

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15578

研究課題名(和文) 遺伝子導入を用いずに移植片のシャペロン発現を体外で調節する方法の開発

研究課題名(英文) Regulation of chaperone expression outside the body

研究代表者

三野 和宏 (Mino, Kazuhiro)

北海道大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80750380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：心停止ドナー腎のタンパク発現量と活性を体外で制御し、冷保存再灌流障害を軽減する方法を探索した。尿細管上皮細胞いくつかの薬物を作用させると、3時間以内に14-3-3 の発現、Aktのリン酸化は増強した。この処置済の細胞、14-3-3 強発現細胞株をUW液中で低温酸素化保存すると、何れもATP量は時間と共に増加し、生存シグナル関連分子のリン酸化が維持された。各種阻害剤を用いた検討により、このATP増加は消失した。低温酸素化灌流の細胞条件では、酸化的リン酸化が主要な経路であり、そのエネルギー源は細胞自体のタンパク質、脂質がオートファジーによって分解されて供給されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Human renal tubular cell line (HK-2) or 14-3-3 overexpressed HK-2 (HK-2) were subjected to cold preservation in UW solution for 72 hours. Cellular death, ATP content, and MTT catabolism were evaluated. Despite possessing many potentially protective functions, 14-3-3 worsen the cellular injury under hypothermic oxygenated condition. 14-3-3 accelerates mitochondrial functions together with iron-dependent oxidative damage. The upregulation of 14-3-3 could be a method to maintain mitochondrial function under hypothermic oxygenated condition, shown in HMP of renal grafts, when appropriate antioxidant treatment is applied.

研究分野：移植外科

キーワード：移植・再生医療 外科 発現制御 臓器灌流

1. 研究開始当初の背景

単純冷保存は代謝抑制による臓器保護法だが、心停止腎グラフトには効果が不十分である。冷保存中に ATP 減少、ミトコンドリア機能障害、酸化ストレス、Ca²⁺ overload、臓器膨張、pH 低下が起こり、能動輸送の停止、apoptosis、炎症、autophagy が追隨する。近年、臨床腎移植において臓器灌流の有用性が報告されたが、心停止腎の修復に使用可能な臓器保存液、灌流液の Gold standard はない。

われわれは新規臓器保存液を開発し、ラット心臓や肝臓の冷保存許容時間を 24 時間以上延長し、ラット心臓の冷保存では、冷保存液の酸素化により好気代謝が亢進することを明らかにした。これらの知見は、低温酸素化灌流による臓器修復の奏功機序を支持する所見と考えられる。しかしながら、最も臨床応用が進んでいる腎臓でも、灌流による臓器修復のメカニズムや至適条件は詳細に検討されていない。

2. 研究の目的

心停止腎グラフトの冷保存再灌流障害を軽減する方策を確立するために、以下の項目を明らかにする。

- (1) 冷保存後の細胞に対する遺伝子導入、あるいは、転写活性制御によってタンパクの発現レベルの調整が可能であり、至適温度、限界温度が存在することを示す。
- (2) 14-3-3 の活性増強が腎尿細管上皮細胞の低温酸素化・復温 (冷保存再灌流) による機能障害を軽減するか？
- (3) 新規保存灌流液による腎臓の冷保存あるいは臓器灌流により、14-3-3 の活性増強、Akt 活性増強がおこるか？

3. 研究の方法

- (1) タンパク発現 (量) の制御 (*In vitro*) 遺伝子導入：

ヒト尿細管上皮細胞株 (HK-2) に pCMV-mCherry-14-3-3 プラスミドベクターを投与し、mCherry-14-3-3 融合タンパク発現を比較した。同様の検討を 17, 22, 27 でも行い、温度の影響を評価した。さらに、同様の検討を培養液の替りに UW 液、で検討し、17-37 における遺伝子導入、タンパク発現の実現可能性を検証した。

薬物によるコンディショニング：

HK2 を通常培養し、14-3-3 の発現を増強する可能性がある薬物 A を各種濃度で添加し、1, 3, 6, 12, 24 時間後に細胞を回収し、細胞質、核のタンパクを抽出した。同様の検討を硫化水素ナトリウム (NaHS) を添加した細胞でも行った。

評価項目

ウェスタンブロット：

細胞質 14-3-3、Akt 活性、核 Nrf2、Stat3、AP-1 と、それらに関連する生存、細胞死、炎症、エネルギー代謝、抗酸化に関わるタンパクの発現量、リン酸化の程度を評価した：Akt、PI3K、PDK1、PTEN、PP2A、mTOR、Bad、Bid、PFKFB2、p70S6k、IKK。

生細胞率・死細胞率：

細胞の破碎懸濁液ストックを用いて LDH 活性-細胞数の標準曲線を作成し、ストレス負荷、薬物投与後の細胞を所定の時間に洗浄後、-80 で凍結した。この試料抽出液中および上清の LDH 活性を測定して、細胞数、死細胞率、生細胞率を算出した。

ATP 量：Luciferin/Luciferase 化学発光法により、細胞内の ATP 量を測定し、細胞数当たりの ATP 量を評価した。

増殖能：MTT assay により、細胞増殖能を評価した。冷保存後の viability を評価する目的では、生細胞あたりの MTT 代謝能も評価した。

アポトーシス、ネクローシス比：

アネキシン V (AlexaFluor488[®]: 緑)、PI (赤)、Hoechst33248 (青) の蛍光 3 重染色により、それぞれアポトーシス、ネクローシス、生細胞を染色し、蛍光顕微鏡で各々の細胞数を計測し、総細胞数に占める各々の割合を算出した。

- (2) 14-3-3 は冷保存障害を軽減するか？

14-3-3 を安定強発現する HK2 (HK2) と元株 (HK2) を使用して、UW 液中に大気下 48-72 時間低温保存した。大気下では酸素が単純拡散溶解し、pO₂ は 80-110 mmHg 程度となる。低温酸素化灌流における pO₂ より低い、冷保存時の低酸素状態とは異なるものである。

低温酸素化下での ATP 産生の経路を明らかにするために、同じ系に GAPDH 阻害剤、電子伝達系複合体阻害剤、ミトコンドリア脱共役剤、オートファジー阻害剤 (E64d, Leupeptin, CPD18) 等を添加し、同様に評価した。

4. 研究成果

(1) タンパク発現 (量) の制御 (*In vitro*) 遺伝子導入：

ヒト尿細管上皮細胞株 (HK2) の正常培養では、mCherry-14-3-3 plasmid はリポフェクション 24 時間後にはタンパク発現が確認されたが、レンチウイルスを使用しても導入効率は向上しなかった。GFP 発現ベクターを用いた検討では、UW 液による冷保存、27 静置では導入効率が低減し、

17 ではほとんど導入されなかった。関連する micro RNA のリポフェクションにおいても同様の結果であった。

14-3-3 の発現を抑制する micro RNA-451 を対象として、同様の検討を行うと、micro RNA-451 agonist (mimics)、miRVana®miR-451 阻害物質も 37 以外では各々の効果が著明に低下し、低温灌流におけるリポフェクション試薬との併用は困難と考えられた。別の研究で検討した、リポフェクション法による肝臓への mRNA 導入でも同様の結果であり、核酸医薬の取り込みあるいはその後の処理が温度の感受性が高いことが再確認された。

薬物によるコンディショニング：

NaHS は投与後 1-3 時間で Nrf2 の核内移行を促進し、Akt のリン酸化、H0-1 の発現、TRX-1 の発現を増強させた。NaHS は Akt のリン酸化を促進することは既に他の細胞種でも確認していたので、Akt の下流の種々のタンパクがリン酸化されることは予想通りであった。

薬物 A は添加後 1 時間で 14-3-3 発現を増強し、3 時間では 10 倍以上に増加させた。24 時間の時点でも発現量増加は 3 倍以上であった。薬物 A と NaH の併用により、生存シグナル、増殖シグナルが増強された。薬物 A を冷保存の 1-3 時間前に投与することで、グラフト内の 14-3-3 の発現を増強できると考えられた。

薬物 A による 14-3-3 の発現増強は多くのタンパクのリン酸化維持に寄与するはずである。実際、リン酸化が維持されたタンパクの大部分が 14-3-3 結合ドメインを有するか、14-3-3 結合ドメインを有するキナーゼの下流に位置する分子であった。これらの結果から、NaHS と薬物 A は別の機序で Akt のリン酸化を増強すると考えられた。

(2) 14-3-3 は冷保存障害を軽減するか？

正常細胞 (HK2) の低温酸素化により ATP が減少し、ミトコンドリア膜電位が低下し、死細胞が増加した。HK2 では低温酸素化時間の延長と共に ATP 量が増加し、ミトコンドリア膜電位は高値を維持した。興味深いことに、UW 液には解糖、TCA 回路、

酸化の何れの基質も含まれていないにもかかわらず、HK2 では低温下で ATP が正常細胞よりも増加した。

14-3-3 による低温下での ATP 産生促進はオートファジーと酸化的リン酸化が関与していた。そのエネルギー源はタンパク質由来のアミノ酸、あるいは、脂質由来の遊離脂肪酸と推測され、TCA 回路を経て酸化的リン酸化を進めることが示唆された。

薬物 A の単剤あるいは NaHS との併用によってコンディショニングした細胞を UW 液中で冷保存すると、48-72 時間後の死細

胞数が減少し、ATP 量、ミトコンドリア膜電位が良好に維持される条件があった。しかし、併用時には細胞数当たりの ATP 量が増加する程、死細胞が寧ろ増加することが解った。同様の現象は 14-3-3 の安定強発現細胞株でも確認された。

ATP 増加に伴う死細胞増加は、ミトコンドリア由来の酸化ストレスが原因と考えられた。そこで抗酸化剤 (エダラボン、アスコルビン酸、Trolox) を添加すると、低温酸素化後の ATP 量はさらに増加し、細胞障害は軽減された。逆に、過酸化水素や tert-BuOOH の添加により、ATP 増加は消失した。これらの結果は、14-3-3 の強発現状態は酸化的リン酸化を促進し、随伴する酸化ストレスによって細胞死を誘導することを示していた。すなわち、臓器灌流によって生存シグナル増強、エネルギー状態改善が見込まれる一方で、抗酸化能との兼ね合いで、酸化的障害を増強する場合もあることを示唆していた。それ故、適切な抗酸化治療との併用により、より安全に臓器修復灌流が可能になると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 橋本咲月, 深井 愿, 梅本浩平, 木村 太一, 大谷晋太郎, 中藪拓哉, 早坂孝宏, 三野和宏, 惠淑萍, 千葉仁志, 嶋村剛, 武富紹信: 質量分析イメージング法 (IMS) 阻血再灌流における新規予後予測マーカーの探索. 第 29 回 代用臓器・再生医学研究会, かでる 2・7 (北海道札幌市), 2017.2.25
2. 深井 愿, 島田慎吾, 小林希, 梅本浩平, 大谷晋太郎, 中藪拓哉, 三野和宏, 山下健一郎, 嶋村剛, 武富紹信: 臓器灌流法の先にあるべき技術の開発. 第 43 回 日本臓器保存生物医学学会学術集会, 東京薬科大学 (東京都八王子市), 2016.11.26 (シンポジウム)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三野 和宏(MINO KAZUHIRO)
北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員
研究者番号：80750380

(2) 研究分担者

嶋村 剛(SHIMAMURA TSUYOSHI)
北海道大学・大学病院・准教授
研究者番号：00333617

深井 原(FUKAI MOTO)
北海道大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号：60374344

木村 太一(KIMURA TAICHI)
北海道大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号：90435959