

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K16757

研究課題名(和文) サイクロフィリンDノックアウトマウスによる敗血症関連脳症のミトコンドリア分子解析

研究課題名(英文) Mitochondrial molecular analysis of sepsis-associated encephalopathy by the Cyclophilin D knockout mice

研究代表者

魚島 直美 (UOSHIMA, Naomi)

東京医科大学・医学部・臨床助教

研究者番号：20792211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：第7-8週齢の雄性C57BL/6マウス(WTマウス)とCyclophilin D遺伝子欠損マウス(KOマウス)を用いて盲腸結紮穿孔法による敗血症関連脳症モデルを作成し、死亡率の比較及びCelestine blue and acid fuchsin染色とHE染色にて大脳の神経細胞死を比較したところ、KOマウスで有意に低かった。モデル作製18時間後の海馬および大脳皮質を用いて炎症性サイトカイン発現と、ミトコンドリア呼吸鎖の機能を測定したが有意差はなかった。SAEの発生機序としてCyclophilin Dが関わるか明らかにならなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症関連脳症の脳障害発症機序は不明であり標的分子も明らかではない。本研究では活性酸素種により活性化されるBcl family とMPTPを制御するミトコンドリアpeptidyl prolyl isomerase (Ppi) のCyclophilin Dに注目し、SAEの誘発機序としてCyclophilin D遺伝子欠損(Ppif^{-/-})マウスを用いた盲腸結紮穿孔法誘発脳症モデルにて解析を進めた。死亡率や神経細胞死の減少は認められたが、炎症性サイトカインやミトコンドリア呼吸鎖に有意差はなく詳細なメカニズムの解明には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Model of sepsis-associated encephalopathy (SAE) were made by cecal ligation and puncture (CLP) using adult male C57/BL6 mice at 7 to 8 weeks of age wild-type (WT mice) mice and mice null for Ppif on the same background (Ppif^{-/-} KO mice). WT mice and KO mice groups were compared mortality rates and cerebral neuronal death by Celestine blue and acid fuchsin staining and HE staining. The mortality rate was significantly lower in KO mice. The expression of inflammatory cytokines and mitochondrial respiratory chain function were measured in the hippocampus and in the cortex at 18 hours after creation of the model, but there were no significant differences. It was not clear whether Cyclophilin D is involved in the pathogenesis of SAE.

研究分野：Nerve anesthesia

キーワード：敗血症性脳症 Cyclophilin D mitochondria

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)の脳障害発症機序は不明であり、その標的分子も明らかではない。本研究では、虚血性神経細胞死やSAEのメカニズム研究で蓄積された脳内MPTP(Mitochondrial Permeability Transition pore)の役割解析の成果を発展させ、MPTPに伴う脳ミトコンドリア機能不全に焦点を置き、SAEの実態をMPTPを制御するCyclophilin Dおよび活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS)を機軸とした情報伝達系との関連解析に展開することを目的とした。SAEの機序解明、新規防御法開発、麻酔科学・蘇生学・神経集中治療学領域での安全性と信頼性を高めることを目標とした。

2. 研究の目的

SAE誘発に参与する活性酸素種により活性化されるBcl familyとMPTPを制御するミトコンドリアpeptidyl prolyl isomerase(Ppi)のCyclophilin Dの情報伝達系とに着目し、ROS-Bcl family-MPTP-apoptosis/necrosisという経路を機軸として、SAEの誘発機序をCyclophilin D遺伝子欠損(*Ppif*^{-/-})マウス(CypD KOマウス)を用いた盲腸結紮穿孔法(Cecal ligation and puncture; CLP)誘発脳症モデル(SAEモデル)にて解析を進めた。

(1)CypD KOマウスにおけるSAEモデルの生存率の解析、(2)SAE発症におけるミトコンドリア機能不全とCypDを介したapoptosis/necrosisの関連、(3)CypD KOマウスにおけるSAEモデルの脳内遺伝子発現の解析、(4)敗血症関連脳症がROS-Bcl-2family-MPTPを介したミトコンドリア機能不全においてCyclophilin Dが脳MPTPへ及ぼす影響の関係を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)第7-8週齢の雄性C57BL/6マウス(WTマウス)とCyclophilin D遺伝子欠損(*Ppif*^{-/-})マウス(KOマウス)を用いて回盲部結紮と盲腸1回穿孔(盲腸結紮穿孔法、Cecal ligation and puncture; CLP)による敗血症関連脳症モデル(SAEモデル)を作製した。モデル作製3,6,18,24時間後の生存率を評価した。

(2)第7-8週齢の雄性C57BL/6マウス(WTマウス)とCyclophilin D遺伝子欠損(*Ppif*^{-/-})マウス(KOマウス)を用いて回盲部結紮と盲腸1回穿孔(盲腸結紮穿孔法、Cecal ligation and puncture; CLP)による敗血症関連脳症モデル(SAEモデル)を作製し、Celestine blue and acid fuchsin染色およびHE染色による大脳皮質、海馬の神経細胞死の比較を行い、Cyclophilin Dの生存率および神経細胞死に及ぼす影響を比較した。

(3)第7-8週齢の雄性C57BL/6マウスをWTマウスとKOマウスの2群に分けて、SAEモデルを作製する。モデル作製6,12,24時間後に凍結切片作製と大脳のサンプリングを行い、mRNAと蛋白の抽出後、RT-PCRとwestern blotでBcl family(Bax,Bak,Bcl-2),TNF,IL-6の炎症性サイトカインの発現を比較した。

(4)第7-8週齢の雄性C57BL/6マウスをWTマウスとKOマウスの2群に分けて、SAEモデルを作製後、大脳皮質を取り出して、Elmer等の方法(Morota et.al J Neuro Chem 2007)に準じてParcol法でミトコンドリア分画を抽出しMir05 bufferに加えてOROBOROS Oxygraph-2kを用いてミトコンドリアの呼吸鎖の機能を測定した。

4. 研究成果

(1)第7-8週齢の雄性C57BL/6マウス(WTマウス)とCyclophilin D遺伝子欠損(*Ppif*^{-/-})マウス(KOマウス)各群10匹を用いて回盲部結紮と盲腸1回穿孔(盲腸結紮穿孔法、Cecal ligation and puncture; CLP)による敗血症関連脳症モデル(SAEモデル)を作成し、死亡率を比較したところ、KOマウスの死亡率が有意に低かった($p=0.004$)。WTマウスは半数が30時間以内に死亡し、46時間以内に全数が死亡した。一方KOマウスは70時間を超えても半数が生存していた。

(2)SAEモデル作製3,6,18時間後の大脳サンプリングを各群5匹用いてRT-PCRとwestern blotを用いてBax,Bak,Bcl-2,TNF,IL-6の炎症性サイトカインの発現を比較したが、有意差はなかった。

(3) SAE モデル作成 18 時間後の大脳サンプリングを用いて Celestine blue and acid fuchsin 染色と HE 染色による神経細胞死を比較したところ、KO マウスは WT マウスに比べて神経細胞死が有意に低下していた(大脳皮質: $p < 0.001$, 海馬: $p = 0.004$)。

(4) SAE モデル作製 3, 6, 18 時間後の大脳のサンプリングからミトコンドリア分画を抽出した後、OROBOROS Oxygraph-2k にてミトコンドリア呼吸鎖の機能を測定したが、complex ~ において有意差はなかった。

KO マウスでは死亡率の低下や神経細胞死の減少といった差はみられたが、炎症性サイトカインの発現やミトコンドリア呼吸鎖機能に有意差は認められず、SAE の発生機序として Cyclophilin D が関わるか明らかにならなかった。ROS-Bcl family-MTPT-apoptosis/necrosis という経路が SAE の脳障害発症に関わるという仮説を立てて実験を進めたが、本研究期間では解明に至らなかった。

引用文献 Kobayashi, T. et al. A. Disease Outcome and Brain Metabolomics of Cyclophilin-D Knockout Mice in Sepsis. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 961

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------