

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18307

研究課題名(和文)敗血症関連脳障害におけるシクロフィリンD/Sirtuin3情報伝達系の連関解析

研究課題名(英文) Linkage analysis of Cyclophilin D / Sirtuin 3 signaling system in sepsis-associated brain dysfunction

研究代表者

石田 裕介 (Ishida, Yusuke)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：40805884

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)：敗血症性脳症誘発脳内サイトカイン発現、神経細胞死・アポトーシス形成における脳内ミトコンドリア・CypD・MPTとSIRT3情報伝達系の果たす役割解明を検討した。第8-10週令の雄性C57B6 wildマウス(wild群)とCypD遺伝子欠損(Ppif<sup>-/-</sup>)マウス(CypD KO群)を用いて回盲部結紮+2回穿刺による(CLP)誘発敗血症性関連脳障害モデルを作製した。モデル作製1、6時間後、1日後に大脳のサンプリングを行い、メタボローム解析、DNAチップ解析を行った。様々な情報伝達系の代謝産物の活性を比較し敗血症性脳症に至るメカニズムを検討した。得られたデータをもとに論文作成の準備を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果としては、メタボローム解析や、DNAチップ解析から、敗血症性脳症誘発における脳内のミトコンドリア・CypD・MPTとSynn・ERAD情報伝達系とオートファジーの役割が明確化され、SAE誘発性脳障害におけるミトコンドリアER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事が本研究の社会的意義と考える。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of brain mitochondria, CypD, MPT and SIRT3 signaling pathways in septic encephalopathy-induced brain cytokine expression, neuronal cell death and apoptosis formation. We created a model of septicemia-related brain injury induced by ileal ligation plus two punctures (CLP) using male C57B6 wild mice (wild group) and CypD gene-deficient (Ppif<sup>-/-</sup>) mice (CypD KO group) at 8-10 weeks of age. Cerebrum was sampled at 1, 6 hours, and 1 day after model creation for metabolomic and DNA chip analysis. We compared the activities of metabolites of various signaling pathways and examined the mechanisms leading to septic encephalopathy. Based on the data obtained, we are preparing to write a paper.

研究分野：神経麻酔、集中治療

キーワード：敗血症 シクロフィリンD 敗血症性関連脳傷害 ミトコンドリア

### 1. 研究開始当初の背景

脳障害や多発性硬化症モデルでは示されている(Sun et al. 2016, Warne et al.2016)。また、申請者は、ERAD (Endoplasmic Reticulum-associated Degradation) に関与する Syvn の発現を抑制することでミトコンドリア保護機構を有する PGC-1 を過剰発現させて神経毒性のあるキヌレニンがキヌレン酸に代謝されるのを促進し、PGC-1 が神経保護作用を有することを明らかとした(Ishida et al. 2018)。その一方で、SAEにおける CypD やミトコンドリア蛋白であり、エネルギー代謝やアポトーシス・酸化ストレス制御等に重要な役割を担う SIRT3 の役割は明らかでなく両者の関係については十分な解析が行われていない。本研究では、これまでの虚血性神経細胞死における脳内 MPT (Mitochondrial Permeability Transition) の役割解析の成果を基盤として SAE の実態を MPT 誘発ミトコンドリア機能不全の中心的役割を担うミトコンドリア・Cyclophilin D (CypD) を介した細胞死・アポトーシス実行経路とミトコンドリアのエネルギー代謝やアポトーシス・酸化ストレス制御を担う Sirtuin3(SIRT3)を機軸とした情報伝達系を介したミトコンドリア保護機構の連関解析を Cyclophilin D 遺伝子欠損(Ppif<sup>-/-</sup>)マウス(CypD KO マウス)を用いて行うとともに SAE における CypD と SIRT3 を介した情報伝達系が細胞内クリアランス機構のオートファジーに果たす役割解明に展開し、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的とするという着想に至った。この試みは、SAE のメカニズム MPT-apoptosis/necrosis-SIRT3cell/survival の連関という新しい解釈を加えるものであり、この解釈を基にして、新規の防御法を開発し、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指す。このような試みはこの領域の研究にはこれまでにほとんどなされておらず、その成果は十分に世界レベルの研究に値するものである。また、SAE 発症における MPT 誘発における CypD との関係や SIRT3 による MPT 開孔制御との関係も手付かずの状態、詳細なメカニズムの解明が早急に求められている。また、大隅らの研究により明らかとなったオートファジー現象は、細胞質や場合によってはミトコンドリアやペルキシソーム等のオルガネラを包み込んだ後に隔離膜の末端同士が細胞質や場合によってはミトコンドリアやペルキシソーム等のオルガネラを包み込んだ後に隔離膜の末端同士が融合し、閉じた 2 重膜構造が完成してオートファゴソームとなり (Tsukada et al. 1993) 続いてその外膜に消化オルガネラであるリソソームが融合しオートリソソームになって内容を消化・分解する一連のプロセスである。タンパク凝集体の消化、ミトコンドリアもクリアランスにも関与している (Mitophagy) 。また、オートファジーによる細胞死の誘導を Autophagic cell death 呼ぶことも提唱されている。一方で、SAE 誘発機構における mitophagy と CypD の関係や Autophagic cell death と CypD の関係も解析は手付かずの状態である。それ故に、本研究では、SAE 誘発機序に於けるミトコンドリア・CypD・MPT 情報伝達系のクロストークとオートファジーの役割を解明し未知の病態である SAE 誘発機構解明に一石を投じ、SAE の機序解明、新規防御法開発するという研究着想に至った。

### 2. 研究の目的

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と Syvn・ERAD 情報伝達系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連関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。予想される結果としては SAE 誘発性脳障害における脳内のミトコンドリア・CypD・MPT と Syvn・ERAD 情報伝達系とオートファジーの役割が明確化される SAE 誘発性脳障害におけるミトコンドリア ER 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ということが本研究を行う意義と考える。

### 3. 研究の方法

敗血症性脳症の実態を MPT 誘発ミトコンドリア機能不全の中心的役割を担うミトコンドリア・Cyclophilin D (CypD) を介した細胞死・アポトーシス実行経路とミトコンドリアのエネルギー代謝やアポトーシス・酸化ストレス制御を担う Sirtuin3(SIRT3)を機軸とした情報伝達系を介するミトコンドリア保護機構の解析のために、敗血症性脳症誘発脳内サイトカイン発現、神経細胞死・アポトーシス形成における脳内ミトコンドリア・CypD・MPT と SIRT3 情報伝達系の果たす役割解明を検討した。第 8-10 週令の雄性 C57B6 wild マウス(wild 群)と CypD 遺伝子欠損(Ppif<sup>-/-</sup>)マウス(CypD KO 群)を用いて回盲部結紮+2 回穿孔による (CLP) 誘発敗血症性関連脳障害モデル (SABD モデル) を作製する。モデル作製 1、6 時間後、1 日後 (各時間とも 5 匹の動物を) に大脳のサンプリングを行い、メタボローム解析、DNA チップ解析を行う。様々な情報伝達系の代謝産物の活性を比較し、敗血症性脳症に至るメカニズムを検討する。また、重症や軽症など、条件を変更し、敗血症性脳症モデルマウスの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 TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10 などのサイトカインの発現を両群で比較し有意差がでるか検討する。

#### 4. 研究成果

敗血症性脳症の実態を MPT 誘発ミトコンドリア機能不全の中心的役割を担うミトコンドリア・Cyclophilin D (CypD) を介した細胞死・アポトーシス実行経路とミトコンドリアのエネルギー代謝やアポトーシス・酸化ストレス制御を担う Sirtuin3 (SIRT3) を機軸とした情報伝達系を介するミトコンドリア保護機構の解析のために、敗血症性脳症誘発脳内サイトカイン発現、神経細胞死・アポトーシス形成における脳内ミトコンドリア・CypD・MPT と SIRT3 情報伝達系の果たす役割解明を検討した。第 8-10 週令の雄性 C57B6 wild マウス(wild 群)と CypD 遺伝子欠損(Ppif<sup>-/-</sup>)マウス(CypD KO 群)を用いて回盲部結紮+2 回穿刺による (CLP) 誘発敗血症性関連脳障害モデル (SABD モデル) を作製した。モデル作製 1、6 時間後、1 日後 (各時間とも 5 匹の動物を) に大脳のサンプリングを行い、メタボローム解析、DNA チップ解析を行った。様々な情報伝達系の代謝産物の活性を比較し、敗血症性脳症に至るメカニズムを検討した。また、メタボローム、DNA チップ解析の結果から、現在、敗血症性脳症の原因代謝産物の追及と、敗血症性脳症誘発におけるクリアランス現象であるオートファジー形成の検証を行っている。DNA チップによる遺伝子発現解析については、脳障害に関与する遺伝子の Pathway 解析を施行した。得られたデータをもとに関連学会、および論文の作成の準備を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Kobayashi Takayuki, Uchino Hiroyuki, Elm?r Eskil, Ogihara Yukihiko, Fujita Hidetoshi, Sekine Shusuke, Ishida Yusuke, Saiki Iwao, Shibata Shoichiro, Kawachi Aya	4. 巻 23
2. 論文標題 Disease Outcome and Brain Metabolomics of Cyclophilin-D Knockout Mice in Sepsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 961 ~ 961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23020961	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 -

〔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
---------	---------