

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861147

研究課題名(和文)体外でタンパクを発現させる画期的な心グラフト機能修飾法の開発

研究課題名(英文)Methodology of the protein expression in the cardiac graft outside the body

研究代表者

若山 顕治(Wakayama, Kenji)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：50646544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：心臓移植に利用できるドナー臓器を増やすためには、臓器修復法の開発が必要である。本研究では低温下で酸素を利用してエネルギーを作り出すことの功罪を分子生物学的に評価し、新しい概念を提示し得た。その大要は以下に要約される。1) 心筋細胞では低温下で積極的に酸化的リン酸化が促進され、2) そのエネルギー源はオートファジーによって供給される可能性が高い、3) 低温下での酸化的リン酸化は酸化ストレスを増強し、細胞障害がむしろ増強する、4) この酸化ストレスによる細胞死は抗酸化治療によって軽減できる、5) 低温下での酸化的リン酸化、オートファジーを積極的に制御するタンパクが存在する。

研究成果の概要(英文)：To enlarge donor pool for the heart transplantation, reliable method to repair the "less-than-ideal grafts". In the present study, we evaluated the merit and demerit of the oxidative phosphorylation under hypothermia. The results are summarized as follows. 1) Oxidative phosphorylation is progressed under hypothermic conditions. 2) The energy source of the ATP production under hypothermic oxygenated conditions is endogenous amino acids derived from the autophagic pathway. 3) This oxidative phosphorylation under hypothermia worsen the cellular death due to the oxidative stress. 4) Appropriate antioxidant therapy may reduced this cellular death. 5) Some proteins, probably chaperon, may actively regulate oxidative phosphorylation and autophagy under hypothermia.

研究分野：移植・再生医療

キーワード：移植・再生医療 虚血再灌流 臓器保存 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

心臓の冷保存許容時間は UW/Celsior 液でも 4-6 時間程度と短く、冷保存中から細胞質 Ca²⁺ overload、細胞骨格破綻、ミトコンドリア機能障害、浮腫が進行し、再灌流後に血球浸潤、グラフト壊死、アポトーシスが級数的に増悪する。この冷保存再灌流障害がグラフト機能、生存を規定する。心臓は直ちに機能しなければ生命維持が危ぶまれ、再生能力が乏しいなどの特殊性があり、他臓器よりも冷保存法改善の必要性が高いが、臨床上 UW/Celsior 液による単純冷保存を凌駕する方法論はない。(Talar 2008 J Heart Lung Transplant; Keck 1994 Clin Transplant; Jahania 1999 Ann Thorac Surg)。

われわれはこれまでに新規保存液 (新液) を自作し、ラット肝臓の冷保存再灌流やラット心臓の冷保存・移植モデルにおいて既存の UW 液を凌駕する臓器保護効果を得ることに成功した。また、ラット心臓を UW 液、自作の新規保存液 (新液)、新液 + 加圧酸素化 (1.5 atm) で 24 時間冷保存し、代謝物 (約 200 種類) の動態を正常心と比較した。UW 液では明らかに metabolic arrest を示したが、新液では解糖が亢進し、酸素化によってさらに TCA 回路、酸化リン酸化の経路が著明に亢進し、正常肝と近似した代謝物 profile を示した。新液は単純冷保存、酸素化冷保存何れにも有効であった。

上記の新液による酸素溶存下ラット心臓冷保存において、多くのタンパク質酸化が維持され、それらの構造を比較すると、大部分のタンパク質は 14-3-3 結合配列を有することを見出した。すなわち、新液による臓器保護効果は、14-3-3 によるタンパク質のリン酸化維持作用が深く関与することが示された。それ故、本課題では冷保存、あるいは、低温酸素化状態におけるリン酸化タンパク質の動態とエネルギー産生、酸化ストレスを中心に、新液による臓器保護のメカニズムを解析した。

2. 研究の目的

本研究は心移植における冷保存心グラフトを体外で修復し、再灌流後のグラフト障害軽減する方法論を確立するために行った。心グラフトを既存の臓器保存液および我々が開発した臓器修復液内で低温酸素化し、低温下でのエネルギー状態、細胞死、生存シグナルの推移を解明し、生存方向に導く至適条件を見出すことがゴールである。

3. 研究の方法

(1) 心筋細胞の冷保存障害の推移:

ラット心筋細胞株 (H9c2) を 10 cm dish (sub-confluent)、あるいは、96 well plate (1

x 10⁴ cells/well) に培養し、低温酸素化保存した。培地を UW 液、HTK 液、新規保存液 (新液)、および、新液に各種薬剤を添加した液 (4) に交換し、冷蔵庫内に静置することにより、低温・酸素溶存状態 (pO₂ 80-100 mmHg) とした。24-72 時間後に 37 °C の完全成長培地に置換し、1, 6, 12 時間, 1, 3 日目まで培養した。細胞を低酸素チャンバー内で冷蔵する群も作成した。

各タイムポイント、保存終了時、正常細胞における細胞死 (LDH 漏出)、viability (MTT assay)、ATP 量 (vs. ATP content in normal state) を検討した。

(2) 冷保存中のミトコンドリア機能:

新液による細胞保護効果とミトコンドリア機能の関係を解明するために、エネルギー状態とミトコンドリア、解糖、細胞環境の相互関係を解析した。

新液に 2-deoxy-glucose (2-DG; 解糖阻害剤)、Iodoacetic acid (IAA; GAPDH 阻害剤)、Rotenone, Antimycin, Sodium cyanide (ミトコンドリア複合体阻害剤)、A23187 (Ca²⁺ ionophore)、Monensin (Na⁺ ionophore)、Cyclopiazonic acid (Ca²⁺-ATPase 阻害剤)、Amiloride (Na⁺チャンネル阻害剤)、Ouabain (Na⁺-K⁺ ATPase 阻害剤) を添加し、同様に細胞を 24 時間冷蔵庫内に静置した。

(3) 冷保存中の酸化ストレス

冷保存中の酸化ストレスが冷保存中、復温後のミトコンドリア機能に与える影響を評価するため、UW 液による 48 時間冷保存 (冷蔵庫) を行った。24 時間冷保存では酸化ストレス源として過酸化水素 (H₂O₂; 0.1-0.5 mM)、また、われわれが発見した新規抗酸化物、あるいは、既存の抗酸化物を添加し、ATP 量、LDH 漏出、MTT assay により、効果を評価した。

(4) 冷保存における 14-3-3 の関与

レンチウイルスベクターを用いて、14-3-3 の安定高発現細胞株を作成し、上記と同様の群、タイムポイントを作成し、細胞質タンパク質を NP-40 バッファーで抽出した。常法の如く SDS-PAGE 用のサンプルを作成し、ウェスタンブロットを行った。

4. 研究成果

(1) 心筋細胞の冷保存障害の推移:

心筋細胞株を既存の UW 液、HTK 液に浸漬して冷蔵庫内に静置すると、48 時間以上では冷保存終了時に既に漏出 LDH 活性が高く、MTT assay, ATP assay は測定不能であり、生細胞ほとんど存在しなかった。

24 時間冷保存終了時の LDH 漏出は UW 液

群を 100%として比較すると、HTK 液群では 223%、新液群では 29%であり、新液群では冷保存による細胞死が有意に軽減された。保存終了時から 2 時間までの復温培養中に代謝された MTT 量は、新液群では 250%(vs. UW 液群)であった。復温後速やかにミトコンドリアの薬物代謝が機能することが示唆された。

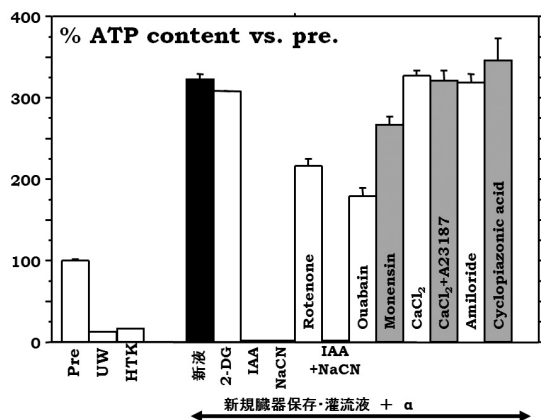
(2)冷保存中のミトコンドリア機能：

冷保存 24 時間後の ATP 量は UW 液群、HTK 液群では正常細胞の 15-19%に低下した。新液群では 327%と著明に増加し、正常細胞よりも高値を示した。

この ATP 増加のメカニズムを解明するために種々の薬剤を添加して、関係する経路を探索した。新液の ATP 量増加は 2-DG の影響を受けなかったが、GAPDH 阻害剤 (IAA)、ミトコンドリア複合体 の阻害では作用が完全に打ち消された。一方、Rotenone は軽度 ATP 量を減少させた。また、低酸素チャンパー内に低温保存すると、新液による ATP 増加作用は消失した。これらの結果から、新液による ATP 量増加は、解糖からの基質 (ピルビン酸) 供給や、基質レベルでの ATP 産生によるものではなく、酸化リン酸化の促進が作用点であり、ミトコンドリアへの NADH(2)の供給あるいは利用と深く関係することが示唆された。

正常細胞より ATP 量が多い理由として、低温による ATP 消費速度低下が関与する可能性がある。Na⁺-K⁺ ATPase は定常状態で ATP 消費の大部分を占めるが、低温下での活性、酸素の役割は不明である。本検討では、Monensin によって Na⁺を負荷しても ATP 量に影響しなかった。また Na⁺-K⁺ ATPase、Ca²⁺-ATPase を阻害しても ATP 量は増加しなかった。ミトコンドリアの酸化リン酸化やアポトーシスに関与する、ミトコンドリア膜電位は、冷保存終了時の膜電位は新液群では UW 液群の 527%の高値を示した。

新液による ATP 量増加は、ATP 消費の抑制ではなく、産生の促進が深く関与すること



が明らかになった。すなわち、冷保存中にミ

トコンドリアが機能できるように、物質の供給と場の整備が重要な機能と考えられた。酸素溶存、低酸素、何れの場合にも新液群では復温 (再培養) 後速やかに MTT 代謝活性が回復したことから、新液は冷保存中のミトコンドリア機能の維持が重要であることが示唆された。

(3)冷保存中の酸化ストレス

冷保存中の酸化ストレスが冷保存中、復温後のミトコンドリア機能に与える影響を評価した。UW 液群では 48 時間冷保存後に生細胞はほとんど存在せず、逸脱 LDH 活性は高値であり、ATP、MTT assay も ND であった。また、復温後 3, 5 日目にも生細胞はほとんど存在せず、ATP、MTT assay は ND であった。種々の抗酸化物を添加すると、冷保存障害保存終了時の逸脱 LDH 活性は有意に低下し、ATP 量、MTT assay では有意に高値を示した。3, 5 日目の ATP 量、MTT assay も有意に高値であった。

一方、24 時間冷保存時に抗酸化物を添加すると、保存終了時から再培養後 5 日までの ATP 量、MTT 値は無治療群よりも有意に高値であったが、GAPDH 阻害剤 (IAA)、オートファジー阻害剤を添加すると ATP の増加効果は消失した。また、過酸化水素の添加によっても効果は消失した。これらの結果から、新液による低温酸化状態における ATP 量増加効果は、オートファジーによるエネルギー基質の供給と酸化リン酸化の亢進によるものと推測された。

(4)冷保存における 14-3-3 の関与

14-3-3 が低温下でのエネルギー産生、生存シグナル、オートファジーシグナルに関与する可能性が示唆された。低温下で 14-3-3 を積極的に制御することができれば、低温酸化状態における心筋細胞の障害を軽減できる可能性が示唆された。

現在、体外で 14-3-3 の発現レベルと酸化リン酸化、オートファジーを統合的、合目的的に制御し得る薬剤治療をいくつか試行し、有望な結果を得ており、有望な知財 (シーズ) と考えている (結果記載しない)。

まとめ

低温下でのエネルギー産生は酸化ストレスを増強する。一方、酸化ストレスはこのエネルギー産生を阻害し、抗酸化物はエネルギー産生を促進する。内因性抗酸化物が少ない心筋細胞においては、非生理的温度下での冠選択的灌流や灌流保存のような、酸化リン酸化を促進する治療が求められている。

本研究の結果は、非生理的温度での体外灌流は、適切な抗酸化治療との併用により、さらに有効性が増す可能性があることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Shimada S, Fukai M, Wakayama K, Ishikawa T, Kobayashi N, Kimura T, Yamashita K, Kamiyama T, Shimamura T, Taketomi A, Todo S. Hydrogen sulfide augments survival signals in warm ischemia and reperfusion of the mouse liver. *Surg Today*. 2015, 45(7):892-903 査読有

2. 深井原, 島田慎吾, 若山顕治, 嶋村剛, 山下健一郎, 藤堂省, 武富紹信. 臓器保存液の現状と今後 ~ 単純冷保存は役割を終えたのか? *Organ Biology*. 2013, 20(2):176-180 査読無

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 深井原, 島田慎吾, 若山顕治, 石川隆壽, 山下健一郎, 嶋村剛, 武富紹信. 低温灌流時の酸化的リン酸化と細胞内シグナルの制御 ~ 尿細管上皮を用いた検討. 第42回日本臓器保存生物医学会学術集会, 岩手県民情報交流センター(盛岡市), 2015.11.13 (指定演者)

2. Fukai M, Ishikawa T, Wakayama K, Shimada S, Fujiyoshi M, Kimura T, Yamashita K, Shimamura T, Taketomi A. Time course of autophagy and oxidative phosphorylation during hypothermic oxygenated conditions and subsequent re-warming in human renal tubular cell line (HK2). 17th Congress of the European Society for Organ Transplantation (ESOT), Brussels (Belgium), 13-16 September 2015

3. Fukai M, Ishikawa T, Wakayama K, Shimada S, Kimura T, Yamashita K, Shimamura T, Taketomi A. Signal transduction during hypothermic oxygenated conditions in human renal tubular cells. 14th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST), Suntec City (Singapore), 23-26 August 2015

4. 石川隆壽, 深井原, 島田慎吾, 若山顕治, 後藤了一, 木村太一, 大澤郁朗, 山下健一郎, 嶋村剛, 武富紹信. 低温酸素化体外灌流における水素ガスの肝保護効果. 第115回日本外科学会定期学術集会, 名古屋国際会議場(名古屋市), 2015.4.17

5. 深井原, 石川隆壽, 島田慎吾, 若山顕治, 後藤了一, 山下健一郎, 嶋村剛, 武富紹信. 低温下でのエネルギー代謝と Apoptosis, Autophagy. 第41回日本臓器保存生物医学

会学術集会, 千里ライフサイエンスセンター(豊中市), 2014.11.28

6. 深井原, 石川隆壽, 島田慎吾, 若山顕治, 山下健一郎, 嶋村剛, 神山俊哉, 藤堂省, 武富紹信. より良い灌流保存のためのより良い単純冷保存法 ~ 重水と水素ガスの新たな可能性. 第114回日本外科学会定期学術集会, 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都市), 2014.4.3

7. 石川隆壽, 深井原, 島田慎吾, 若山顕治, 山下健一郎, 嶋村剛, 神山俊哉, 藤堂省, 武富紹信. ヘリウムガスによる肝冷保存再灌流障害軽減の試み. 第114回日本外科学会定期学術集会, 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都市), 2014.4.3

8. 深井原, 島田慎吾, 若山顕治, 石川隆壽, 山下健一郎, 嶋村剛, 武富紹信. より良い臓器灌流のための臓器保存法と再灌流時治療: 重水、水素の可能性. 第40回日本臓器保存生物医学会学術集会, 東京医科大学病院臨床講堂(東京都新宿区), 2013.11.9

9. Shimada S, Fukai M, Wakayama K, Yamashita K, Taniguchi M, Suzuki T, Shimamura T, Kamiyama T, Furukawa F, Todo S, Taketomi A. Heavy Water and Hydrogen Gas Ameliorates Cold Preservation and Reperfusion Injury in Rat Liver. Congress of European Society for Organ Transplantation 2013, Vienna (Austria), 8-13 September 2013

10. Shimada S, Fukai M, Wakayama K, Yamashita K, Taniguchi M, Suzuki T, Shimamura T, Kamiyama T, Furukawa F, Todo S, Taketomi A. Heavy Water and Hydrogen Gas Confer Protection Against Hepatic Cold Ischemia and Reperfusion Injury in Isolated Perfused Rat Liver. American Transplant Congress 2013, Seattle (USA), 18-22 May 2013

11. 深井原, 若山顕治, 山下健一郎, 廣方玄太郎, 谷口雅彦, 古川博之, 島田慎吾, 小倉正臣, 鈴木友己, 嶋村剛, 尾崎倫孝, 神山俊哉, 藤堂省. 低温下でエネルギー産生を賦活化させる新しい方法 ~ 有効性と普遍性. 第113回日本外科学会定期学術集会, 福岡国際会議場・福岡サンパレス・マリンメッセ福岡(福岡市), 2013.4.11

12. 島田慎吾, 深井原, 若山顕治, 山下健一郎, 鈴木友己, 嶋村剛, 尾崎倫孝, 神山俊哉, 藤堂省. ラット冷保存肝における再灌流時水素ガス投与の効果. 第113回日本外科学会定期学術集会, 福岡国際会議場・福岡サンパレス・マリンメッセ福岡(福岡市),

2013.4.11

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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

若山 顕治 (WAKAYAMA, Kenji)
北海道大学・北海道大学病院・医員
研究者番号：50646544

(2) 研究分担者：なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者：なし

()

研究者番号：