

令和 6 年 5 月 18 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09255

研究課題名（和文）敗血症性脳症誘発機序とシクロフィリンD情報伝達系の連関及びMPT孔構造解析の試み

研究課題名（英文）New approach for the mechanisms of septic encephalopathy based on cyclophilin D signal transduction and mitochondrial permeability transition pore structure

研究代表者

内野 博之（Hiroyuki, Uchino）

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） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、敗血症性脳症（SAE）の実態を2020年にProtein ArrayとmiRNA解析によるCypD情報伝達系の細胞死・アポトーシス実行経路への役割の網羅的解析を試みた。ケモカインがCLP作成6、18時間後に増加した。脳内GSH/Nrf2解析ではHO-1の有意な変動がCLP作成18時間後に見られた。2021～2023年にmitophagyの解析を行ったが、走査電顕に用いるためのサンプルに対する免疫染色を行うための適切な抗体が得られず十分な解析は出来なかった。クライオ電顕での解析は今回の研究では行えなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症関連脳症（Sepsis associated encephalopathy; SAE）の脳障害発症機序は未だに機序や責任分子も明らかではない。本成果は十分に得られなかったが、研究では、SAEの実態を脳内ケモカインの役割や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内のCyclophilin D（CypD）と脳内抗酸化ストレス機構のGSH/Nrf2を機軸とした情報伝達系が関与することを見出せた。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指すことに繋がったものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to comprehensively analyze the actual status of septic encephalopathy (SAE) in 2020 by Protein Array analysis of the role of CypD signaling pathway in cell death and apoptosis execution pathway. Chemokines increased 6 and 18 hours after CLP creation. In brain GSH/Nrf2 analysis, significant changes in HO-1 were observed at 18 hours after CLP preparation. 2021-2023, mitophagy analysis was performed, but the immunostaining of the samples for scanning electron microscopy was not sufficient for adequate analysis. Cryo-EM analysis could not be performed in this study.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：敗血症性脳症 シクロフィリンD ミトコンドリア アポトーシス オートファジー マイトファジ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症の治療成績の向上とともに患者の生存率も改善されてきたが、QOL を低下させる後遺症に敗血症関連脳症 (Sepsis associated encephalopathy; SAE) がある。本研究では、CLP 誘発敗血症性脳症モデル (SAE モデル) に対する ER ストレス制御機構の ERAD の関与するシノピオリン (Syn) のメカニズム研究やメタボローム解析により GSH を中心とした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 (Hara et al. 2015)。また、我々の解析実験よりミトコンドリア特異的なシクロフィリン D (CypD) が MPT 誘発に伴うミトコンドリア機能不全の原因となることを見出した (Uchino et. al 2002)。特に、脳傷害形成に、CypD は酸化ストレスに伴う MPT 誘発に重要な役割を担うことが明らかとなった (Baine et.al 2005)。CypD は、MPT 開孔に重要な因子で、我々の作成した CypD 遺伝子欠損 (Ppif<sup>-/-</sup>) マウス (CypD KO マウス) の研究では SAE 後の GSH 系の維持と生存日数が延長することが明らかとなった (データは解析中)。その一方で、SAE 発症機序における CypD と脳内抗酸化機構を担うグルタチオン (GSH) 系が包含する情報伝達系と酸化ストレスに対する生体防御遺伝子群の発現を制御する転写因子である Nrf2 (nuclear factor erythroid2-related factor 2) が関与する情報伝達系 (以後、CypD/GSH/Nrf2 情報伝達系とする) との連関解析は十分ではない。また、細胞内の浄化・リサイクルシステムでミトコンドリアなどの細胞内小器官のクリアランスにも関与するマイトファジー (Mitophagy) による細胞死と CypD/GSH/Nrf2 情報伝達系との連関は不明である。更には、MPT 孔の中心的構成要素である CypD・ANT (adenine translocase)・VDAC (voltage dependent anion Channel) の複合体構造の解明は全く手付かずの状態と言える。本研究では、CypD KO マウスを用いて SAE 発症機序を CypD/GSH/Nrf2 情報伝達系との連関解析から細胞死・アポトーシス実行経路に対する役割を検討する。また、SAE 発症と CypD 情報伝達系のミトコンドリア選択的なオートファジー (mitophagy) に果たす役割解明に展開し、クライオ電子顕微鏡による電子トモグラフィ法を用いた MPT 孔の構造特定という新規の切り口で SAE 発症のメカニズム解明を学際的に試み、SAE 発症機序解明、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が研究課題の核心をなす学術的「問い」となる。

### 2. 研究の目的

本研究目的とその学術的独自性は、SAE の発症実態を解明するために CypD 情報伝達系を中心に捉えて、CypD/GSH/Nrf2 情報伝達系との連関および細胞内ミトコンドリアのクリアランス機構である mitophagy に果たす役割解明に展開して、細胞死・アポトーシス実行経路の連関解析を行う。更に、MPT 孔の中心的構成要素と考えられる CypD・ANT (adenine translocase)・VDAC (voltage dependent anion Channel) の構造解析をクライオ電子顕微鏡で明確にする。これまで SAE 研究ではこのようなアプローチは試みられておらず、SAE の病態解明に一石を投じる点で高い創造性がある。

#### 【III: 本研究で何をどのように、どこまで明らかにしようとするのか】

本研究期間では SAE 発症病態を CypD 遺伝子欠損 (Ppif<sup>-/-</sup>) マウス (CypD KO マウス) を用いて CLP による SAE モデルにて以下の 4 点から進める。Protein Array と microRNA (miRNA) 解析による CypD 情報伝達系の細胞死・アポトーシス実行経路特定に対する網羅的解析 CypD と脳内酸化ストレス産生および GSH/Nrf2 情報伝達系との連関解析 ミトコンドリア選択的なオートファジーである mitophagy の検証と役割の検討 クライオ電子顕微鏡による MPT 孔の構造解析を行い、SAE 発症機序における CypD 情報伝達系と MPT 孔の役割を明らかにしていくことを目指す。

### 3. 研究の方法

#### 【令和 2 年度研究計画】

Protein Array と miRNA 解析による CypD 情報伝達系の細胞死・アポトーシス実行経路への役割の網羅的解析 第 8-10 週令の雄性 C57B6 wild マウス群、CypD KO 群を用いて CLP 誘発 SAE モデルを作製し、モデル作製 6、18 時間後 (各時間・両群、各群の sham とともに 5 匹ずつのマウスを使用) に大脳皮質から total mRNA と蛋白抽出をする。その後、250ng の RNA を miRNA Oligo chip にアプライして蛍光色素の cy5 を用いた microRNA 発現を行う。発現比、群間差、クラスター解析を行い、ターゲット遺伝子となる mRNA を選択して RT-PCR を行い、miRNA と mRNA の統合解析を行う。更に、300µg の蛋白を用いた protein array での TNF、IL-1、IL-6、IL-8、IL-10 などのサイトカインとケモカインの発現解析を行い、miRNA レベルと蛋白レベルで細胞死・Apoptosis に関与する因子を網羅的に比較することで CypD 情報伝達系の細胞死・アポトーシス実行経路への役割を明確にする。

CypD の脳内酸化ストレス産生への関与と GSH/Nrf2 情報伝達系との連関解析 第 8-10 週令の雄性 C57B6 マウスの wild 群と CypD KO 群を用いて CLP 誘発 SAE モデルを作製する。モデル作製 6、18 時間後 (各時間・両群、各群の sham とともに 5 匹ずつのマウスを使用) に大脳皮質から parcol gradient 法で脳ミトコンドリアを抽出する。0.5mg/ml 相当を 96 well plate 内に移して Ca<sup>2+</sup> overload (0.5µmol/mg) による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生を作り出し 0.5U/ml HRP、20U/ml SOD、1µM Amplex Red を加えて O<sub>2</sub> radical との反応による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生量を 560nm で代謝産物の resorufin 量を計測する。両群を比較し、CypD の GSH 系に及ぼす酸化ストレス発現量を比較評価する。また、脳抽出蛋白 10µg を用いて western blot を行い、Nrf2 およびリン酸化 Nrf2、HO-1 の発現解

析より酸化ストレスの生体防御遺伝子群発現への影響と CypD/GSH/Nrf2 情報伝達系の SAE における役割を解析する。

#### 【令和3年度研究計画】

SAE 誘発における脳マイトファジー形成の検証と CypD 情報伝達系のマイトファジー発現に果たす役割の解明 第8-10週令の雄性 C57B6 マウスの wild 群、CypD KO 群を用いて SAE モデルを作製し、モデル作製6、18時間後(各時間・両群、各群の sham とともに5匹ずつのマウスを使用)に4%パラホルムアルデヒド+2.5%グルタルアルデヒド加 0.1M リン酸バッファー溶液で灌流固定する。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固定後にエポン包埋し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マイトファゴソーム形成の有無を解析する。抗 LC3B 抗体と抗 p62 抗体を用いた immunoblotting を行い、デンシトメトリーにて LC3-II(脂質修飾型)/LC3-I 比(マイ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・脳マイトファジー形成を検証・定量化し、CypD 情報伝達系のマイトファジーに果たす役割を解明する。

#### 【令和4年度研究計画】

クライオ電子顕微鏡トモグラフィーによる MPT 孔構造の解析 第8-10週令の雄性 C57B6 マウスの wild 群、CypD KO 群を用いて SAE モデルを作製し、モデル作製6、18時間後(各時間・両群、各群の sham とともに5匹ずつのマウスを使用)に Parcol 法で脳ミトコンドリアを抽出して Ca<sup>2+</sup> overload による MPT とミトコンドリアの膨化 (swelling) を in vitro にて 520nm で測定比較する。300 µg/ml のミトコンドリアを KCl buffer に加えて 200nmol CaCl<sub>2</sub> 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、持続的な脳内ミトコンドリアの Ca<sup>2+</sup> 取り込み (Calcium Retention Capacity: CRC) による MPT の発現を Fura6F でリアルタイムに視覚化させる。MPT が起こり始めた状態と最大限 MPT を呈した状態のミトコンドリアを 1%digitonin で処理して超遠心 23000G30 分でミトコンドリアを沈殿させて isolation buffer に懸濁し、GST-CypD 樹脂にてミトコンドリアの CypD・ANT・VDAC 複合体を吸着後に可溶化する。western blot と CBB (Coomassie Brilliant Blue) 染色で分子量から複合体形成を確認して可溶性蛋白をクライオ電子顕微鏡による電子トモグラフィー法を用いて解析し、ミトコンドリア内膜と外膜の近接する部位を狙って観察し MPT 孔構造の断面解析より、MPT 孔の中心的構成要素である CypD・ANT/VDAC 複合体構造の解析・特定を試みる。

【クライオ電子顕微鏡による構造解析について】 クライオ電子顕微鏡による生体分子複合体構造解析は、非晶質の氷に包埋した生体試料を電子顕微鏡で観察する手法で、二次元デジタル画像から生体分子複合体の三次元立体構造を再構築する。電子トモグラフィー法と単粒子解析法があるが、今回は、電子トモグラフィー法を用いて MPT 孔の構成タンパク質の構造を解析・特定する。

1. Uchino H. et. al Neurobiol. 10(3): 219-233: 2002
2. Baine et. al Nature 434(7003):658-62
3. Hara N. et. al Shock. 2015 44(6):578-84

#### 4. 研究成果

Protein Array と miRNA 解析による CypD 情報伝達系の細胞死・アポトーシス実行経路への役割の網羅的解析および CypD の脳内酸化ストレス産生への関与と GSH/Nrf2 情報伝達系との関連解析

Protein Array と miRNA 解析による CypD 情報伝達系の細胞死・アポトーシス実行経路への役割の網羅的解析を試みた。ケモカインが CLP 作成 6、18時間後に増加した。脳内 GSH/Nrf2 解析では HO-1 の有意な変動が CLP 作成 18時間後に見られた。

SAE 誘発における脳マイトファジー形成の検証と CypD 情報伝達系のマイトファジー発現に果たす役割の解明

2021~2023年に mitophagy の解析を行ったが、走査電顕に用いるためのサンプルに対する免疫染色を行うための適切な抗体が得られず十分な解析は出来なかった。

クライオ電子顕微鏡トモグラフィーによる MPT 孔構造の解析

クライオ電顕での解析は今回の研究では行えなかった。

#### 5. 研究成果の社会的意義

敗血症関連脳症 (Sepsis associated encephalopathy; SAE) の脳障害発症機序は未だに機序や責任分子も明らかではない。本成果は十分に得られなかったが、研究では、SAE の実態を脳内ケモカインの役割や 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内の Cyclophilin D (CypD) と脳内酸化ストレス機構の GSH/Nrf2 を機軸とした情報伝達系が関与することを見出せた。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指すことに繋がったものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takayuki Kobayashi , Hiroyuki Uchino , Eskil Elmer , Yukihiko Ogihara , Hidetoshi Fujita , Shusuke Sekine , Yusuke Ishida , Iwao Saiki , Shoichiro Shibata , Aya Kawachi	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 Int J Mol Sci .	6. 最初と最後の頁 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 該当する

1. 著者名 Yosuke Fujita , Tomoki Nagakura , Hiroyuki Uchino , Masato Inazu , Tsuyoshi Yamanaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Functional Expression of Choline Transporters in Human Neural Stem Cells and Its Link to Cell Proliferation, Cell Viability, and Neurite Outgrowth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10020453.	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

〔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、河内文、魚島直美、柴田勝一郎、石田裕介、藤田英俊、中島利博、内野博之
2. 発表標題 敗血症関連脳症発症におけるCyclophilinD遺伝子欠損マウスを用いた脳内サイトカイン発現の検証
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2021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	石田 裕介  (Ishida Yuhsuke)  (40805884)	東京医科大学・医学部・講師    (32645)	

6. 研究組織（つづき）

	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	柴田 勝一郎  (Shibata Katsuichiro)  (70869429)	東京医科大学・医学部・助教     (32645)	

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