

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11062

研究課題名(和文)敗血症関連脳症における脳ミトコンドリア機能不全と小胞体ストレス制御機構の役割解明

研究課題名(英文) Investigation for the role of mitochondrial dysfunction and ER stress on SAE

研究代表者

内野 博之(Uchino, Hiroyuki)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：60266476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症関連脳症(Sepsis associated encephalopathy; SAE)の脳障害発症機序をCypD KOマウスを用いて、回盲部結紮+2回穿刺によるCLPモデルで解析した。CLP作成18時間後には、脳内GSHの低下とGSSGの増加が観察された。mitophagyは観察されなかった。Csapase3は、CLP作成6、18時間後で有意な増加を示した。SAEの脳障害発症機序として、脳内抗酸化系の破綻、Csapase3を介したアポトーシス経路とCypDを介した細胞死経路の関与が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当該分野における本研究の学術的特色は、SAE発症病態をCypD・MPTを介したミトコンドリア機能不全ならびに細胞内のクリアランスシステムであるオートファジーとの関連解析から明確にすることに着目しSAEに対する新規脳保護・脳蘇生法確立を目指した点が独創的である。得られた結果としては、SAE誘発性脳障害における脳内のミトコンドリア・CypD・MPTと抗酸化系およびアポトーシスの役割が明確化された。SAE誘発性脳障害におけるミトコンドリアCypD・MPT制御機構の役割の特定と、他の神経系関連疾患の病態解明にも貢献し新規治療薬開発へ繋がる可能性を見いさせたことを本研究を行った意義と考える。

研究成果の概要(英文)：The mechanism for Sepsis associated encephalopathy (SAE) was analyzed using the CypD KO mouse by CLP model with cecal ligation and puncture. 18 hours after CLP preparation, a decrease in brain GSH and an increase in GSSG were observed. No mitophagy was observed. Csapase3 showed a significant increase at 6 and 18 hours after CLP. The possible mechanisms of SAE involve the breakdown of the antioxidant system in the brain, the involvement of the apoptosis pathway via Csapase3 and the cell death pathway via CypD KO.

研究分野：神経科学

キーワード：シクロフィリンD CypD 敗血症関連脳症 CLPモデル メタボローム解析 アポトーシス オートファジー MPT

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症関連脳症 (**Sepsis associated encephalopathy; SAE**) は感染による全身性炎症反応の結果として生じるびまん性脳機能障害で、9 - 71%の死亡率が報告されている (**Muller-Werdan et al. 2006**) が、SAE 誘発機構における **ER-phagy** や **mitophagy** と **CypD** の関係や **Autophagic cell death** と **Syvn**・**ERAD** および **CypD** の関係も解析は手付かずの状態である。

2. 研究の目的

敗血症関連脳症 (**Sepsis associated encephalopathy; SAE**) の脳障害発症機序は未知で、標的分子も明らかではない。本研究では、これまでの SAE 発症に対する **ERAD** (**Endoplasmic Reticulum-associated Degradation**) に関する **Syvn** のメカニズム研究で蓄積された結果と従来の虚血性神経細胞死における脳内 **MPT** の役割解析の成果を基盤として、SAE 誘発機構を細胞死やアポトーシス誘発の中心的役割を担う **MPT** によるミトコンドリア・**CypD** と **Syvn**・**ERAD** 制御経路を機軸とした両情報伝達系からの連関解析を行うとともに SAE における細胞死・アポトーシス誘発が **ERAD** とは異なる細胞内のクリアランスシステムであるオートファジーの果たす役割解明に展開することを目的とした。

3. 研究の方法

Syvn **KO** マウスおよび **Syvn**・**CypD** **KO** マウスの作成が思わしくなく、最終的には **CypD** **KO** マウスを用いた解析を進める形となった。

【C : **CypD** 遺伝子欠損 (**Ppif**^{-/-}) マウス (**CypD** **KO** マウス) の作成】

CypD **KO** マウスは **Jackson Lab** より購入して、系統維持している。このマウスは、**CypD** 遺伝子のエクソン 1~3、および、翻訳開始点上流 20 bp をネオマイシンカセットの挿入により欠失させたノックアウトマウスである。そのため、**CypD** **KO** マウス同士の交配により、系統維持を行う。このマウスは、ミトコンドリアの膜透過性亢進 (**MPT**) を減弱させる表現型を有するため **CypD** 遺伝子欠損 (**Ppif**^{-/-}) マウス (**CypD** **KO** マウス) を作製した。

【平成 29 年度研究計画】

第 8-10 週令の雄性 C57B6 wild マウスを wild 群と **CypD** 遺伝子欠損 (**Ppif**^{-/-}) マウス (**CypD** **KO** 群) を用いて回盲部結紮 + 2 回穿刺による (CLP) 誘発敗血症性脳症モデル (SAE モデル) を作製する。モデル作製 6、18 時間後 (wild 群と Edaravon 群、**CypD** **KO** 群ともに各群 3 匹の動物を使用、また、各群の sham として 3 匹ずつの動物を使用) に大脳のサンプリングを施行して 5% (w/w) マンニトール水溶液 10ml を添加し、懸濁し、メタノール 800ml を添加する。さらに内部標準液 500ml 添加し 30 秒間 vortex し、2,300xg、4 5 分間遠心して遠心上清 350ml x2 を限外濾過フィルターにて除タンパクして 9,100xg 2~5 時間遠心して pellet を 5% (w/w) マンニトール水溶液 10ml に懸濁し CE-TOFMS による脳内代謝経路のメタボローム解析を行い、脳内ミトコンドリア **CypD** 情報伝達系の脳内代謝経路への役割を網羅的に検討した。

【平成 30 年度研究計画】

オートファジーは、単一アッセイでの定量性に乏しい。そのため以下の複数のアッセイを組み合わせることによって総合評価を行う。第 8 10 週令の雄性 C57B6 wild マウスを wild 群、**CypD** **KO** マウス群を用いて SAE モデルを作製し、モデル作製 12 時間後、1、2 日後 (各時間・両群とも 5 匹のラットを使用) に 4 2% パラホルムアルデヒド + 2.5% グルタルアルデヒド + 0.1M リン酸

バッファー溶液で灌流固定して、大脳(視交叉より2mm後方)の冠状断面で2mmの切片を切り出し、3%グルタルアルデヒド+1%リン酸バッファー+4%酸化オスミウムにて後固定後にエポキシ包埋し0.12mmで薄切切片を作成し、0.2%クエン酸鉛+1%酢酸ウランにて染色した後に走査電顕にてオートファゴソームおよびオートリソソーム形成の有無を解析するとともに大脳皮質タンパクを可溶化、抗LC3B抗体と抗p62抗体を用いたimmunoblotting法を行う。デンシトメトリーにてLC3-II(脂質修飾型)/LC3-I比(オートファゴソーム形成・量を反映)、p62の減衰スピード(分解能を反映)を評価し、SAE誘発オートファジー形成を検証・定量化し、CypD・MPT情報伝達系のオートファジー発現(mitophagy)に果たす役割を検討した。

【平成31年～令和元年度研究計画】

第8 10週令のC57B6 wildマウスを2群に分けて解析する。wild群とCypD KO群を用いてSAEモデルを作製し、モデル作製12時間後、1、2日後(各時間・両群とも5匹のラットを使用)に脳ミトコンドリアを抽出してCa²⁺ overloadをin vitroにて作り出し、ミトコンドリアの膨化(swelling)を計測、解析比較する。ラット大脳皮質からParcoI法でミトコンドリア分画を抽出し蛋白定量後、25µg/mlのミトコンドリアをKCl bufferに加えてCaCl₂(0-10µmol/mgprotein)を加えて520nmでlight scatteringを行いMPTに伴うミトコンドリアの膨化率を測定する。また、細胞死・Apoptosisの発現変動をCelestinblue-acid fuchsin染色とIκB, Bax, P53をimmunoblotにて検討した。

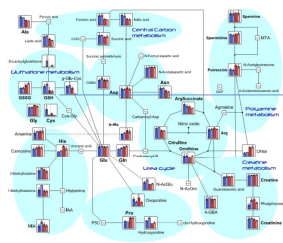
4. 研究成果

(1) SAE誘発時の脳内ミトコンドリアCypDを介した脳内代謝経路のメタボロームによる網羅的解析

CypD KOマウスは、当初CLPモデルによるSEに対して抵抗性を示すという予想通り最長72時間後まで生存したが、wildマウスは18時間後までにすべて死亡した。メタボローム解析にてWild群、CypDKO群の解析結果より、wild群ではCLP6、18時間後にGSH(グルタチオン)の有意な低下を示したが、CypDKO群ではGSHの低下は認められず、抵抗性を示した。フリーラジカル消去剤のエダラボン投与wildマウス群(E群)では18時間後にGSHは低下したが、wildよりその低下は少なかった。脳内の抗酸化機構が維持されているが、機能が抑制されていることが明らかとなった(図1、2)。

この結果から、脳内抗酸化機構のグルタチオン系の破綻と脳内ミトコンドリアにおけるMPT(Mitochondrial Permeability Transition)に伴うミトコンドリア機能不全のSAEに於ける重要性が明らかとなった。OHラジカル消去剤のエダラボンの投与はミトコンドリアにおける酸化ストレスの影響を完全には抑制できないことが明らかとなった。

脳内メタボローム解析による敗血症性脳症の発現機序解析結果



結論
Wildマウスでは脳グルタチオン系の破綻が起こり、CypDKOマウスでは脳グルタチオン系が維持され抗酸化機構が果たさないため脳保護作用が示された。

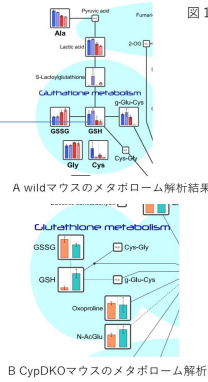


図 1

脳内メタボローム解析による敗血症性脳症の発現機序解析結果

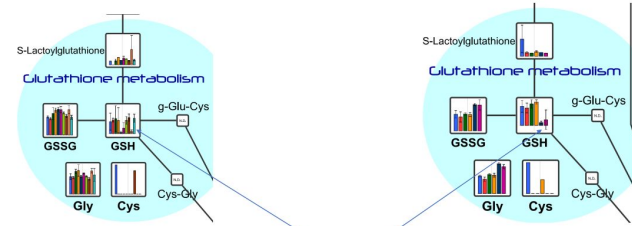


図 2

CypDKOマウスでは6、18時間後もGSHは低下せず脳内の抗酸化機構が維持されていることが明らかとなった。

GSHの発現

Edaravon投与KOマウスでは18時間後にGSHは低下したが、wildよりその低下は少なかった。脳内の抗酸化機構が維持されているが、かなり機能が抑制されていることが明らかとなった。

(2) オートファジーとの関連について

オートファジーを検出するための抗 LC3B 抗体と抗 p62 抗体を用いた immunoblotting 法では wild マウスと CypD KO マウスとの差は認められなかった。

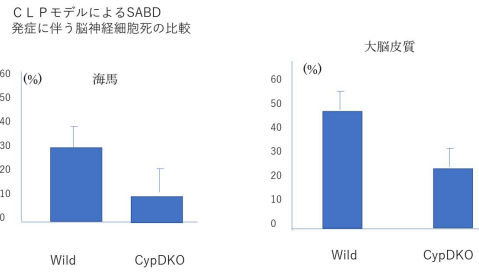
(3) 両群における神経細胞死の比較および western blot

SAE 作成 6 時間後までは脳のどの部位も細胞死は認められなかった。18 時間後においては Wild 群で海馬 (左 $27.5 \pm 5.6\%$, 右 $25.8 \pm 8.1\%$: 平均 26%)、大脳皮質 (左 $45.6 \pm 8.4\%$, 右 $47.4 \pm 7.84\%$: 平均 46%)、CypD KO マウス群において海馬 (左 $8.4 \pm 6.6\%$, 右 $7.8 \pm 7.1\%$: 平均 26%)、大脳皮質 (左 $19.6 \pm 8.4\%$, 右 $18.4 \pm 8.94\%$: 平均 18.7%) と CypD KO マウス群において細胞死の減少を認めた (図 3)。

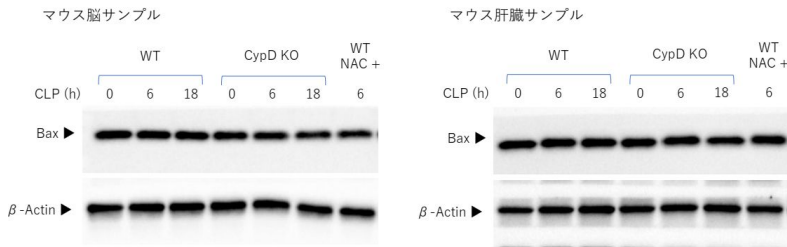
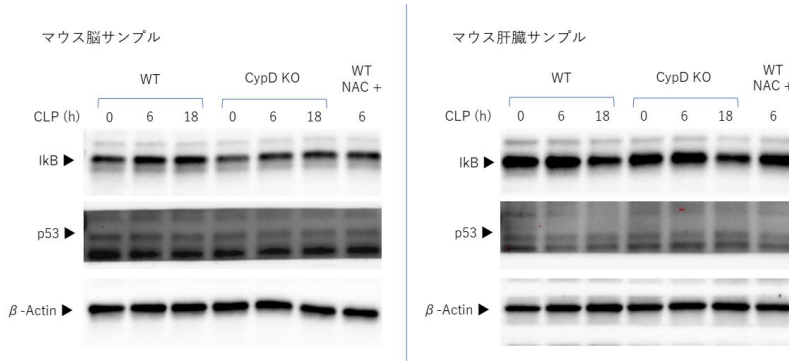
I κ B は CLP 処置後 18 時間の肝臓サンプルにおいて若干の発現量の低下が見られ、これが I κ B の分解であれば、その分 NF κ B が活性化している可能性がある。脳に於いては、I κ B は、wild マウスと CypD KO マウスとの差を認めなかった。

p53 は脳・肝臓サンプルともに CLP 処置による発現誘導は認められず、wild マウスと CypD KO マウスとの差を認めなかった (図 4)。Bax は脳・肝臓サンプルともに CLP 処置による発現誘導は認められず、wild マウスと CypD KO マウスとの差は認められなかった (図 5)。

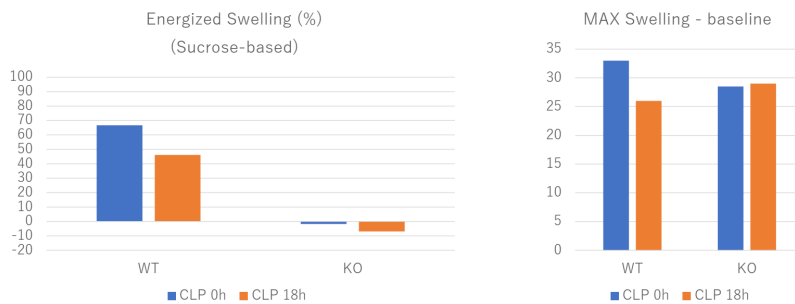
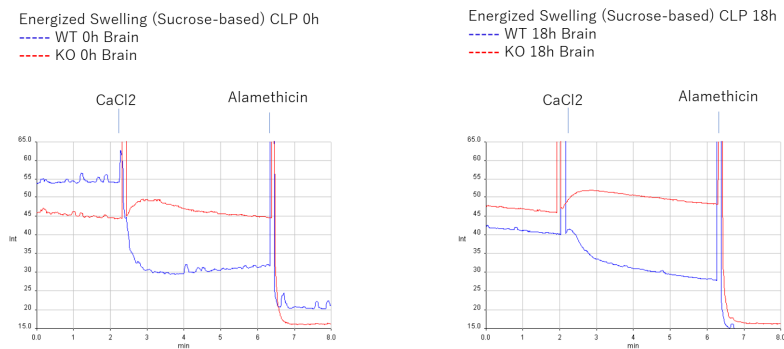
De-Energized Swelling と同様に、wild マウスでは著しい膨化が認められたが、CypD KO マウスではほとんど膨化が認められなかった。また、CLP 処置後 18 時間のサンプルでは、wild マウスのサンプルにおいて初期値の低下及び光散乱強度の変化量の減少が見られ、ミトコンドリアの膨化が進行している可能性が示唆された (図 6, 7)。



(4) Wild マウスと CypD KO マウスにおける Bax 発現



(5) CypD KO, CLP 0h, 18h 群 マウス脳ミトコンドリア 光散乱測定による Swelling 解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishida Y, Fujita H, Aratani S, Chijiwa M, Taniguchi N, Yokota M, Ogihara Y, Uoshima N, Nagashima F, Uchino H, Nakajima T.	4. 巻 18
2. 論文標題 The NRF2-PGC-1 pathway activates kynurenine aminotransferase 4 via attenuation of an E3 ubiquitin ligase, synoviolin, in a cecal ligation/perforation-induced septic mouse model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Med Rep.	6. 最初と最後の頁 2467-2475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2018.9175	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 該当する

1. 著者名 Bilotta F, Laretta MP, Tewari A, Haque M, Hara N, Uchino H, Rosa G.	4. 巻 32
2. 論文標題 Insulin and the Brain: A Sweet Relationship With Intensive Care.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Intensive Care Med	6. 最初と最後の頁 48-58
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 有
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 -

1. 著者名 内野 博之, 長島 史明, 小林 賢礼, 長倉 知輝, 藤田 陽介, 荻原 幸彦	4. 巻 37
2. 論文標題 神経麻酔と神経集中治療における脳保護戦略	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本臨床麻酔学会誌	6. 最初と最後の頁 457-474
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 有
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 -

1. 著者名 黒田 泰弘(香川大学 医学部救急災害医学), 相引 眞幸, 内野 博之, 木下 浩作, 小畑 仁司, 永山 正雄, 澤村 淳, 三宅 康史, 坂本 哲也, 山下 進, 有元 秀樹, 久保山 一敏, 櫻井 淳, 守谷 俊, 垣花 泰之, 野々木 宏, 日本集中治療医学会JRC蘇生ガイドライン2015ALS部門作業部会	4. 巻 24
2. 論文標題 JRC蘇生ガイドライン2015 成人の二次救命処置 心拍再開後の集中治療、予後評価	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本集中治療医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 151-183
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 有
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林 賢礼
2. 発表標題 CyclophilinD遺伝子欠損マウスを用いたCLP誘発敗血症関連脳症の発症機序に対するメタボローム解析
3. 学会等名 日本神経麻酔集中治療学会
4. 発表年 2018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	魚島 直美 (Uoshima Naomi) (20792211)	東京医科大学・医学部・病院助教 (32645)	
研究分担者	石田 裕介 (Ishida Yuhsuke) (40805884)	東京医科大学・医学部・助教 (32645)	
研究分担者	西山 遼太 (Nishiyama Ryota) (60795607)	東京医科大学・医学部・助教 (32645)	
研究分担者	小林 賢礼 (Kobayashi Takayuki) (80837724)	東京医科大学・医学部・助教 (32645)	
研究分担者	千々岩 みゆき (Chijiwa Miyuki) (80407080)	東京医科大学・医学部・助教 (32645)	