

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16509

研究課題名（和文）腸間膜リンパ液エクソソームによる外傷後炎症性メディエーターの新たな輸送機構

研究課題名（英文）Mesenteric lymph exosomes are key mediators of post-trauma systemic inflammation

研究代表者

小島 光暁 (Kojima, Mitsuaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：40815065

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：外傷による大量出血の患者を救命するには、緊急手術による止血に加えて、ショック後に生じる多臓器不全に対する集中治療が鍵となる。しかし、大量出血により生じる多臓器不全は、その発症機序が完全には解明されておらず、現在までに有効な治療方法もない。我々は、外傷により生じる多臓器不全と、腸で産生される炎症性物質の関連を研究してきた。具体的には、出血後に腸で産生されるエクソソームと呼ばれる小粒子が、肺などの臓器に炎症性物質を運ぶ可能性を発見した。今回の研究では、多臓器不全の診断や治療ターゲットとなり得るエクソソーム内の炎症性物質を脂質、タンパク、マイクロRNAに注目し解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では、出血性ショックの動物モデルや培養細胞モデルからエクソソームを採取し、その内部に含まれる炎症性物質を解析した。実臨床で外傷患者から採取したエクソソーム内にも、本研究で確認された炎症性脂質、タンパク質、マイクロRNAが確認できれば、外傷後臓器不全の発症を予測するバイオマーカーや治療標的として応用できる可能性がある。救急分野でエクソソームを用いた診断や治療の可能性を報告した研究は殆どなく、本研究の新規性は学術的に意義深いものであると考える。

研究成果の概要（英文）：Hemorrhagic shock is the leading cause of mortality in severe trauma patients. The critical components to treat severe trauma patients are control bleeding and intensive care for multiple organ failure. However, the mechanisms of post-trauma organ failure are not fully understood. Our group has studied the association between intestinal inflammatory mediators and the development of organ injury after severe injuries. Exosomes are nano-sized small vesicles released from most types of human cells. We have recently found that exosomes secreted from the gut deliver inflammatory mediators to the body after severe injury. This study found the specific lipid, protein and micro RNA that can be diagnostic and therapeutic targets in severe trauma patients.

研究分野：救急医学

キーワード：外傷 出血性ショック 多臓器不全 エクソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

外傷出血性ショックに続発する過剰な炎症反応は、急性肺障害などの多臓器不全の原因となる。出血性ショックおよび輸液・輸血による蘇生治療は、腸管虚血再灌流障害を引き起こす。これまでの研究によると、腸管で産生された炎症性メディエーターは、腸間膜リンパ管を介して体循環に流入し、急性肺障害を始めとする臓器障害を惹起すると考えられてきた。ショック後腸間膜リンパ液中には、炎症性サイトカインおよび脂質メディエーターの存在が報告されているが、具体的な治療標的の同定や輸送機構の解明には至っていない。

エクソソームは、多種の細胞から分泌される、直径 30-100nm 程度の細胞外小胞であり、血液、尿、髄液など、ほとんどの体液中に存在する。近年エクソソームは、内部のタンパク質、脂質や核酸を標的細胞に送達することで細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たしていることが明らかになった。特に、癌や炎症性疾患では、病気の進展に関わる“新たな情報伝達機構”として注目を集めている。我々は、腸間膜リンパ液に注目し電子顕微鏡およびナノ粒子トラッキング解析を用いて、ラット腸間膜リンパ液中にエクソソームが存在することを初めて証明した。さらに、出血性ショック後に腸間膜リンパ液から抽出したエクソソームが、健常動物から採取したエクソソームに比べて強い生物活性をもち、急性肺障害発症に関与する可能性も報告した。以上の結果から、我々はエクソソームが出血性ショック後の炎症性メディエーターの輸送体として全身性炎症反応症候群や急性肺障害の発症に関わる可能性を解明してきた。よって、腸間膜リンパ液中のエクソソームに内包される炎症関連物質に関する研究が重要であると考えた。

## 2. 研究の目的

外傷出血性ショック後に産生された腸間膜リンパ液は多臓器障害の誘因となる炎症惹起作用を有することが報告されてきたが、炎症惹起性物質の輸送機能を含めた腸間膜リンパ液の急性炎症における詳細な役割は明らかになっていない。我々は最近、ショック蘇生後の腸間膜リンパ液中にエクソソームが存在することを証明し、これが急性肺障害の発症に関与する可能性を見出した。エクソソームは、直径 100nm 程度の細胞外小胞であるが、病態により異なるタンパク質、核酸、脂質などを含有し、細胞間情報伝達に関与する。本研究では、出血性ショック後に腸間膜リンパ液中のエクソソームに内包される炎症メディエーターを同定し、急性肺障害の発症機序の解明を進めた。具体的には、ラット外傷出血性ショックモデルの腸間膜リンパ液および腸管上皮細胞モデルからエクソソームを分離し、急性肺障害の新たなバイオマーカーの発見や治療標的を明らかにすることが目的とした。

## 3. 研究の方法

### I. ラット腸間膜リンパ液エクソソームの脂質解析

ラット腸管虚血再灌流(SMAO)モデルを作製し、腸間膜リンパ液からエクソソームを分離した。これらのエクソソームを単球に添加し、NF- $\kappa$ B の発現を用いて炎症惹起作用を比較した。エクソソームに含有された脂質を抽出し、ショック前後での組成の変化を質量分析で網羅的に解析した。

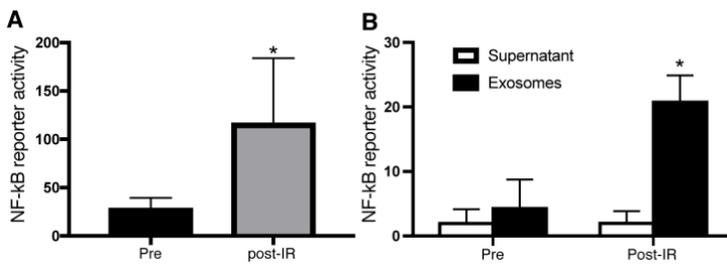
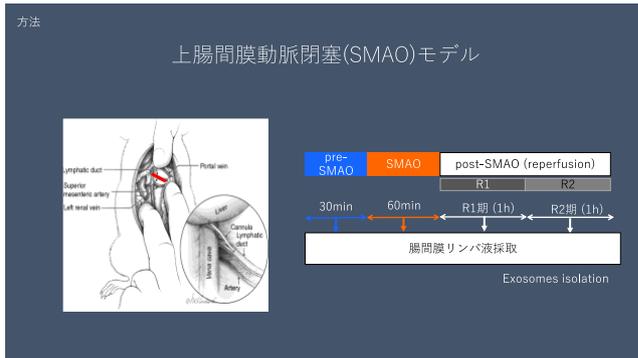
### II. 腸管上皮細胞培養モデルからのエクソソーム分離およびタンパク、microRNA 解析

ヒト腸管上皮細胞を *in vitro* で培養し、通常培養と低酸素再酸素化モデルの培養液中からエクソソームを分離した。エクソソーム内に含有される、脂質、タンパク、microRNA をそれぞれ網羅的に解析した。

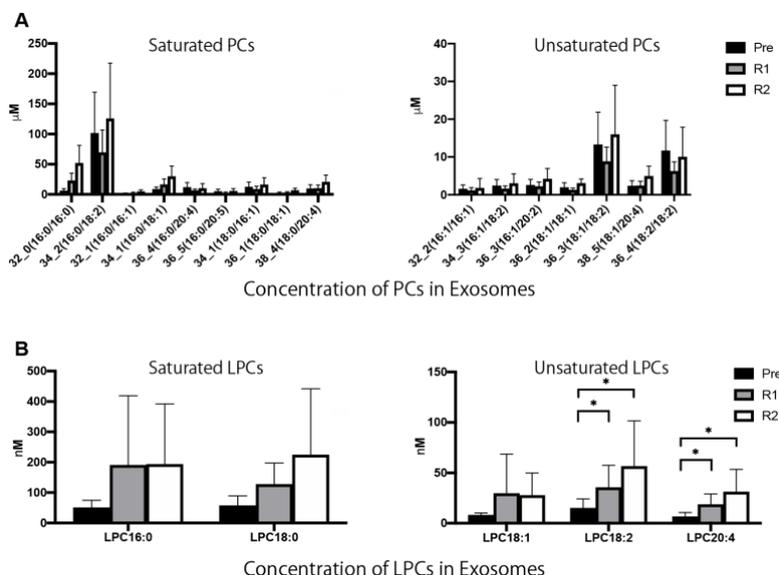
#### 4. 研究成果

##### I. ラット腸間膜リンパ液エクソソームの脂質解析

出血性ショックによる腸管虚血と蘇生による再灌流を再現するため、上腸間膜動脈をクランプ、開放する SMAO モデルを作製した。各期間 (Pre, R1, R2) から採取した腸間膜リンパ液 (ML) 中のエクソソーム画分を超遠心法により精製、Bligh & Dyer 法で脂質抽出を行い LC-MS/MS で リン脂質 (PC) と リゾリン脂質 (LPC) について分析した。SMAO モデル由来エクソソームの炎症作用を調べるため、単球 (THP-1 cells) における NF- $\kappa$ B 発現作用を定量した。その結果、SMAO 刺激を加えた後のエクソソームは炎症惹起作用があることが明らかになった。一方で、エクソソームを除いた上清 (supernatant) には炎症作用が見られなかった。



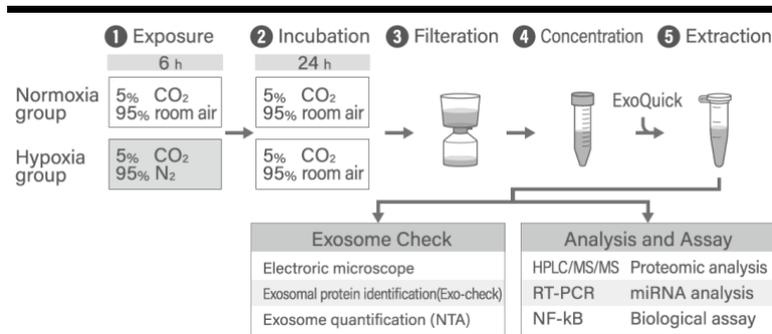
脂質組成変化を検証するため、経時的なモデル由来エクソソームの脂質組成変化を質量分析によって調査した (図 2)。SMAO モデルラットから腸間膜リンパ液を採取し超遠心法により分離したエクソソーム画分について総脂質抽出を行い、LC-MS/MS により脂質分析を行った。A : PC 濃度変化 (左側 : 飽和脂肪酸含有 PC, 右側 : 不飽和脂肪酸含有 PC), B : LPC 濃度変化 (左側 : 飽和脂肪酸含有 LPC, 右側 : 不飽和脂肪酸含有 LPC). 表示は、平均値  $\pm$  標準誤差 (n=5),  $P < 0.01^*$ . リノール酸 (18:2) やアラキドン酸 (20:4) を含有する Unsaturated LPCs の濃度は、Pre, R1, R2 の順に有意に増加した。



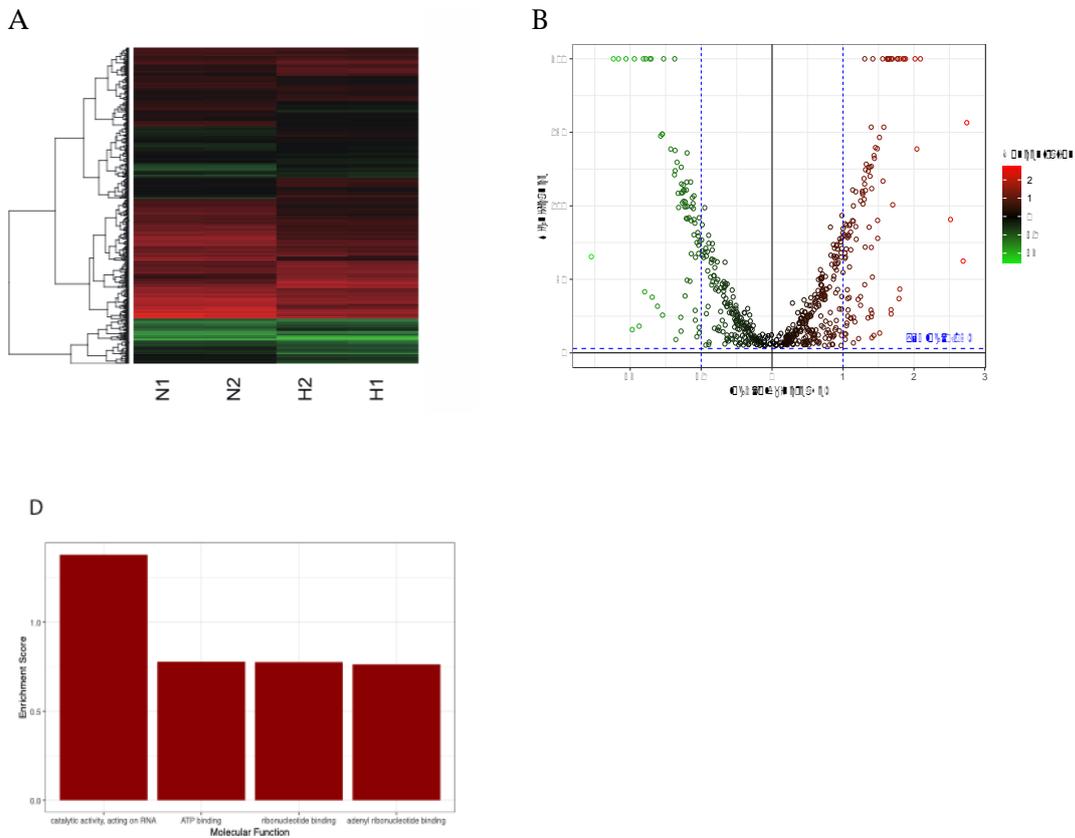
以上の結果から、腸間膜リンパ液中のエクソソーム内に含まれる脂質メディエータが腸管虚血再還流後の臓器障害の原因物質となっている可能性があることが示唆された。

## II. 腸管上皮細胞培養モデルからのエクソソーム分離およびタンパク、microRNA 解析

図の如く、腸管上皮細胞を通常培養(Normoxia)と低酸素培養(Hypoxia)に分けて培養し、エクソソームを分離した。採取したエクソソームを用いてタンパク、microRNA(miRNA)の網羅的解析を行った。



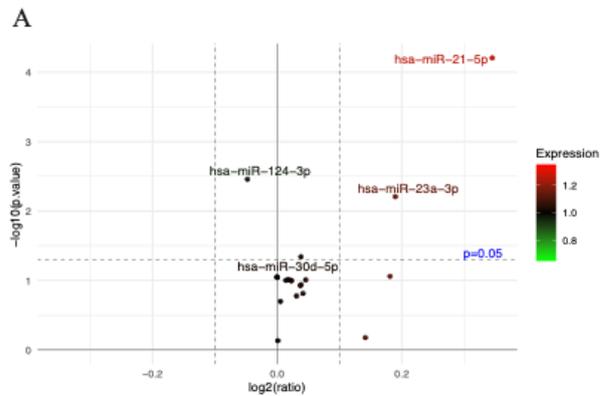
タンパク網羅的解析では、低酸素刺激によりエクソソーム内の 110 種以上のタンパクが有意に増加することが明らかになった。Bioinformatic 解析を行うと、低酸素刺激で RNA 触媒作用を持つタンパクが特に増加しており、ショック後の炎症反応に後述の miRNA とともに関与する可能性が示唆された。



### miRNA 解析

RT-PCR array を用いて、低酸素刺激によるエクソソーム内 miRNA の増減を調べた。その結果、刺

激後に miR-21-5p, miR-23a-3p が有意に増加することが示された。



#### 結果のまとめ

本研究では、腸管虚血再灌流障害により腸管上皮細胞より分泌されるエクソソームの蘇生が大きく変化し、それらがNF- $\kappa$ Bを介した炎症反応に関与することを示した。腸管からエクソソームを介して全身に運搬される炎症惹起物質としては、不飽和脂肪酸含有リゾリン脂質、miR-21-5p, miR-23a-3p および RNA の触媒に関与するタンパク群などが同定された。

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 0件）

1. 著者名 Yagi Masayuki, Morishita Koji, Ueno Akinori, Nakamura Hajime, Akabori Hiroya, Senda Atsushi, Kojima Mitsuaki, Aiboshi Junichi, Costantini Todd, Coimbra Raul, Otomo Yasuhiro	4. 巻 167
2. 論文標題 Electrical stimulation of the vagus nerve improves intestinal blood flow after trauma and hemorrhagic shock	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 638 ~ 645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.surg.2019.09.024	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 該当する

1. 著者名 Senda Atsushi, Morishita Koji, Kojima Mitsuaki, Doki Sanae, Taylor Beth, Yagi Masayuki, Watanabe Arisa, Kobayashi Tetsuyuki, Aiboshi Junichi, Coimbra Raul, Otomo Yasuhiro	4. 巻 89
2. 論文標題 The role of mesenteric lymph exosomal lipid mediators following intestinal ischemia-reperfusion injury on activation of inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Trauma and Acute Care Surgery	6. 最初と最後の頁 1099 ~ 1106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ta.0000000000002897	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Atsushi Senda
2. 発表標題 Lipidomic Analysis of Exosomes in Mesenteric Lymph after Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury.
3. 学会等名 Academic Surgical Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuaki Kojima
2. 発表標題 Exosomes as inflammatory mediator after severe trauma.
3. 学会等名 7th Pan-pacific Trauma Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千田篤、森下幸治、小島光暁、土岐早苗、小林哲幸、八木雅幸、相星淳一、大友康裕
2. 発表標題 Lipidomic Analysis of Exosomes in Mesenteric Lymph after Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury.
3. 学会等名 14th Annual Academic Surgical Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小島光暁
2. 発表標題 Exosomes as immuno-inflammatory mediators
3. 学会等名 5th Pan-pacific Trauma Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島光暁、森下幸治、千田篤、八木雅幸、大友康裕
2. 発表標題 腸間膜リンパ液中のエクソソームは出血性ショック後の肺傷害および免疫不全発症に関与する
3. 学会等名 第54回日本腹部救急医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千田篤、森下幸治、土岐早苗、小島光暁、小林哲幸、八木雅幸、相星淳一、大友康裕
2. 発表標題 腸管虚血再灌流障害後の腸間膜リンパ液は炎症細胞の活性化に関与する
3. 学会等名 第46回日本救急医学会総会・学術集会
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
研究協力者	森下 幸治  (Morishita Koji)		
研究協力者	千田 篤  (Senda Atsushi)		
研究協力者	八木 雅幸  (Yagi Masayuki)		

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