

# 水素の反応制御による肝低温・低酸素/復温・再酸素化傷害の軽減

深井 原 [ 北海道大学病院 / 医員 ]

## 背景・目的

移植待機患者の死亡が増加しており、阻血再灌流傷害を受けやすい脂肪肝や心臓死ドナーからの安全な移植が模索されている。肝の冷保存中には、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇、 $\text{Na}^{+}$ と水の流入、アクチンの脱重合が促進される。他の細胞種では重水は - を抑制し、また、肝、腎、大動脈内皮の冷保存傷害を軽減する。しかし - と細胞保護の関係は解明されていない。

本研究の目的は、重水の 1)低温保存 2)低温・低酸素/復温・再酸素化 (CH/WR) に対する細胞保護効果を明らかにし、今後の精査の根拠を提示することである。

## 内容・方法

方法: 細胞は16時間前培養した後、DMEM、FBS(-)、 $\text{D}_2\text{O}$ (0)培地あるいは重水を含む培地に交換した。低酸素曝露チャンバーに静置し、95%  $\text{N}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$ で通気後にクランプした。

1)<肝細胞株AML12の低温傷害>

大気下で4、72時間まで静置。

2)<AML12のCH/WR>

低酸素下で4、12時間静置し、通常の培養液に交換。37 で培養し、12時間静置。

3)<マクロファージ株との混合培養でのAML12の低酸素(4時間)再酸素化(37)WH/WR>

AML12は培養皿に、RAW264.7細胞はスライドグラスに培養し、細胞数は4:1とした。低酸素、37 で静置。4時間後に培養液に交換、37 で通常通りに培養し、12時間後に評価。

評価項目: エンドポイントで培地上清のLDH活性を測定し、MTT assayで残存細胞のviabilityを評価した。

## 結果・成果

結果

1)AML12の低温(4)曝露による傷害

重水不含メディアで72時間まで低温保存すると、時間依存的に細胞が傷害され、LDH上昇、MTT assayの低下を認めた。これらの評価項目は重水含有培地では改善された。

2)AML12のCH/WR

重水不含メディアでCH/WRすると、再酸素化後に急激に細胞が傷害され、LDH上昇、MTT assayの低下を認めた。これらの評価項目は重水含有培地では改善された。

3)混合培養系での肝細胞株のWH/WR

上清LDHによって傷害を評価すると、低酸素中の傷害はおのおの単独ではごく軽度であったが、混合培養により約3.8倍に増加した。再酸素化後1時間、6時間でも同様に、混合培養は2-3倍強く傷害された。本モデルでは重水の効果はみていない。マクロファージと肝細胞の相互作用に対する重水の作用は今後の重要な検討課題である。

## 重水の効果と成果に関する考察

上記1)2)に対して重水含有培養液を用いて細胞保護効果を検討した。また、バッファー、糖、重水を含む臓器保存液を作成し、同様の検討を行った。重水は一定の濃度域で低温保存、低温・低酸素/復温・再酸素化傷害を軽減する可能性が示唆された。しかし、高濃度では細胞傷害は軽減されず、むしろ増悪した。高濃度の重水は多数の水で水和することによってアクチンやチューブリンをはじめとするタンパク質の構造を安定化させることが知られており、これが細胞分裂を阻害して、腫瘍増殖を抑制することが知られている。しかし、肝の再生、生存のためには、冷保存中にはタンパク、細胞骨格が保護され、再灌流後には速やかに重水がwash outされることが望ましい。したがって、冷保存中の至適濃度、毒性濃度を把握することが重要である。肝、腎、大動脈内皮の冷保存モデルでの奏効性は既に報告されている。

今回の実験で、至適濃度、適応疾患(細胞、組織、臓器)を評価するための、細胞レベルのモデルが完成した。また、細胞培養で一般的に使用されるある種の成分を重水含有臓器保存液に添加することで、細胞保護効果が格段に高まることも明らかになった。奏効メカニズム(細胞骨格、嫌気代謝、イオンおよび水の移動、トンネル反応制御など)について、詳細に評価するための基礎検討も進行している。"用途の明確化とメカニズムについて、進歩性の提示"を行い、特許出願に向けて、さらに詳細な解析を進めていくための準備が整ったことが、本研究の最大の成果と考えられる。

## 今後の展望

心、肺、小腸、腎、肝の一括摘出、冷保存し、冷保存中の傷害を評価するモデルおよびそれらの臓器を酸素化したバッファーで定圧体外灌流を行い、再灌流傷害を評価するモデルを現在、作成中である。脳、心の阻血再灌流傷害をin vivoで軽減するかを検討する。肝では培養細胞、肝体外灌流、ラット移植モデルを用いて、嫌気代謝、アクチン細胞骨格、水、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ に対する重水の効果を遺伝子から個体のレベルまでの検証を2年以内に達成することを目標とする。最終的には予算が許せば、大動物の肝、腎、小腸移植モデルで臨床応用の可能性を評価したい。