

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22754

研究課題名（和文）血管を流れる好中球由来小胞の解析

研究課題名（英文）Dynamic and functional analysis of circulating neutrophil derived extracellular vesicles

研究代表者

栗生 智香（Ao, Tomoka）

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任研究員（常勤）

研究者番号：90880865

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：生体イメージングにより炎症部位の血管壁に浸潤する好中球から小胞が分泌されることを明らかにした。また、セルソーターを用いて末梢血中から好中球由来小胞を回収する技術確立した。さらにフローサイトメトリーの技術を用いて細菌性肺炎モデルマウスにおける末梢血中の好中球由来小胞の数をモニターし、末梢血中の好中球由来小胞が炎症の進行に伴い増加することを示した。その機能についての検討もを行い、脳の特定領域に投与すると、肺炎モデルマウスの臓器障害が抑制された。またその動態についての検討を行い、好中球由来小胞を血管内投与すると網内系や脳の一部に蓄積されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎などの重症感染症の患者の血液から好中球由来小胞が検出されること、またin vitroにおいて免疫制御機能を持つことが明らかになっていたが、その動態や生命維持に関わる機能は明らかにされていなかった。今回の研究により、血液を循環する好中球由来小胞が生体内で分泌される様子を観察することに成功した。また、その一部が脳の特定領域に集積し、肺炎における臓器障害を抑制するはたらきを持つことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Intravital imaging revealed that extracellular vesicles are secreted from neutrophils that infiltrate the walls of blood vessels at the site of inflammation. We also established a technique for collecting neutrophil-derived extracellular vesicles from peripheral blood using a cell sorter. Furthermore, we monitored the number of neutrophil-derived extracellular vesicles in peripheral blood in bacterial pneumonia model mice using flow cytometry techniques, and showed an increase of them in peripheral blood. The function was also investigated, and when administered to a specific site of the brain, organ damage in pneumonia model mice was suppressed. We also investigated their dynamics, and when neutrophil-derived extracellular vesicles were intravascularly administered, they accumulated in the reticuloendothelial system and a specific part of the brain.

研究分野：薬理学

キーワード：好中球由来小胞 生体イメージング

1．研究開始当初の背景

研究代表者の所属する研究室では、生体イメージングの手法を用いて免疫細胞の動態観察を行い、「動き」や「形態」といったパラメーターに着目して免疫応答の多様性を明らかにしてきた。特に好中球と血管内皮細胞との相互作用は、炎症の初期に好中球が集積する上で重要であり、かつ数秒～数分単位で進行するダイナミックな反応である（Nishizawa, Ao et al, JPS, 2020）。そこで研究代表者は血管壁を移動する好中球を可視化する生体イメージング系を立ち上げ、観察を行ったところ、好中球が小胞（Neutrophil-derived extracellular vesicles; NDEVs）を分泌し、NDEVが好中球と共に血液中を流れていく様子を可視化することに成功した。NDEVは、ヒトの炎症性疾患において、血漿、肺胞液などから検出される（Dalli J, et. al., Moll Cell Proteomics, 2013, Hess C, et.al., J Immunol 1999, Prakash PS, et.al., J Trauma Acute Care Surg, 2012）。*in vitro*においてNDEVの機能を検討する研究も行われており、血管内皮細胞に作用してIL-6などの炎症性サイトカインの産生を促進するという報告や、マクロファージに作用してTNF- α 、IL-8、IL-10などのサイトカインの抑制に関わるといった報告がある（Mesri M, et.al., J Biol Chem., 1999, Hong Y, et.al., J Am Soc Nephrol., 2012, Gasser O, et.al., Blood, 2004）。従来炎症メディエーターとしてサイトカインやケモカインが注目されてきたが、これらの報告は、免疫細胞由来の小胞も免疫制御作用を持つことを裏付けている。さらに最近では、細菌性肺炎モデルマウスにNDEVを投与することで生存率が改善するという報告もあり（Neudecker et al., Sci. Transl. Med., 2017, Rossaint et al., Nat commun., 2016）、*in vivo*においても機能を持つことが示唆される。しかし、NDEVの動態解析は十分にされておらず、好中球が組織中で放出した小胞が周辺の細胞に作用し、組織内でのメディエーターとして機能すると推測されている。血液を循環し、臓器間メディエーターとして機能するNDEVの存在は提唱されておらず、本研究により急性炎症における、小胞を介した脳 身体連関の実態が明らかになると考えられた。

2．研究の目的

本研究では、血管内で分泌され、血管内を流れるNDEVの性質を調べ、NDEVを受容する細胞を同定し、その機能を検討し、NDEVの生理的意義を統合的に明らかにすることを目的とした。

3．研究の方法

1. NDEVの標的細胞の同定

仮説を検証する急性炎症モデルとして、好中球が病態に深く関与し、致死的で生命維持のために臓器の連携が必要と考えられる細菌性肺炎を選択した。骨髓由来好中球をTNF- α で刺激して得られたNDEVを、蛍光色素であるPKH26で標識して心臓に投与し、脳内において取り込みがみられる細胞を組織切片にて確認した。

2. NDEVが持つ生体の恒常性の維持に対する機能の検討

細菌性肺炎モデルマウスの末梢血から、LysMEGFP+Ly6G⁺のNDEV、およびコントロールの小胞を、セルソーターを用いて回収した。別に細菌性肺炎を誘導した野生型マウスの脳に、定位脳手術の手法を用いて、NDEVを投与し、臓器障害の血液マーカー、血中カテコラミン濃度、ホルモン濃度を比較した。

4．研究成果

まず生体イメージングにより炎症部位の血管壁に浸潤する好中球から小胞が分泌されることを

明らかにした。また、cell sorter を用いて末梢血中から好中球由来小胞を回収する技術を確立した。さらにフローサイトメトリーの技術を用いて細菌性肺炎モデルマウスにおける末梢血中のNDEVの数をモニターし、末梢血中の好中球由来小胞が炎症の進行に伴い増加することを示した。またその動態についての検討を行い、NDEVを心臓に投与すると網内系や、脳においては視床下部など一部に蓄積された。視床下部におけるその機能についての検討も行い、定位脳手術の手法を用いて投与すると、肺炎モデルマウスの臓器障害マーカーの上昇が抑えられた。

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