増加 (表 1) を示した。体重 (body weight: BW) は2週までは、各グループ間で差は示されなかったが、3週では、IH+CQ群はC群とCQ群と比較すると体重の増加が少なかった (図 7) (表 1)。食物摂取は2~3週の間で急速に減少し、心収縮期の障害の進行と同様であった。3-MA投与モデルの実験時 (表 2) (図 8) においては3週ではIH群のBWの体重の増加が少なかった。IH曝露によって初めのうちは体重の増加は少ないが2週以降、個体によって環境適応がある可能性がある。一方、心重量 (heart weight: HW) はBWと同時に減少したのでIH+CQ群のHW/BW比は、他の群と比較して有意な低下は示されなかった。CQ単独投与、あるいは、3-MA単独投与では、赤血球、Hb、体重、心重量に対する影響は明らかでなかった (表 2)。

表 1. IH 曝露 3 週目の C 群、CQ 群、IH 群、IH+CQ 群でのバイオメトリックパラメータ

	C (n = 7)	CQ (n = 7)	IH (n = 8)	IH+CQ (n = 5)
HW (g)	0.78 ± 0.033	0.73 ± 0.014	0.78 ± 0.026	0.70 ± 0.015
BW (g)	299 ± 10.1	283 ± 6.67	288 ± 6.69	253 ± 5.17 ^{**‡}
HW/BW (%)	2.60 ± 0.077	2.60 ± 0.031	2.74 ± 0.056	2.78 ± 0.052
RBC (×10 ⁴ /μL)	774.6 ± 34.9	767.0 ± 30.9	816 ± 48.0	833.7 ± 38.7 [‡]
Hb (g/dL)	14.7 ± 0.68	14.5 ± 0.65	15.6 ± 0.79 [†]	15.63 ± 0.57 [†]
Ht (%)	43.3 ± 1.84	42.9 ± 1.79	46.4 ± 2.79 ^{**††}	46.0 ± 1.27 [*]

HW, heart weight; BW, body weight; RBC, red blood cell count; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit. *P < 0.05 vs. C, **P < 0.01 vs. C, †P < 0.05 vs. CQ, ††P < 0.01 vs. CQ, ‡P < 0.05 vs. IH (Tukey-Kramer test). Values are presented as mean ± SEM (n, numbers of rats).

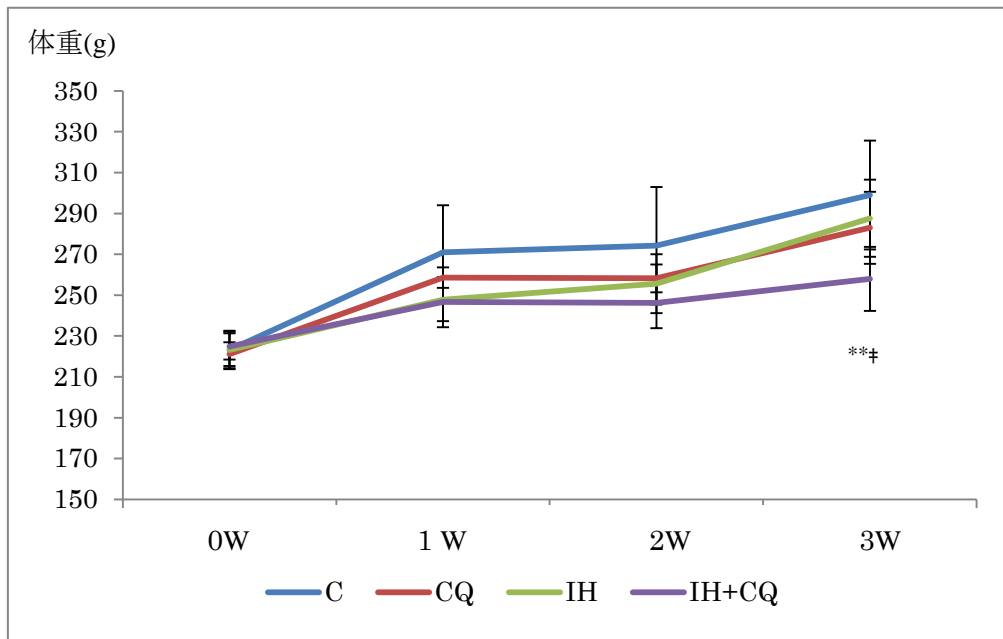


図7 各群の時間的体重の変化 (CQ)

体重は2週までは、各グループ間で差は示されなかったが、3週では、IH+CQ群はC群とIH群と比較して体重の増加が小さかった。Values are presented as mean \pm SEM **P < 0.01 vs. C、†P < 0.05 vs. IH (Tukey-Kramer test). (n;C=7,CQ=7,IH=8,IH+CQ=5).

表 2. IH 曝露 3 週目の C 群、 MA 群、 IH 群、 IH+MA 群でのバイオメトリック
パラメータ

	C	MA	IH	IH+MA
	(n = 4)	(n = 5)	(n = 6)	(n = 6)
HW (g)	0.69 ± 0.004	0.59 ± 0.015 ^{**}	0.61 ± 0.013 ^{**}	0.64 ± 0.013
BW (g)	268 ± 6.64	246 ± 4.78	235.7 ± 4.01 [*]	246 ± 5.16
HW/BW (%)	2.59 ± 0.061	2.40 ± 0.045	2.58 ± 0.039	2.59 ± 0.033
RBC (×10 ⁴ /μL)	774.8 ± 26.4	756.4 ± 27.9	845.2 ± 11.0 [§]	855.3 ± 19.9 [§]
Hb (g/dL)	14.9 ± 0.26	14.3 ± 0.5	16.2 ± 0.14 ^{*§§}	16.3 ± 0.26 ^{*§§}
Ht (%)	44.0 ± 0.91	42.3 ± 1.08	45.0 ± 0.39 [§]	46.9 ± 0.42 ^{*§§}

*P < 0.05 vs. C, **P < 0.01 vs. C, §P < 0.05 vs. MA, §§P < 0.01 vs. MA (Tukey-Kramer test). Values are presented as mean ± SEM (n, numbers of rats).

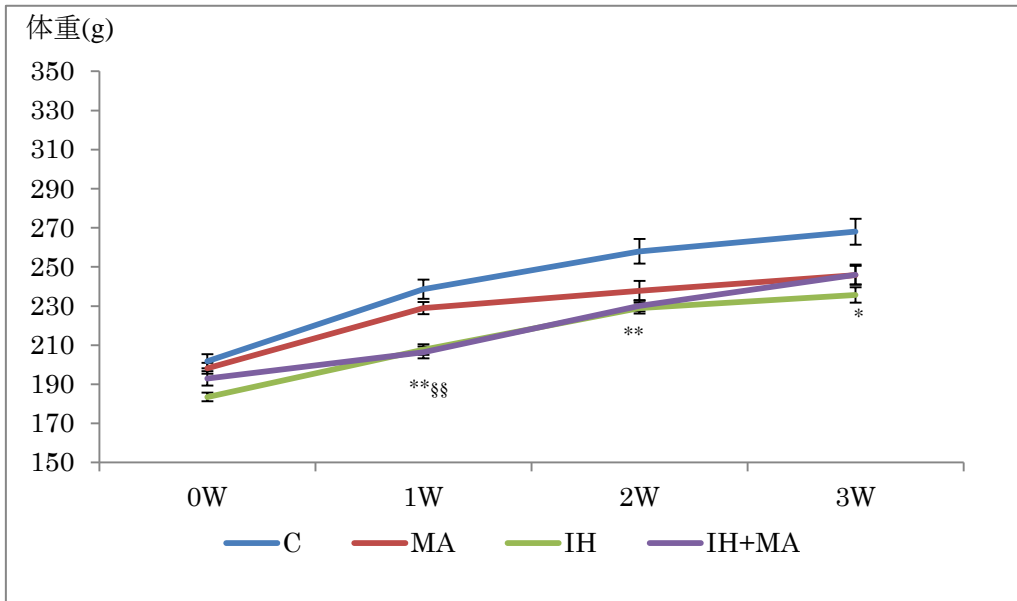


図8 各群の時間的体重の変化 (MA)

体重は2週までは、各グループ間で差は示されなかったが、3週では、IH群はC群と比較して体重の増加が小さかった。Values are presented as mean \pm SEM *P < 0.05 vs. C, **P < 0.01 vs. C, §§P < 0.01 vs. MA (Tukey-Kramer test). (n;C=4,CQ=5,IH=6,IH+MA=6).

2. IHによるオートファジーの誘導

オートファジーの過程において、ホスファチジルエタノールアミン結合によってオートファゴソーム膜のLC3-Iの取り入れに引き続いて、LC3-IIに変形し、オートファゴソーム膜に繋ぎ止められる [11, 21]。IH曝露後の経過に従って、LC3-IからLC3-IIへの変換が進んだことから、オートファゴソーム形成が進んだことが分かる (図9)。

LC3-II/LC3-IはIH+CQ群では増加したが、IH+MA群では低下した (図9)。

電子顕微鏡により定性評価すると、IH曝露3週間後、C群と比べて、オートファゴソームの増加が確認された (図10-A,B)。一方、IH曝露のリソソームは、対照群と比べて、均質で電子密度の高い細胞質内空胞でみたまされていた [17, 18] (図10-D,E)。IH曝露により、電子密度の低いミトコンドリアが観察され (図10-E,F,G,H)、CQ投与による空胞が出現し (図10-C,D,G,H)、IH曝露によって増強傾向がみられた (図10-C,D,G,H) が、これの意味するところは知ることができなかった。オートファジー阻害剤の効果を確認することはできなかった。また、定量的評価を試みたが、標本の数が少なく、評価できなかった。今後の課題である。

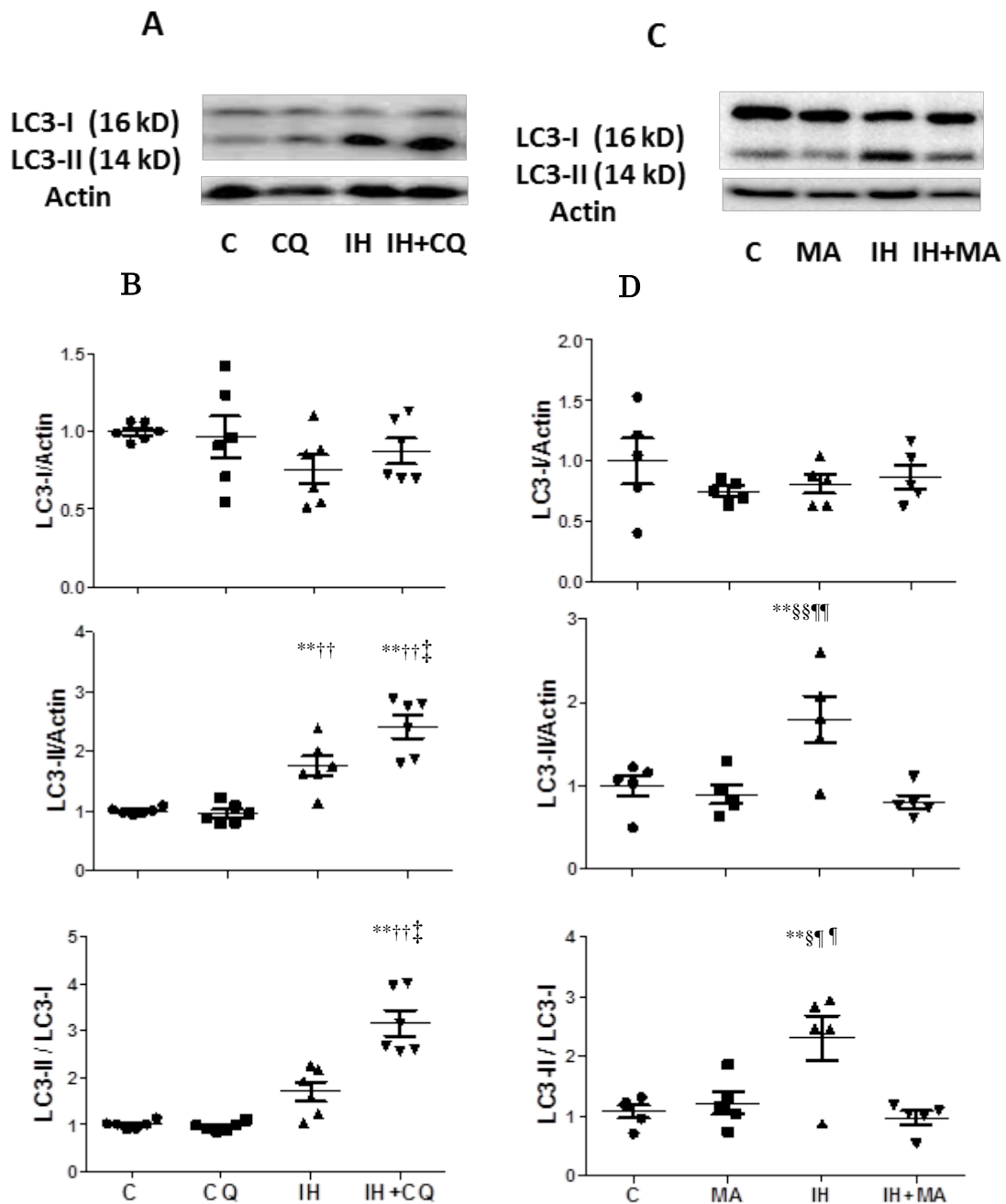


図9 IHおよびオートファジー阻害剤によるLC3の変化

IHは左室においてLC3-IIの量、およびLC3-II/LC3-Iを増加させる。オートファジー阻害剤であるCQの投与によってこれらはさらに増加するが、3-MAによって減少する。パネルA-Dはwestern blotsおよびその定量。

mean \pm SEM, 各群 n = 6(B), 5(D). * P < 0.05 vs. C, ** P < 0.01 vs. C, †† P < 0.01 vs. CQ, ‡ P < 0.05 vs. IH, ††† P < 0.01 vs. IH, § P < 0.05 vs. MA, §§ P < 0.01 vs. MA, ¶¶ P < 0.01 vs. IH+MA (Tukey-Kramer test).

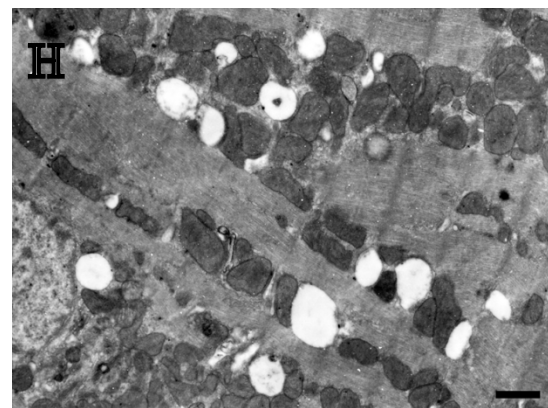
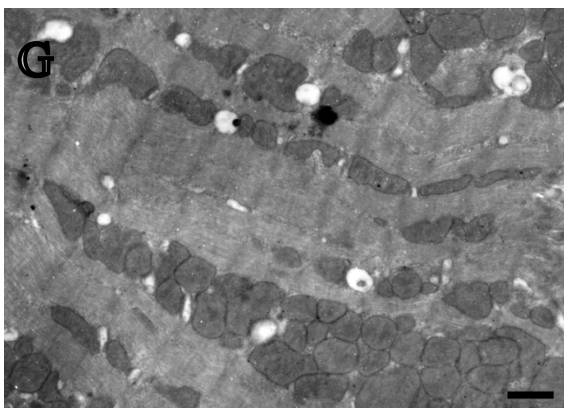
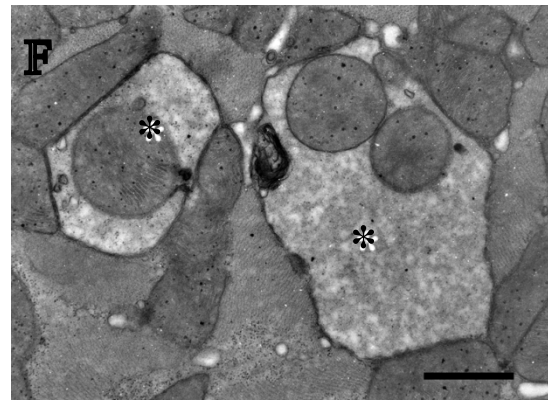
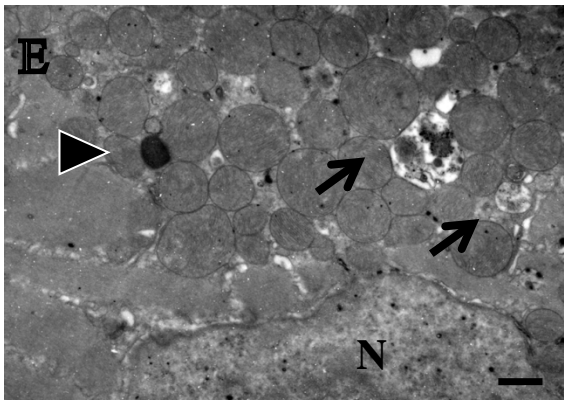
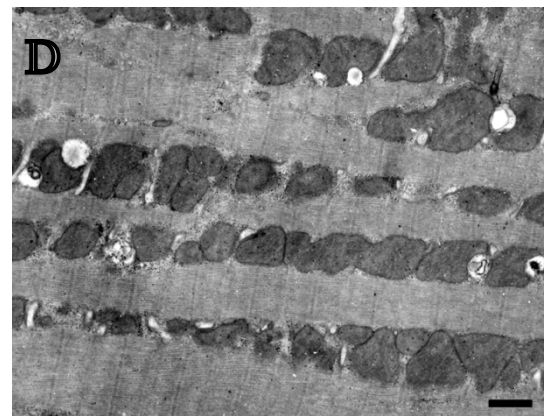
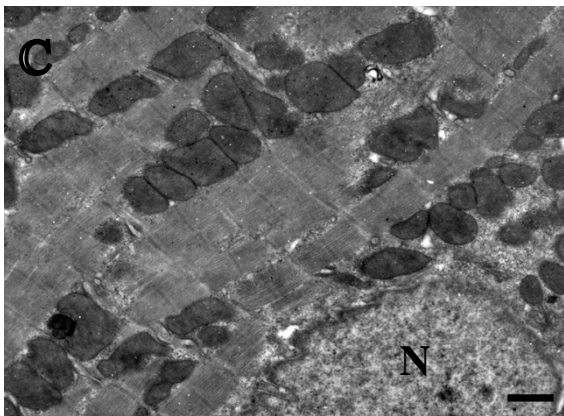
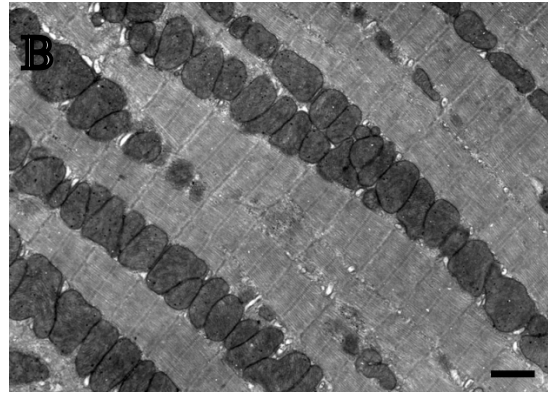
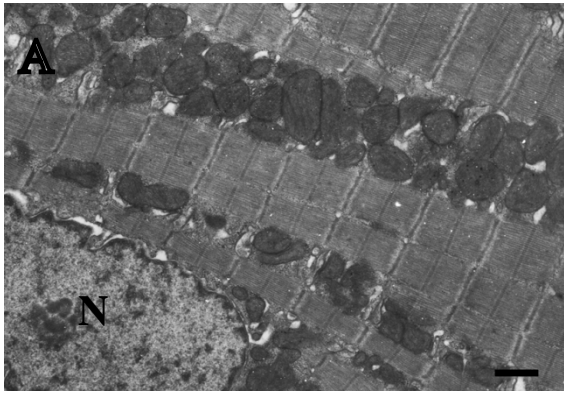


図 10 IH 曝露 3 週目のラットの心臓の電子顕微鏡写真

C 群 (A,B) と比較すると、IH 群ラット (E,F) の心筋は低い電子密度の低い、腫脹したミトコンドリア (アスタリスク) を含むオートファゴソームが増加しており (矢印) (E: 低倍率、F: 高倍率)、電子密度の高いリソソームも増加していた (矢頭) (D)。CQ 群 (C,D) では空胞が出現し、IH+CQ 群 (G,H) では電子密度の低い、ミトコンドリアとさらに奥の空胞が出現した。N は核を指す。Scale bar=1 μ m。

3. オートファジー経路の阻害による IH 曝露ラットの心収縮機能への影響

表 3 および 4 に、IH 曝露 3 週後の、CQ、3-MA、各々の心エコー指標に対する影響を示し、図 11 に、IH 曝露 3 週までの FS の経時的変化を示した。3 週の時点まで、C 群、CQ 群、MA 群および IH 群の各群には、FS、収縮期・拡張期の左心室前壁・後壁の壁厚、内腔直径、心拍数等に関して、変化は認めなかった（表 3 および表 4）。

しかし、IH+CQ 群、IH+MA 群のラットにおいては、3 週まで徐々に FS の低下が認められ（図 9-a,b）、3 週の時点で C 群、CQ 群、MA 群および IH の各群と比べて、有意に低下していた（表 3 および表 4）。さらに、IH 4 週まで観察すると IH+CQ の FS は、3 週（ $44.23 \pm 2.03\%$ ）と比較して、4 週（ $41.02 \pm 4.60\%$ ）でさらに低下していた。IH 曝露 3 週後、左心室収縮期内径（LVDs）が増加し、左心室収縮期前壁厚（LVAWs）が減少した（表 3 および表 4）。これらの所見は、左心室の収縮不全により、左心室内腔が拡張し、壁が薄くなっていることを示している。以上より、IH 曝露 4 週まで、IH により誘導されたオートファジーによって心収縮能の恒常性が保たれるが、オートファジーを阻害すると心収縮能が低下することが明らかになった。

表 3. IH 曝露 3 週目の C 群、CQ 群、IH 群、IH+CQ 群で心エコー分析結果

	C	CQ	IH	IH+CQ
	(n = 10)	(n = 10)	(n = 11)	(n = 9)
FS (%)	54.94 ± 1.28	55.85 ± 1.83	54.77 ± 2.82	44.23 ± 2.03 ^{** † † † †}
LVAWd (mm)	1.51 ± 0.068	1.51 ± 0.040	1.55 ± 0.073	1.39 ± 0.048
LVAWs (mm)	2.84 ± 0.10	2.76 ± 0.073	2.86 ± 0.15	2.29 ± 0.068 ^{** † † † †}
LVDd/BW (mm/100 g)	2.32 ± 0.074	2.38 ± 0.056	2.30 ± 0.060	2.48 ± 0.069
LVDs/BW (mm/100 g)	1.05 ± 0.061	1.05 ± 0.061	1.05 ± 0.082	1.38 ± 0.067 ^{* † †}
LVPWd (mm)	1.92 ± 0.35	1.78 ± 0.37	1.90 ± 0.27	1.80 ± 0.45
LVPWs (mm)	3.08 ± 0.32	3.05 ± 0.26	3.06 ± 0.51	2.61 ± 0.40
HR (bpm)	354.4 ± 39.3	350.0 ± 13.8	392.0 ± 34.8	362.8 ± 48.6

FS, fractional shortening; LVAWd, left ventricular (LV) anterior wall (AW) thickness in diastole; LVAWs, LVAW thickness in systole; LVDd, LV end-diastole dimension (LVDd); LVDs, LV end-systolic diameter; LVPWd, LV posterior wall (PW) thickness in diastole; LVPWs, LVPW thickness in systole; HR, heart rate. *P < 0.05 vs. C, **P < 0.01 vs. C, †P < 0.05 vs. CQ, ††P < 0.01 vs. CQ, †‡P < 0.05 vs. IH (Tukey-Kramer test). Values are presented as mean ± SEM (n, numbers of rats).

表 4. IH 曝露 3 週目の C 群、MA 群、IH 群、IH+MA 群での心エコー分析結果

	C	MA	IH	IH+MA
	(n = 4)	(n = 5)	(n = 6)	(n = 6)
FS (%)	59.32 ± 1.77	55.65 ± 1.32	53.92 ± 1.37	44.48 ± 1.33 ^{**§§‡‡}
LVAWd (mm)	1.46 ± 0.031	1.43 ± 0.029	1.43 ± 0.057	1.44 ± 0.071
LVAWs (mm)	2.82 ± 0.09	2.69 ± 0.064	2.73 ± 0.10	2.51 ± 0.13 ^{**§‡‡}
LVDd/BW (mm/100 g)	2.35 ± 0.091	2.49 ± 0.216	2.61 ± 0.091	2.63 ± 0.141
LVDs/BW (mm/100 g)	0.96 ± 0.053	1.11 ± 0.055	1.20 ± 0.053	1.47 ± 0.060 ^{**§§‡‡}
LVPWd (mm)	1.93 ± 0.13	1.74 ± 0.12	2.03 ± 0.11	1.78 ± 0.10
LVPWs (mm)	2.74 ± 0.14	2.79 ± 0.03	2.96 ± 0.11	2.44 ± 0.09 ^{‡‡}
HR (bpm)	366.8 ± 22.1	372.5 ± 13.0	357.2 ± 20.1	345.1 ± 12.1

*P < 0.05 vs. C, **P < 0.01 vs. C, §P < 0.05 vs. MA, §§P < 0.01 vs. MA, †P < 0.05 vs. IH,

‡‡P < 0.01 vs. IH (Tukey-Kramer test). Values are presented as mean ± SEM (n, numbers of rats).

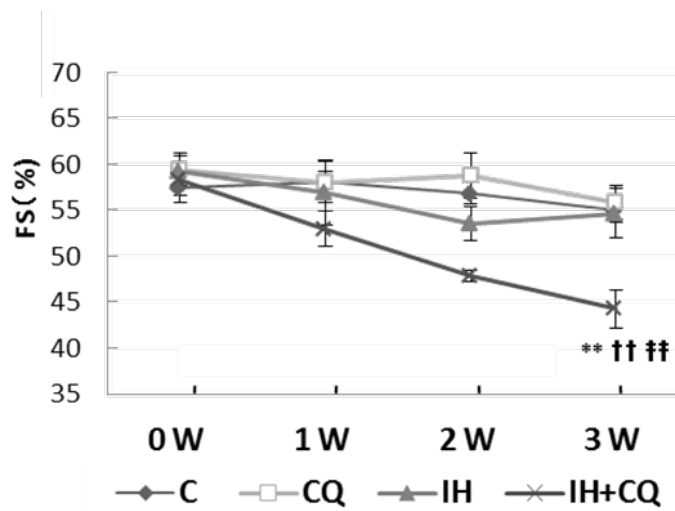
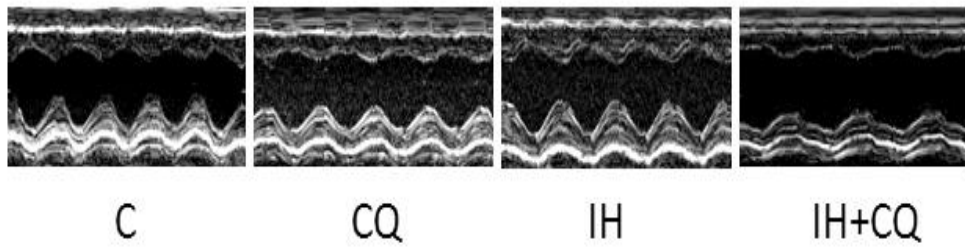


図 11-a IH 阻害剤 (CQ) による心エコー(FS)の評価

IH+CQ 群による FS の変移。明確に 3 週目において低下している。
 mean \pm SEM. ** $P < 0.01$ vs. C, †† $P < 0.01$ vs. CQ, †† $P < 0.01$ vs. IH
 (Tukey-Kramer test).

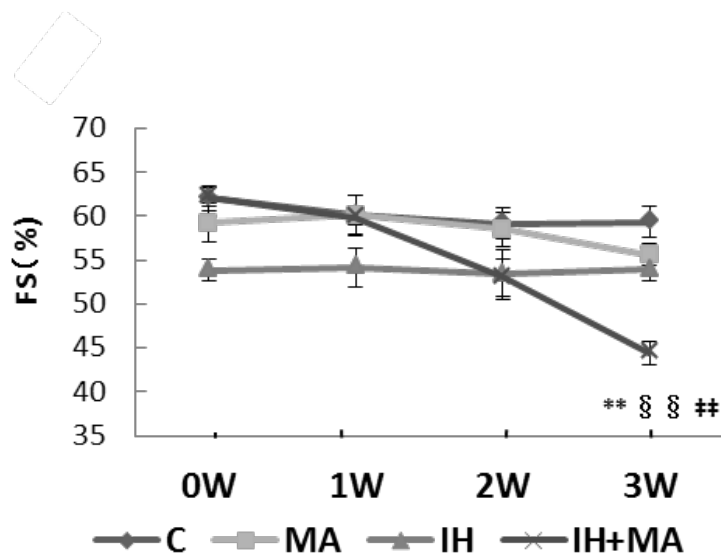
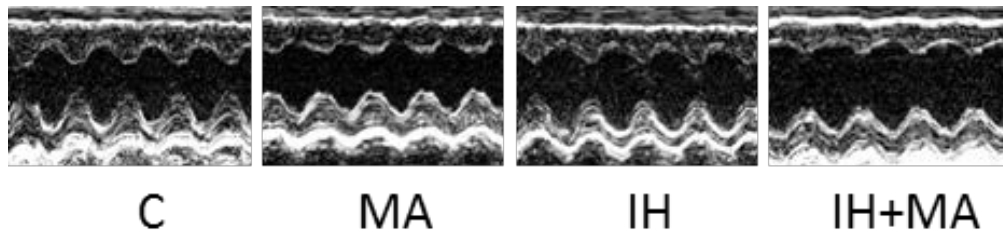


図 11-b オートファジー阻害剤 (3-MA) による心エコー(FS)の評価
 IH+3-MA 群による FS の変移。明確に 3 週目において低下している。
 mean \pm SEM. ** $P < 0.01$ vs. C, §§ $P < 0.01$ vs. 3-MA, # $P < 0.01$ vs. IH
 (Tukey-Kramer test).

4. 心筋障害と細胞死

収縮不全を示した心筋の形態変化を組織学的検査により調べた。エコーのデータ（表3および4）と一致して、IH群、IH+CQ群ともに、左心肥大、右心肥大、心筋線維化、左右心室拡張等を認めなかった（図12）。

次に、細胞死が心収縮不全を惹起した可能性について検討した。代表的な細胞死として、従来から、ネクローシスとアポトーシスが知られている。ネクローシスは、細胞膜破綻、アポトーシスは、核の濃縮や断片化を伴う。生化学的な指標として、ネクローシスは、心筋内のトロポニンT等の血中への逸脱や細胞内への色素取込み、アポトーシスは、細胞死実行プロテアーゼであるカスパーゼ3の限定分解や核TUNEL染色により評価できる。

血清トロポニンTはIH+CQ群において4週で増加しており、心筋のネクローシスが示唆された（図13A）。しかし、IH群、CQ群、MA群には、血中トロポニンT上昇を認めなかった。さらに、IH+CQ群において、血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）は増加したが、トロポニンTに比べ、増加程度は軽度であったことから（図13B）臓器の中でも、心臓のネクローシスが有意であると思われた。

変性蛋白や傷害小器官は、オートファジーにより処理されるが、処理が不十分な場合、アポトーシスが誘導され、細胞死によって処理されると考えられて

いる[13]。しかしながら、IH+CQ群において、カスパーゼ3の切断片を認めなかった(図13C)ことから、心筋収縮障害にアポトーシスは関与していないと考えられた。

IH曝露4週における各群の数は各々、C群 n=6、CQ群 n=5、IH群 n=4、IH+CQ群 n=13とした。IH+CQ群は心機能低下により死亡する可能性を考慮しこの群のみ数を多くしたが結果的に死亡例はなかった。トロポニンTは採血量が足りずにASTと比較しn数が少なくなっているものがあり、数のばらつきが生じてしまった。

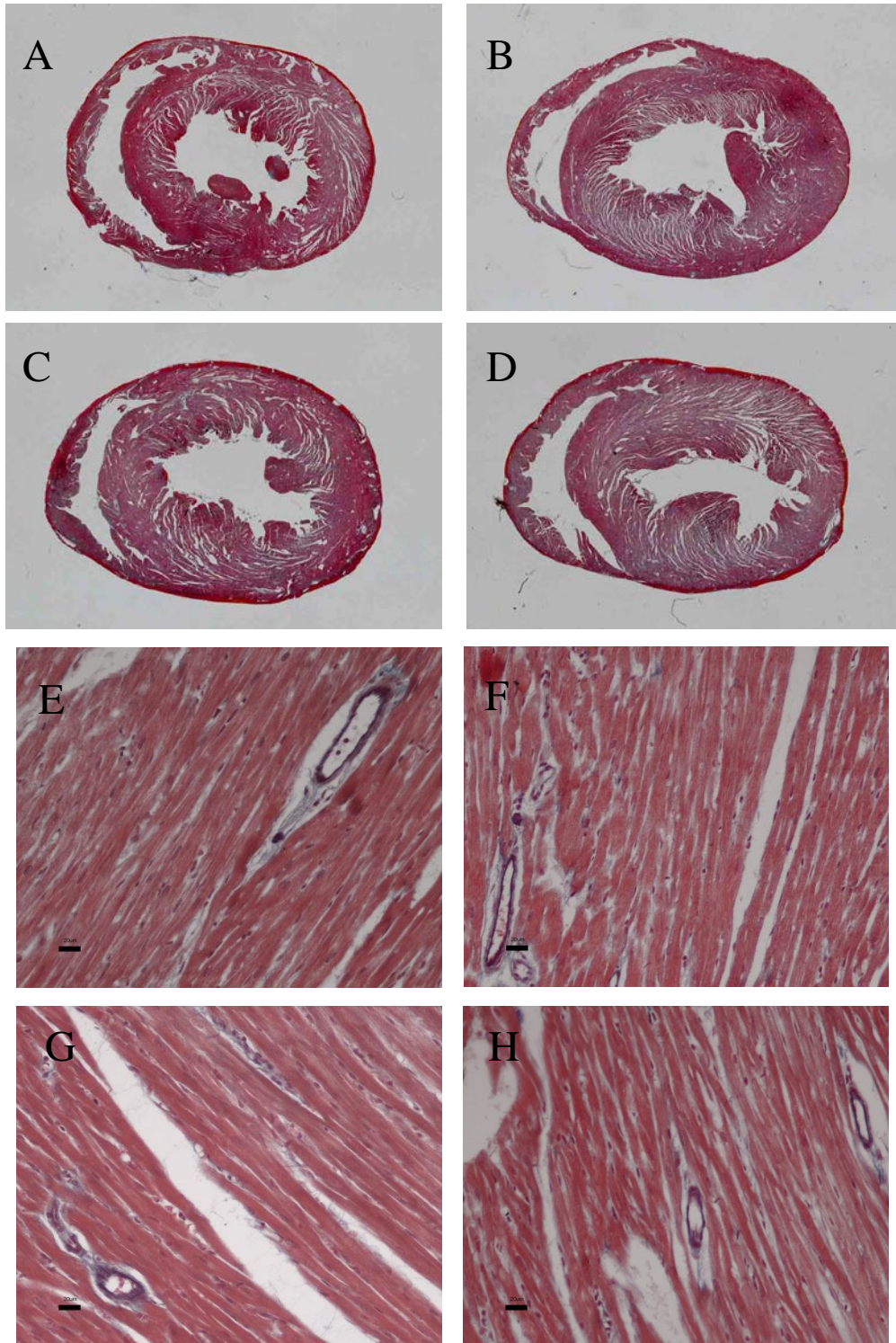


図 12 心臓組織学的検査

心臓の水平断 (A-D) および組織学的検査。C(A,E)、CQ(B,F)、IH(C,G)、IH+CQ(D,H)。(Elastica-Masson staining)。線維化及び肥厚はこれらの切断面では認められない。Scale bar=20 μ m.

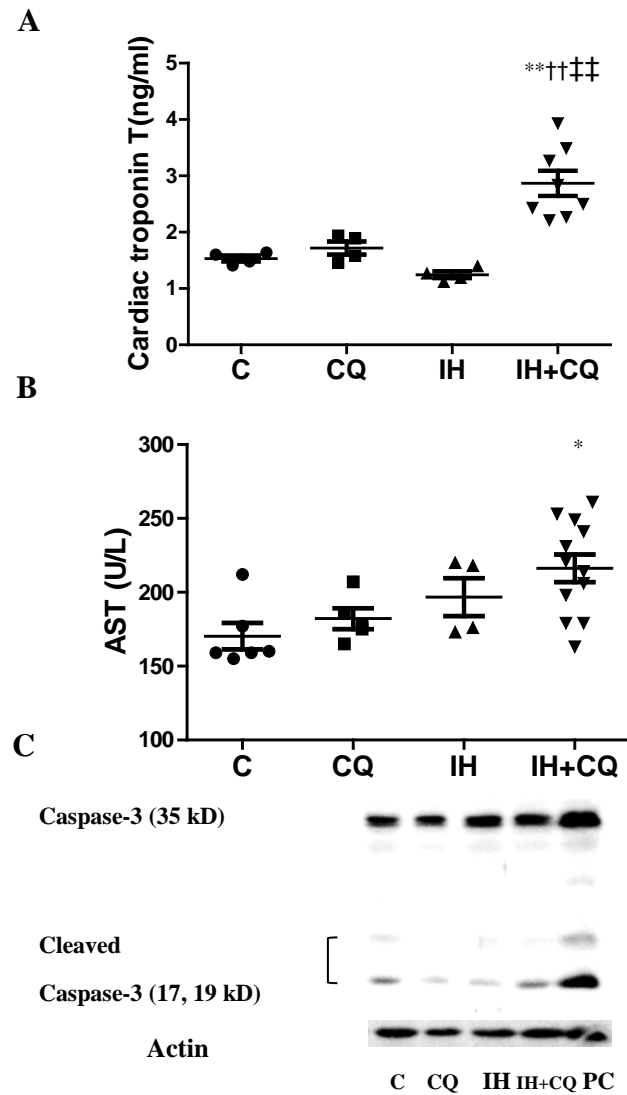


図 13 心筋障害と細胞死

IH 曝露 4 週での CQ の効果。血清トロポニン T (A) とアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) (B) は増加する。Caspase-3 の Western blots (C)。 mean ± SEM. * $P < 0.05$ vs. C, ** $P < 0.01$ vs. C, †† $P < 0.01$ vs. CQ. ‡‡ $P < 0.01$ vs. IH (Tukey-Kramer test).

5. オートファジー誘導のシグナリングパスウェイ

定常状態では、mTOR が、オートファジー開始を制御している。しかし、ストレスが負荷されると、AMPK 系の活性化、または、Akt 系の活性抑制により mTOR が不活化され、オートファジーが開始される [22, 23]。リン酸化特異抗体を用いた Western blotting により、AMPK、Akt、 mTOR の活性化を検討した。

3 週間の IH 曝露により、リン酸化 Akt-Serine 473 (p-Akt-Ser 473)/総 Akt 比が減少したことより、IH は、Akt の活性を低下させることが分かった (図 14)。これと一致して、IH 曝露後、Akt によりリン酸化される mTOR-Serine 2448、及び mTOR-Ser2481 のリン酸化が低下していた (図 14)。一方、IH は、AMPK-Threonine 172 リン酸化、及び、AMPK による mTOR-Threonine 2446 のリン酸化には影響を与えなかった (図 14)。したがって、IH においては、AMPK 活性化でなく、Akt 活性抑制によって、mTOR が活性化され、オートファジーが誘導されることが分かった。MA 群および CQ 群では、Akt、mTOR のリン酸化に影響を与えなかった。

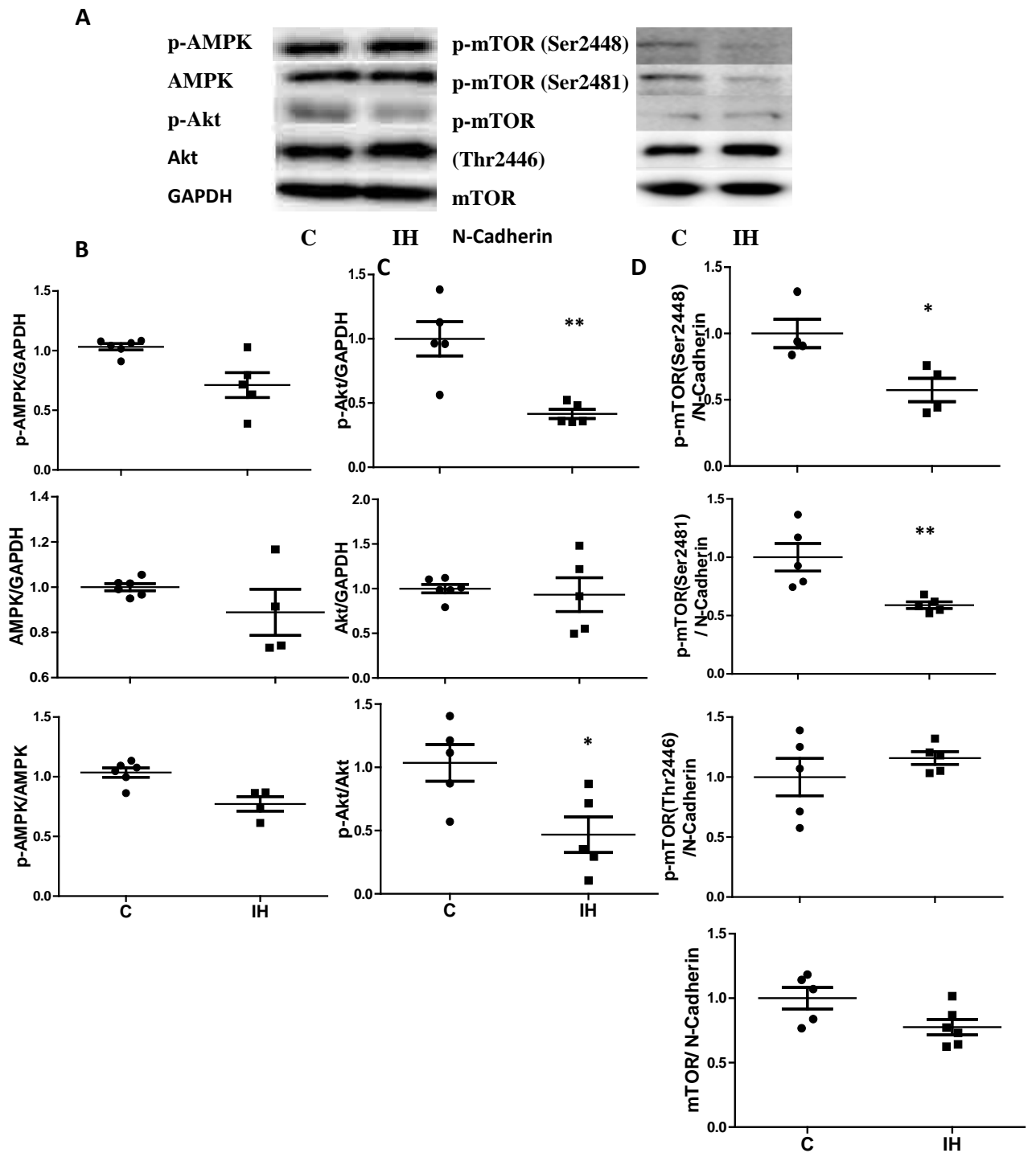


図 14 IH 曝露によるオートファジー関連の Western blots

IH 曝露 3 週のオートファジー関連キナーゼ。Western blots (a)。リン酸化タンパクおよび総タンパク定量 (B-D)。

mean \pm SE (each group n = 5–6). *P < 0.05 vs. C, **P < 0.01 vs. C (Tukey-Kramer test).

V. 考察

1. IH はオートファジーを誘導する

IH はオートファゴソーム形成マーカーである LC3-II 量および LC3-II/LC3-I 比の増加 (図 9) を認めた。オートファジーの経路を阻害する薬剤のうち、3-MA は、Class III PI3 kinase 活性阻害により、オートファゴソームの形成開始を抑え、CQ は bafilomycin A1 (H⁺-ATPase 阻害剤) と同様、オートファゴソームとリソソームの融合を阻害する (図 2) [11, 21]。IH 曝露による、LC3-II の増加を、3-MA が抑え、CQ が促した (図 9)。この知見は、IH がオートファジーの流れ (Flux) を促進することを示している。

同様に、電子顕微鏡検査で観察されたように、IH はオートファゴソームとリソソームの数を増加させた (図 10)。これらのデータは IH によってオートファジーが誘導されることを示唆する。そして、多くのオートファゴソームに、電子密度が低く、膨隆したミトコンドリアが含まれていたことから、傷害されたミトコンドリアがオートファジーにより処理されている (マイトファジー) が示唆された。

2 種のオートファジー阻害剤は、上記のように、LC3 動態を指標とした場合、予想どおりの効果を発揮した。しかし、各々、毒性や副作用に関する報告も少

なくないことから、予備実験において、毒性等について検討した。

CQ 及び 3-MA は、投与後、ラットの基礎心機能、心拍数等のエコー指標、血液学指標、体重、及び外見に変化を生じなかった（表 1 および 2）。文献上、CQ が、mTOR 阻害剤である bafilomycin A1 と比較して、動物に使用する場合、より安全で、安価で、適切であるという報告がある [21]。一方、3-MA の効果は、オートファジーのいくつかの段階において予想外の結果を生じるため、疑問が持たれた [40]。ラットのアドリアマイシン心筋症モデルで、3-MA (100mg/kg) を静脈内注射し、オートファジーの関与を調べたという報告がある [41]。これはオートファジー心筋細胞死がアドリアマイシンにより誘導されたラットにおける心不全の病因に重要な役割を果たしており、3-MA 投与により改善したという結果であった。しかし、本研究の予備試験において、用量を検討した結果、15mg/kg の 3-MA が、上記のように、IH 曝露ラット心筋オートファジーの流れに、予想どおりの結果を生じたことより、適切な使用量を得ることができた（図 2, 9, 11）。

2. オートファジー阻害は IH 心臓の心収縮機能障害を誘導する

3 から 4 週の IH 曝露では心エコーにおいて、心機能に変化は示されなかったが、オートファジー経路を阻害する薬剤である CQ および 3-MA を投与すると、IH では次第に FS が低下し LVDs を増加させ（表 3 よび表 4；図 11）、収縮機能障害が出現した。これらの知見はオートファジーの流れが IH によって増強され、収縮機能を維持する際に貢献していることを証明する。しかしながら、もし、オートファジー活性が、オートファジーの過程やシグナリングを害する薬物治療あるいは疾病の状態のために低い場合、IH は収縮機能障害やついには心不全を引き起こすことが示唆される。

機能的な見解から、IH+CQ あるいは IH+MA での心収縮機能障害は左室充満および心筋収縮を害された結果におこる場合があり、それは最近のげっ歯類の IH 心エコー検査の論評によると左室のリモデリングおよび心筋障害に関する [42]。IH+CQ 群においては、FS 低下にもかかわらず、左室拡張末期径 (LVDd)、心拍出量の減少を認めず、左心室の肥大、壁肥厚、線維化も認めなかった。（図 12、表 1 および 3）。したがって、左心室のリモデリングでなく、何らかの心筋障害が収縮不全の原因と考えられる。

3. オートファジーによるネクロシス抑制

電子顕微鏡によって、多くのオートファゴソームに、電子密度が低く、膨隆したミトコンドリアが含まれていたことから、傷害されたミトコンドリアがオートファジーにより処理されている（マイトファジー）が示唆された。傷害ミトコンドリアは、活性酸素種を生成し、エネルギー（ATP）産生を抑制するため、細胞機能の低下、傷害の増悪をもたらす[13-16]。一方、飢餓マウスの心機能障害は、オートファジー阻害剤（Bafilomycin A1）により増悪し、心筋 ATP 含量も減少する[18]。このように、IH や飢餓のストレスは、心筋の ATP 消費量を増し、ミトコンドリアに対する負荷から傷害も促進されると考えられる。このような状況で、オートファジーが活性化され、ミトコンドリアの品質管理、傷害ミトコンドリアの除去に貢献していると推定される。ただし、私達は、CQ の存否が、IH 曝露後の心筋オートファゴソームの数、中に含まれるミトコンドリアの数・質に、影響を与えるという証拠を得ることができなかった。本研究において、オートファジー阻害剤処理によって、IH 曝露ラット心筋に封入体やユビキチン化凝集体を認めることはできなかった。しかし、「適応反応」としてのオートファジーによる変性蛋白や傷害ミトコンドリアの処理によって、心不全の発症を抑制していると推定される。

加えて、4 週の IH+CQ 群ではトロポニン T 放出による心筋のネクロシスが

誘導された (図 13)。心筋細胞では以前の報告によると、グルコース除去が 3-MA またはレプチンによってオートファジーを阻害することでアポトーシスではなくネクローシスを誘導する [43]。心筋症ハムスターにおいて、オートファジーとネクローシスの密接な関係を示しており、自己貪食心筋細胞は、TUNEL 染色は陽性ではなく、リソソームのカテプシン B の浸透染色と局在を表した [44]。本研究では IH+CQ においてカスパーゼ 3 フラグメント (図 13)、および TUNEL 陽性のようなアポトーシスを立証する証拠は得られなかった。さらに、Su らは CO9 シグナルソームの遺伝子欠損、ユビキチン-プロテアソームの調節、または CQ 投与によってオートファジーが抑制するためオートファゴソームが蓄積することでマウスにおいて心筋壊死を誘発することを報告した [45]。本研究において、4 週の CQ 単独投与においてトロポニン T および収縮機能障害は起こらなかった (図 13)。しかしながら、オートファジーの抗ネクローシス効果は動物種の違いにかかわらず、本研究では同じであった。注目すべきは、ATP の消耗がアポトーシスより、ネクローシス支持し [13]、オートファジーがストレスにตอบสนองして、適応と生存のエネルギー供給をプロモートしている [11]。

これらの知見を合わせると、オートファジーが阻害されると、有害な物質を含むオートファゴソームの蓄積によって、IH は左室収縮機能障害とネクローシスを誘導すると推測した。実際、IH に曝露したラットで、異常なミトコンドリ

アを含む、豊富なオートファゴソームを観察し、活性酸素種の生成の増強と無益な ATP の消費を導いた [46] (図 10)。しかしながら、今回、IH および IH+CQ 群の間でミトコンドリアおよびオートファゴソームの明白な差を見つけることができなかつたのでさらなる分析が必要である。

4. 臨床的意義

Zhu らは、マウスの 3 週を超えた TAC において FS の低下が臨床的に重要だと論じている [20]。なぜなら、疫学的研究において、収縮機能の低下を表すことは、心不全の長期予後を予測できる [47]。本研究において、3 週の IH+CQ での FS は 12% (56% から 44% へ) 低下 (図 11) と明確で、正常ラットの短い IH 曝露期間で得られている。

疫学的に、SAS が心不全の危険因子かどうか論争の的になっている [1-4]。

2058 の Sleep Heart Health 研究関連によれば、睡眠時無呼吸症候群の重症度の指標となる 1 時間当たりの無呼吸および低呼吸の回数を表す AHI は左室拡張期径の増大、左室短縮率の低下に関連していた。しかしながら、うっ血性心不全の病歴は AHI 高い群 (>30) でさえも、SAS 患者のわずか 6.4% であった [2]。心不全患者の SAS の罹患率はいくらか高いように言われている [1, 3]。本研究で示唆されるように、心不全と SAS の併存は SAS の初期段階でオートファジーの増強がない場合はより高くなる。SAS の初期の過程においてオートファジーの増強が心不全の治療および予防の潜在的な新しい治療戦略であると考えられる。

5. IH でのオートファジーのシグナルパスウェイ

オートファジーの全般的なレセプターである mTOR は Thr2446 において AMPK によって間接的にリン酸化され、抑制され、Ser2448/2481 において Akt によって間接的にリン酸化され、活性化される [22-26]。本研究において、IH は Akt 側 (Ser2448/2481) において mTOR を脱リン酸化を誘導し、Akt-Ser473 の脱リン酸化と一致していることを確認した (図 14)。このように Akt-mTOR パスウェイが抑えられることで IH においてオートファジーが誘導されることを確認した。一方、虚血、低酸素、飢餓、栄養制限等による情報伝達に重要な役割を果たす AMPK のリン酸化 (活性化) に、IH の影響を認めなかった。Akt のベースレベルの活性維持がオートファジー開始を抑制しており、IH 等のストレスによる活性低下がオートファジー開始の引き金を引く現象のメカニズムと意義を、今後、検討する必要がある。

VI. 本研究の限界及び今後の課題

実際の SAS においては高炭酸ガス血症と低酸素血症を生じ、高炭酸ガス血症による呼吸性アシドーシスを生じる。本研究の場合は突然死に関与すると言われている低酸素血症を誘発する IH のみについて考察した。それによって過換気によるアルカローシスを生じている。しかし、この結果は IH 曝露の初期の段階で、IH 曝露を続けていた場合に、実際にアルカローシスになっているかどうかは検証していない。今後の課題となる。高炭酸ガス血症も重要な SAS の病因の因子であるが、本研究は SAS の突然死病因解明のために初段階として低酸素血症に着目し、IH がオートファジーを誘導し、心機能に影響することを検証した。今後は高炭酸ガス血症に関しても検証していく必要があると考えている。

本研究の結果は、IH 曝露の早期において、他に合併疾患がない場合、無呼吸発作による低酸素血症が、オートファジーを誘導することによって、心不全を防止していることを示している。したがって、他に交絡因子のない SAS 患者では、心不全は抑制されている可能性がある。SAS に合併することの多い、高血圧、糖尿病、高脂血症、冠動脈疾患、肥満等 [1-4] のモデル動物を IH 曝露することによって、心不全や肺高血圧等の病態が誘導される可能性がある。今後、このような病態モデル動物の IH 曝露後の病態解析を行いたい。

VII. 総括

正常なラットの心臓において、IHが、オートファジーをAktがmTORを不活化することによって誘導し、心収縮機能を維持と心筋壊死を防いでいる。そこでオートファジーの経路の阻害作用のある2つの作用部位の異なる薬剤を用いてオートファジー経路を阻害するとどちらの薬剤においても心収縮機能が低下した。このことよりオートファジーが心収縮機能の維持に関与していると考えることが可能である(図15)。本研究の結果はSASの初期段階におけるオートファジーの心保護の役割を示したとともにSASによる突然死のメカニズムのきっかけとなることが示唆される。先にも述べてあるが、突然死した人の中にはSASや心不全との関連が疑われ解剖になる事例があり、法医鑑定においては確かな診断根拠が必要となる。剖検例において、この現象が実際のSAS患者の心不全で生じているならば、心筋においてはオートファジーのfluxの破綻がおきていると仮定される。つまり、心不全でなければオートファジーは亢進しており、心臓突然死を否定できる可能性もある。これらの事象を、実際の事例で検証し、応用できる段階へと研究を進めていきたい。

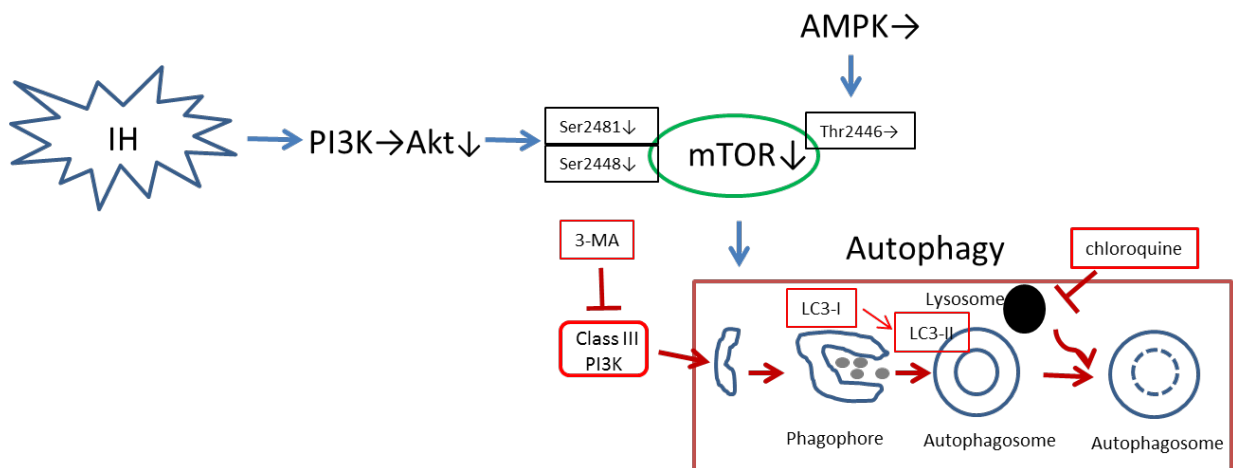


図 15 IH 曝露からオートファジー誘導までのまとめ

IH 曝露により Akt が不活化することで mTOR が不活化しオートファジーが誘導される。このとき AMPK は変化しない。オートファジーが誘導されている時は心収縮機能は低下しないが 3-MA や chloroquine を用いてオートファジー経路を阻害すると心収縮機能の低下が出現する。

VIII. 文献

- [1] W.T. McNicholas, M.R. Bonsignore, Management Committee of EU COST ACTION B26, Sleep apnea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities, *Eur. Respir. J.* 29 (2007) 156–178.
- [2] H.A. Chami, R.B. Devereux, J.S. Gottdiener, R. Mehra, M.J. Roman, E.J. Benjamin, D.J. Gottlieb, Left ventricular morphology and systolic function in sleep-disordered breathing: the Sleep Heart Health Study, *Circulation* 117 (2008) 2599–2607.
- [3] H.A. Chami, H.E. Resnick, S.F. Quan, D.J. Gottlieb, Association of incident cardiovascular disease with progression of sleep-disordered breathing, *Circulation* 123 (2011) 1280–1286.
- [4] J.J. Thomas, J. Ren, Obstructive sleep apnea and cardiovascular complications: perception versus knowledge, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 39 (2012) 995–1003.
- [5] 高田綾, 斎藤一之, 呂彩子, 村井達哉, 黒田直人, habitual snoringのみ
られた睡眠中の突然死例-閉塞性睡眠時無呼吸症候群との関連について-. 法
医学の実際と研究. 42(1999) 237-242.
- [6] T.V. Cloward, J.M. Walker, R.J. Farney, J.L. Anderson, Left ventricular

hypertrophy is a common echocardiographic abnormality in severe obstructive sleep apnea and reverses with nasal continuous positive airway pressure, *Chest* 124 (2003) 594–601.

[7] E.C. Fletcher, Invited review: physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure, *J. Appl. Physiol.* 90 (2001) 1600–1605.

[8] J. Naghshin, K.R. McGaffin, W.G. Witham, M.A. Mathier, L.C. Romano, S.H. Smith, A.M. Janczewski, J.A. Kirk, S.G. Shroff, C.P. O'Donnell, Chronic intermittent hypoxia increases left ventricular contractility in C57BL/6J mice, *J. Appl. Physiol.* 107 (2009) 787–793.

[9] T. Hayashi, T. Yoshioka, K. Hasegawa, M. Miyamura, T. Mori, A. Ukimura, Y. Matsumura, N. Ishizaka, Inhalation of hydrogen gas attenuates left ventricular remodeling induced by intermittent hypoxia in mice, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301 (2011) H1062–H1069.

[10] L. Chen, J. Zhang, X. Hu, K.D. Philipson, S.M. Scharf, The Na⁺/Ca²⁺ exchanger-1 mediates left ventricular dysfunction in mice with chronic intermittent hypoxia, *J. Appl. Physiol.* 109 (2010) 1675–1685.

[11] N. Mizushima, T. Yoshimori, B. Levine, Methods in mammalian autophagy research, *Cell* 140 (2010) 313–326.

[12] Anne Hamacher-Brady, Nathan R. Brady, and Roberta A. Gottlieb, Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes, *J. Bio. Chem.* 281(2006) 29776-29787

[13] K. Nishida, O. Yamaguchi, K. Otsu, Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease, *Circ. Res.* 103 (2008) 343–351.

[14] M. Komatsu, S. Waguri, M. Koike, Y.S. Sou, T. Ueno, T. Hara, N. Mizushima, J. Iwata, J. Ezaki, S. Murata, J. Hamazaki, Y. Nishito, S. Iemura, T. Natsume, T. Yanagawa, J. Uwayama, E. Warabi, H. Yoshida, T. Ishii, A. Kobayashi, M. Yamamoto, Z. Yue, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka, Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice, *Cell* 131 (2007) 1149–1163.

[15] A. Nakai, O. Yamaguchi, T. Takeda, Y. Higuchi, S. Hikoso, M. Taniike, S. Omiya, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress, *Nat. Med.* 13 (2007) 619–624.

[16] J.S. Pattison, H. Osinska, J. Robbins, Atg7 induces basal autophagy and rescues autophagic deficiency in CryABR120G cardiomyocytes, *Circ. Res.* 109 (2011) 151–160.

[17] H. Kanamori, G. Takemura, K. Goto, R. Maruyama, A. Tsujimoto, A. Ogino, T.

Takeyama, T. Kawaguchi, T. Watanabe, T. Fujiwara, H. Fujiwara, M. Seishima, S.

Minatoguchi, The role of autophagy emerging in postinfarction cardiac remodelling, *Cardiovasc. Res.* 91 (2011) 330–339.

[18] H. Kanamori, G. Takemura, R. Maruyama, K. Goto, A. Tsujimoto, A. Ogino, L. Li, I. Kawamura, T. Takeyama, T. Kawaguchi, K. Nagashima, T. Fujiwara, H. Fujiwara, M. Seishima, S. Minatoguchi, Functional significance and morphological characterization of starvation-induced autophagy in the adult heart, *Am. J. Pathol.* 174 (2009) 1705–1714.

[19] Z.V. Wang, B.A. Rothermel, J.A. Hill, Autophagy in hypertensive heart disease, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 8509–8514.

[20] H. Zhu, P. Tannous, J.L. Johnstone, Y. Kong, J.M. Shelton, J.A. Richardson, V. Le, B. Levine, B.A. Rothermel, J.A. Hill, Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 1782–1793.

[21] E. Iwai-Kanai, H. Yuan, C. Huang, M.R. Sayen, C.N. Perry-Garza, L. Kim, R.A. Gottlieb, A method to measure cardiac autophagic flux in vivo, *Autophagy* 4 (2008) 322–329.

[22] K. Inoki, J. Kim J, K.L. Guan, AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52 (2012) 381–400, (Review).

- [23] C.H. Jung, S.H. Ro, J. Cao, N.M. Otto, D.H. Kim, mTOR regulation of autophagy, *FEBS Lett.* 584 (2010) 1287–1295.
- [24] S.W. Cheng, L.G. Fryer, D. Carling, P.R. Shepherd, Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 15719–15722.
- [25] V.B. Pillai, N.R. Sundaresan, G. Kim, M. Gupta, S.B. Rajamohan, J.B. Pillai, S. Samant, P.V. Ravindra, A. Isbatan, M.P. Gupta, Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 3133–3144.
- [26] G.A. Soliman, H.A. Acosta-Jaquez, E.A. Dunlop, B. Ekim, N.E. Maj, A.R. Tee, D.C. Fingar, mTOR Ser-2481 autophosphorylation monitors mTORC-specific catalytic activity and clarifies rapamycin mechanism of action, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 7866–7879.
- [27] Eugene C. Fletcher, Joachim Lesske, Wei Qian, Charles C. Miller III, and Thomas Unger, Repetitive, Episodic Hypoxia Causes Diurnal Elevation of Blood Pressure in Rats, *Hypertention.* 19(1992) 555-61
- [28] Jessica B. Snow , Vanessa Kitzis , Charles E. Norton , Samantha N. Torres , Kimberly D. Johnson , Nancy L. Kanagy , Benjimen R. Walker , Thomas C. Resta.

Differential effects of chronic hypoxia and intermittent hypocapnic and eucapnic hypoxia on pulmonary vasoreactivity. *J. App. Physiol.* 104(2008) 110-118.

[29] Charles E. Norton , Nikki L. Jernigan , Nancy L. Kanagy , Benjimen R. Walker , Thomas C. Resta. Intermittent hypoxia augments pulmonary vascular smooth muscle reactivity to NO: regulation by reactive oxygen species. *J. App. Physiol.* 111(2011) 980-988.

[30] Maeda H, Nagai H, Takemura G, Shintani-Ishida K, Komatsu M, Ogura S, Aki T, Shirai M, Kuwahira I, Yoshida K, Intermittent-hypoxia induced autophagy attenuates contractile dysfunction and myocardial injury in rat heart, *Biochim Biophys Acta.* 1832(2013) 1159-1166.

[31] Kuma Y, Usumi-Fujita R, Hosomichi J, Oishi S, Maeda H, Nagai H, Shimizu Y, Kaneko S, Shitano C, Suzuki J, Yoshida K, Ono T, Impairment of nasal airway under intermittent hypoxia during growth period in rats, *Arch Oral Biol.* 59(2014) 1139-45

[32] Shirai M, Tsuchimochi H, Nagai H, Gray E, Pearson JT, Sonobe T, Yoshimoto M, Inagaki T, Fujii Y, Umetani K, Kuwahira I, Schwenke DO, Pulmonary vascular tone is dependent on the central modulation of sympathetic nerve activity following chronic intermittent hypoxia, *Basic Res Cardiol* 109(2014) 432.

[33] Nagai H, Kuwahira I, Schwenke DO, Tsuchimochi H, Nara A, Inagaki T, Ogura

S, Fujii Y, Umetani K, Shimosawa T, Yoshida K, Pearson JT, Uemura K, Shirai M, β 2-Adrenergic receptor-dependent attenuation of hypoxic pulmonary vasoconstriction prevents progression of pulmonary arterial hypertension in intermittent hypoxic rats, PLoS One 28;9(2014) e10693.

[34] Man Jiang, Kebin Liu, Jia Luo, Zheng Dong, Autophagy Is a Renoprotective Mechanism During in Vitro Hypoxia and in Vivo Ischemia-Reperfusion Injury, Am J Pathol.176(2010) 1181-1192.

[35] Liu TT, Hu CH, Tsai CD, Li CW, Lin YF, Wang JY, Heat stroke induces autophagy as a protection mechanism against neurodegeneration in the brain, Shock. 34(2010) 643-8.

[36] Lu Long, Xudong Yang, Mark Southwood, Junyu Lu, Stefan J. Marciniak, Benjamin J. Dunmore, Nicholas W. Morrell, Chloroquine Prevents Progression of Experimental Pulmonary Hypertension via Inhibition of Autophagy and Lysosomal Bone Morphogenetic Protein Type II Receptor Degradation, Circulation Research.112(2013) 1159-1170

[37] Kana Unuma, Toshihiko Aki, Takeshi Funakoshi, Ken-ichi Yoshida, Koichi Uemura, Cobalt protoporphyrin accelerates TFEB activation and lysosome reformation during LPS-induced septic insults in the rat heart. PLoS ONE, 15;8(2013) e56526

[38] Sintani-ishida K, Saka K, Yamaguchi K, Hayashida M, Nagai H, Takemura G, Yoshida K, MDMA induces cardiac contractile dysfunction through autophagy upregulation and lysosome destabilization in rats, *Biochim Biophys Acta.* 1842(2014) 691-700

[39] Maki Katamura, Eri Iwai-Kanai, Mikihiro Nakaoka, Yoshifumi Okawa, Makoto Ariyoshi, Yuichiro Mita, Akihiro Nakamura, Koji Ikeda, Takehiro Ogata, Tomomi Ueyama, Satoaki Matoba, Curcumin Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Inducing Autophagy via the Regulation of JNK Phosphorylation, *Clinical & Experimental Cardiology*, 5;9(2014) 1000337

[40] Y.T. Wu, H.L. Tan, G. Shui, C. Bauvy, Q. Huang, M.R. Wenk, C.N. Ong, P. Codogno, H.M. Shen, Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 10850–10861.

[41] L. Lu, W. Wu, J. Yan, X. Li, H. Yu, X. Yu, Adriamycin-induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in a rat model of heart failure, *Int. J. Cardiol.* 134 (2009) 82–90.

[42] R. Ram, D.M. Mickelsen, C. Theodoropoulos, B.C. Blaxall, New approaches in small animal echocardiography: imaging the sounds of silence, *Am. J. Physiol. Heart*

Circ. Physiol. 301 (2011) H1765–H1780.

[43] R. Maruyama, K. Goto, G. Takemura, K. Ono, K. Nagao, T. Horie, A. Tsujimoto, H. Kanamori, S. Miyata, H. Ushikoshi, K. Nagashima, S. Minatoguchi, T. Fujiwara, H. Fujiwara, Morphological and biochemical characterization of basal and starvation-induced autophagy in isolated adult rat cardiomyocytes, Am. J. Physiol.

Heart Circ. Physiol. 295 (2008) H1599–H1607.

[44] S. Miyata, G. Takemura, Y. Kawase, Y. Li, H. Okada, R. Maruyama, H. Ushikoshi, M. Esaki, H. Kanamori, L. Li, Y. Misao, A. Tezuka, T. Toyo-Oka, S. Minatoguchi, T. Fujiwara, H. Fujiwara, Autophagic cardiomyocyte death in cardiomyopathic hamsters and its prevention by granulocyte colony-stimulating factor, Am. J. Pathol. 168 (2006) 386–397.

[45] H. Su, F. Li, M.J. Ranek, N. Wei, X. Wang, COP9 signalosome regulates autophagosome maturation, Circulation 124 (2011) 2117–2128.

[46] R.A. Gottlieb, R.S. Carreira, Autophagy in health and disease. 5. Mitophagy as a way of life, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 299 (2010) C203–C210.

[47] T.J. Wang, J.C. Evans, E.J. Benjamin, D. Levy, E.C. LeRoy, R.S. Vasan, Natural history of asymptomatic left ventricular systolic dysfunction in the community, Circulation 108 (2003) 977–982.

IX. 謝辞

稿をおえるにあたり、本研究の機会を与えていただき、常にあたたかいご指導とご助言をいただいた本学医学部法医学講座、吉田謙一前教授（現 東京医科大学法医学教室 教授）、ご高閲を賜りました岩瀬博太郎教授に謹んで深く御礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、多大なご教唆とご配慮をいただいた岐阜大学循環器内科、竹村元三教授（現 朝日大学内科教授）、東京都医学総合研究所・タンパク質分解プロジェクト 小松雅明前プロジェクトリーダー（現 新潟大学 遺伝子制御講座教授）、国立循環器病研究センター・心臓生理機能部 白井幹康部長に対し深く御礼申し上げます。また、的確な力添えとご助言を賜りました永井恒志前助教（現 慶應義塾大学法医学教室 助教）、黒田亮平前助教（現 東大病理学教室 特任臨床医）、新谷香前講師（現 京都府立医科大学 准教授）、五十嵐敦子技術員、今信子技術員に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたって私を支えてくださったすべての方々に感謝申し上げます。