

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592360

研究課題名(和文)敗血症肝不全誘発機序の基礎的解明

研究課題名(英文)Basic study of the induction mechanism in septic liver failure

研究代表者

田上 正(Tanoue, Tadashi)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：60145323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】ミトコンドリア呼吸能から敗血症性肝不全(SLF)発症機序を解明。【方法】マウスSLF(CLP群)作成しSham群と比較。肝Mito Ca²⁺リこみ能、Citrate SynthaseとRespiratory Control Ratioを比較。SUIT protocolで呼吸鎖障害部位検討。【結果と考察】CLP群で早期にCa²⁺を取り込み形態変化に差が生じる可能性、Complex Iを中心としたETS活性の障害が示唆。

研究成果の概要(英文)：To study the mechanism of SLF using the change of mitochondrial (Mito) respiratory function in SLF model. Male C57bl/6J mice were divided into two groups, one was CLP group induce sepsis and the other was Sham group. Isolated liver mito were exposed to continuous infusions of Ca²⁺. Monitoring of extra-mito Ca²⁺ and mito respiration provided a quantitative assay for mPT sensitivity by determining CRC and mito swelling%. And we investigated the role of different uncoupler and respiratory complex to evaluate maximal respiratory activity of mito and ETS. No significant changes in CRC, Swelling%, a value, CS and RCR of CLP were detected compared to Sham. The CLP tended to be slightly high in Swelling% rate and a value rate in CLP/Sham. FCCP and Rote value of CLP were lower compared to Sham significantly in SUIT protocol. There was little change in FCCP/Rot between both CLP and Sham. These results suggested the possibility of the obstacle of the ETS activity around complex I in CLP.

研究分野：麻酔科

キーワード：ミトコンドリア 肝不全 敗血症

1. 研究開始当初の背景

1)敗血症性肝不全 (Septic Liver Failure : SLF)の発症機序は特定されていない。敗血症性臓器障害の発症にミトコンドリアの関与が注目され、細胞内呼吸の重要な要素である酸化リン酸化とエネルギー産生のリンクの障害が注目されるようになった。

2)肝臓のミトコンドリアを抽出し、in vitroでミトコンドリアの呼吸機能、酸化リン酸化の効率、ミトコンドリア内での産物などの変化を通してミトコンドリア機能障害を解析する研究¹⁾も始まったが、酸化リン酸化を促進する電子伝達系の役割やその標的分子も明らかではない。

2. 研究の目的

虚血性神経細胞死解析実験で蓄積されたMPT(Mitochondrial Permeability Transition)に伴うミトコンドリア機能不全に対する成果を新規肝保護法確立のためにSLFのメカニズム解析に展開し、肝細胞障害のみに着目した従来の肝障害の解析から肝細胞内ミトコンドリア機能不全と敗血症で特徴的な末梢循環不全(microcirculation dysfunction : MD)に伴う組織低酸素に焦点を置き、SLFの実態をMPTとミトコンドリア機能特に呼吸機能の変化の関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1)敗血症性肝不全(SLF)モデルおよび対象モデルの作成のために、東京医科大学動物実験規程および日本学会議の定めた動物実験の適切な実施にむけたガイドラインに基づき以下の実験を実施した。生後8週の雄性C57bl/6J雄マウスを実験に用いた。セボフルレン麻酔下に約2cmの腹部正中切開を行い盲腸を体外に出した。CLP(cecal ligation and puncture)群では、便を盲腸内に押し込み盲腸の起始部かつ回盲弁部の末梢側で結紮した。21G注射針で盲腸を穿通し便が穿通部から漏出することを確認し腹腔内に戻し閉腹した²⁾。Sham群は同様に開腹したが盲腸の結紮と穿通は行わなかった。両者ともに0.9%食塩水を1ml皮下注射しケージに戻した。自由に飲水できるケージ24時間飼育した。24時間後も生存したCLP群マウスでもSham群と比較して運動や刺激への反応、視診上差のないマウスは30時間までケージ内で観察し、Sham群と差が生じてきたことを確認してsacrificeし、同一ケージ内で飼育したSham群マウスをペ

アにしてミトコンドリア機能の解析を行った。CLP群マウスは、外見、動き、刺激への反応からSLFの程度を、

1: Looks exactly same as Sham, 2: Looks OK, 3: Slightly sick, 4: Sick(raising of hair + slowly movement), 5: Severely sick (raising of hair + slowly move, rough breathing)

の1~5のSLF Score分類で示した。

2)SLFモデルにおけるMPTに伴うミトコンドリア機能不全の解析のために以下の実験を行った。肝組織を取り出して、Morota et.al.の方法³⁾に準じてIsolation Bufferにてhomogenize後に40,26,12%の濃度の異なるParcolを重層した溶液にhomogenizeを重層して、3回の超遠心後ミトコンドリアを分離した。蛋白定量後、300µgのミトコンドリア蛋白を用いて解析を行った。200mMATPと50mMADPおよび1mg/mlのオリゴマイシンをミトコンドリア懸濁液に加えた。ミトコンドリアのCa²⁺取りこみ(Calcium Retention Capacity: CRC)⁴⁾は、200nmolCaCl₂を10mM/分で持続投与し、蛍光色素のFura6Fを懸濁液に加え509nmで励起して測定を行い、SLFが肝内ミトコンドリアCa²⁺取りこみ能とMPTに与える影響およびミトコンドリアの膨化(swelling)をCLP群とSham群とを比較解析し、SLFのMPTに伴うミトコンドリア機能不全との連関をCRCに焦点を当てて評価した。

3)SLFが肝内ミトコンドリア呼吸能に与える影響をみるために以下の実験を行った。肝不全モデルのミトコンドリアの呼吸能をより厳密に調べるためにhigh-resolution respirometer (Oroboros Oxygraph-2k, Innsbruck, Austria)を用いてミトコンドリア呼吸能を調べた。分離したIsolated MitochondriaおよびHomogenate Mitochondriaを用いて、Citrate Synthaseの量を測定した。蛋白定量後、25µg/mlのミトコンドリアをKCL bufferに加えた。クラーク酸素電極を用いてミトコンドリアの呼吸基質である5mMマレイン酸とグルタミン酸を加えた後200µMADP添加して酸素消費量をADP添加前(state3)と添加後(state4)で計測して両者の比としてRespiratory Control Ratio(RCR)を計算し、SLFが肝内ミトコンドリア呼吸能に与える影響をShamと比較解析した。さらに基質、uncoupler、呼吸阻害薬を加えて呼吸量の変化をみるSUIT protocolにより呼吸鎖のどの部分に変化が生じるのかを検討した。SUIT protocol⁵⁾は、クエン酸回路を促進するMalateとPyruvateの添加、

Complex 1 を促進する ADP、Glutamate を添加、2) Complex 1 における電子の膜間腔への流入を促進し complex 1 の H⁺の膜間腔への流れを促進する Succinate の添加、complex 1 を抑制し ATP 循環が呼吸に与える影響を除外するための Oligomycin の添加、complex 1 を促進し電子伝達系全体を促進する FCCP の添加、Complex 1 の阻害薬の Rotenone を添加し呼吸鎖のどの部分に変化が生じるか検討した。統計処理は GraphPad Prism6 で解析した。

4. 研究成果

(1) 研究結果

1) CLP によって作成した SLF モデル 56 頭のうち 36 頭が 24 時間以内に死亡した。24 時間後の生存率は 35.7%であった。実験に用いた CLP 群マウスは 11 頭であり同時に飼育した Sham 群マウスと比較した。表 1 に実験に資した CLP 群マウスのプロフィールを示す。K 各群の No9, 10, 11 で体温測定をしたが、Sham 群で 38.7、37.7、37.8 で、CLP 群では 32.3、36.0、28.0 であった。CLP 群の重症度は、SLF Score 分類をした。

表 1 CLP 群の SLF Score 分類と肝臓の視覚所見

	Time after ope	score	CLP Liver
CLP1	29h	4	
CLP2	28h	4	
CLP3	24h	5	color is pale
CLP4	30h	3	color is pale
CLP5	30h	4	color is pale
CLP6	30h	3	color is a bit paler
CLP7	30h	3	color is a bit paler
CLP8	30h	5	color is a bit paler
CLP9	24h	4	pale
CLP10	24h	3	pale
CLP11	24h	5	pale

2) MPT に伴うミトコンドリア機能不全の解析において、CRC は Sham 群で $2.74 \pm 0.42 \mu\text{mol}/\text{mg mito}$ (mean \pm SE) であり、CLP 群では $2.97 \pm 0.31 \mu\text{mol}/\text{mg mito}$ であり有意差はなかった。Sham 群を 1 として CRC の割合をみた CLP/Sham でも 1.20 ± 0.11 であり、有意な変化は見られなかった。Swelling %、a values および comparative a values の結果をび図 1、図 2、図 3 に示す。Swelling % は Sham 群 $81.78 \pm 6.13\%$ (mean \pm SE) であり CLP 群の $82.61 \pm 3.02\%$ に比べ有意差はなかった。a values は Sham 群で 99.41 ± 10.35 、CPL 群で 114.16 ± 13.18 で有意差はなかったが、同一日に手術を行い同一ケージで飼育した Sham と CLP をペアとした CLP/Sham ratio では、 1.15 ± 0.09 ($p = 0.0853$) であった。

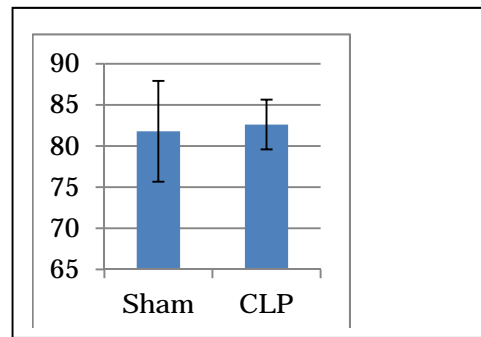


図 1 Swelling % Sham 群と CLP 群の比較

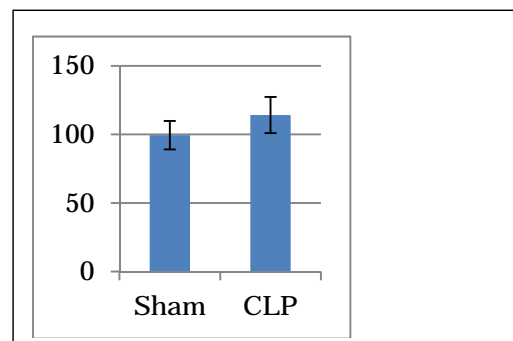


図 2 a value Sham 群と CLP 群の比較

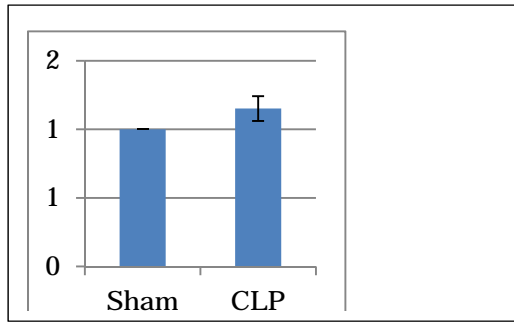


図3 CLP/Sham ratio

2) 肝内ミトコンドリアの呼吸能を測定
Isolated Mitochondriaおよび Homogenate Mitochondriaの Citrate Synthase (CS) を測定し Sham 群と CLP 群を比較した。Isolated Mitochondria では、Sham 群 22.95 ± 2.09 $\mu\text{mol}/\text{Mill cells} \cdot \text{min}$ で CLP 群では 23.13 ± 3.09 $\mu\text{mol}/\text{Mill cells} \cdot \text{min}$ 、Homogenate Mitochondria では 21.87 ± 1.34 Homogenate Mitochondria CLP 群で 19.41 ± 0.50 Homogenate Mitochondria で有意差はなかった。ADP 添加によって活性化された酸加的リン酸化による呼吸活性 (state3) で消費された酸素量と Oligomycin を投与し complex を抑制し ATP 循環が呼吸に与える影響を除外した内膜を leak した H⁺ による呼吸活性 (state4) で消費された酸素の量を比較した。SUIT protocol では CLP 群の FCCP の値が Sham 群 $218.83 \pm 12.92 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ に比べて CLP 群では $172.90 \pm 5.942 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ に有意に低下した。Rotenone の値も、Sham 群 $188.90 \pm 10.72 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ に比べて CLP 群では $153.20 \pm 5.452 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ 有意に低下した。(図4)

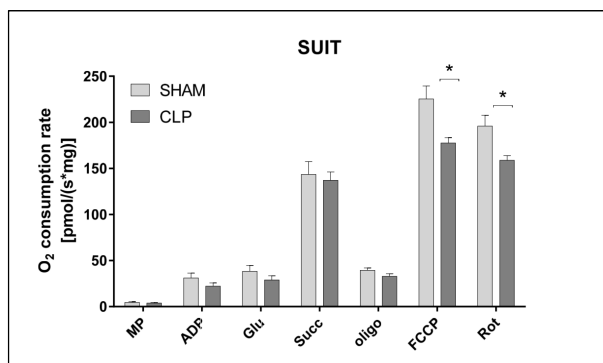


図4 SUIT protocol の結果

(2) 考察

齧歯類の盲腸を結紮し針で穿通して作成する敗血症モデル(cecal ligation and puncture:CLP)は、敗血症研究のスタンダードな敗血症実験モデルとして広く使用されている。Rittirschらは盲腸の結紮位置、針のサイズ、穿通個数によって敗血症の重症度が異なることを、CLP作成18~24時間後の重度の敗血症発症時には、動きがなく、発熱や震えを生じ、立毛や弱弱しく活動性が落ちてくることを示している²⁾。一方敗血症の重症度は盲腸内の便が腹腔内に漏出する量によるので、大網による穿通部の被覆が生じると重症の敗血症に至らないことも起こりうる。Rittirschらの提唱した Large (High grade) と Medium (Mid grade) を作成したが、作成した SLF モデル56頭のうち36頭が24時間以内に死亡した。24時間後の生存率は35.7%であり High grade の24時間後の生存率とほぼ一致した。しかし、生存マウスの中には敗血症の症状が軽度のものであり、その解釈によっては解析から外すべきかもしれない。

ミトコンドリアの Ca²⁺取りこみ能 (Calcium Retention Capacity: CRC) は、ミトコンドリアの懸濁液に CaCl₂ を持続的に注入しミトコンドリア外の [Ca²⁺]_e を Ca 感受性蛍光色素 Fura6F の excitation rate (ミトコンドリアが Ca²⁺ の取り込み開始 (a value) から、mPT が誘発され Ca²⁺ が assay buffer 内に放出される時点 (b value) の間にミトコンドリア内に貯蔵することができた Ca²⁺ の総量を $\mu\text{mol}/\text{mg}$ mitochondria protein として示したもの¹⁾³⁾ でミトコンドリアのマトリックスの量に影響される。ミトコンドリアの呼吸能の実験における CRC は呼吸率が増加し始めた時から呼吸率の急速な減少が生じるまでのミトコンドリア内に流入した Ca²⁺ の総量として示したもので、ミトコンドリアのマトリックスの量や構造的密度に影響される。またこの間ミトコンドリアは膨化を生じていく。敗血症によって肝ミトコンドリア内膜に変化が生じ、mPT が生じやすい状態になるのか否かが CRC や Swelling %、a values に変化をもたらす。しかし、CRC、Swelling% や a value に有意差がみられなかったことから、これらに影響が出るほどの変化が生じていなかったと考えられる。ここで Sham 群の値を1とした a value (CLP/Sham) ratio や Swelling% (CLP/Sham) ratio では CLP が若干高値を示す傾向があり、細胞内の Ca 濃度上昇に伴い既にミトコンドリアがいくらかの Ca²⁺ を取り込んでいる場合やミトコンドリアの形態に変化に差が生じた可能性も考えられるが電顕レベルでの形態学的な検討が必要である。

Citrate Synthase (CS) はクエン酸回路の第一段階の速度を調節する酵素であり短時間当たりの酵素活性をみたものである。ミトコンドリアのマトリックス内に存在し完全なミトコンドリアの量のマーカーとしての意義がある。Isolated Mitochondria および Homogenate Mitochondria の CS はともに Sham 群と CLP 群で有意差がなく、ミトコンドリア内の生合成の状況には差が生じていなかったものと考えられる。

この状況下で ADP 添加によって活性化された酸加的リン酸化による呼吸活性 (state3) で消費された酸素量と Oligomycin を投与し complex を抑制し ATP 循環が呼吸に与える影響を除外した内膜を leak した H⁺ による呼吸活性 (state4) で消費された酸素の量の比 Respiratory Control Ratio (RCR) を計算し比較したが有意差はなかった。

SUIT protocol において、Oligomycin によって ATPase を阻害するとプロトン (H⁺) のマトリックス内への供給がなくなる。呼吸鎖はマトリックス内のプロトンを消費してしまうので呼吸鎖は駆動力を失い酸素消費量は減少する。ここで complex とを促進し電子伝達系 (ETS: electron transfer system) を最大にするように FCCP (protonophore, carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)

phenylhydrazone) を滴定すると ATPase に頼らずにプロトンがマトリックスに増える。(Oligomycin 添加とその後の FCCP 滴定によって ETS が最大でどのぐらいの活性をもっているかが推測される。今回 FCCP 滴定での酸素消費率が CLP 群が Sham 群に比し優位に低かったことは、両群における内膜の完全性の問題と ETS 活性の変化が考えられる。RCR の有意差はなく、電顕レベルでの内膜の障害の確認が必要になる。Rotenone は complex を阻害し complex の電子供給を残す。酸素消費率の変化をみるため FCCP における Sham 群と CLP 群の酸素消費率の差と Rotenone 添加後の酸素消費率の差に注目し、ETS の最大活性に complex がどの程度寄与するかを FCCP/Rot を両群で比較したが差がなかった。Complex の活性の違いというよりも ETS 活性の違い、これには complex に活性の違いが影響を及ぼしたものと推察された。

本研究の SLF モデルは SLF Score 分類で示すように必ずしも一定の進行した敗血症レベルになく、早期から臨死期の重症敗血症に分布している可能性がある。その時期はモデル作成からの時間に必ずしも一致しない。ミトコンドリアの SLF に伴う形態学的な変化特に内膜の電顕レベルでの検討まで至っていないことが limitation としてあげられる。

(3) 結論

CLP 群/Sham 群で Swelling% rate と a value rate 細胞で CLP 群がやや高い傾向にあり、内の Ca 濃度上昇に伴い既にミトコンドリアがいくらかの Ca²⁺ を取り込んでいる場合やミトコンドリアの形態に変化に差が生じた可能性が示唆された。SUIT protocol から、CLP 群では complex を中心とした ETS 活性の障害が示唆された。

< 引用文献 >

- 1) Eyen P, Roussel D, Morel J, et al. Early septic shock induces loss of oxidative phosphorylation yield plasticity in liver mitochondria. *J Physiol Biochem* 2014; 70:285-296
- 2) Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc.* 2009;4:31-36
- 3) Morota S, Hansson MJ, Ishii N, et al. Spinal cord mitochondria display lower calcium retention capacity compared with brain mitochondria without inherent differences in sensitivity to cyclophilin D inhibition. *J Neuro Chem.* 2007;103: 2066-76
- 4) Hansson MJ, Morota S, Teilmann M, et al. Increased potassium conduction of brain mitochondria induces resistance to permeability transition by enhancing matrix volume. *J Biol Chem.* 2010;285:741-750
- 5) Sjövall F, Morota S, Hansson MJ, et al. Temporal increase of platelet mitochondrial respiration is negatively associated with clinical outcome in patients with sepsis. *Critical Care.* 2010; 14:R214
- 6) Larch J, Lancel S, Hassoun SD, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents sepsis-induced myocardial dysfunction and mortality. *JACC* 2006;48:377-385

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- 1) 原 直美、齋木 巖、屋良美紀、石田裕介、長島史明、西山遼太、諸田沙織、宮田和人。田上 正、内野博之。敗血症マウスモデルにおける早期の脳ミトコンドリア機能障害。東京医科大学雑誌 72: 82.2014 (査読なし)
- 2) Uchino H, Hatakeyama K, Morota S, Tanoue T, Nishiyama T, Usui D, Taguchi C, Suzuki M, Hansson MJ, Elmer E: Cyclophilin-D inhibition in neuroprotection: Dawn of a new era of mitochondrial medicine. Acta Neurochir Suppl 118:311-316, 2013 (査読有)
- 3) Nishiyama T, Hasegawa E, Yanagi S, Kudo Y, Hamada R, Matsumura N, Tomino M, Muromachi Y, Hatakeyama K, Uchino H: Simultaneous measurement of cytosolic and mitochondrial Ca(2+) during ischemia in mice whole-brain slice preparation and its application to drug evaluation. Acta Neurochir Suppl 118:65-70, 2013 (査読有)
- 4) Miyashita R, Chen L, Oshiro H, Uchino H, Shibasaki F: Int6 silencing causes induction of angiogenic factors in neuronal cells via accumulation of hypoxia-inducible factor 2 and decreases brain damage in rats. Neuroscience Letters The rapid communication journal for the neurosciences 528:83-88, 2012(査読有)
- 5) Yokoyama T, Tanoue T, Hasegawa E, Ikeda Y, Ohta S, Omi A, Kudo Y, Uchino H: Evaluation of the protective effects of cyclosporine a and FK505 on abnormal cytosolic and mitochondrial Ca²⁺ dynamics during ischemia and exposure to high glutamate concentration in mouse brain slice preparations. J Pharmacological sciences 120:228-240, 2012 (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

- 1) 内野博之。神経集中治療における脳保護のあり方。第41回日本集中治療医学会 2014 (2014.2.27-3.1) 京都

- 2) Naomi H, Karlsson M, Sjovalf F, Hansson M, Elmer E, Uchino H: Early brain mitochondrial dysfunction in a mouse model of sepsis. ESA 2013(2013.6.1-4) バルセロナ

- 3) 宮下亮一、諸田沙織、関根秀介、宮田和人、Eskil Elmer、内野博之。PMX-DHP 有用性評価の新たなバイオマーカーの探索 - 血小板ミトコンドリア呼吸鎖の観点から。第18回エンドトキシン血症救命治療研究会 2013 (2013.1.17-18) 東京

- 4) 沖田綾乃、内野博之、田上 正、岩瀬直人、松村典子、久保田愛子。当院 ICU における死亡症例の検討。日本麻酔科学会第59回学術集会 2012(2012.6.7-9) 神戸

〔図書〕(計1件)

- 1) 田上 正、関根秀介、柿沼孝泰。周術期薬物療法を行っている患者の術前評価とリスク管理。内野博之編：神経麻酔 Q&A エビデンスに基づく最新の知識とテクニック。東京。総合医学社，2014；61 - 67

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)
- 〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田上 正(Tanoue Tadashi)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：60145323

(2) 研究分担者

内野 博之(Uchino Hiroyuki)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：60266476