

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03785

研究課題名（和文）ミトコンドリア機能と品質管理機構から捉える重症病態の分子病態研究

研究課題名（英文）Mitochondrial function and quality control in critical illness

研究代表者

宮崎 裕美（Miyazaki, Hiromi）

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医学研究センター 医療工学研究部門・講師

研究者番号：30531636

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアは活性酸素種の主要な発生源でありながら、あらゆる細胞の代謝やアポトーシス、炎症制御の中心装置でもあり、病態の重症化に大きく関与している。本研究は酸化ストレスを基軸とした病態生理ではなく、ミトコンドリア機能と品質管理機構という2つの視点から熱傷や外傷、敗血症病態における細胞や組織の機能の関係を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア機能とその動態を制御するという視点は、長期予後の改善を含めた有効な治療法の確立につながる可能性が示唆され、病態改善のbreak throughとなるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Mitochondria are a major source of reactive oxygen species. However, they are also central in regulating metabolism, apoptosis, and inflammation in all types of cells, and they play a significant role in the severity of pathological conditions. This study clarified the relationship between cellular and tissue functions in pathological conditions from two viewpoints: mitochondrial function and quality control mechanisms, rather than oxidative stress-based pathophysiology.

研究分野：侵襲免疫学

キーワード：ミトコンドリア 品質管理機構 重症熱傷 敗血症 外傷

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

外傷や広範囲熱傷、出血性ショック、敗血症などの病態が重症化していく過程や臓器障害において、酸化ストレスの関与が広く示されている。すなわち、過剰な活性酸素種の産生によって細胞内レドックスバランスの制御不能が、様々な機能低下や病的状態を引き起こしている。近年、重症患者に対して、酸化ストレスの制御による病態改善を目的とした抗酸化栄養療法が積極的に施行され、また、集中治療医学の発展によって短期的な転帰は飛躍的に改善した。しかし、断続的な生体防御機能の低下や炎症応答、筋タンパク質の異化亢進、糖代謝の変化など代謝障害によって、長期予後や生活の質はまだまだ改善されていない。したがって、救命を目指す治療とともに、身体機能や認知機能の低下、精神障害などの集中治療後症候群 (Post-Intensive Care Syndrome: PICS) を予防・回避し、いかに長期予後を改善するかが大きな課題である (Needham et al. Crit Care Med 2012)。申請者らは、活性酸素種の主要な発生源であるミトコンドリアの動態に着目した病態の解明が、課題解決のヒントになると考えている。

ミトコンドリアは、酸化的リン酸化による ATP や熱エネルギーの産生、アポトーシスの制御、ステロイドやヘムなどの合成、カルシウムや鉄の細胞内濃度の調節など、細胞にとって機能を維持するためにきわめて重要な役割を担っている。また、インフラマソームと相互作用することで炎症・免疫応答のキープレーヤともなっている (Zhong et al. Nature 2018)。

また、ミトコンドリアは機能を保つために常に融合と分裂による形態変化を繰り返す、ダイナミックなオルガネラである。傷ついたミトコンドリアや異常なミトコンドリアは細胞にとって有害なため、オートファジー/マイトファジーを介した不良ミトコンドリアを取り除く品質管理機構が備わっている。実際に、糖尿病や心疾患、神経疾患などにおいて、細胞内に不良ミトコンドリアが蓄積し、病態の発症に関わっていることが示され (Um JH et al. BMB Rep 2017)、ミトコンドリアの機能や品質管理機構に関わる分子機序の解明は、病態形成や治療法開発の糸口として注目されている。

敗血症病態においても、ミトコンドリアの動態が免疫細胞の機能や運命 (表現型) を左右し、病態形成に関わっていること (Mills et al. Nat Immunol 2017) や、損傷を受けたミトコンドリアが炎症増強物質であるミトコンドリア DNA などの Damage-associated molecular patterns (DAMPs) を放出し病態を悪化させること (Zhang et al. Nature 2010)、T 細胞特異的オートファジー不全マウスに腹膜炎を発症させると、IL-10 が持続的に高値を示し予後が不良となること (Oami et al. Crit Care Med 2017) などが報告されている。これらのことから、ミトコンドリア不全状態を制御することが重症病態において大きな治療効果をもたらすと期待される。しかし、重症病態においてミトコンドリアの質的・量的な品質管理機構の破綻がいかに惹起されるのかは、いまだ明確な証拠は示されていない。

2. 研究の目的

本研究では、重症熱傷、敗血症、頭部外傷における主要臓器や免疫細胞のミトコンドリア機能、品質管理機構について解析を行い分子病態学的な知見を得ることを目的とし、以下について検討を行った。

- (1) それぞれの病態において、細胞代謝ストレスやミトコンドリア機能障害、ミトコンドリア動態が病期に応じてどのように変化するか明らかにする。
- (2) ミトコンドリア膜電位の変化によるミトコンドリア機能障害およびそれによる細胞死と DAMPs 放出について検討する。

3. 研究の方法

- (1) 広範囲熱傷モデルは湯浴法によりマウス背部に体表面積の 20% に相当する III 度熱傷を作製した。頭部外傷は圧力負荷によって発生する衝撃波を利用してモデルを作製し、敗血症モデルは、盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture: CLP) を施した腹膜炎による敗血症モデルを用いた。各モデルにおける受傷後の急性期から亜急性期にかけて、肝臓や小腸、脳のミトコンドリア機能や動態を評価するために、各臓器からタンパク質を抽出しマイトファジー関連タンパク質の発現量等を western blot 法で評価し、クエン酸合成酵素活性を測定することによりミトコンドリアの活性評価を行なった。また、臓器から単離した細胞を用いて、フローサイトメトリー法によってミトコンドリア由来活性酸素種の産生と細胞機能を評価した。
- (2) 小腸パイエル板から採取したリンパ球にミトコンドリア作動性化合物を添加し、膜電位、ROS 産生、細胞死経路について評価した。また、DAMPs の放出として培養上清中の mtDNA について解析を行なった。

4. 研究成果

広範囲熱傷後には過大侵襲による高血糖やインスリン抵抗性を伴う代謝亢進、過剰な炎症・抗炎症メディエーターや活性酸素種の産生が病態に関与しているといわれている。そこで、受傷 1

日後、3日後、易感染性を示す受傷5日後、亜急性期の10日後に肝臓および小腸を採取し、ミトコンドリア分裂・融合因子、マイトファジー関連因子のタンパク発現量を非熱傷マウスと比較検討した。その結果、肝臓では、受傷後早期からミトコンドリアの分裂と融合のバランス異常が生じていた。また、マイトファジーは受傷1日後には亢進したが、自然免疫応答が低下し易感染性を呈する5日後には減少しており、10日後までマイトファジーが停滞していることが示された。このマイトファジーの変化に関連してクエン酸合成酵素活性も低下しており、傷害ミトコンドリアの蓄積が示唆された。電子顕微鏡による観察からも、ミトコンドリアの形態異常が受傷5日後から続いており、10日後には肝細胞に脂肪滴が蓄積していることが示された。さらに肝臓では、常在マクロファージであるKupffer細胞は受傷5日後に貪食・殺菌能が著しく低下し、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の発現量が大きく減少していた。また、炎症性サイトカインの産生が高まっていることも示された。小腸では、ミトコンドリア活性が低下し腸管透過性が著しく低下していたが、分裂・融合因子の発現量は食餌量の影響を強く受けており、個体差が大きいことが明らかとなった。一方、パイエル板B細胞はミトコンドリア膜電位が損なわれ、ミトコンドリアの機能が障害されていることが示された。また、B細胞が産生するIgA濃度も低下していた。ミトコンドリア電子伝達系補酵素であるコエンザイムQ10 (CoQ10) は代謝活性および活性酸素産生に関与している。そこで還元型CoQ10を熱傷後に連日腹腔内投与したところ、パイエル板B細胞のミトコンドリア膜電位が回復しており活性酸素産生が抑えられ活性型B細胞が増加していることが示された。また、受傷直後からの高血糖や過剰な炎症性メディエーター産生の軽減効果が示され、易感染性も軽減した。

病理組織学的には出血や浮腫が認められない衝撃波による頭部外傷モデルを用いて、受傷1、3、7日後に脳を採取し、ミトコンドリア機能制御因子のタンパク質の発現解析を行った。その結果、受傷3、7日後にミトコンドリアの酸化的リン酸化、分裂因子、融合因子の発現が低下しており、7日後にはマイトファジーが低下していることが明らかとなった。また、ミトコンドリアの酸素呼吸がマイトファジーの変化と相関していることも示された。さらに、グリア細胞の挙動を評価するために免疫組織染色を行なったところ、対照群と比較して、頭部外傷モデルでは時間経過とともに反応性アストロサイトが出現し、その後活性型ミクログリアの増加が観察された。先行研究によって、アストロサイトのミトコンドリアがグルタミン酸やGABAなどの特異的トランスポーターの発現や機能に影響を与え、シナプス伝達機能維持における能動的役割を担っていることが示唆されている。本実験モデルは1ヶ月程度経過すると社会行動異常を呈し脳機能障害を発症する。今後は、ミクログリアによる慢性炎症のみならず、早期から引き起こされるミトコンドリアの機能低下やマイトファジーの変化を適切に制御することが不顕性の機能障害の悪化と病態発症を防ぐことができるか検討を進める予定である。

重度の敗血症では、急性期において肝ミトコンドリアの過度な分裂が観察され、細胞の機能低下と関連していた。ミトコンドリアの分裂異常に継いで融合不全が引き起こされ、ATP産生能の低下と細胞内代謝の異常が観察され臓器不全の引き金となっている可能性が示された。さらに、急性期にはマイトファジーが一過性に亢進していたが、その後停滞することが示された。一方、軽症の腹膜炎モデルでは、急性期には分裂因子と融合因子がいずれも増加しており、慢性期には分裂因子が対照群と同程度であるにも関わらず細胞障害が観察された。これらのことから、適切なタイミングにマイトファジー実行因子を活性化させ機能不全に陥ったミトコンドリアを適切に除去し、ミトコンドリアの代謝回転を増加させることが病態の遷延を防ぐことにつながるかもしれない。

パイエル板から採取したリンパ球にマイトファジー阻害物質を添加し3時間培養した後にLPSで刺激したところ、ミトコンドリア膜電位の低下とROS産生の増大とともに活性化型caspase-3の増加が認められた。培養上清中のmtDNA量の上昇も観察されたが、その程度は僅かであった。

これらの研究成果は、ミトコンドリア動態から捉える細胞や組織代謝を標的とした重症病態のみならず軽症の病態においても新しい治療戦略の基盤となるものであり、現在論文投稿中(1編)および投稿準備中(2編)である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyazaki Hiromi, Kinoshita Manabu, Nakashima Hiroyuki, Nakamura Shingo, Saitoh Daizoh	4. 巻 23
2. 論文標題 Pioglitazone Modifies Kupffer Cell Function and Protects against Escherichia coli-Induced Bacteremia in Burned Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12746 ~ 12746
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms232112746	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 宮崎裕美	4. 巻 40
2. 論文標題 ミトコンドリア機能と品質管理機構から捉える敗血症病態	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 214 ~ 218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 宮崎裕美, 伊藤希, 木下学, 辻本広紀, 関修司, 齋藤大蔵
2. 発表標題 自然免疫応答の制御による重度侵襲後の敗血症対策
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miyazaki H, Kinoshita M, Nakashima H, Nakashima M, Seki S, Nakamura S, Saitoh D.
2. 発表標題 Mitochondrial agents protect burn-injured mice from bacterial infection by affecting the function of Kupffer cells
3. 学会等名 16th Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Seno S, Tomura S, Miyazaki H, Sato S, Saitoh D.
2. 発表標題 Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on depression-like behavior in a mouse model of mild blast traumatic brain injury
3. 学会等名 5th International Forum on Blast Injury Countermeasures (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ohkoshi E, Kon A, Miyazaki H, Umemura N.
2. 発表標題 Induction of necroptotic cell death and mitochondrial dysfunction using shikonin multidrug resistant head and neck squamous cell carcinoma
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyazaki H, Kinoshita M, Nakashima H, Nakashima M, Seki S, Nakamura S, Saitoh D.
2. 発表標題 Mitochondrial disturbance in Kupffer cells exacerbates sepsis-induced mortality following burn injury
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀬野宗一郎, 戸村 哲, 宮崎裕美, 佐藤俊一, 齋藤大蔵
2. 発表標題 レーザー誘起衝撃波を用いた頭部爆傷モデルマウスに対するSSRIの効果
3. 学会等名 第35回日本外傷学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今監理, 梅村直己, 宮崎裕美, 大越絵実加
2. 発表標題 多剤耐性を獲得した転移性口腔がんのナフキノンをを用いた細胞死誘導メカニズムの解明
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸田 皐, 梅村直己, 宮崎裕美, 水野憲一, 大越 絵実加
2. 発表標題 多剤耐性を獲得した転移性口腔がんのナフトキノンをを用いたネクロプトーシス誘導メカニズムの解明
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎裕美, 山村浩史, 佐藤泰司, 中村伸吾, 齋藤大蔵
2. 発表標題 低強度の爆風衝撃波による脳ミトコンドリア動態の変化
3. 学会等名 第36回日本外傷学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎裕美, 木下学, 中島弘幸, 秦裕樹, 齋藤大蔵, 中村伸吾
2. 発表標題 基礎研究・橋渡し研究: マウス広範囲熱傷モデルにおけるミトコンドリアダイナミクスと品質管理機構
3. 学会等名 第48回日本熱傷学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大越 絵実加 (Ohkoshi Emika) (10287667)	青森大学・薬学部・教授 (31101)	
研究分担者	亀井 康富 (Kamei Yasutomi) (70300829)	京都府立大学・生命環境科学研究科・教授 (24302)	
研究分担者	小野 聡 (Ono Satoshi) (30531355)	東京医科大学・医学部・兼任教授 (32645)	
研究分担者	木下 学 (Kinoshita Manabu) (70531391)	防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・免疫・微生物学・教授 (82406)	
研究分担者	齋藤 大蔵 (Saitoh Daizoh) (90531632)	防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医学研究センター 外傷研究部門・教授 (82406)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------