

令和元年6月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09203

研究課題名(和文)細胞外障害ミトコンドリアを起点とし敗血症病態の解明に迫る

研究課題名(英文)Extrusion of mitochondrial contents from lipopolysaccharide-stimulated cells.

研究代表者

鷓沼 香奈 (UNUMA, Kana)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：30586425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、LPS投与した肝細胞において、ミトコンドリア障害やオートファジー-リソソーム系による障害ミトコンドリアの除去、細胞外ミトコンドリアDNAおよびミトコンドリアタンパク発現の増加を確認した。また、ラット初代培養肝細胞ならびにマウス胚性線維芽細胞(MEF)において、LPS刺激により、オートリソソーム内腔に存在するミトコンドリアタンパクの分泌を伴うが、オートリソソーム膜タンパク質の分泌は伴わないことを明らかにした。さらに、炎症性サイトカインIL1B / interleukin-1 の誘導し精製ミトコンドリアを直接曝露した場合、多核白血球が活性化することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、敗血症病態のヒト血漿中でミトコンドリアに豊富に存在するタンパク発現が増加することなどは知れていたが、多くは逸脱と考えられていた。本研究では、単離白血球に精製ミトコンドリアを曝露したところ、炎症性サイトカインが産生されたことや、細胞膜が破綻しない段階で細胞外に障害ミトコンドリアが確認されたことから、その一部が能動的なメカニズムを介していることが明らかになることができたのは学術的意義があることと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, in the liver of sepsis, elimination of damaged mitochondria through the autophagy-lysosome system and increased appearance of mitochondrial DNA in plasma were confirmed. Moreover, we provide evidence for the secretion of mitochondrial proteins and DNA from lipopolysaccharide (LPS)-stimulated rat hepatocytes as well as mouse embryonic fibroblasts (MEFs). The secretion of mitochondrial contents is accompanied by the secretion of proteins that reside in the luminal space of autolysosomes, but not by a lysosomal membrane protein. The pharmacological inhibition of autophagy and Atg5(-/-) MEFs blocks the secretion of mitochondrial constituents from LPS-stimulated cells. Furthermore, we show that direct exposure of purified mitochondria activates polymorphonuclear leukocytes, as evident by the induction of IL1B/interleukin-1, a pro-inflammatory cytokine.

研究分野：法医学

キーワード：LPS autophagy hepatocyte mitochondria lysosomal exocytosis; 敗血症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臨床医学、基礎医学の発展にもかかわらず、敗血症性多臓器不全による死亡率はいまだに高い水準にあり、早期診断や効果的な治療方法の確立が求められている。敗血症は感染した病原菌などが血流にはいりサイトカインが高産生され、免疫細胞が異常に活性化された病態である。ただし、この炎症性サイトカインの血中濃度は、敗血症早期に収束することが知られている。したがって、敗血症で遷延する臓器障害の原因としては、持続するミトコンドリアの機能低下などがその本態として想定されている。我々はこれまでに心臓、肺、水晶体などをはじめ多臓器において、敗血症病態における活性酸素種の集積、ミトコンドリア障害、オートファジー-リソソーム系による障害ミトコンドリアの除去などについて、研究を進めてきた。一方、敗血症患者やモデル動物の血漿中に、ミトコンドリアDNAやミトコンドリアタンパクの発現が増加することも知られていた。我々は、大腸菌などのグラム陰性菌の細胞壁成分であるリポポリサッカリドを処理したラットの肝臓において、血管内や血管近傍に変性して電子密度の高いミトコンドリアの集簇することが明らかになり、何らかの能動的メカニズムが背景にあるのではないかと注目した。

2. 研究の目的

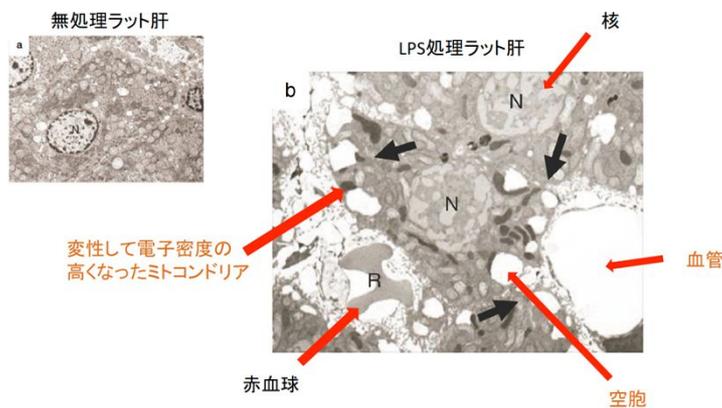
本研究では、障害ミトコンドリアの細胞外分泌には何らかの能動的メカニズムが関与しているのではないかと仮説をたて、それを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

まず、LPS 投与したラット初代培養肝細胞ならびにマウス胚性線維芽細胞(MEF)において、ミトコンドリア障害、オートファジー-リソソーム系の活性化を阻害した場合、細胞外ミトコンドリアDNAおよびミトコンドリアタンパク発現に変動があるかを明らかにする。さらに、単離白血球に精製ミトコンドリアを曝露し、炎症応答などにどのような変化が現れるかを生化学的、組織学的手法を用いて解析した。

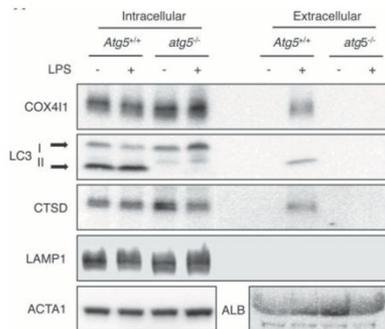
4. 研究成果

大腸菌などのグラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖(LPS)を投与し敗血症モデルとした。

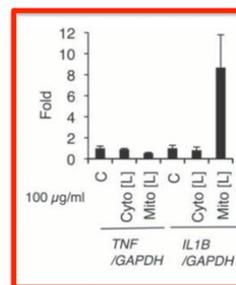
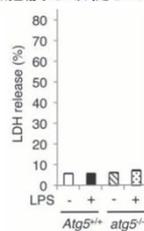


LPS 処理群の初代培養肝細胞では、血管内や血管近傍に変性して電子密度の高くなったミトコンドリアが集簇していた。

LPS を投与した肝細胞においては、細胞膜は破綻していない段階にもかかわらず、細胞外へのミトコンドリア DNA およびタンパク発現増加が確認された。また、LPS 投与群では、オートリソソーム内腔のタンパクの細胞外発現増加は見られるものの、膜タンパクにはほとんど変動がないことが明らかになった。さらに 3MA を用いた薬剤によるオートファジー阻害に加え、Atg5^{-/-} (オートファジー-KO 細胞) を用いて細胞外ミトコンドリア DNA やタンパク変動を確認した。その結果、いずれの群においても、これらの効果がキャンセルされることが明らかになった。

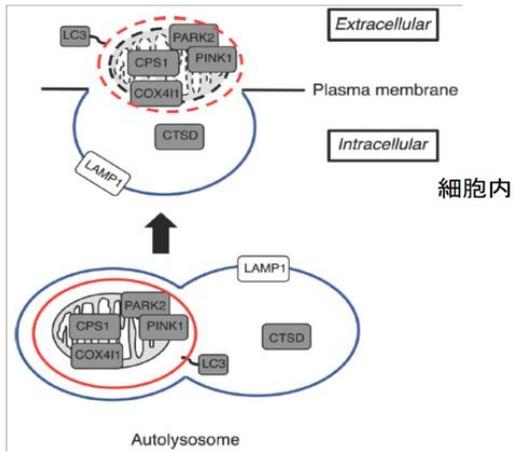


細胞膜は破綻していない



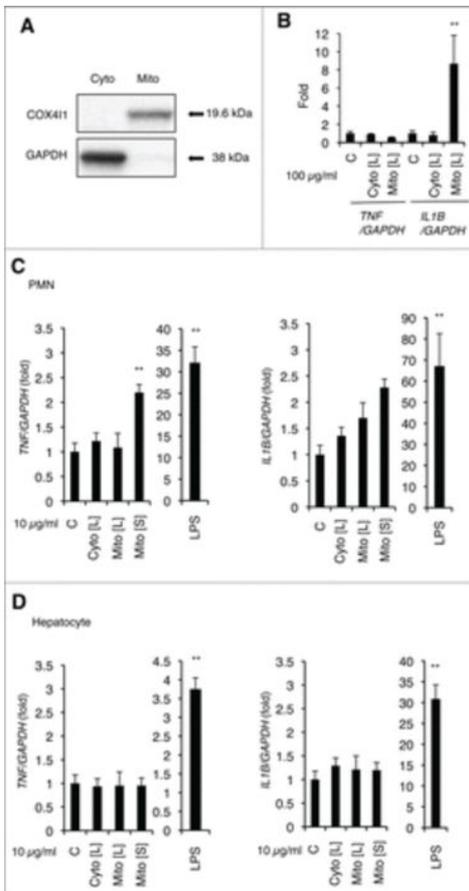
Atg5^{-/-}:オートファジーKO細胞

細胞外



細胞内

さらに、単離白血球に精製ミトコンドリアを曝露したところ、炎症性サイトカイン産生が誘導された。



細胞外になぜ障害ミトコンドリアが放出されるかの意義を確定することはできないが、これらの結果から敗血症肝ではミトコンドリアの原核生物様性質で免疫活性化が促進されたために生じた可能性も考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10件) すべて査読あり

2018年

1. Unuma K, Aki T, Nagano S, Watanabe R, Uemura K. The down-regulation of cardiac contractile proteins underlies myocardial depression during sepsis and is mitigated by carbon monoxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 495: 1668-1674.
2. Hirayama N, Aki T, Funakoshi T, Noritake K, Unuma K, Uemura K. Necrosis in human neuronal cells exposed to paraquat. *J. Toxicol. Sci.* 2018;43(3):193-202.
3. Aki T, Unuma K, Noritake K, Kurahashi H, Funakoshi T, Uemura K. Interaction of carbon monoxide-releasing ruthenium carbonyl CORM-3 with plasma fibronectin. *Toxicology in Vitro*. 2018 Mar 23;50:201-209.

2017年

4. Unuma K, Aki T, Noritake K, Funakoshi T, Uemura K. A CO-releasing molecule prevents annexin A2 down-regulation and associated disorders in LPS-administered rat lung. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jun 3;487(3):748-754.
5. Watanabe R, Unuma K, Noritake K, Funakoshi T, Aki T, Uemura K. Ataxia telangiectasia and rad3 related (ATR)-promyelocytic leukemia protein (PML) pathway of the DNA damage response in the brain of rats administered arsenic trioxide. *J. Toxicologic Pathology*. 2017; 30: 333-337.
6. Noritake K, Aki T, Kimura M, Funakoshi T, Unuma K, Uemura K. Restoration of YAP activation rescues HL-1 cardiomyocytes from apoptotic death by ethanol. *J Toxicol Sci*. 2017;42(5):545-551.
7. Aki T, Unuma K, and Uemura K. Emerging roles of mitochondria and autophagy in liver injury during sepsis. *Cell Stress*. 2017; Vol.1, No.2:79-89.

2016年

8. Kimura-Kojima H, Unuma K, Funakoshi T, Kato C, Komatsu A, Aki T, Uemura K. Increased MFG-E8 expression and its implications in the vascular pathophysiology of cocaine abuse. *J Toxicol Pathol*. 2016 Apr;29(2):131-8.
9. Fujii Y, Funakoshi T, Unuma K, Noritake K, Aki T, Uemura K. Hydrogen sulfide donor NaHS induces death of alveolar epithelial L2 cells that is associated with cellular shrinkage, transgelin expression and myosin phosphorylation. *J Toxicol Sci*. 2016;41(5):645-54.
10. Funakoshi T, Aki T, Tajiri M, Unuma K, Uemura K. Necroptosis-like Neuronal Cell Death Caused by Cellular Cholesterol Accumulation. *J Biol Chem*. 2016 Nov 25;291(48):25050-25065.

〔学会発表〕(計 5件)

2018年

1. Kana Unuma, Toshihiko Aki, Ryo Watanabe, Koichi Uemura. Down-regulation of cardiac contractile protein is involved in cardiac dysfunction during sepsis and is mitigated by carbon monoxide. 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine. Fukuoka, June 5-8, 2018.

2017年

2. 鵜沼香奈、則竹香菜子、船越丈司、坂幹樹、木村遥、藤井祐介、上村公一. 乳幼児における薬物分析検査の重要性—思いがけず薬物の寄与が明らかになった2剖検例—. 第101回法医学会全国集会. 長良川国際会議場. 岐阜. 2017.
3. 平山菜穂、鵜沼香奈、榎野陽介、渡邊 嶺、小松亜由美、上村公一. 遊具の打撲に起因する延髄周囲の硬膜下血腫が見逃された例. 第101回法医学会全国集会. 長良川国際会議場. 岐阜. 2017.
4. 渡邊 嶺、鵜沼 香奈、小松 亜由美、加世田 莉奈、永井 みどり、高橋 蓮穂、古川 真子、上村 公一. 交通事故後に見過ごされていた頭蓋外椎骨動脈の仮性動脈瘤破裂により死亡した一剖検例. 第86回日本法医学会学術関東地方集会. 杏林大学. 東京. 2017.

2016年

5. 鵜沼 香奈、原田 一樹、榎野 陽介、小松 亜由美、上村 公一. CTにて明らかになった全身死蝕化を伴う頭部銃創の1例. 第101回法医学会全国集会. 2016.

〔図書〕(計 3件)

2018年

1. Toshihiko Aki, Kanako Noritake, Kana Unuma, Koichi Uemura. Autophagic regulation of cardiomyocyte survival and heart regeneration. "Autophagy in health and disease", "Stem Cell Biology and Regenerative Medicine" book series, published by Humana press, Springer-Nature, 2018, pp101-118
ISBN 978-3-319-98145-1 ISSN 2196-8985

2017年

2. Toshihiko Aki, Kana Unuma, and Koichi Uemura. Emerging roles of mitochondria and autophagy in liver injury during sepsis. Cell Stress. Vol.1, No.2:79-89. doi:10.15698/cst2017.11.110 ISSN(online):2523-0204

2016年

3. 鵜沼 香奈、秋 利彦. 敗血症における心筋ミトコンドリア障害と一酸化炭素による保護. 月刊「細胞」 48(11): 31-34 (2016)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.tmd.ac.jp/med/legm/houi_kenkyuu.html

6. 研究組織

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科法医学分野

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。