

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10500

研究課題名(和文)14-3-3とNrf2の制御による革新的な心停止腎グラフトの灌流修復法の開発

研究課題名(英文)Renal graft conditioning by simultaneous upregulation of 14-3-3 and Nrf2 during machine perfusion

研究代表者

深井 原 (Fukai, Moto)

北海道大学・医学研究院・特任講師

研究者番号：60374344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は臓器移植におけるドナー不足解消を目指して、臓器灌流法の開発、臓器の防御能を向上させるコンディショニング法の開発を行うものである。まず、臓器低温灌流を模倣した細胞実験を用いた実験を行い、薬物による14-3-3の発現増強とNrf2の活性化は3時間以内に達成できることを示した。コンディショニング済細胞を冷保存・復温・再酸素化すると、14-3-3結合タンパク質のリン酸化維持が細胞傷害軽減に關与することが明らかになった。14-3-3によるエネルギー産生賦活と広範な生存シグナル増強、Nrf2による抗酸化シグナルの増強は新たなコンディショニング法として有望なシーズと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

各種の薬剤性コンディショニングの有効性をヒト腎尿細管細胞株で検証した。14-3-3の発現増強は14-3-3結合ドメインを有する多くのリン酸化タンパク質のリン酸化を維持し、生存シグナル増強、細胞骨格アクチンの脱重合阻害、エネルギー産生系の賦活に寄与した。NaHSは生存シグナル(PI3K-Akt)の活性化、Nrf2の活性化を促進した。これらの併用がストレス下の細胞保護に寄与することを明らかにした。しかし、両薬物が水に溶けず、脂溶性溶媒に起因する毒性のために臓器レベルでは有効性を示せなかった。今後、drug deliveryの検討が必須と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study are to establish a method to strengthen the protective ability of renal grafts by pharmacological interventions during machine perfusion, and to resolve the donor shortage in renal transplantation. In vitro study mimicking machine perfusion of the renal graft, using human renal tubular cell line, revealed that pharmacological conditioning successfully upregulated 14-3-3 zeta protein level and nuclear translocation of Nrf2 within 3 hours. Further, these conditioning reduced cellular injury at least in in vitro. Although these drugs seemed to be promising, in organ and in animal levels, it could not be reconfirmed due to its water-insolubility and solvent (DMSO) toxicity. After resolving the drug solubility and delivery issues, it would become a promising candidate to condition the renal graft outside the body.

研究分野：臓器移植、臓器保存、臓器灌流、酸化ストレス

キーワード：臓器保存 臓器灌流 腎移植 コンディショニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ドナー不足解消策として心停止ドナーの利用が挙げられるが、移植成績は芳しくない。機械灌流 (MP) による臓器修復が試みられ、臨床腎移植 (Moers 2012 *N Engl J Med*)、肝移植 (Guarrera 2010 *Am J Transpl*) で有効性が示され、温度、灌流液、併用治療が各国で検討されているが Gold standard は存在しない。

温度によらず体外灌流時の障害の要因は、1) 冷保存 (CS) 中の障害、2) 灌流中の臓器膨張、3) Ca^{2+} overload、4) 酸化ストレス、5) 血管抵抗増大であり、これらが移植後 (再灌流) の障害の原因となる。それ故、灌流液は pH、浸透圧、粘性、緩衝能等の物性を基礎として、1)-5) を同時に抑制し、冷保存、灌流両方に使用でき、灌流温度を問わない組成と、さらにグラフト防御能の増強法 (併用治療) の開発が望まれる。

14-3-3ζ は 14-3-3-結合配列を有する 200 種以上のタンパク質に結合して、リン酸化部位を覆ってリン酸化を維持させるシャペロンである (Rubio 2004 *Biochem J*)。われわれは先行研究で、**14-3-3ζ** を高発現させれば保護効果が得られるとの仮説のもと、ヒト尿管上皮細胞株 (HK2) に 14-3-3ζ を高発現させ評価した。14-3-3ζ 高発現株では通常培養時に増殖、生存シグナルが増強し、ATP 量が増加した。UW 液で低温酸素化すると HK2 では ATP は減少したが、14-3-3ζ 高発現株では減少しなかった。しかし、死細胞は寧ろ多かった (* vs. HK2)。14-3-3ζ 高発現による細胞死はデフェロキサミン (DFX) で抑制された。14-3-3ζ は酸化的リン酸化を促進し、随伴する酸化ストレス (細胞死) を促進したが、抗酸化治療によって回避できた。14-3-3ζ の発現増強と抗酸化治療の併用は、低温灌流時の臓器修復に有用な手段になると考えられた (Fukai et al. 2016 *Transplant Proc*)。

臓器灌流のスタンダードを目指した先鞭争いが各臓器で進み、その後の臓器コンディショニング法の開発が求められている。しかし、世界の趨勢は動物実験や細胞実験による精密な evidence が軽視される風潮が否めない。欧米の動物実験規制の強化と Proof of Concept study の競争の激化に起因するものだが、evidence に基づく地道な開発研究が必須である。

2. 研究の目的

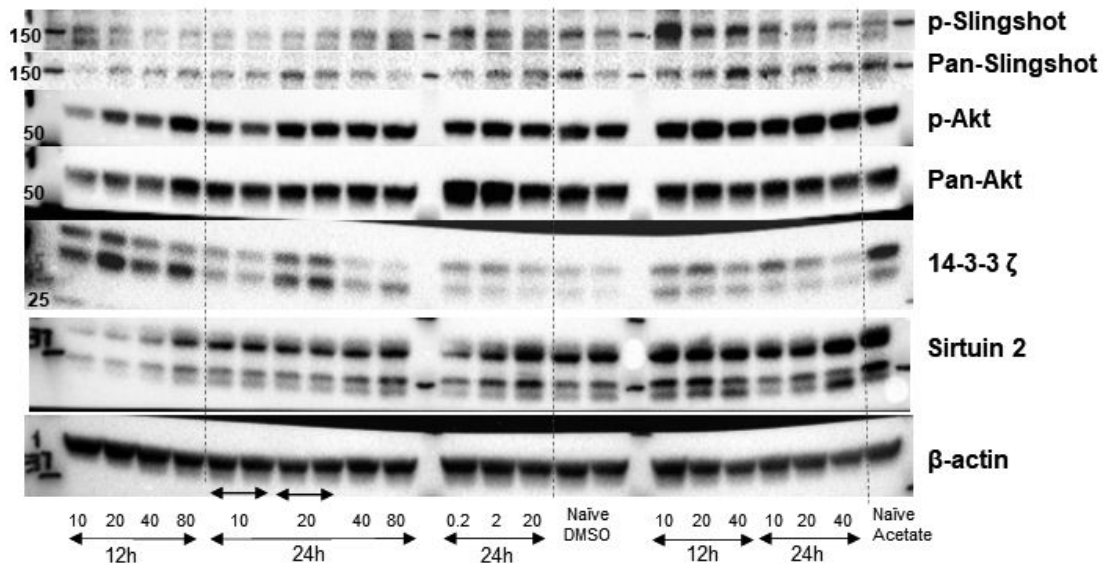
- 1) in vitro で 14-3-3ζ 発現・Nrf2 活性化の同時誘導法を確立し、正常ラットにおいて同処置の効果を検証する。
- 2) ラット腎温虚血再灌流における同処置の効果を検討する。
- 3) 心停止ドナー腎に対して、1) 灌流の至適温度、灌流時間を決定する、2) 14-3-3ζ 発現、Nrf2 活性化の至適条件を確立し、有効性を証明する、3) 修復機構を明らかにする

3. 研究の方法

- 1) 薬物による 14-3-3ζ の発現調節：
ヒト尿管細胞株 (HK-2) を用いて、14-3-3ζ の発現誘導が予想される各種の薬剤のコンディショニング効果をスクリーニングした。薬剤を添加後、12、24 時間後のタンパク質発現を評価した。
- 2) 併用効果：
保護性の急性期タンパク質の発現誘導作用が知られている NaHS との併用効果を検証した。NaHS (N; 400 μM)、14-3-3ζ の発現誘導物質 A、両者併用 (B) を比較した。
- 3) 保護性タンパク質のリン酸化状態の制御：
- 4) 種々の細胞内シグナルへの影響：
ミトコンドリア傷害、小胞体ストレス、酸化ストレス、 Ca^{2+} 依存性タンパク質、オートファジー、Necroptosis 等に関わる多くのタンパク質に対する 14-3-3ζ の影響を解析した。
- 5) 臓器、個体レベルでの検証
 - a) 単離腎灌流、
 - b) 薬剤投与

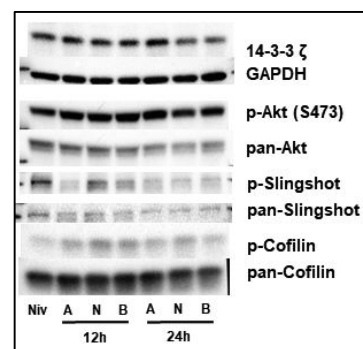
4. 研究成果

- 1) 薬物による 14-3-3ζ の発現調節：薬物により 14-3-3ζ の発現を増強することに成功した。曝露後 3、6 時間で各々 10.3 倍、7.7 倍に既に増加しており (data not shown)、A は 14-3-3ζ の発現誘導コンディショニングに利用できると考えられた。



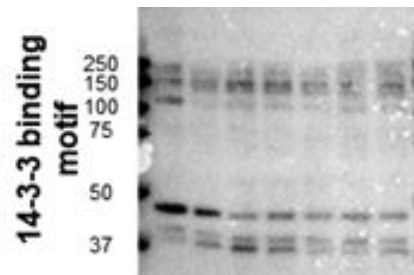
2) 併用効果：

A の効果は NaHS との併用によって変化せず、NaHS は Akt のリン酸化を促進した。また、NaHS は HO-1 の発現を増強した (data not shown)。A と NaHS は各々の細胞保護メカニズムを別々に発揮し、夫々の薬剤によって緩衝されることはなかった。これらの結果から、両薬剤の添加 (B) は抗ストレスコンディショニングとして有用と考えられた。



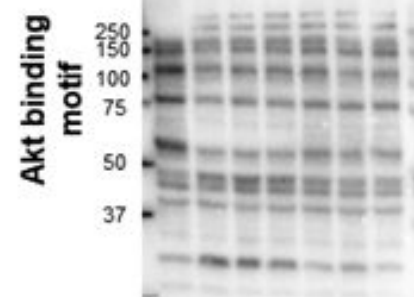
3) 保護性タンパク質のリン酸化状態の制御：

R-X-X-S* を認識する 3 種類の抗体を用いて、14-3-3 binding motif [(K/R)-X-X-S*-P], Akt binding motif [(K/R)-X-X-(S*/T*)], AMPK binding motif [(L/M)-X-R-X-X-(S*/T*)] or R-X-X-(S*/T*) で示される、セリン(S)、スレオニン(T)のリン酸化を評価した。A, NaHS 共に Akt の下流シグナルのリン酸化を増強していた。これらの傾向は肝細胞株、心筋細胞株、小腸上皮細胞株でも観察され、本法が細胞種に依らず普遍性のあるコンディショニング法であることが示唆された。



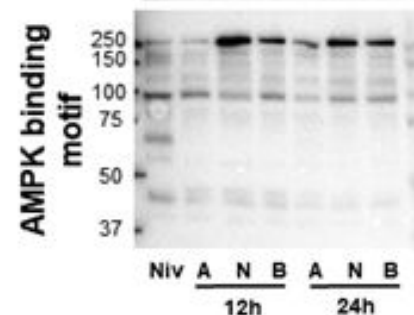
4) 種々の細胞内シグナルへの影響：

ミトコンドリア傷害、小胞体ストレス、酸化ストレス、Ca²⁺ 依存性タンパク質、オートファジー、Necroptosis 等に関わる多くのタンパク質に対する 14-3-3ζ の影響を主にプロテオーム解析により評価した。14-3-3ζ がリン酸化状態の維持を介して種々の保護性の作用を呈することが示唆された。特に臓器冷保存や酸素化灌流時にはこれらのコンディショニング法が細胞保護に奏功する可能性が見出された



5) 臓器、個体レベルでの検証

- a) 単離腎灌流はいつでもできる状態に完成した。
- b) 薬剤投与方法の検討はとん挫した。A が水に溶けないために溶剤として用いた DMSO が傷害性を発揮し、薬剤の効果を検証できなかった。今後、リボゾム包埋やシクロデキストリン包接等の薬剤送達の工夫が必要である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shimada Shingo, Fukai Moto, Shibata Kengo, Sakamoto Sodai, Wakayama Kenji, Ishikawa Takahisa, Kawamura Norio, Fujiyoshi Masato, Shimamura Tsuyoshi, Taketomi Akinobu	4. 巻 8
2. 論文標題 Heavy Water (D2O) Containing Preservation Solution Reduces Hepatic Cold Preservation and Reperfusion Injury in an Isolated Perfused Rat Liver (IPRL) Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1818 ~ 1829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8111818	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 島田慎吾, 柴田賢吾, 小林希, 三好早香, 早坂孝宏, 深井原, 嶋村剛, 武富紹信	4. 巻 25(2)
2. 論文標題 脂肪肝虚血再灌流障害をターゲットとしたAMPKの役割	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Organ Biology	6. 最初と最後の頁 134-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishikawa T, Shimada S, Fukai M, Kimura T, Umemoto K, Shibata K, Fujiyoshi M, Fujiyoshi S, Hayasaka T, Kawamura N, Kobayashi N, Shimamura T, Taketomi A.	4. 巻 48(12)
2. 論文標題 Post-reperfusion hydrogen gas treatment ameliorates ischemia reperfusion injury in rat livers from donors after cardiac death: a preliminary study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 1081-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-018-1693-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 深井原, 島田 慎吾, 梅本 浩平, 中藪 拓哉, 小林 希, 三野 和宏, 嶋村 剛, 武富 紹信	4. 巻 24(2)
2. 論文標題 臓器灌流法の先にあるべき技術とは?	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Organ Biology	6. 最初と最後の頁 49-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11378/organbio.24.169	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kengo Shibata, Takahiro Hayasaka, Moto Fukai, Koichi Kato, Takahisa Ishikawa, Kohei Umemoto, Shingo Shimada, Nozomi Kobayashi, Tsuyoshi Shimamura, Taichi Kimura, Akinobu Taketomi
2. 発表標題 Elucidation of the role of lyso-phospholipids on hepatic warm ischemia and reperfusion injury; Comprehensive analysis by imaging mass spectrometry.
3. 学会等名 19th Congress of the European Society for Organ Transplantation (ESOT 2019). Copenhagen, 15-18 Sep. 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kengo Shibata, Takahiro Hayasaka, Moto Fukai, Koichi Kato, Takahisa Ishikawa, Kohei Umemoto, Shingo Shimada, Nozomi Kobayashi, Tsuyoshi Shimamura, Taichi Kimura, Akinobu Taketomi
2. 発表標題 Elucidation of the mechanisms of hepatic warm ischemia and reperfusion injury in rats; Exploration of predictive markers of IRI by imaging mass spectrometry.
3. 学会等名 16th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST 2019). Greater Noida, India. 29-Sep, 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深井原、柴田賢吾、島田慎吾、石川隆壽、若山顕治、藤好直、小林希、加藤紘一、早坂孝宏、三野和宏、川村典生、嶋村剛、武富紹信
2. 発表標題 生存シグナル増強を目指した機械灌流による肝グラフトの薬剤性コンディショニング法の探索
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会、大阪国際会議場、2019.4.20
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深井原、柴田賢吾、坂本聡大、島田慎吾、小林希、石川隆壽、若山顕治、藤好真人、川村典生、嶋村剛、武富紹信
2. 発表標題 虚血再灌流傷害に対する水素ガスの作用点の探索
3. 学会等名 第46回 日本臓器保存生物医学会学術集会（福島、ふくしま医療機器開発支援センター）2019.11.8（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田賢吾、橋本咲月、早坂孝宏、深井原、加藤紘一、中藪拓哉、島田慎吾、小林希、梅本浩平、大谷晋太郎、三野和宏、嶋村剛、木村太一、武富紹信
2. 発表標題 温虚血再灌流障害におけるリゾリン脂質の役割に関する基礎的研究 質量分析イメージング法による解析
3. 学会等名 第119回 日本外科学会定期学術集会 (大阪,大阪国際会議場) 2019.4.19 (Young Investigator 's Award Session)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深井原、島田慎吾、小林希、中藪拓哉、石川隆壽、柴田賢吾、梅本浩平、鈴木崇史、三野和宏、嶋村剛、武富紹信
2. 発表標題 心停止ドナー肝のNrf2と生存シグナルを増強させる薬剤性コンディショニング法の探索
3. 学会等名 第118回 日本外科学会学術集会 (東京, 東京国際フォーラム) 2018.4.7
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田賢吾、橋本咲月、早坂孝宏、深井原、加藤紘一、中藪拓哉、島田慎吾、小林希、梅本浩平、鈴木崇史、大谷晋太郎、三野和宏、嶋村剛、木村太一、武富紹信
2. 発表標題 温虚血再灌流障害におけるリゾリン脂質の役割に関する基礎的研究 - 質量分析イメージング法による解析
3. 学会等名 第45回 日本臓器保存生物医学会学術集会 (名古屋, 今池ガスホール) 2018.11.10
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 深井原、島田慎吾、梅本浩平、中藪拓哉、柴田賢吾、早坂孝宏、鈴木崇史、大谷晋太郎、橋本咲月、三野和宏、嶋村剛、武富紹信
2. 発表標題 臓器灌流時のコンディショニング法の探索
3. 学会等名 第44回 日本臓器保存生物医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中敷拓哉, 深井原, 島田慎吾, 小林希, 梅本浩平, 柴田賢吾, 早坂孝宏, 鈴木崇史, 大谷晋太郎, 橋本咲月, 三野和宏, 嶋村剛, 武富紹信
2. 発表標題 小腸上皮細胞の低温保存における溶存酸素と酸化ストレスの影響
3. 学会等名 第44回 日本臓器保存生物医学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	嶋村 剛 (Shimamura Tsuyoshi) (00333617)	北海道大学・大学病院・准教授 (10101)	
研究分担者	川村 典生 (Kawamura Norio) (20746953)	北海道大学・医学研究院・特任助教 (10101)	
研究分担者	島田 慎吾 (Shimada Shingo) (40755576)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	
研究分担者	木村 太一 (Kimura Taichi) (90435959)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------