

令和 3 年 4 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18174

研究課題名(和文) 微弱電磁場と不凍糖タンパクを用いた低温心保存法

研究課題名(英文) Heart Cryopreservation using Antifreeze Glycoprotein in a Variable Magnetic Field

研究代表者

鷹合 真太郎 (Takago, Shintaro)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：60619790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラット心を低温単純浸漬法にて保存実験した。control群(n=6)として保存液のみ、AFGP添加群(n=6)として保存液にAFGP500 µg/mLを添加したものを、それぞれ浸漬保存液として使用した。4、24時間の低温単純浸漬保存の後、Langendorff装置による再灌流実験を実施し、30分、60分、90分、120分経過時点の心拍数、冠灌流量、心収縮力、心拡張力を測定した。また、保存心の組織水分含有量と組織ATP含有量を測定し、それぞれの測定項目について2群間の結果を比較検討した。多くの項目において、AFGP添加群の保存心が運動機能的・代謝機能的に良い状態であったことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AFGPは単純浸漬・非凍結低温心保存の基質添加剤として有用である可能性が示された。臓器保存における、AFGPの有用性を示唆した報告は初めてである。研究成果については、2019年の第119回日本外科学会定期学術集会にて発表し、2020年にPhysiological Researchにて出版された。

研究成果の概要(英文)：Surgically removed control rat hearts (n = 6) were immersed in UW solution while AFGP-treated hearts (AFGP group) (n = 6) were immersed in UW solution containing 500 µg/mL AFGP. After static hypothermic preservation, a Langendorff apparatus was used to reperfuse the coronary arteries. After 30, 60, 90, and 120 min the heart rate (HR), coronary flow (CF), cardiac contractile force (max dP/dt), and cardiac diastolic force (min dP/dt) were measured. Tissue water content (TWC) and tissue adenosine triphosphate (ATP) levels in the reperfused preserved hearts were also assessed. All parameters were compared between the control and AFGP groups. The higher HR, CF, max dP/dt, min dP/dt, and tissue ATP levels in the AFGP than control hearts suggested that AFGP conferred superior hemodynamic and metabolic functions. Thus, AFGP might be a useful additive for the static/nonfreezing hypothermic preservation of hearts.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：不凍糖タンパク 低温心保存法 再灌流実験

## 1. 研究開始当初の背景

心移植における長時間の臓器保存は、深刻な臓器不足問題を解決する鍵である。低温保存は長時間の臓器保存に有用であるが、凍結障害、イオン再分布や細胞腫脹が起こることが知られている。我々は微弱電磁場による過冷却状態を用いた非凍結保存環境を構築し、その低温心保存の有用性を証明した。しかし、過冷却状態は非常に不安定であり実用化は困難であった。近年、凝固点降下・氷結晶の成長抑制、低温環境下での細胞保護機能を有した生体物質である不凍糖タンパク (AFGP; antifreeze glycoprotein) の高度精製抽出が可能となった。また、AFGP は過冷却状態を安定化させる効果も有していることが確認された。これまで我々が行ってきた「微弱電磁場」による心保存法に AFGP の効果を組み合わせ「微弱電磁場+不凍糖タンパク」による心保存法を確立することで、より実用的な長時間低温保存法を確立できると考えた。

## 2. 研究の目的

### 低温での心保存法の取り組み

これまで、我々は微弱電磁場を用いた非凍結下氷点での心保存を研究し、その有用性を証明してきた(1)。これは冷却装置内に均一な複数の微弱エネルギーを発生させ、マイクロな微弱振動を起こしながら冷却を行う技術であり、過冷却状態を作り出すため、凍結させずに氷温(-4℃)での低温保存が可能となる。しかしながら、過冷却状態は非常に不安定であり、保存心が低温に曝されることで起こる低温障害、つまりイオン再分布や細胞腫脹が不可避であり、より安定、良好な低温心保存の実現ためには更なる工夫が必要であった。

### 基質添加剤を用いた心保存法

単純浸漬法の低温保存状態の問題点を解決する手段として、浸漬保存液に ATP(adenosine triphosphate)やアルブミン、アスパラギン酸等の基質添加剤を加えた心保存法が報告されてきたが、いずれも冠灌流法を優れた保存状態を期待できる基質添加剤は発見されていない。

### 基質添加剤の選択

寒冷地に生息する動植物から同定された生体物質が、体液の凝固点を低下させ、氷結晶の成長を抑制する作用があることが示された。この生体物質の一つとして同定されたものが AFGP である。AFGP については、過冷却状態の安定化、低温保存状態での細胞膜イオンチャネルの遮断、細胞膜の安定化等が報告されており、この物質を使用することで、我々が継続研究してきた長時間の低温心保存法が更に発展すると考えた。

睪頭細胞や精子細胞などの低温保存の基質添加剤として、AFGP の有効性が報告されているものの(2,3)。しかし、これらは細胞保存の報告である。これまで AFGP の高度精製抽出は非常に困難であったこともあり、AFGP を用いた低温環境下保存は、心臓以外の他の臓器も含め成功した研究成果は報告されていない。そこで、AFGP が実質臓器の低温保存において、浸漬保存液の基質添加剤として有用であるという仮説を立て、ラットの心臓を用いた単純浸漬・非凍結低温臓器保存の研究を通して、AFGP の基質添加剤としての有効性を評価した。

## 3. 研究の方法

ラット心を摘出する方法や、Langendorff 装置を用いた再灌流実験と心機能測定法は、我々が過去に報告した Isolated rat heart model と同様の実験体系とした(1)。ラットから摘出した心臓を低温環境下で単純浸漬法にて保存実験した。control 群 (n=6) として UW 液のみ、AFGP 添加群 (n=6) として UW 液に AFGP500  $\mu$ g/mL を添加したものを、それぞれ浸漬保存液として使用した。4℃、24 時間の低温単純浸漬保存の後、Langendorff 装置を用いて酸素を加えた Krebs-Henseleit 溶液を冠動脈に再灌流させ、30分、60分、90分、120分経過時点の心拍数 (HR)、冠灌流量 (CF)、心収縮力 (max dP/dt)、心拡張力 (min dP/dt) を測定した。また、再灌流実験後の保存心から、組織水分含有量 (TWC) と組織 ATP 含有量を測定した。それぞれの測定項目について、control 群と AFGP 添加群の 2 群間の結果を比較検討した。

UW 液(in g/L: pentafraction, 50;lactobionic acid, 35.83; potassium phosphate monobasic, 3.4; magnesium sulfate heptahydrate, 1.23; raffinose pentahydrate, 17.83; adenosine, 1.34; allopurinol, 0.136; total glutathione, 0.922; potassium hydroxide, 5.61; pH 7.4)

Krebs-Henseleit 溶液 (in mM: NaCl, 118; KCl, 4.7; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.2; CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 2.5; NaHCO<sub>3</sub>, 25; glucose, 11.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; pH=7.6)

#### 4. 研究成果

##### 心拍数 Heart Rate (HR)

control 群 vs AFGP 添加群では、30 分で 80.7 ± 1.4 vs 80.0 ± 2.5/min ; p=0.55, 60 分で 78.7 ± 37.6 vs 134.2 ± 24.3/min ; p<0.05, 90 分で 98.5 ± 38.4 vs 167.0 ± 33.1/min ; p<0.05, 120 分では 102.7 ± 46.7 vs 174.2 ± 33.0/min ; p<0.05 であった (図 1). 再灌流実験開始 60 分, 90 分, 120 分の時点で control 群と比較し, AFGP 群で有意に自律的な心拍数が高くなっていた。

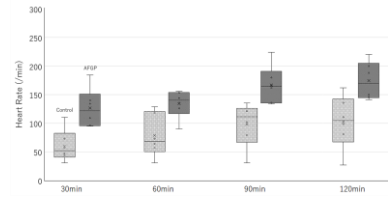


図 1. HR

##### 冠灌流量 Coronary Flow (CF)

control 群 vs AFGP 添加群では、30 分で 2.47 ± 1.93 vs 4.60 ± 0.59mL/min ; p<0.05, 60 分で 2.03 ± 1.27 vs 4.87 ± 0.39mL/min ; p<0.05, 90 分で 2.92 ± 1.44 vs 5.37 ± 0.39mL/min ; p<0.05, 120 分で 3.50 ± 1.83 vs 5.77 ± 0.53mL/min ; p<0.05 であった (図 2). 再灌流実験開始 30 分, 60 分, 90 分, 120 分の全ての時点で control 群と比較し, AFGP 添加群の CF が有意に高値であった。

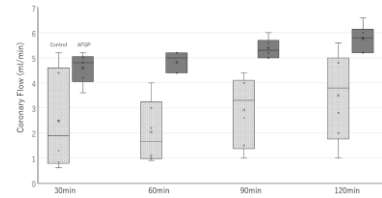


図 2. CF

##### 心収縮力 max dP/dt

control 群 vs AFGP 添加群では、30 分で 164.7 ± 127.7 vs 462.8 ± 319.1mmHg/s ; p=0.060, 60 分で 187.0 ± 91.1 vs 396.5 ± 300.0mmHg/s ; p=0.13, 90 分で 126.5 ± 66.6 vs 488.3 ± 236.2mmHg/s ; p<0.05, 120 分で 176.8 ± 129.2 vs 521.0 ± 370.0mmHg/s ; p=0.056 であった (図 3a). max dP/dt は再灌流実験開始 90 分の時点が control 群と比較し, AFGP 群で有意に高値であった。また, 再灌流実験開始 30 分, 120 分では AFGP 群が高い傾向が認められた。再灌流実験開始 30 分, 90 分, 120 分の時点で, AFGP 添加群の保存心の心収縮力が高い状態であった。

##### 心拡張力 min dP/dt

control 群 vs AFGP 添加群では、30 分で 169.8 ± 143.2 vs 434.8 ± 298.2mmHg/s ; p=0.078, 60 分で 176.5 ± 87.3 vs 349.8 ± 231.9 ; p=0.12, 90 分で 126.5 ± 65.6 vs 460.8 ± 234.6mmHg/s ; p<0.05, 120 分で 159.3 ± 90.6 vs 531.5 ± 384.1mmHg/s ; p<0.05 であった (図 3b). min dP/dt は再灌流実験開始 90 分, 120 分の時点が control 群と比較し, AFGP 群で有意に高値であった。また, 再灌流実験開始 30 分では AFGP 群が高い傾向が認められた。再灌流実験開始 30 分, 90 分, 120 分の時点で, AFGP 添加群の保存心の心拡張力が高い状態であった。

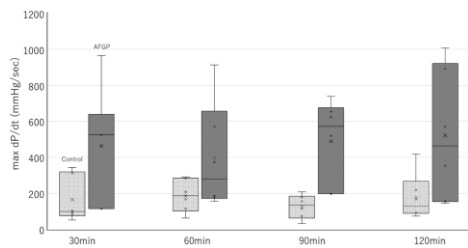


図 3a. max dP/dt

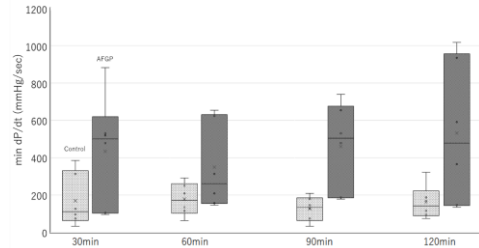


図 3b. min dP/dt

##### Tissue Water Content (TWC)

TWC は 80.7 ± 1.4 vs 80.0 ± 2.5% ; p=0.55 で, control 群と AFGP 群において, 有意差はなく (図 4), 再灌流実験後の保存心の心筋浮腫に差はなかった。

##### Adenosine Triphosphate Levels

組織 ATP 含有量は 1.10 ± 0.30 vs 4.28 ± 2.34 μmol/g ; p<0.05 で, control 群と比較し, AFGP 群は有意に高く, (図 5) AFGP 添加群の保存心が control 群と比較し, 組織内に ATP が保存されていた。

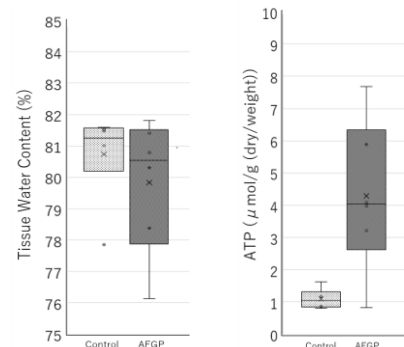


図 4. TWC

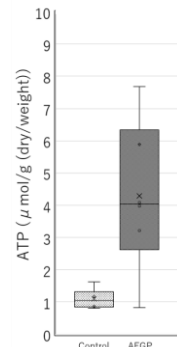


図 5. ATP

再灌流実験開始 30 分以降の 60 分, 90 分, 120 分の HR, 再灌流実験開始後全ての時点の CF,

再灌流実験開始 30 分, 90 分, 120 分の max dP/dt と min dP/dt の項目において, control 群と比較し, AFGP 添加群の測定値は高いものであった. HR, CF, max dP/dt, min dP/dt はいずれも, 再灌流実験における AFGP 添加群の保存心が, control 群と比較し高い運動能力が保たれていることを示していた. また, 代謝機能の評価として組織 ATP 含有量を測定したが, control 群と比較し AFGP 添加群の測定値は有意に高く, 代謝機能的にも AFGP 添加群で保たれていた. 今回, AFGP 添加群は control 群と比較し, 保存心の運動機能も代謝機能も保たれており, 臓器の低温保存における AFGP の有用性が示唆された.

<引用文献>

- (1) Kato H. et al. Subzero 24-hr nonfreezing rat heart preservation: a novel preservation method in a variable magnetic field. *Transplantation*. 2012; 94: 473-477.
- (2) Rubinsky B. et al. Inhibition of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> currents by "antifreeze" proteins. *Am J Physiol*. 1992; 262(3 Pt 2): R542-5.
- (3) Rubinsky B et al. The effect of antifreeze glycopeptides on membrane potential changes at hypothermic temperatures. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 173(3):1369-74.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takago Shintaro, Matsumoto Isao, Kato Hiroki, Saito Naoki, Ueda Hideyasu, Iino Kenji, Kimura Keiichi, Takemura Hirofumi	4. 巻 69
2. 論文標題 Hypothermic preservation of rat hearts using antifreeze glycoprotein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiological Research	6. 最初と最後の頁 1029 ~ 1038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33549/physiolres.934473	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鷹合真太郎
2. 発表標題 不凍糖タンパク質を用いた低温心保存法
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------