

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670572

研究課題名(和文) シャペロン分子により生存シグナルを増強させる画期的な肝グラフト修復法の開発

研究課題名(英文) Novel methods to regulate hepatic graft by extracorporeal perfusion : Chaperone mediated mechanisms

研究代表者

嶋村 剛 (Shimamura, Tsuyoshi)

北海道大学・大学病院・准教授

研究者番号：00333617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞株に14-3-3 を遺伝子導入によって強発現させ、低温酸素化灌流を模した低温酸素化状態に静置し、細胞障害とエネルギー代謝に対する影響を精査した。14-3-3 は低温下でATP産生、MTT代謝を促進し、ミトコンドリア膜電位を高値に保った。14-3-3 の発現増強は低分子化合物でも可能であり、臓器灌流時に併用することで臓器を修復できる可能性が示唆された。また、NaHSによりAktのリン酸化、HO-1、TRX1の発現が増強され、14-3-3 発現増強物質との併用により、上記の "強く生きる" 能力の全てが増強された。権利化、実用化を念頭に向けてメカニズムと臓器レベルでの効果を検証中である。

研究成果の概要(英文)：The role of 14-3-3 zeta on the cellular injury and energy production during and after hypothermic storage with or without oxygen, using mouse hepatocytes derived cell line (AML12). 14-3-3 zeta overexpression was introduced by gene delivery or some small molecule. After confirmation of 14-3-3 zeta protein level, cells were subjected to hypothermic oxygenate condition mimicking the cellular environment during organ perfusion. Combination of 14-3-3 zeta inducing molecule and hydrogen sulfide strengthen the mitochondrial functions related to oxidative phosphorylation, drug (MTT) metabolism, and antioxidant ability, due to the prevention of protein dephosphorylation (14-3-3) and stimulation of ARE-binding transcription factors (NaHS). These results revealed novel strategy to pre-condition the marginal graft not by gene delivery but by transcriptional and post-translational regulations.

研究分野：移植外科

キーワード：移植・再生医療 外科 発現制御 臓器灌流

1. 研究開始当初の背景

[灌流保存の必要性]

低温酸素化灌流 (Hypothermic Oxygenated Perfusion; HOPE) は好気代謝、washout等の複合効果による臓器 “修復法” である (Bon *Nature Rev Nephrol* 2012)。ラット脂肪肝、心停止肝 (Dutkowski *Ann Surg* 2006)、臨床の腎移植 (Moers *N Engl J Med* 2012)、肝移植 (Guarrera *Am J Transplant* 2010) で奏功した。しかし、好気代謝に伴う酸化ストレスは却って傷害することが懸念され、HOPEに適した灌流液の組成や灌流条件の検討が必要である。

[臓器灌流のための新技術開発]

われわれは新規保存液 (新液) を作成し、ラット心臓の冷保存・移植モデルを用いてその有効性を確認した。移植後のグラフト生存率、壊死領域、移植後経時的心エコーによる収縮力の評価等により、新液は UW 液を凌駕する保護効果を発揮し、エネルギー代謝の中核であるミトコンドリア保護が主作用と推測された。しかし、心筋の代謝物解析やタンパク解析の結果、細胞のエネルギー産生促進、細胞の生死、炎症に関わるタンパクが統合的、合目的的に制御され、単一の作用点では説明が困難であった。

ミトコンドリアを標的とした薬物投与の有用性は知られているが、臓器保存のような機能低下状態では毒性増強が懸念される。われわれは、薬物代謝負荷になりにくい硫化水素、水素ガスの効果を検討し、肝虚血再灌流障害の軽減、有用性を見出した (Shimada et al. 2015. *Surgery Today*; Shimada et al. 2016. *Artificial Organs*)。それらの検討では、再灌流後早期の保護効果は、医用ガスによる直接的な抗酸化、血管拡張作用が主作用と考えられた。一方で、*in vivo* 虚血再灌流では再灌流後 6 時間以降に Nrf2 の活性化、HO-1、TRX1 の発現増強が確認され、再灌流直前に投与した NaHS が Nrf2、Stat3 の核内移行を促進することが明らかになった。しかし、この作用が臓器灌流のように低温、あるいは、血液の存在しない、等の条件下で同様に起こるかは明らかではない。

[研究の概要]

本研究は肝移植における心停止ドナー肝を体外で修復する方法を確立し、グラフト修復における 14-3-3 の役割を明らかにするための基礎的研究である。肝細胞株を用いて 14-3-3 を強発現、ノックダウンし、冷保存障害への関与を明らかにし、グラフト修復のための至適なコンディショニング法を明らかにするものである。

2. 研究の目的

ラットの肝臓あるいは肝細胞において冷保存、低温酸素化灌流における抗酸化物、抗酸化酵素発現誘導刺激等が実際に細胞保護効果を発揮するのか、また、その作用点、シ

グナル伝達を精査し、新たな臓器修復法の確立を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) タンパク発現の制御 (*In vitro*)

遺伝子導入の効率、タンパク発現に要する時間を知るために、マウス肝細胞株 (AML12) に pCMV-mCherry-14-3-3 (プラスミドベクター) を投与し、mCherry 発現の推移を蛍光顕微鏡で観察した。また、フローサイトメトリーで mCherry-14-3-3 陽性細胞をソーティングし、限界希釈により選択的に増やしストックした。

同様の検討を 17, 27 でも行い、温度の影響を評価した。さらに、同様の検討を培養液の替りに UW 液で検討し、17-37 における遺伝子導入、タンパク発現の実現可能性を検証した。

薬物によるコンディショニング:

14-3-3 の発現を増強する可能性がある 4 種類の薬物の効果をスクリーニングした。AML12 を通常培養し、各種濃度の薬物を添加し、1, 3, 6, 12, 24 時間後に細胞を回収し、細胞質、核のタンパクを抽出した。同様の検討を硫化水素ナトリウム (NaHS) を添加した細胞でも行った。

評価項目

タンパクの発現量とリン酸化の動態は SDS-PAGE, Immuno blot で評価した。細胞質の 14-3-3 量、Akt 活性、核の Nrf2、Stat3、AP-1 の量をまず評価した。さらに、生存、細胞死、炎症、エネルギー代謝、抗酸化に関わるタンパクの発現量、リン酸化を評価した。生存シグナルは Akt のリン酸化を正負に制御する 14-3-3、PI3k、PDK1、PTEN、PP2A、mTOR、下流のタンパク (Bad, Bid, PFKFB2、p70S6k、IKK) を評価した。

生細胞率・死細胞率はストレス負荷、薬物投与後に上清と残存細胞の破碎懸濁液の LDH 活性を測定し算出した。アポトーシス、ネクローシス比は アネキシン V (AlexaFluor488®: 緑)、PI (赤)、Hoechst33248 (青) の蛍光 3 重染色により、アポトーシス、ネクローシス、生細胞を染色し、蛍光顕微鏡で各々の細胞数を計測し、総細胞数に占める割合を算出した。

ミトコンドリア機能は Luciferin/Luciferase 化学発光法による ATP 量は測定、HPLC 法による Adenine nucleotides、Purine catabolites の定量、MTT assay、JC-1 蛍光プローブによるミトコンドリア膜電位により評価した。

(2) 14-3-3 による冷保存障害の軽減

14-3-3 を安定強発現する AML12 (AML12) と元株 (AML12) を UW 液中に大気下 (酸素溶存状態) で 72 時間低温保存し、死

細胞率、生細胞当たりのミトコンドリア機能 (ATP 量、MTT 代謝能) を評価した。

低温酸素化下で GAPDH 阻害剤 (Iodoacetic acid; IAA)、電子伝達系複合体 ~ 阻害剤 (Rotenone, アンチマイシン、シアン化カリウム)、ミトコンドリア脱共役剤 (FCCP)、オートファジー阻害剤 (E64d, Leupeptin, CPD18) 等を添加し、それらの影響を評価した。

4. 研究成果

(1) タンパク発現の制御

AML12 に pCMV-mCherry-14-3-3 (プラスミドベクター) を投与すると、24 時間後には mCherry-14-3-3 の発現が確認されたが、Lenti-ZsGreen-IRES-14-3-3 (レンチウイルスベクター) を使用しても導入効率はほとんど変わらなかった。これらの遺伝子導入はリポフェクション法でもエレクトロポレーション法でも効率は大きくは変わらず、27 以下ではさらに導入効率が低下した。

14-3-3 の一過性強発現細胞を用いて 14-3-3 の機能を解析するために、多量に調製、同一ロットのプラスミドを多量にストックし、遺伝子導入に使用した。安定高発現株の作成は、フローサイトメトリーで ZsGreen あるいは mCherry 発現細胞をソーティングし、限界希釈培養により増殖させた。遺伝子導入を 37 で、リポフェクション法で行うと、タンパク発現を増強できたが、精密に制御することは困難であった。27 以下では事実上タンパクの発現量、期間を制御することは不可能であった。

遺伝子発現の制御は温度に強く依存し、各種温度での臓器灌流への応用を考慮すると、温度条件の検討が重要と考えられた。

次に転写活性因子の活性を制御し、タンパクの発現を制御し得るかを検討した。

NaHS はマウス肝臓 (in vivo) や、ヒト尿細管上皮細胞株を用いた検討では、Akt のリン酸化、ARE に結合する転写活性因子の核内移行を促進し、HO-1, TRX1 等の抗酸化タンパクの発現を増強することを別の project で確認してきた。同様の検討を AML12 で行うと、NAHS の投与後 1-3 時間で Nrf2 の核内移行が促進され、HO-1, TRX-1 の発現が増強した。Akt のリン酸化も予想通り増強された。

薬物 A は添加後 1 時間で 14-3-3 の発現を増強させ、3 時間では 5 倍以上に増加させた。24 時間の時点でも発現量は 2 倍以上の増加であった。薬物 A と NaHS の併用により、生存シグナル、増殖シグナルが増強された。

これらの結果から、薬物 A を冷保存の 1-3 時間前に投与することで、グラフト内の 14-3-3 の発現量を増加させられると考

えられた。また、37 での酸素化体外修復灌流の際に、1-3 時間投与することが有用と推測された。14-3-3 は Akt をはじめとする 200 種類を超える 14-3-3 結合モチーフを持つタンパクと結合し、そのリン酸化 Aer/Thr を覆い隠し、phosphatase による脱リン酸化作用を減弱させるシャペロンである。その結合パートナーは生存、エネルギー産生、増殖、細胞骨格制御、オートファジー等多岐に渡り、これらのかけ離れた反応系を合目的的、統合的に制御するマスターレギュレーターと言える。

今回の検討結果から、転写活性因子の活性制御 (NaHS) とタンパクのリン酸化状態の制御 (翻訳後修飾; 薬物 A) によって、細胞生存、エネルギー代謝等を “元気に生きる” 方向に制御できることが証明された。他の細胞でも同様の効果が見られたことから、細胞種を問わない普遍的な方法論になることが期待される結果であった。

一方で、14-3-3、Akt 等の “元気に生きる” ための生体機能は臓器保存においては有用だが、癌細胞では悪性を増強する厄介者となる。移植の原疾患が癌の場合には、循環腫瘍細胞に対する効果、グラフトの発癌に対する促進因子とならないかを慎重に検討する必要がある。そのような視点からも、体外灌流で臓器のみをコンディショニングするのは安全性が高く、血液・血球成分を介さずに薬剤の拡散浸透で効果を発揮するところにも意義がある。

(2) 14-3-3 による冷保存障害の軽減

低温酸素化状態は冷保存ではなく低温酸素灌流の際の細胞環境を mimic したものである。元株では低温酸素化 72 時間以上では ATP 量が減少し、ミトコンドリア膜電位が低下し、死細胞が増加した。一方、14-3-3 高発現株では低温酸素化時間の延長と共に ATP 量が増加し、ミトコンドリア膜電位は高値を維持した。これらの結果は尿細管上皮細胞でも認められており、14-3-3 の機能の普遍性が示唆された。

UW 液の前世代のユーロコリンズ液にはグルコースが含まれていたため、冷保存時に解糖が促進され、乳酸アシドーシスを呈した。これを軽減するため、UW 液にはエネルギー産生基質が含まれていない。本実験では尿細管上皮細胞での検討と同様に、酸素化時にのみ低温下でも ATP が増加し、14-3-3 高発現株では著明に増加した。この ATP 増加はオートファゴリソソームプロテアーゼの阻害で完全に消失したことから、オートファジーによるアミノ酸の供給が主要なメカニズムであることが示唆された。

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)

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Shingo Shimada, Kenji Wakayama, Moto Fukai, Tsuyoshi Shimamura, Takahisa Ishikawa, Daisuke Fukumori, Kenichiro Yamashita, Taichi Kimura, Satoru Todo, Ikuro Ohsawa, Akinobu Taketomi : Hydrogen gas ameliorates hepatic reperfusion injury after prolonged cold preservation in isolated perfused rat liver. *Artificial Organs*, 査読有, 40(12):1128-1136, 2016
2. Fukai M, Kobayashi N, Ishikawa T, Wakayama K, Shimada S, Umemoto K, Ohtani S, Fujiyoshi M, Yamashita K, Shimamura T, and Taketomi A: 14-3-3 -mediated stimulation of oxidative phosphorylation exacerbates oxidative damage under hypothermic oxygenated conditions in human renal tubular cells (HK-2). *Transplant Proc.*, 査読有, 48(4):1288-1291, 2016
3. 深井原, 島田慎吾, 小林希, 石川隆壽, 梅本浩平, 大谷晋太郎, 山下健一郎, 嶋村剛, 武富紹信: 低温酸素化状態におけるタンパク機能制御. *Organ Biology*, 査読無, 23(2): 173-179, 2016
4. Shimada S, Fukai M, Wakayama K, Ishikawa T, Kobayashi N, Kimura T, Yamashita K, Kamiyama T, Shimamura T, Taketomi A, Todo S: Hydrogen sulfide augments survival signals in warm ischemia and reperfusion of the mouse liver. *Surgery Today*, 査読有, 45(7):892-903, 2015
5. Masahiko Taniguchi, Tsuyoshi Shimamura, Satoru Todo, Hiroyuki Furukawa: Small-for-size syndrome in living-donor liver transplantation using a left lobe graft. *Surgery Today*, 査読有, 45(6):663-671, 2015
6. Toshiya Kamiyama, Hideki Yokoo, Tatsuhiko Kakisaka, Tatsuya Orimo, Kenji Wakayama, Hirofumi Kamachi, Yosuke Tsuruga, Kenichiro Yamashita, Tsuyoshi Shimamura, Satoru Todo and Akinobu Taketomi: Multiplication of alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence-II is a powerful predictor of prognosis and recurrence in hepatocellular carcinoma patients after a hepatectomy. *Hepatology research*, 査読有, 45(10):E21-E31, 2015
7. 嶋村剛, 藤堂省: 肝移植. 消化器外科, 査読無, 38(6):921-930, 2015
8. 深井原, 島田慎吾, 若山顕治, 石川隆壽, 嶋村剛, 山下健一郎, 武富紹信: 臓器保

存におけるオートファジーの病態と評価法, 査読無, *Organ Biology* 22(2):26-31, 2015

9. 嶋村剛, 太田稔, 山下健一郎: 薬物性劇症肝不全に対する肝移植. *肝胆膵*, 査読無, 68(2):272-278, 2014
10. 深井原, 嶋村剛, 武富紹信: よりよい臓器灌流のための臓器保存法と再灌流時治療. 重水, 水素, ヘリウム, 生物活性. *Organ Biology*, 査読無, 21(2):159-165, 2014

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 橋本咲月, 深井原, 梅本浩平, 木村太二, 大谷晋太郎, 中藪拓哉, 早坂孝宏, 三野和宏, 惠淑萍, 千葉仁志, 嶋村剛, 武富紹信: 質量分析イメージング法 (IMS) 阻血再灌流における新規予後予測マーカーの探索. 第29回 代用臓器・再生医学研究会 かでる2・7 (北海道札幌市), 2017.2.25
2. 深井原, 島田慎吾, 小林希, 梅本浩平, 大谷晋太郎, 中藪拓哉, 三野和宏, 山下健一郎, 嶋村剛, 武富紹信: 臓器灌流法の先にあるべき技術の開発. 第43回 日本臓器保存生物医学学会学術集会 東京薬科大学 (東京都八王子市), 2016.11.26 (シンポジウム)
3. 嶋村剛, 古川博之, 藤堂省: 脳死肝移植を増やすために今できること: 北海道における臓器提供・移植医療の理解に向けた取り組み. 第34回 日本肝移植研究会大雪アリーナ (北海道旭川市) 2016.7.7 (パネルディスカッション)
4. Fukai M, Ishikawa T, Wakayama K, Shimada S, Fujiyoshi M, Kimura T, Yamashita K, Shimamura T, Taketomi A: Time course of autophagy and oxidative phosphorylation during hypothermic oxygenated conditions and subsequent re-warming in human renal tubular cell line (HK2). *Transplantation Science Symposium Asian Regional Meeting 2016 (TSS)*, KFC ホール (東京都墨田区), 8 April 2016

〔図書〕(計 0 件)

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

手術動画

Tsuyoshi Shimamura, Toshiya Kamiyama,
Satoru Todo: Open Hepatic Left Lateral
Sectionectomy for Live Donor
Transplantation. ACS Multimedia Atlas of
Surgery: Liver Surgery Volume, 2014
American College of Surgeons

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋村 剛 (SHIMAMURA TSUYOSHI)
北海道大学・北海道大学病院・准教授
研究者番号： 00333617

(2) 研究分担者

深井 原 (FUKAI MOTO)
北海道大学・医学研究科・特任助教
研究者番号： 60374344

木村 太一 (KIMURA TAICHI)
北海道大学・医学研究科・特任助教
研究者番号： 90435959