

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25820063

研究課題名(和文)細胞内凍結の伝播阻害による内皮細胞の凍結耐性の向上に関する研究

研究課題名(英文) Study on blockage of the IIF propagation for improvement endothelial vascular cell viability

研究代表者

福永 鷹信 (FUKUNAGA, TAKANOBU)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・技術職員

研究者番号：60591196

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)：細胞内凍結の発生は細胞に致命的な凍結損傷を与えると考えられている。そこで我々は、細胞間結合の一つであるギャップ結合を介した物質輸送に着目し、この結合を阻害することによって細胞内凍結の伝播の抑制と凍結耐性の向上を図ることを試みた。凍結実験および動画解析の結果から、我々が予想したとおり、ギャップ結合を可逆的阻害剤のヘプタノールで阻害することで、隣接する細胞へ細胞内凍結が伝播するパターンが変わり、細胞内凍結の細胞間伝播を抑制できることが明らかになった。しかしながら、ギャップ結合の働きを阻害した場合、細胞の生存率は期待に反して著しく低下する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Intracellular ice formation (IIF) propagates from cell to cell and causes lethal damage to the cell during the freezing process. In this study, we hypothesized that IIF passes through gap junctions between cells and that blockage of gap junctions increases cell viability after the freeze-thaw process because of the inhibited IIF propagation. Monolayer cultures of Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells on glass coverslips were preincubated with and without the gap-junction blocker heptanol and subsequently frozen at different cooling rates on a temperature-controlled stage. Microscopic observations showed that IIF propagation was successfully inhibited in the blocked group. However, cell viability in the blocked group after thawing was significantly lower than that in the non-blocked group. Although results of this study did not confirm our hypotheses, they indicated the important role of gap-junctional communication in the occurrence of IIF and the consequent cell damage.

研究分野：生体熱工学

キーワード：細胞内凍結 ギャップ結合 細胞生存率

1. 研究開始当初の背景

医療の現場では、凍結保存された種々の細胞、血液、精子、皮膚、角膜などが実用に供されている。今後は、再生医療や組織工学の急速な進歩に伴い、細胞と人工物を組み合わせた人工組織や人工臓器の凍結保存の必要性がますます高まると考えられる。さらに、平成22年7月から改正臓器移植法が施行され、臓器移植の機会は増えることが見込まれ、需要も必然的に伸びると考えられる。しかしながら、限られた比較的単純な生体組織しか凍結保存できていないのが現状である。これに対して臓器の凍結保存が可能になればドナーとレシピエントの時間的・空間的ミスマッチングの問題が解消でき、移植医療は大きく前進すると考えられる。

臓器の凍結保存を妨げている主な原因の一つは、血管系細胞の凍結解凍に対する生存率が低いことにある。なかでも、細胞内凍結 (Intracellular Ice Formation, IIF) の発生は細胞に致命的な凍結損傷を与えると考えられている[1-2]。細胞をシート状に単層培養した場合には、IIF が不規則に発生するだけでなく、細胞間を介して伝播していく様子が観察されている[3]。このような IIF の伝播は血管内皮細胞でも認められている。血管を有する生体組織をバルクで凍結解凍するのが困難なのは、この血管内皮細胞における IIF の伝播と凍結耐性の低さが原因とされている。

2. 研究の目的

そこで本研究は、臓器の凍結保存技術開発の基礎として、凍結解凍後の細胞内凍結および生存率に及ぼす細胞間接着の影響を明らかにするとともに、細胞間結合の可逆的阻害により内皮細胞の凍結耐性を飛躍的に向上させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

イヌ腎臓尿管上皮細胞株 MDCK を継代培養して使用した。培地には、10%ウシ胎児血清 (Biowest) と 1% 抗生剤 (Gibco) を含む α -MEM 培養液 (和光純薬) を用いた。MDCK 細胞を $\phi 25$ mm カバーガラス上に密度 $130\text{cells}/\text{mm}^2$ で播種し、2 日間培養したものを実験に用いた。

ギャップ結合の働きを阻害するために、培養液に 3 mM ヘプタノール (Sigma-Aldrich) を添加して試料を 30 分間培養した。このようにギャップ結合の働きを阻害した実験群を Blocked 群とした。実験対照として、ヘプタノールと同量の無水エタノールを添加した Control 群を用意した。

(2) ギャップ結合による物質輸送の確認と阻害実験

カバーガラス上に単層培養した MDCK 細胞の培養液に 0.05% Lucifer yellow (Biotium) および $15\mu\text{M}$ ヨウ化プロピジウム (PI, Molecular Probes) を添加した。細胞層に対し

て外科用メスで数か所の引っ掻き傷を加え、インキュベータ内で 30 分間培養した。その後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、倒立型蛍光顕微鏡 (TE300, Nikon) で観察した。Lucifer yellow は健全な細胞膜を透過しないが、引っ掻き傷を与えられた細胞膜から細胞内に入り黄緑色蛍光を発する。さらにギャップ結合が形成されていれば、隣接する細胞にも輸送されて蛍光を発する。一方、PI は引っ掻き傷を与えられた細胞の核を染色して赤色蛍光を発するが、ギャップ結合を介した伝播はない (scrape loading 法[4])。

(3) 凍結実験 (生存率に与える影響)

ギャップ結合の阻害が IIF の伝播に与える影響を調べるために、低温顕微鏡を用いて凍結実験を行った。Blocked 群と Control 群のそれぞれに 0.15 M NaCl 水溶液を $8\mu\text{l}$ 滴下し、その上にカバーガラス ($18\text{mm} \times 18\text{mm}$, 0.15mm 厚) を被せた。なお、この NaCl 水溶液には緩衝液として 20 mM HEPES を、細胞が潰れるのを防ぐスパーサーとしてガラスビーズ ($\phi 20\mu\text{m}$) を添加した。

試料を正立顕微鏡 (E600FN, Nikon) と顕微鏡用冷却・加熱ステージ (図 1, LK-600PM, Linkam) からなる低温顕微鏡に設置し、図 2a に示す温度履歴に従い細胞の凍結実験を行った。初期温度 37°C から $5\text{K}/\text{min}$ の速度で冷却を開始し、 -1°C にて植氷を行った。その後、1, 5, 10, 25, または $50\text{K}/\text{min}$ の 5 つの条件で -20°C まで冷却を行った。 -20°C で 5 分間保持した後、速度 $5\text{K}/\text{min}$ で 0°C まで復温させ解凍した。さらに 5 分後に再び $5\text{K}/\text{min}$ で 37°C まで復温させた。

(4) 凍結実験 (凍結パターンに与える影響)

前述 (3) と同様に -1°C まで細胞を冷却したところで凍結前の細胞の輪郭を画像撮影した (図 2b)。そのまま 3 分間温度を保持し、細胞外氷晶を発生させ、その後、 $50\text{K}/\text{min}$ の速度で -20°C まで冷却を行って IIF を発生させた。凍結過程における IIF の伝播の様子を CCD カメラ (CSDS60CM3, Toshiba Teli) により動画撮影した。

(5) IIF 発生率の解析

前述 (4) で撮影した動画を 100 フレーム (約 1.67 秒) 毎に静止画像として切り出し、IIF

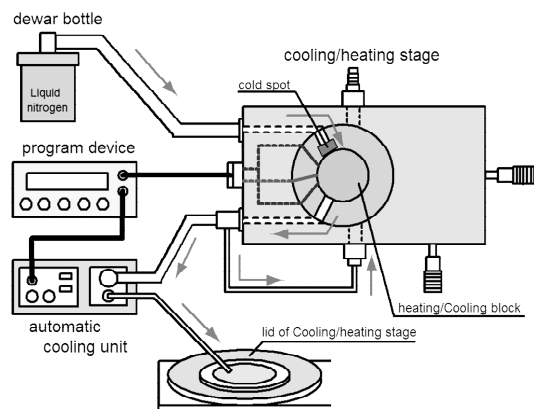


Fig. 1 Schematic of temperature controlled stage.

を生じた細胞の数を計数した。IIF を生じた細胞は細胞内氷晶の発達とともに暗化し、細胞全体が黒く観察される（フラッシング）。なお、IIF の発生率は、IIF が発生した細胞の数を画像内細胞数で除し算出した。

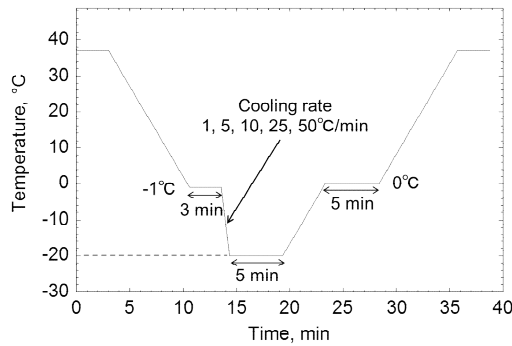


Fig. 2a Temperature history of freezing.

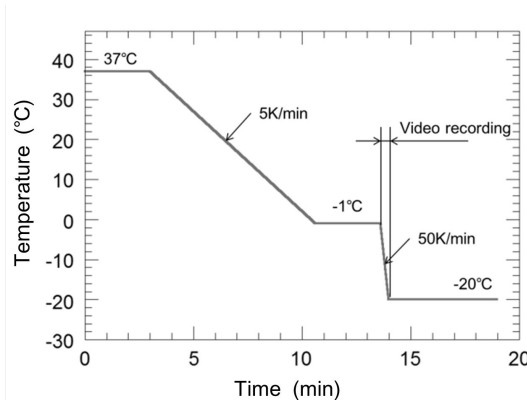


Fig. 2b Temperature history of freezing.

4. 研究成果

(1) ギャップ結合による物質輸送の確認と阻害実験

ギャップ結合の機能を蛍光色素の物質輸送によって調べた結果を図3に示す。いずれの実験群も、引っ掻き傷に沿った細胞の核はPIによって染色されていた。また、これらの細胞はLucifer yellow による黄緑色蛍光も発しており、蛍光色素が損傷を受けた細胞膜を通過して細胞内に拡散したことが示された。

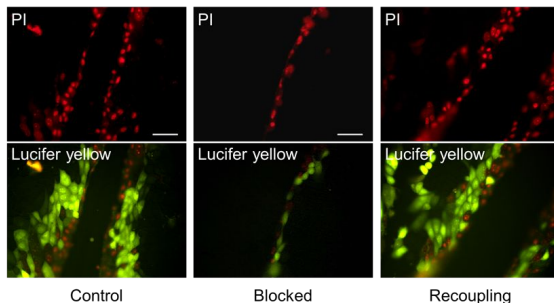


Fig. 3 Fluorescence micrographs of PI-positive scraped cells and transfer of Lucifer yellow dye via gap-junctional coupling between MDCK cells. Bar: 100 μ m.

Control 群では、これらの細胞に隣接する細胞でも Lucifer yellow による黄緑色蛍光が観察された。これは、ギャップ結合を介して蛍光色素が隣接細胞へ拡散したことを示す。一方、ギャップ結合の機能を阻害した Blocked 群では、Lucifer yellow は直接引っ掻き傷を受けた細胞に留まり、隣接細胞への伝播は認められなかった。

(2) 凍結実験（生存率に与える影響）

冷却速度 5、または 25 K/min で凍結させた MDCK 細胞の蛍光染色の結果を図4および図5にそれぞれ示す。5 K/min の緩慢な冷却条件では、Control 群、Blocked 群のいずれも細胞内凍結の発生がほとんど認められなかった。Calcein と PI を用いた染色像からは、Control 群に比べて Block 群で生細胞数が非常に少ないことが分かった（図6）。25 K/min の比較的急速な冷却条件では、両群で細胞内凍結の発生が観察された。Control 群では各所で発生した細胞内凍結が隣接細胞に伝播していく様子が見られたが、Blocked 群では細胞内凍結がランダムな箇所でも単発的に発生するだけであった。この Blocked 群では、解凍後に生細胞がほとんど認められなかった。

(3) 凍結実験（凍結パターンに与える影響）

冷却速度 50 K/min で凍結させた MDCK 細胞において、最初の IIF が発生した時刻から 1.7 秒、5.0 秒、6.7 秒、15.0 秒経過後における細胞の様子を図7に示す。なお、内部が暗転した細胞を IIF を生じた細胞と定義し、緑色に塗り分けて示す。IIF 初出からの時間経過とともに Control 群、Blocked 群の両群で IIF を生じた細胞は増加した。IIF が発生した細胞の数は、最初の約 5 秒間は Control 群の方が多かったが、その後は Control 群の方が上回った。冷却ステージの温度が -20°C に達する 15 秒経過後までには、両群ともにほぼ全ての細胞が IIF を生じていた。さらに、凍結実験中の動画観察によると、両群の IIF 伝播の様子に明らかな違いが認められた。Control 群では、単発的に IIF を生じた細胞を起点とし、周囲の隣接する細胞に IIF が連続的に伝わっていく様子が確認された。一方、Blocked 群は、Control 群と同様に単発的な IIF の発生が認められたものの、隣接する細胞に伝播する IIF は限定的であった。

静止画像を 100 フレームおきに IIF を起した細胞数を計数し、ステージ温度で IIF の発生率を整理した結果を図8に示す。Control 群では、最初の IIF を生じた直後から IIF 発生率は急激に増加し、 -18°C でほぼ 100% に漸近した。一方、Blocked 群では IIF 発生率の増加は Control 群と比較して緩やかであり、撮影視野におけるすべての細胞に IIF が伝播したのは -20°C であった。両群を比較すると Blocked 群よりも Control 群の方が常に IIF 発生率は高かった。Control 群の IIF の急激な増加は IIF の隣接細胞への伝播を示す、一方、Blocked 群での緩慢な発生率の増加は、

単発的な IIF の蓄積が支配的であることを示している。

ギャップ結合は、水溶性の小さなイオンや 1 kDa 以下の分子を通過させることができるため、Ca²⁺シグナリングによる細胞の力学応答に寄与していること[5]、アポトーシス促進シグナリングの経路となっていること[6]が報告されており、細胞間の物質輸送を担っていることが知られている。凍結実験の動画解析および IIF 発生率の比較から、細胞間結合の一種であるギャップ結合をヘプタノールで阻害することで隣接する細胞への IIF 伝播を抑制できることが明らかになった。これは、ギャップ結合が IIF の伝播経路になっている可能性を示唆している。

本研究では、細胞にとって致命的と言われている IIF がギャップ結合を介して伝播すると考え、ギャップ結合の可逆的阻害を行うことで凍結・解凍後の細胞生存率の向上に繋がることを期待し実験を行ってきた。予想通り、ギャップ結合を阻害することで IIF の伝播パターンが変わり、IIF の細胞間伝播を抑制させることが可能になった。しかしながら、ギャップ結合の働きを阻害した Blocked 群では、細胞の生存率は期待に反して著しく低下する結果が得られている。このメカニズムの詳細は本研究では明らかにできなかったが、今後、IIF の発生のみならず、凍結実験時における細胞の脱水・収縮過程の観察、植氷温度や凍結温度が伝播パターンに与える影響を調査し、細胞の凍結・解凍時におけるギャップ結合の重要性を明らかにすることで、細胞の凍結耐性を向上させる知見を得ることにつながる。

<引用文献>

- [1] Z. Higgins, et al., Biophysical Journal, Vol.105, No.8 (2013), pp.2006-2015.
- [2] K. Muldrew, et al., Biophysical Journal, Vol.57, No.9 (1990), pp.525-532.
- [3] J.P. Acker, et al., Biophysical Journal, Vol. 81, No. 3 (2001), pp.1389-1397.
- [4] Spanakis SG, et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. Vol. 39, No.8 (1998), pp. 1320-1328.
- [5] M. Junkin, et al., Biomaterials, Vol. 34, No.8 (2013), pp.2049-2056.
- [6] P. Kameritsch, et al., Cell Death Dis, Vol. 4 (2013), e584.

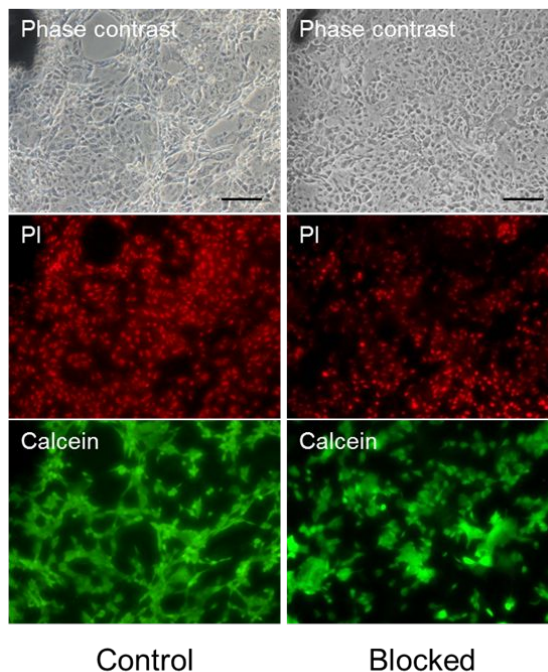


Fig. 4 Distribution of PI-positive dead cells and calcein-positive live cells in monolayers of MDCK cells cooled to -20°C at 1 K/min. Bar: 100 μm .

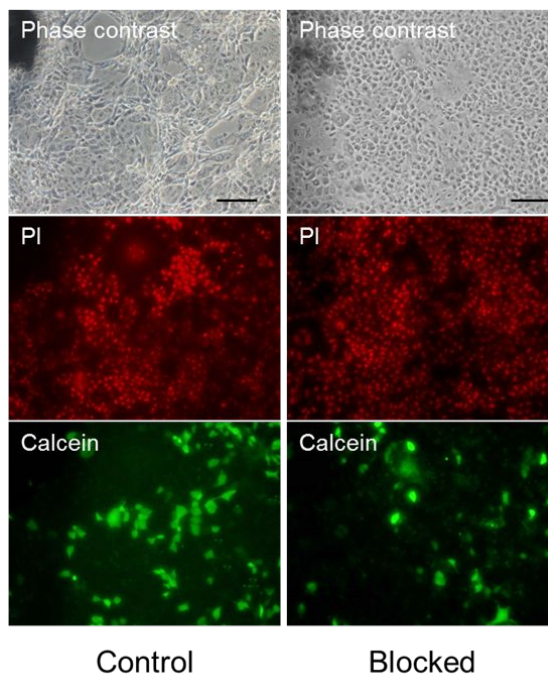


Fig. 5 Distribution of PI-positive dead cells and calcein-positive live cells in monolayers of MDCK cells cooled to -20°C at cooling rates of 25 K/min. Bar: 100 μm .

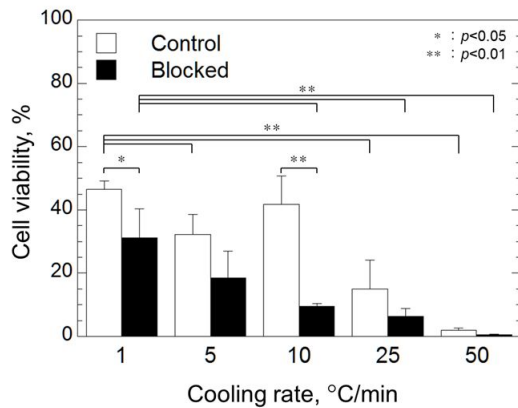


Fig. 6. Cell viability after the freeze-thaw process with different cooling rates.

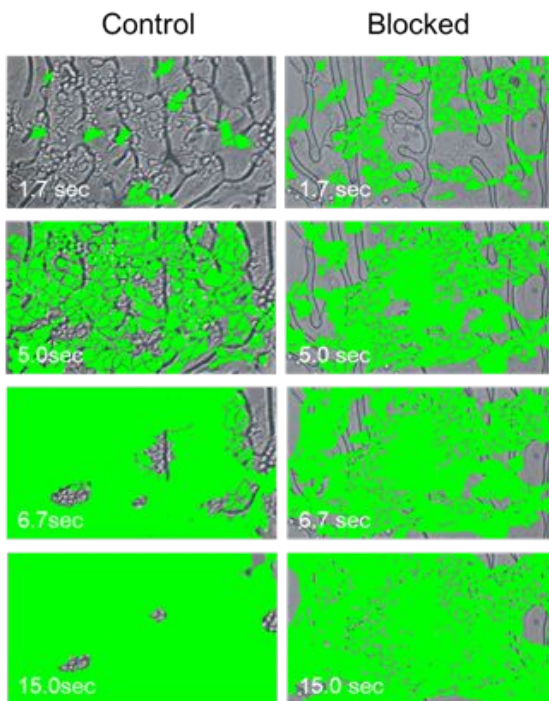


Fig. 7 Microscopic images of propagation of IIF.

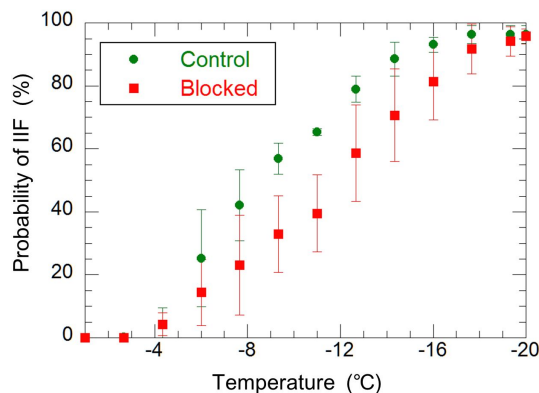


Fig. 8 Probability of IIF as a function of temperature.

5. 主な発表論文等

- (1) 久保啓杜, 福永鷹信, 藏田耕作, 高松洋, 細胞内凍結の発生が細胞生存率に与える影響, 日本機械学会九州学生会第 45 回卒業研究発表講演会論文集, 2014.3.4, 九州大学 (福岡県・福岡市).
- (2) 南島茂枝, 福永鷹信, 藏田耕作, 高松洋, ギャップ結合を介した物質輸送が細胞内凍結の伝播に与える影響, 日本機械学会九州学生会第 46 回卒業研究発表講演会論文集, 2015.3.3, 北九州高専 (福岡県・北九州市).
- (3) 福永鷹信, 南島茂枝, 平原豪人, 藏田耕作, 高松洋, 第 52 回日本伝熱シンポジウム, 2015.6.3-5, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
- (4) Takanobu FUKUNAGA, Hiroto KUBO, Kosaku KURATA, Hideto HIRAHARA, Hai-dong WANG, Hiroshi TAKAMATSU, Effect of gap-junctional cell-to-cell communication on intracellular ice propagation and consequent cell viability, *The 24th IIR international congress of refrigeration*, 2015.8.16-22, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

[学会発表](計 4 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

福永 鷹信 (FUKUNAGA TAKANOBU)
九州大学・大学院工学研究院・技術職員
研究者番号：60591196