

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09293

研究課題名（和文）ミトコンドリアDNAヘテロプラスミーの制御は敗血症の治療ターゲットになるか？

研究課題名（英文）The role of mitochondrial heteroplasmy in sepsis

研究代表者

中平 毅一（Nakahira, Kiichi）

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80844414

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：感染症により重篤な臓器障害を呈する敗血症は、集中治療室における主要死亡原因の一つで、その病態の解明と治療法の開発は急務である。本研究において、我々はマウス敗血症モデルおよび初代培養マクロファージを用いて、ミトコンドリアDNA変異の増加が自然免疫反応を増大させることで敗血症の病態を増悪化させることを示した。さらに、ミトコンドリアDNA変異の制御に、ミトコンドリア融合が関わっている可能性も解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究においてヘテロプラスミーの敗血症における役割及びヘテロプラスミーを制御する因子を解明したことは、敗血症の新たな病態の解明だけに留まらず、新規治療戦略策定にも寄与すると考えられる。さらに、本研究成果は敗血症のみならずmtDNA変異が関与する多くの難治性疾患の新たな治療標的の発見につながる可能性もあり重要性の高いものである。

研究成果の概要（英文）：Sepsis, a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection, is a major public health concern with high mortality and morbidity. In this study we observed that the accumulation of mitochondrial mutation exacerbates the pathogenesis of sepsis by increasing inflammatory responses in vitro and in vivo. We also found that mitochondrial dynamics is implicated in the pathogenesis of sepsis by regulating mitochondrial DNA integrity.

研究分野：集中治療

キーワード：敗血症 ミトコンドリア 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感染症により重篤な臓器障害を呈する敗血症は、集中治療室における主要死亡原因の一つで、人口高齢化や癌・慢性疾患患者の増加もあり、その病態の解明と治療法の開発は急務である。申請者は、ミトコンドリア DNA (以下 mtDNA) が自然免疫反応の一つであるインフラマソームの活性化を介して、敗血症の病態進展に関与することを示してきた(1-3)。しかし、mtDNA がどのような機序で敗血症の病態に関与するか不明な点は依然多い。遺伝子解析技術の進歩によって、ミトコンドリア ヘテロプラスミーと呼ばれる細胞内における正常および異常 mtDNA の混在状態が健常者の約 90%に認められることが明らかになった(4, 5)。その一方、ヘテロプラスミーの敗血症における役割は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、インフラマソーム依存性敗血症におけるヘテロプラスミーの役割を解明すると共に、ヘテロプラスミーの制御因子同定および機序解明を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、敗血症モデルにおけるヘテロプラスミーの役割、さらにその制御因子としての MFN1 の関与と制御機序を明らかにし、敗血症に対する新たな治療戦略を提案する。

計画 1 . mtDNA 変異の蓄積が敗血症モデル (マウスおよび細胞) に及ぼす影響を検討

(目的) ヘテロプラスミー頻度の増加が、敗血症モデルに及ぼす機能的役割 (例: 生存率、炎症反応) を検討する。さらにヘテロプラスミー頻度と、臓器障害レベルおよびインフラマソーム活性との相関関係を検討。

計画 2 . ミトコンドリア融合がヘテロプラスミーおよび敗血症モデルに及ぼす影響を検討

(目的) ミトコンドリア融合関連タンパクである mitofusin-1(MFN1) の欠損が敗血症モデルに及ぼす影響を検討し、その表現型が mtDNA 変異の増加によることを明らかにする。

計画 3 . 敗血症患者におけるヘテロプラスミーの関与を検討

(目的) 敗血症患者におけるヘテロプラスミーの頻度と患者重症度との間に相関関係があるかについて患者血液を用いて検討する。

4. 研究成果

4-1. mtDNA 蓄積が敗血症モデルに及ぼす影響

ヘテロプラスミーの敗血症における役割を検討するため、盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture: CLP) による腹膜炎敗血症モデルを用いた動物実験を行った。ヘテロプラスミー蓄積モデルとして使用されている mtDNA 変異 POLG マウス(6)に対して CLP を施行したところ、対照群に対して生存率の低下を雄雌ともに認めた(図1)。さらに、CLP後のマウス血液中の炎症性サイトカイン IL-1 β は、mtDNA 変異 POLG マウスにおいて対照群より著明に増大していた。

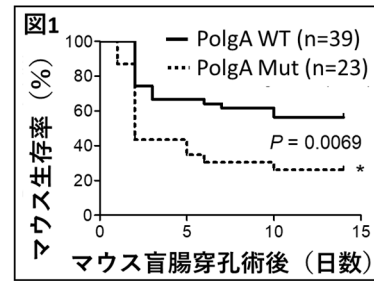


図1 Polg野生型マウス(WT)と mtDNA変異マウス(Mut)のCLP手術後の生存率を検定 *P=0.0069 by Log-rank test vs. Polg WT CLP mice.

4-2. mtDNA 蓄積がインフラマソーム依存性自然免疫反応に及ぼす影響

mtDNA 変異 POLG マウスが炎症反応増大に伴う敗血症後の生存率低下を認めたが、その炎症反応増大の細胞レベルでの機序を解明するため、マウス骨髄由来マクロファージを用いて細胞実験を行った。インフラマソーム刺激に対して、mtDNA 変異 POLG マウスマクロファージは caspase-1 の活性化の増大及び、インフラマソーム依存性サイトカイン (IL-1 β , IL-18)の放出増大を認めた(図2)。しかし、非依存性サイトカインである TNF- α の放出には明らかな違いを認めなかった。

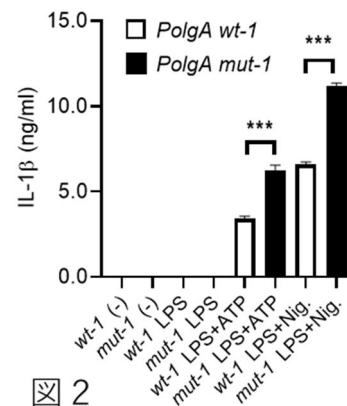


図2

4-3. ミトコンドリア融合が mtDNA 変異および敗血症に及ぼす影響

ミトコンドリアにおいては、常にミトコンドリアの融合分裂が行われ細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしている(7, 8)。我々は、mtDNA 変異の制御機序にミトコンドリア融合が関与しているかを検討した。ミトコンドリア融合に関与する MFN1 を骨髄細胞特異的にノックアウトした MFN1 KO マウス(*Mfn1*^{-/-})は CLP 処置後、対照群 (*Mfn1*^{+/+}) より死亡率の増大(図3)及び、血液中 IL-1 β の産生増加を示した。さらに *Mfn1*^{-/-}骨髄由来マクロファージは対照群に比して mtDNA の変異頻度の増加を示し(図4) さらにインフラマソーム活性の増大を示した。これらの結果は、MFN1 が mtDNA の変異を制御することによって、インフラマソーム依存性免疫反応、さらには敗血症病態を制御する可能性を示唆している。

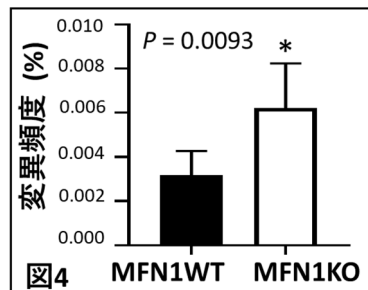
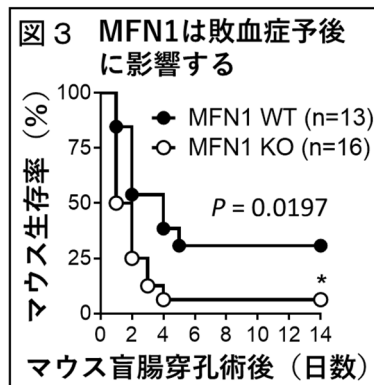


図4

4-4. 敗血症患者におけるヘテロプラスミーの関与

最後に我々は、敗血症患者におけるヘテロプラスミーの関与について検討した。集中治療室入出患者の血液より DNA を抽出し、次世代シーケンサーによってヘテロプラスミーの頻度を解析した(9)。ヘテロプラスミーの頻度は、敗血症患者において対照群に比して有意に増加していた。さらに敗血症の重症度の指標として使用される SOFA スコア (sequential organ failure assessment score) とヘテロプラスミー頻度との間に相関関係が認

められた(10)。

4-5. まとめ

今回の我々の研究結果は、ヘテロプラスミー頻度または mtDNA 変異の増加が、インフラマソーム依存性自然免疫反応を増大することにより、敗血症の重症化に寄与する可能性を示した。

(参考文献)

1. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, Fitzgerald KA, Ryter SW, Choi AMK. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature Immunology*. 2011;12(3):222-30. doi: 10.1038/ni.1980.
2. Nakahira K, Kyung S-Y, Rogers AJ, Gazourian L, Youn S, Massaro AF, Quintana C, Osorio JC, Wang Z, Zhao Y, Lawler LA, Christie JD, Meyer NJ, Causland FRM, Waikar SS, Waxman AB, Chung RT, Bueno R, Rosas IO, Fredenburgh LE, Baron RM, Christiani DC, Hunninghake GM, Choi AMK. Circulating Mitochondrial DNA in Patients in the ICU as a Marker of Mortality: Derivation and Validation. *PLoS Medicine*. 2013;10(12):e1001577. doi: 10.1371/journal.pmed.1001577.
3. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology*. 2016;16(7):407-20. doi: 10.1038/nri.2016.58.
4. Ye K, Lu J, Ma F, Keinan A, Gu Z. Extensive pathogenicity of mitochondrial heteroplasmy in healthy human individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(29):10654-9. Epub 2014/07/09. doi: 10.1073/pnas.1403521111. PubMed PMID: 25002485; PMCID: PMC4115537.
5. Yang X, Zhang R, Nakahira K, Gu Z. Mitochondrial DNA Mutation, Diseases, and Nutrient-Regulated Mitophagy. *Annual Review of Nutrition*. 2019;39(1):201-26. doi: 10.1146/annurev-nutr-082018-124643.
6. Kujoth GC. Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging. *Science*. 2005;309(5733):481-4. doi: 10.1126/science.1112125.
7. Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial Fusion Is Required for mtDNA Stability in Skeletal Muscle and Tolerance of mtDNA Mutations. *Cell*. 2010;141(2):280-9. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.026.
8. Chung K-P, Hsu C-L, Fan L-C, Huang Z, Bhatia D, Chen Y-J, Hisata S, Cho SJ, Nakahira K, Imamura M, Choi ME, Yu C-J, Cloonan SM, Choi AMK. Mitofusins regulate lipid metabolism to mediate the development of lung fibrosis. *Nature Communications*.

2019;10(1). doi: 10.1038/s41467-019-11327-1.

9. Zhang R, Nakahira K, Guo X, Choi AMK, Gu Z. Very Short Mitochondrial DNA Fragments and Heteroplasmy in Human Plasma. *Cell*. 2016;166(6):36097. doi: 10.1038/srep36097.

10. Ferreira FL. Serial Evaluation of the SOFA Score to Predict Outcome in Critically Ill Patients. *JAMA*. 2001;286(14):1754. doi: 10.1001/jama.286.14.1754.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中平毅一
2. 発表標題 Mitofusin1 regulates innate immune responses by inhibiting the accumulation of mitochondrial DNA mutation in sepsis
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
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	趙 晶 (Zhao Jing) (60804466)	奈良県立医科大学・医学部・助教 (24601)	

	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
研究協力者	伊藤 利洋 (Ito Toshihiro)		

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		
米国	Cornell University	Weill Cornell University	
米国	Weill Cornell Medicine	Cornell University	