

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462348

研究課題名(和文)新規ミトコンドリアー小胞体制御経路を機軸とした敗血症性脳症誘発機序の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenesis for septic encephalopathy based on new mitochondrial endoplasmic reticulum control pathway

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、小胞体関連分解機構に関与するユビキチンリガーゼ(E3)の脳内シノビオリン(Syvn)に着目し、敗血症性脳症(Septic Encephalopathy:SE)のメカニズムを解析した。Syvnを介した脳内代謝経路のメタボローム解析により、SE発症18時間後においてキヌレニン酸の著明な減少とキヌレニンの有意な増加が認められた。キヌレニンは、脳の障害性を誘発する上で重要な役割を担うことが明らかとなった。SEによりKAT活性はモデル作成18時間後のKAT4の活性が上がっていた。結語：Syvnを抑制し、キヌレニンが減少することで神経障害を抑制し、敗血症性脳症の改善に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focus on cerebral synoviolin (Syvn) as a ubiquitin ligase (E3) involved in endoplasmic reticulum-related degradation mechanism, the mechanism of septic encephalopathy (SE) was investigated. As a result, 1 Metabolome analysis of intracerebral metabolic pathway via Syvn showed a marked decrease in kynurenic acid and a significant increase in kynurenine at 18 hours after SE onset. It became clear that kynurenine plays an important role in inducing the impairment of the brain. 2 KAT activity by SE was increased, especially, activity of KAT4 significantly increased 18 hours after CLP model creation. Conclusion: Suppression of Syvn and reduction of kynurenine suppresses neuropathy and it may lead to improvement of septic encephalopathy.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：シノビオリン 敗血症性脳症 メタボローム ユビキチンリガーゼ KAT

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症性脳症(Septic Encephalopathy:SE)の脳障害発症機序は未知で、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SEのメカニズム研究で蓄積された脳内MPT(Mitochondrial Permeability Transition)の役割解析の成果を基盤として、MPTに伴う脳ミトコンドリア機能不全のみを重視した従来の脳障害の解析から、新規に滑膜細胞ライブラリーからクローニングされ、小胞体関連分解機構のERAD(Endoplasmic Reticulum-associated Degradation)にも関与するユビキチンリガーゼ(E3)のシノピオリン(Syv)に焦点を置き、SEの実態をミトコンドリアと小胞体(Endoplasmic Reticulum:ER)間情報伝達系との連関解析に展開することを目的した。

## 2. 研究の目的

**【 : 学術的背景(国内外の関連する研究の中での当該研究の位置づけ、応募者のこれまでの研究成果を踏まえて着想に至った経緯)】** 本研究では、我々のこれまでの虚血性神経細胞死のメカニズム解析ならびにSEに対するMPTに伴うミトコンドリア機能不全の役割解析研究の結果を基盤として、SEの脳障害発症機序をMPTに伴う脳ミトコンドリア機能不全のみを重視した従来の脳障害の解析から、新規に滑膜細胞ライブラリーからクローニングされ、**小胞体ストレス制御機構**のひとつであるERAD(**小胞体関連分解**)に関与するユビキチンリガーゼ(E3)のシノピオリン(Syv)に焦点を置き、SEの実態をミトコンドリアとER間情報伝達系との**連関解析**に展開することを目的した。この試みは、SEのメカニズムに**ミトコンドリア・小胞体間情報伝達系**のク

ロストーク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・神経集中治療医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。

我々の腹膜炎性敗血症モデル(CLPモデル)関連脳症(Septic associated Encephalopathy:SAE)の研究からは、**脳内MPTとミトコンドリア機能不全の存在**が明らかとなった。生体は、虚血、低酸素、熱ショック、アミノ酸飢餓、遺伝子変異等のストレスを受けると、小胞体内に異常構造を持つタンパク質(unfolded protein)の出現頻度が上昇し(**小胞体ストレス**)、小胞体内に不良タンパク質の蓄積が起こり、アポトーシスが誘発されることが報告されている(文献)。一方で、細胞はERストレス誘発性の不良タンパク質の蓄積をERADと呼ばれる小胞体特異的なストレス応答機構で分解し、その蓄積を抑制して生体のホメオスタシスを維持する。共同研究者の中島は、リウマチ患者の滑膜細胞ライブラリーから新規に**小胞体ストレス制御機構**のERADに関与する**ユビキチンリガーゼ(E3)のシノピオリン(Syv)**をクローニングし(文献)、Syv遺伝子ヘテロ欠損(syno+/-)マウスの解析結果から**ERADの亢進は滑膜増殖、ERADの機能低下がアポトーシスを誘発することを見出した**(文献)。また、Syvは、**全身の組織・臓器に発現する特徴を有し、過剰発現することでERADを活性化してサイトカインストームを誘発することも報告されている**。その一方で、脳内のシノピオリンの作用機序についてはほとんど解析が

なされておらず、SE 誘発機序における Syv を介した情報伝達系の役割や小胞体などの細胞内微小臓器機能不全との関連ならびにミトコンドリア・小胞体間情報伝達系のクロストークについての詳細は全く手付かずの状態です。早急な解明が必要である。本研究では、これまでの SE の発症機序解析実験で蓄積された MPT を介したミトコンドリア機能不全が重要な役割を担うという成果を基盤とし、細胞へのストレスを制御する小胞体関連分解に参与するユビキチンリガーゼ (E3) の Syv の分子機序解析を中心として新規脳保護法確立を要する SE のメカニズム解析に展開した。すなわち、SE の実態を MPT を介したミトコンドリア機能不全と Syv を介した小胞体間情報伝達系のクロストークとの関連解析から明確にし、未知の病態である SE に対する新規の防御法開発を目的とするという研究着想に至った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 平成 26 年度研究計画

**敗血症性脳症誘発時の脳内シノビオリン (Syv) 発現の分布、病理組織学的解析**  
第 8-10 週令の雄性 C57B6 wild マウス(体重 25-30g)と Syno 遺伝子ヘテロ欠損 (syno+/-) マウス (SyvKO マウス) 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) を作製した。モデル作製 6、1 日後 (各時間とも 5 匹の動物を使用) に脳凍結切片 (25 $\mu$ m) を作製して Syv の免疫組織化学的解析と HE 染色による細胞死の評価を施行し、シノビオリンの脳内発現や分布の相違を比較する。さらに、脳切片を GFAP や Neu にて二重染色を行い、Syv の発現が神経由来かグリア由来かを特徴付け SE 発現と脳内 Syv 情報伝達系の役割を明確にすることを目的とした。

#### (2) 平成 27 年度研究計画

**SAE 誘発時の脳内ミトコンドリア Syv 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**

第 8-10 週令の雄性 C57B6 wild マウスを wild 群と Syv 遺伝子欠損 (Ppif<sup>-/-</sup>) マウス (Syv 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。

Wild type (WTC) 群, Hetero (HTC) 群, WTsham (WTS) 群, HTsham (HTS) 群の 4 群に分けて実験を行った。すべての群を手術 18 時間後に sacrifice し、脳を検体として用いた。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した。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 350mlx2 を限外濾過フィルタ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 Syv 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。

#### (3) 平成 28 年度研究計画

**脳内シノビオリンと脳内キヌレニン代謝の関連関係解析**

敗血症によって引き起こされる敗血症性脳症の要因としてトリプトファンから合成されるキヌレニン代謝に着目し、脳内シノビオリンと脳内キヌレニンの関連を検討した。第 8-10 週令の雄性 C57B6 wild マウス (体重 25-30g) と Syno 遺伝子ヘテロ欠損 (syno+/-) マウス

(SynvcKO マウス)を用いて回盲部結紮 + 2回穿孔による(CLP)誘発敗血症性脳症モデル(SAE モデル)を作製した。モデル作製18時間後(各時間とも 3 匹の動物を使用した。Wild type (WTC)群, Hetero (HTC 群,WTsham (WTS)群, HTsham (HTS)群の 4 群に分けて実験を行った。すべての群を手術 18 時間後に sacrifice し、脳を検体として用いた。キヌレニンアミノトランスフェラーゼ(KAT)活性も測定した。また、シノビオリンと PGC1- $\beta$ , NRF2 が KATpromotor の活性化にどのように関与するかをルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。

#### 4. 研究成果

##### 【平成 26 年度研究成果】

SynvcKO 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は逆に 12 時間後までに死亡した。SE 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。12 時間後においては大脳皮質(左  $23.6 \pm 2.4\%$ , 右  $22.4 \pm 1.84\%$ )、海馬(左  $5 \pm 0.6\%$ , 右  $4 \pm 1.1\%$ )において細胞死を認めた(図 1、2)。

Synv の脳内の局在と分布は抗体の quality が不十分なため明確にできなかった。また、脳内 Synv を介した遺伝子発現の網羅的解析は SynvcKO マウスが十分な数確保できず施行できなかった。

図 1

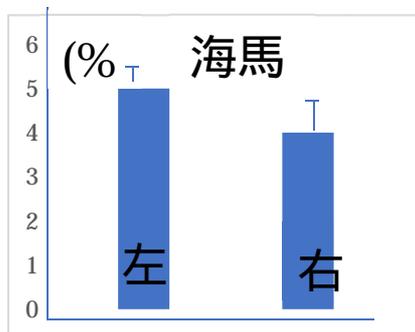
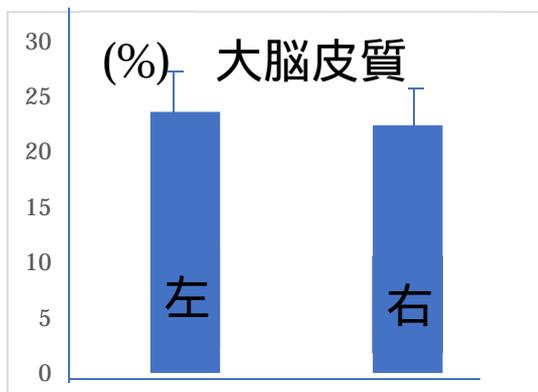


図 2

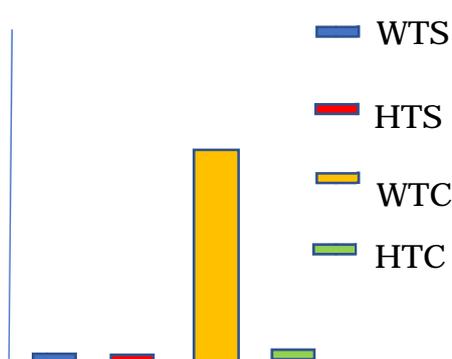


##### 【平成 27 年度研究成果】

CLPモデルによる SE 発症 18 時間後において HTC 群で分岐鎖アミノ酸、芳香族アミノ酸の代謝に関与するキヌレニン酸の著明な減少と WTC 群でキヌレニンの有意な増加が認められた。HTC 群、WTS 群、HTS 群についてはキヌレニンの上昇はほとんど認めず各群間で有意差を認めなかった(図 3)。

キヌレニンは脳障害を誘発する可能性が指摘されているため、SE の誘発機序としてキヌレニンが重要な役割を果たすことが明らかとなった。

図 3

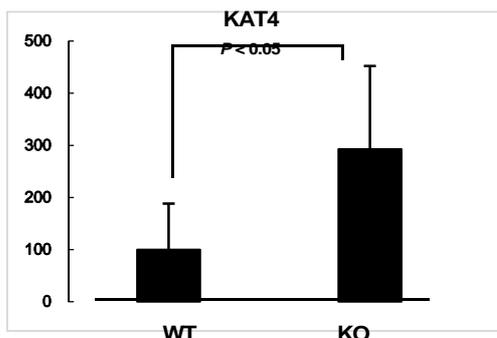


##### 【平成 28 年度研究成果】

メタボローム解析にて Wild type (WTC)群, Hetero (HTC 群,WTsham (WTS)群, HTsham (HTS)群の 4 群に分けて実験を行った結果よりキヌレニンアミノトランスフ

エラーゼ(KAT)の活性を測定し、CLP 作成 18 時間後の KAT4 の有意な活性の上昇が認められた(図 4)。

図 4



NRF2 は単独で KATpromotor を活性化したが PGC-1 との相乗作用でより高い活性化が得られた(図 5)。Synv1 の発現は KAT 活性を抑制したが、NRF2 は Synv1 の KAT 活性化の抑制を阻害した。siSynv は、KAT を活性化した(図 6)。シノビオリンの抑制は神経毒性作用のあるキヌレニンを生産することが示唆された。

図 5

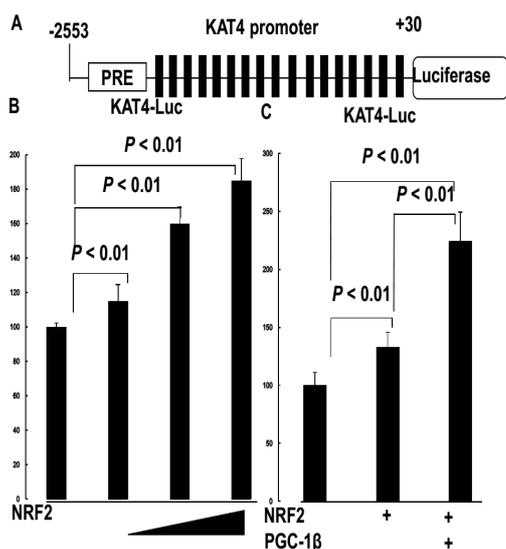
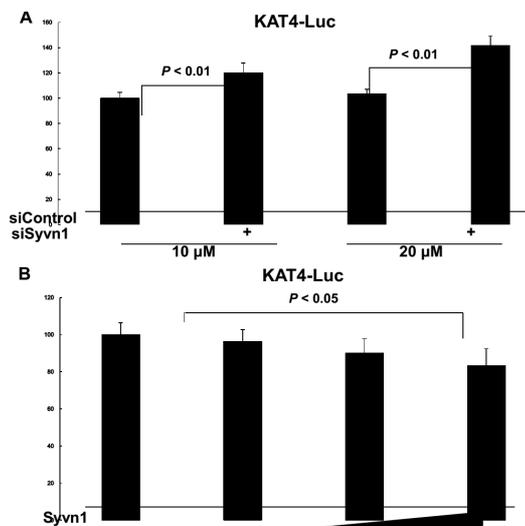


図 6



神経障害に關与するキヌレニンは KAT によって代謝されキヌレン酸になる。本研究からシノビオリンを抑制することで KAT 活性が上昇してキヌレニン代謝を促進したことが推測され、シノビオリンを制御することで敗血症性脳症 (SE) の改善に繋がる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線を引く)

[雑誌論文](計 6 件)

- 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 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 日本集中治療医学会雑誌 24 巻 2号 p151-183 2017 査読あり
- DIVERSE AND TISSUE SPECIFIC MITOCHONDRIAL RESPIRATORY RESPONSE IN A

MOUSE MODEL OF SEPSIS  
INDUCED MULTIPLE ORGAN  
FAILURE.

Karlsson M, Hara N, Morata S,  
Sjövall F, Kilbaugh T, Hansson MJ,  
**Uchino H**, Elmér E.

Shock. 2016 Apr;45(4):404-10. doi:  
10.1097/SHK.0000000000000525.

査読あり

3. Metabolomic Analyses of Brain  
Tissue in Sepsis Induced by Cecal  
Ligation Reveal Specific Redox  
Alterations--Protective Effects of  
the Oxygen Radical Scavenger  
Edaravone.

Hara N, Chijiwa M, Yara M,  
Ishida Y, Ogiwara Y, Inazu M,  
Kuroda M, Karlsson M, Sjovall F,  
Elmér E, **Uchino H**.

Shock. 2015 Dec;44(6):578-84. doi:

10.1097/SHK.0000000000000465. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 内野 博之

シンポジウム

虚血性神経細胞死の病態生理

第44回日本集中治療医学会

2017年3月9日 北海道 札幌市

2. 石田 裕介, 千々岩 みゆき, 内野 博

之, 荒谷 聡子, 藤田 英俊, 中島 利博

敗血症性脳症に対するシノビオリンとの関

連 第177回東京医科大学医学会総会

2016年6月5日、東京都新宿区

3. 内野 博之 千々岩みゆき、原 直美

教育講演

敗血症関連脳症 敗血症関連脳症の病態生理

第43回日本集中治療医学会

2016年2月12日、兵庫県神戸市

〔図書〕(計 1 件)

1. 魚島 直美、内野 博之

【神経集中治療-いま最も知りたい20の論  
点-】敗血症関連脳障害に対して、有効な  
治療法はあるのか?(Q&A/特集)

救急・集中治療 28巻11-12号 p969-972  
2016

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)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