

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月21日現在

機関番号：11201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700502

研究課題名（和文）昆虫由来休眠ペプチドを用いた新規臓器保存液開発へ向けての基礎研究

研究課題名（英文）Basic study for the development of a new organ preservation solution using insect derived dormancy peptide

研究代表者

片山 泰章（KATAYAMA MASAOKI）

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：70436054

研究成果の概要（和文）：昆虫由来休眠ペプチドである C16-Yamamarin を細胞内液および外液組成の既存の臓器保存液に添加し猫腎細胞を低温保存および再加温すると、猫腎細胞の休眠傾向が示唆され、またそれは可逆的であることが示唆された。今回の研究では C16-Yamamarin を用いたことによる臓器保存効果の上昇の確証は得られなかったが、C16-Yamamarin の臓器保存液への応用の可能性を示唆していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cryopreservation and rewarming of feline kidney cells with an existing intracellular and extracellular organ preservation solution added C16-Yamamarin, an insect derived dormancy peptide, was indicated dormancy effects of C16-Yamamarin to the feline kidney cells which were reversible. Although the organ preservation effects of C16-Yamamarin were not provided in this study, it may suggest the possibility of the application of C16-Yamamarin as an organ preservative.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：昆虫、休眠、臓器移植、臓器保存

1. 研究開始当初の背景

臓器移植法の改正に伴い、本邦でも死亡した患者からの臓器提供が注目されている。臓器移植では、臓器提供者（ドナー）から摘出された移植用臓器は、血流が途絶した状態（阻血状態）で、移植までの間数分から数十時間保存される。このため、保存温度、時間や保存液の種類などの保存条件が適切でない場合

には、移植によって移植臓器内の血流が回復した際（再灌流時）に移植臓器に実質的あるいは機能的な傷害が生じることがあるが、このような現象は虚血再灌流傷害と呼ばれており、術後の腎機能、移植臓器の生着率に大きく影響するといわれている。移植用臓器をより生理的な状態で保存するために、摘出後の

移植用臓器を細胞内液組成のユーロ・コリンズ (EC) 液やウィスコンシン大学 (UW) 液などの既存の保存液中で低温保存する方法が採用されているが、長期保存においては未だ移植臓器の機能障害の発現は回避しがたい状況である。したがって、移植医療分野では、移植臓器の機能を維持するためのより保存効果に優れた新規臓器保存液の開発が必要課題となっている。

ネコの腎移植は末期慢性腎不全に対する有効な治療オプションとして確立されている。移植手術ではドナーから摘出した移植用腎を生理食塩水で灌流した直後レシピエントに移植するのが一般的である。しかしながら、生理食塩水は臓器保護・保存効果に乏しく、術後に移植腎の機能遅延が起こることが報告されている。獣医療における腎移植ネットワークを構築するためには移植用臓器の輸送が必要となり、臓器の長時間保存が欠かせない。しかしながら、猫における長時間保存は、UW液を用いた7時間保存以外に報告は皆無である。

休眠絹糸昆虫であるヤママユ (天蚕) はそのライフサイクルにおいて1年のうち9ヶ月間の発育停止期間 (休眠) を有する。これには休眠維持物質が関係しており、その中から単離精製されたバイオペプチドがヤママリンである。ヤママリンはラット肝がん細胞の成長をG0/G1期で休止させることにより細胞増殖抑制作用を示すことが報告されている。この作用は可逆的であり、哺乳動物や昆虫に関係なく広範な動物種で普遍的に発揮できると考えられる。シマリスは休眠を行う代表的な哺乳類であるが、代謝を著しく低下させることにより冬眠に入り、覚醒すると機能障害無く再び正常状態に復する。ヤママリンは非休眠哺乳動物の移植用組織においても、このような休眠動物同様エネルギー代謝を低下させることにより臓器保存効果を発揮することが期待される。休眠物質であるヤママリンは、移植医療における新規臓器保存液開発への新たな可能性を提供するものと考えられる。

2. 研究の目的

臓器移植医療において、移植用臓器の保存状態の良し悪しが術後の移植臓器の機能や生着率に影響を与えることは既知の事実である。移植臓器の状態に大きく関わっているのが虚血傷害の程度であり、これを最小限に抑えることが移植成績向上の一つの鍵となる。休眠昆虫から得られたヤママリンは細胞の成長を休止させることで可逆性の細胞増殖抑制作用を示すバイオ素材である。ヤママリンをネコ

の移植腎保存へ応用することで、ヤママリンの臓器保存効果を明らかにすることを目標としており、本研究により得られた結果は新規臓器保存液の開発につながると考える。また、現代社会には欠かせない存在となっている伴侶動物に応用することは、昆虫由来物質であるヤママリンのヒト医療への臨床応用へ向けての社会的コンセンサスを得る礎となると考える。

3. 研究の方法

(1) 猫遠位尿管細胞増殖抑制の可逆性試験

①細胞と培地組成

実験には岩手大学農学部応用生物化学課程の山下准教授らが樹立した Feline kidney distal tubular cells (以下FKD細胞) を使用した。培地には3%グルタミン (invitrogen, NY, U.S.A.), 10%ウシ胎子血清 (ハナ・ネスコバイオ、東京、日本)、7.5%重炭酸水素ナトリウム (gibco, NY, U.S.A.) を含む Modified Eagle's Medium (日水製薬株式会社、東京、日本) を使用した。すべての実験において細胞は37°C、5%CO₂の存在下で培養を行った。

②細胞増殖抑制活性測定法

FKD細胞の増殖抑制活性は、2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt (以下WST-8) アッセイにより測定した。

細胞は細胞培養用25cm²フラスコで培養し、対数増殖期に培地を取り除きリン酸緩衝生理食塩水 (和光純薬株式会社、大阪、日本) で洗浄した。さらに細胞を0.25%トリプシン (gibco, NY, U.S.A.) で浮遊させ、培地を用いて1.0×10⁴cells/mLの濃度に調整した細胞浮遊液を199μLずつ96穴マイクロプレート (和に添加し、同条件で24h前培養した。培養後の実験区には5mMにDimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, U.S.A.) (以下DMSO) で調整、溶解したサンプルを各ウェルに1μLずつ添加した。なおコントロール区には、サンプルの代わりにDMSOで溶解した同濃度のパルミチン酸 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, U.S.A.) を1μLずつ添加した。

サンプルを加えて24h、48h培養後の時点で培地をすべて取り除き、各ウェルに新しい培地100μLとTetracolor one cell assay system (生化学バイオビジネス株式会社、東京、日本) を10μL加え37°C、5%CO₂の条件下で4h呈色させたのち、吸光度測定を行った。

48h培養後、サンプル入りの培地をすべて

取り除き新しい培地を 200 μ L 添加して 24h 培養した群も、培養後同様の作業により吸光度を測定した。

(2) 4°C 臓器保存液中での細胞代謝抑制実験

① 細胞培養

FKD 細胞を細胞培養用 25cm² フラスコで培養し、対数増殖期に培地を取り除きリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。さらに細胞を 0.25% トリプシンで浮遊させ、培地を用いて 4.0 \times 10⁵ cells/ml の濃度に調整した細胞浮遊液を 50 μ L ずつ 96 穴マイクロプレートに添加した。すべての実験において細胞は 37°C、5%CO₂ の条件下で、24h-25h、コンフルエント状態になるまで培養した。

② 低温保存

培地を取り除いたコンフルエント状態の培養細胞を、37°C に温めたリン酸緩衝生理食塩水で二回洗浄し、UW 液 (ViaSpan, Belgium、組成は表 1)、PBS (組成は表 2)、25 μ M パルミチン酸添加 UW 液、25 μ M パルミチン酸添加 PBS、25 μ M MC16-Yamamarin 添加 UW 液、25 μ M MC16-Yamamarin 添加 PBS、0.05%DMSO 添加 UW 液、0.05%DMSO 添加 PBS に浸し 4°C で低温保存した。

③ LDH 活性の測定

死細胞数は乳酸脱水素酵素 (Lactate dehydrogenase、以下 LDH) 活性を測定することで評価した。LDH 活性の測定には LDH Cytotoxicity Detection Kit (タカラバイオ株式会社、滋賀、日本) を使用し、赤色ホルマザンの生成量から間接的に測定した。陽性コントロールとして臓器保存液の代わりに 2% の triton X-100 (和光純薬株式会社、大阪、日本) を含む PBS で保存したものを使用し、この時の LDH 活性を 100% として表した。LDH 活性は培養細胞を臓器保存液に浸してから 3、6、9、12、15、24h 後において測定した (n=3)。

④ WST-8 アッセイ

代謝活性のある細胞数は、Tetracolor one cell assay system (生化学バイオビジネス株式会社、東京、日本) を使用し WST-8 アッセイにより測定した。低温保存後、ウェルから保存液をできるだけ取り除いた後、37°C に温めたリン酸緩衝生理食塩水で二回洗浄し、培養に使用している培地を各ウェルに 100 μ L ずつと Tetracolor one cell assay system を各ウェルに 10 μ L ずつ加え 4h 呈色反応させたあと吸光度を測定した。活性のある細胞数は培養細胞を低温保存する直前の細胞数を 100%

として表し、培養細胞を臓器保存液に浸してから 3、6、9、12、15、24h 後において測定した (n=3)。

(3) 4°C 臓器保存液中で保存後の加温モデルでの増殖抑制効果の可逆性実験

加温モデル

(2)②で行った低温保存を UW 液、PBS、25 μ M MC16-Yamamarin 添加 UW 液、25 μ M MC16-Yamamarin 添加 PBS を用いて 12 時間行い、その後 4°C のリン酸緩衝生理食塩水で二回洗浄し、4°C の培地を各ウェル 100 μ L 加え培養した。これを加温モデルとした。

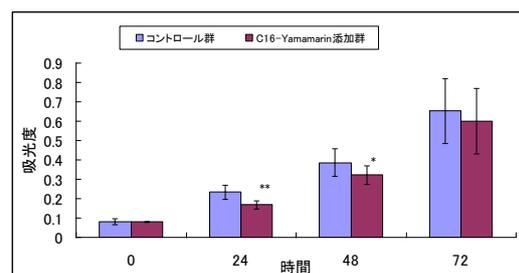
加温モデルの培養開始後、24h、48h、72h の時点で前述の 4°C 臓器保存液中での細胞代謝抑制実験の場合とまったく同様の方法で WST-8 アッセイを行い、吸光度を求め細胞増殖率を比較した。

データは平均土標準偏差で示した。また、t 検定を行い、コントロールと比較した。

4. 研究成果

(1) C16-Yamamarin による猫遠位尿管細胞の可逆的増殖抑制効果

サンプルを加えて培養を始める前の 0h ではコントロール群と実験群の吸光度に有意差はみられなかった。C16-Yamamarin を培地に加えてから 24h、48h の群の吸光度はコントロール群と比較して有意に吸光度が下がった (24h: P<0.05, 48h: P<0.01)。C16-Yamamarin を加えて 48h 培養した FKD 細胞から培地を取り除き、通常の培地を加えて 24h 培養した実験群は、コントロール群との有意差がみられないほど細胞増殖をしていた (図 1)。



(図 1)

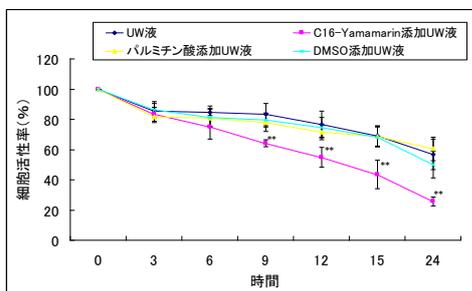
これらから、C16-Yamamarin は FKD 細胞に対しても細胞増殖抑制効果があることがわかり、それは可逆的である傾向が示唆された。

(2) C16-Yamamarin による 4°C 臓器保存液中での代謝抑制効果

① WST-8 アッセイ

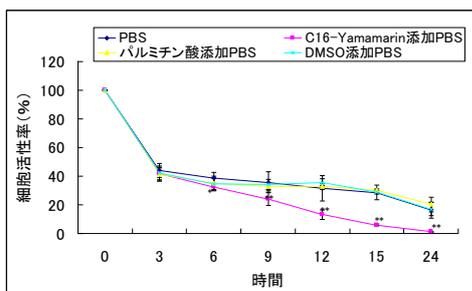
UW 液と C16-Yamamarin 添加 UW 液において、

低温保存開始から 9h、12h、15h、24h 後に C16-Yamamarin 添加 UW 液で保存した群の活性のある細胞数が有意に低下していた ($P < 0.01$) (図 2)。



(図 2)

PBS と C16-Yamamarin 添加 PBS において、低温保存開始から 6h、9h、12h、15h、24h 後に C16-Yamamarin 添加 PBS で保存した群の活性のある細胞数が有意に低下していた (6h : $P < 0.05$, 9h 以降 : $P < 0.01$) (図 3)。



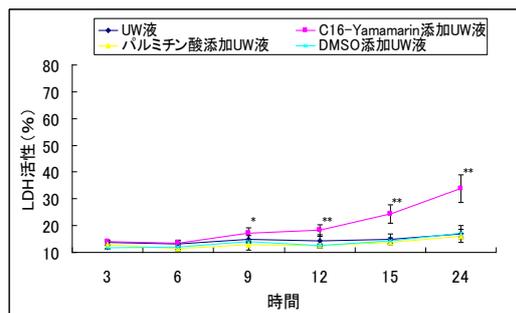
(図 3)

また、UW 液と PBS の両保存液において、DMSO とパルミチン酸は活性のある細胞数に影響をおよぼさないことが確認された。

6h、9h、12h、15、24h 保存した C16-Yamamarin を添加した群で活性のある細胞数が低下したが、これは C16-Yamamarin によるミトコンドリアの呼吸抑制によって Tetracolor one cell assay system に含まれる WST-8 がホルマザンに還元される機構が阻害されたために起きた現象であり、24h 低温保存後の FKD 細胞の形態を観察してもコントロール群と C16-Yamamarin 添加群の間に差はないということからも、保存されている期間で細胞数が減少したためではないだろうと考えられた。

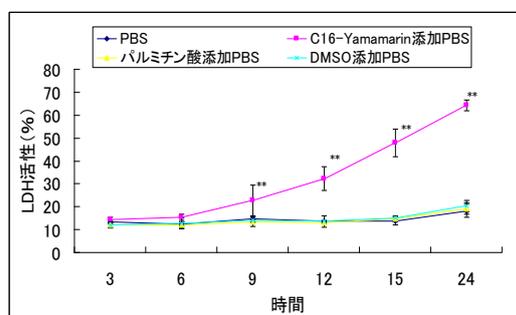
②LDH

UW 液と C16-Yamamarin 添加 UW 液において、低温保存開始から 9h、12h、15h、24h 後に C16-Yamamarin 添加 UW 液で保存した群の LDH 活性が有意に上昇していた (9h : $P < 0.05$, 12h 以降 : $P < 0.01$) (図 4)。



(図 4)

PBS と C16-Yamamarin 添加 PBS において、低温保存開始から 9h、12h、15h、24h 後に C16-Yamamarin 添加 PBS で保存した群の LDH 活性が有意に上昇していた ($P < 0.01$) (図 5)。



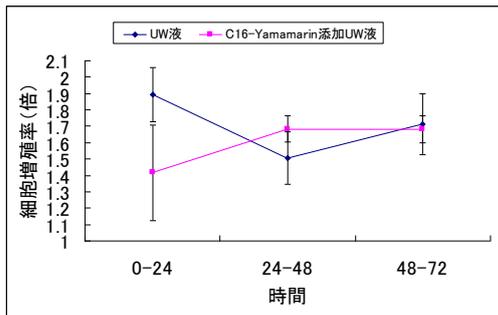
(図 5)

また、UW 液と PBS の両保存液において、DMSO とパルミチン酸は LDH 活性に影響をおよぼさないことが確認された。

LDH 活性が 9h、12h、15h、24h 保存した C16-Yamamarin を添加した群で上昇している結果は、一見 C16-Yamamarin 添加によって死細胞数が増えたように見えるが、これは C16-Yamamarin によるミトコンドリアの呼吸抑制によって、細胞内で酸素を用いない解糖系の回路が活発になったためであり、死細胞数は変わらないが細胞に含まれる LDH の量が上昇したためなのではないかと考えられた。C16-Yamamarin を細胞に作用させたことにより細胞内の LDH 量が増加するという考えについては、今後さらなる検証が期待される。

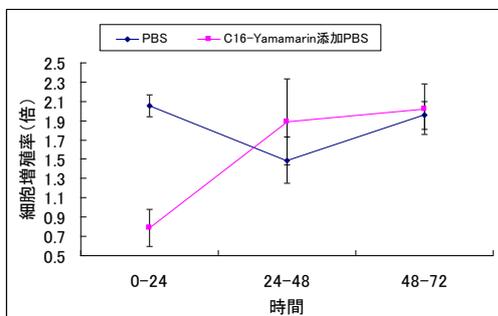
(3)加温モデルにおける、C16-Yamamarin による増殖抑制効果の可逆性

C16-Yamamarin 添加 UW 液で保存した群では、加温により再び細胞増殖がみられ、24-48h の細胞増殖率が UW 液で保存した群を上回る傾向と、48-72h で細胞増殖率が UW 液で保存した群とほぼ同等になる傾向がみられた (図 6)。



(図 6)

C16-Yamamarin 添加 PBS で保存した群では、加温により 0-24h で一時的に細胞数が減る傾向がみられたが、24-48h の細胞増殖率が PBS で保存した群を上回る傾向と、48-72h で細胞増殖率が PBS で保存した群とほぼ同等になる傾向がみられた (図 7)。



(図 7)

加温モデルの実験で、細胞増殖率が初期の 0-24h において C16-Yamamarin 添加群のほうが低かったが、これは低温保存中に細胞内に取り込まれた C16-Yamamarin が加温後代謝されるまでにある程度の時間が必要であるためではないかと考えられた。加温モデルでその後の 24-48h と 48-72h にかけて C16-Yamamarin 添加群で細胞増殖率が上昇しコントロール群とほぼ同等になることから、低温保存中の細胞増殖抑制作用が解除されるには、加温し始めてからおよそ 72h ほどかかることが示唆された。

以上のことから、C16-Yamamarin を臓器保存液に添加し FKD 細胞を保存すると、C16-Yamamarin 添加により FKD 細胞の休眠傾向が示唆され、それは可逆的であることが考えられた。C16-Yamamarin を用いたことによる臓器保存効果の上昇の確証は得られなかったが、今回の研究は C16-Yamamarin の臓器保存液への応用の可能性を示唆していると考えられる。今後は C16-Yamamarin を用いて保存した細胞の形態的、機能的な検討を行うこと

が必要だと考えられる。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 泰章 (KATAYAMA MASAOKI)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：70436054