

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：34602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18196

研究課題名（和文）体外循環時の酸化ストレスによる赤血球溶血の機序解明と新規予防法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of erythrocyte hemolysis caused by oxidative stress during extracorporeal circulation and development of new preventive methods

研究代表者

曾山 奉教（Soyama, Tomonori）

天理大学・医療学部・准教授

研究者番号：10811797

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：体外循環を使用した心臓手術では、赤血球溶血に関連した合併症が問題となる。体外循環中の赤血球溶血の原因の一つは人工肺への過剰な酸素吹送で血液中に発生する酸化ストレスに起因すると言われている。しかし、この酸化ストレスを手術中に検出する方法はない。そこで我々は、赤血球内の様々な物質の中で炭酸脱水酵素に注目し検討を進めた。

結果、炭酸脱水酵素は酸化ストレス（過酸化水素）の濃度の上昇に伴い、酸化型に変化することを発見した。体外循環中の酸化ストレスを炭酸脱水酵素で検出することで、心臓手術後の合併症を減らす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体外循環では人工肺に高流量の酸素を吹送しガス交換が行われるが、このとき血液は過度の酸化ストレスに曝される。この酸化ストレスは溶血性貧血や急性腎障害など術後合併症の原因となるが、体外循環中にこれらの酸化ストレスを検出する方法はない。本研究の成果は、体外循環中に人工肺に過剰な酸素を吹き付けないための指標に「炭酸脱水酵素で検出する酸化ストレス」が加わり、心臓血管外科領域における様々な術後合併症の軽減に貢献する可能性を見出したことである。

研究成果の概要（英文）：Complications related to erythrocyte hemolysis are a problem in cardiac surgery using extracorporeal circulation. One of the causes of erythrocyte hemolysis during extracorporeal circulation is said to be due to oxidative stress generated in the blood by excessive oxygen blown into the artificial lungs. However, there is no way to detect this oxidative stress during surgery. We focused on carbonic anhydrase among various substances in erythrocytes. As a result, we found that carbonic anhydrase changes to the oxidized form as the concentration of oxidative stress (hydrogen peroxide) increases. Detection of oxidative stress during extracorporeal circulation with carbonic anhydrase suggested the possibility of reducing complications after cardiac surgery.

研究分野：体外循環

キーワード：体外循環 酸化ストレス 赤血球内抗酸化物質 炭酸脱水酵素 ゲルシフトアッセイ

### 1. 研究開始当初の背景

体外循環を使用した心臓手術後の赤血球溶血関連合併症は術後の予後に影響する(Vercaemst. J Extra Corpor Technol 2008)。一般的に体外循環中の赤血球溶血は機械的ストレス(せん断応力)に起因すると考えられていたが、近年、酸化ストレスが溶血に関連することが注目されている(Zakkar et al. Oxid Med Cell Longev 2015)。しかし、赤血球溶血と酸化ストレスの因果関係は科学的に解明されていない。本研究では体外循環中の赤血球溶血の原因として、人工肺への過剰な酸素吹送による赤血球への酸化ストレスの関与を想定し、その影響を明らかにする。そこで、赤血球内の抗酸化物質(グルタチオン系、チオレドキシニン系、ペルオキシレドキシニン系)特に赤血球内抗酸化作用として主要な役割を果たし、近年、システイン残基の過酸化(パースルフィド化)(Sawa et al. Adv MicrobPhysiol 2018)が注目されているチオレドキシニンに着眼し、その活性中心の還元能およびシステイン残基の修飾を分析することを目的に研究に着手した。

### 2. 研究の目的

体外循環(人工心肺)を使用した心臓手術では人工肺より高流量の酸素を吹送するため、血液は過度の酸化ストレスに曝される。この酸化ストレスが手術後の予後に影響する赤血球溶血関連合併症を引き起こすことが考えられており、赤血球中の酸化ストレスをモニターする方法の開発が必要である。そこで、レドックス制御蛋白質である赤血球中のチオレドキシニン(thioredoxin; TRX, 12kDa, SH×5)に着目し、酸化ストレス(過酸化水素)がTRXのチオール基数(還元能)に及ぼす影響をチオール基のラベル化(ゲルシフトアッセイ)により検討した。また、同実験系の中で過酸化水素濃度の上昇に伴い高感度に酸化還元状態が変化する新たな分子を検出し、質量分析の結果、炭酸脱水酵素(Carbonic anhydrase 1; CA1, 29kDa, SH×1)を同定した。そこで過酸化水素がCA1のSH基に及ぼす影響を検討し、同物質が体外循環中の酸化ストレスモニタリングとして使用できるのか、併せて検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) レドックスラベルによる赤血球酸化ストレスモニター法の検討

リコンビナントTRX(rTRX)および赤血球内TRX(RBC-TRX)を対象に酸化ストレス(過酸化水素)に対するシステイン残基酸化修飾を解析した。特にRBC-TRXは、ヘパリン採血後、血球分離溶液(Polymorphprep; 比重 1.113)を用い低速遠心で赤血球を分離した。赤血球を洗浄後、終濃度 0 μM から 500 μM となる過酸化水素溶液と 1:1 の比率で過酸化水素に曝露した。赤血球を赤血球溶血液(塩化アンモニウム等)で溶血させ、高速遠心後、上清を使用した。なお、rTRX および RBC-TRX の還元能および構造変化はゲルシフトアッセイ( DOJINDO Protein-SHifter Plus: 15kDa, PEG-PCMaI: 5kDa ) Western Blotting を用いて分析した。

#### (2) 過酸化水素が CA1 の SH 基に与える影響

赤血球内に豊富に存在する抗酸化物質が酸化ストレスのバイオマーカーになるものと考え検討を進める中、SH 基のラベル化によるゲルシフトアッセイで酸化ストレス(終濃度 0 μM から 10mM となる過酸化水素溶液)に高感度に反応する新たな分子を検出し、質量分析の結果、Carbonic Anhydrase 1 (CA1: 分子量 29kDa)であることを同定した。そこで、recombinant CA1(rCA1)を作製し、酸化ストレスが rCA1 内のシステイン残基に及ぼす影響を、ゲルシフトアッセイ(PEG-PCMaI)を用いて検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) レドックスラベルによる赤血球酸化ストレスモニター法の検討

##### 過酸化水素が rTRX に及ぼす影響

rTRX は過酸化水素濃度の上昇に伴い分子間結合(二量体および四量体)を形成した。また、過酸化水素濃度の上昇に伴い rTRX のチオール基数の減少(還元能の低下)を観測した(図1)。

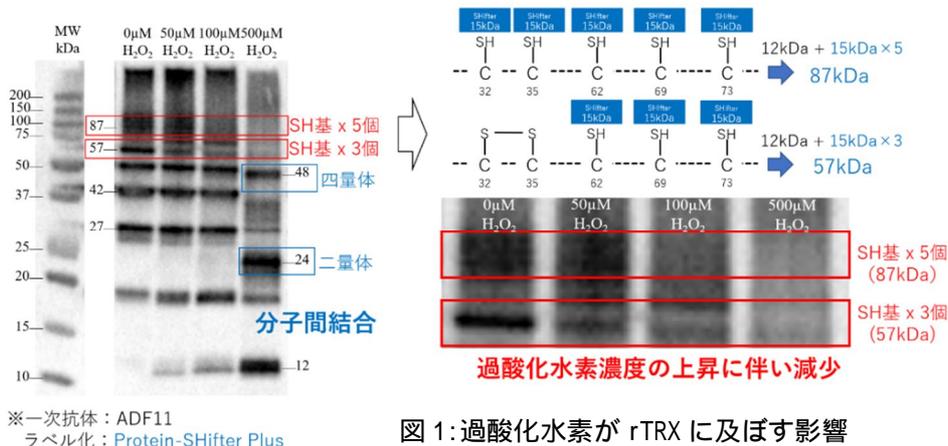


図1: 過酸化水素が rTRX に及ぼす影響

過酸化水素が RBC-TRX に及ぼす影響

過酸化水素濃度の上昇に伴う RBC-TRX のチオール基数に変化（還元能の変化）を認めなかった（図2）。

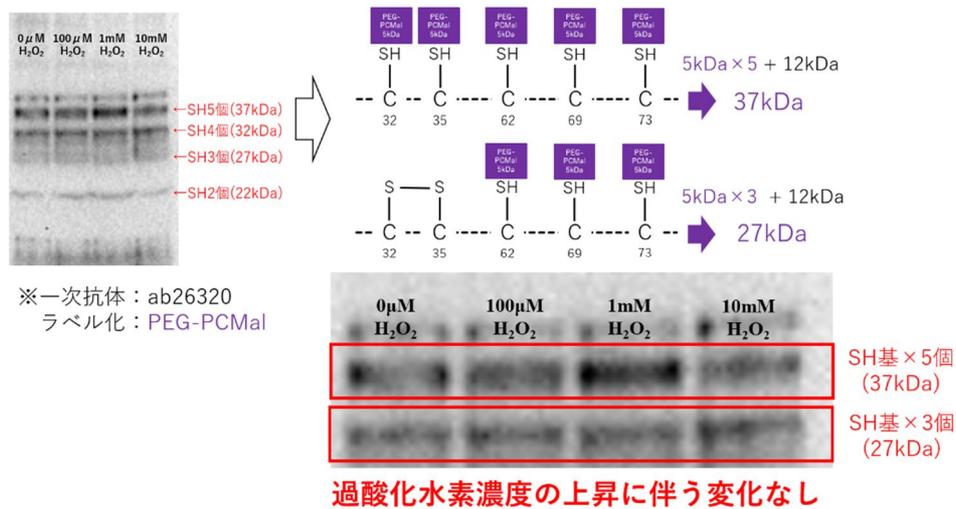
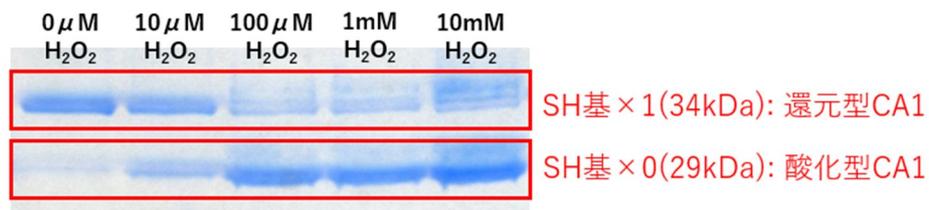


図2: 過酸化水素が RBC-TRX に及ぼす影響

よって、体外循環中の RBC-TRX は還元状態を維持しており、体外循環中の赤血球酸化ストレスモニターとして、RBC-TRX を使用できない可能性が示唆された。

酸化還元状態が変化する新たな分子：Carbonic anhydrase 1

一方、同実験では、Western Blotting 後の Gel の CBB 染色で、過酸化水素濃度の上昇に伴い高感度に酸化還元状態が変化する新たな分子を検出し、質量分析の結果、炭酸脱水酵素 (Carbonic anhydrase 1; CA1, 29kDa SH × 1) を同定した (図3)。



酸化還元状態が変化する新たな分子 (Carbonic anhydrase 1)

図3: 酸化還元状態が変化する新たな分子：Carbonic anhydrase 1

(2) 過酸化水素が rCA1 の SH 基に与える影響

rCA1 は過酸化水素濃度の上昇に伴い血漿中で速やかに酸化型 r-CA1 に変化した (図4)。

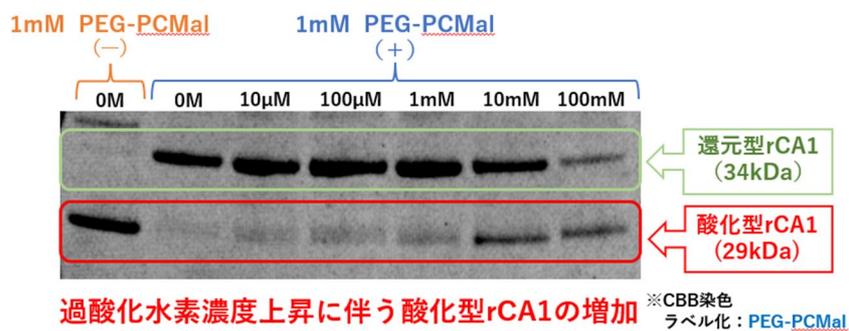


図4: 過酸化水素が rCA1 の SH 基に与える影響

よって、rCA1 が体外循環中の酸化ストレスを検出し、同分子が酸化ストレスをモニタリングできる可能性が強く示唆された。

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 Tomonori Soyama, Hiroshi Masutani, Cristiane Lumi Hirata, Eri Iwai-Kanai, Takashi Inamoto	4. 巻 67
2. 論文標題 Thioredoxin as a novel sensitive marker of biological stress response in smoking	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr	6. 最初と最後の頁 228-231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbn.19-108	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 曾山奉教, 平田クリスチアナ, 増谷弘
2. 発表標題 レドックスラベルによる赤血球酸化ストレスモニター法の検討
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 曾山奉教, 増谷弘, Hirata Lumi, 金井恵理, 稲本俊
2. 発表標題 喫煙における生物学的ストレス反応の新規高感度マーカーとしてのチオレドキシンの検討
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水貞則, 松本智子, 下村大樹, 曾山奉教
2. 発表標題 凝固線溶波形解析による体外循環中の新たな抗凝固線溶管理モニタリング法の開発 - 抗凝固剤が凝固・線溶機能に与える影響 -
3. 学会等名 第60回日本人工臓器学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 曾山奉教, 松本智子, 清水貞則, 北川貴大, 下村大樹
2. 発表標題 凝固線溶波形解析による体外循環中の新たな抗凝固線溶管理モニタリング法 その1 - 血液希釈が凝固線溶機能に与える影響 -
3. 学会等名 第48回日本体外循環技術医学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北川貴大, 松本智子, 小林靖雄, 清水貞則, 下村大樹, 曾山奉教
2. 発表標題 凝固線溶波形解析による体外循環中の新たな抗凝固線溶管理モニタリング法 その2 - 抗凝固剤併用が凝固線溶機能に与える影響 -
3. 学会等名 第48回日本体外循環技術医学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水貞則, 松本智子, 北川貴大, 小林靖雄, 下村大樹, 曾山奉教
2. 発表標題 凝固線溶波形解析による体外循環中の新たな抗凝固線溶管理モニタリング法 その3 - トラネキサム酸が凝固線溶機能に与える影響 -
3. 学会等名 第48回日本体外循環技術医学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 植田みゆ, 清水貞則, 北川貴大, 曾山奉教, 松本智子
2. 発表標題 凝固線溶波形解析による抗凝固剤・抗線溶剤併用時の凝固線溶機能の解明
3. 学会等名 第17回 日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2023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
研究協力者	増谷 弘  (Masutani Hiroshi)		
研究協力者	平田 クリスチアネ  (Hirata Cristiane)		

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