

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10968

研究課題名(和文) 腸間膜リンパ液中の脂質メディエーター機能における迷走神経電氣的刺激の役割

研究課題名(英文) The role of vagus nerve stimulation on lipid mediators in the mesenteric lymph

研究代表者

森下 幸治 (MORISHITA, Koji)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40456207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：迷走神経電氣刺激(VNS)が外傷出血性ショック(T/HS)後の急性肺障害(ALI)/多臓器障害(MODS)を抑制することは証明されているもの、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。T/HS後の腸間膜リンパ液(ML)中にはALI/MODSを惹起する炎症性物質が含まれていることが報告されており、その中でもわれわれは脂質のメディエーターに注目して研究を行った。ラットのT/HSモデルを用いて、VNSを行いML中の脂質メディエーター(リゾリン脂質)を分析したが、明らかな抑制効果を認めなかった。今後は東京電機大学との共同研究により開発したVNS装置を用いて刺激条件を変えて更なる研究を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：Electrical stimulation of the vagus nerve (VNS) is known to prevent acute lung injury(ALI)/multiple organ dysfunction (MODS) in animal models of acute injury such as trauma/hemorrhagic shock (T/HS). We have previously shown that lipid mediators (such as lyso-phosphatidylcholine and arachidonic acid) release into mesenteric lymph (ML) following T/HS and induce ALI/MODS. The aim of our study was to investigate the role of VNS on lipid mediators in the post-T/HS ML, however, we couldn't find any significant changes in lipid mediators in post-hemorrhagic shock ML after VNS (5V, 5Hz, 10 min). Therefore, we develop the new electrical stimulators to find ideal stimulation condition which attenuate the production of lipid mediators in the mesenteric lymph. Further study is needed to investigate the role of VNS on lipid mediators in ML.

研究分野：救急医学

キーワード：迷走神経刺激 出血性ショック 腸間膜リンパ液

1. 研究開始当初の背景

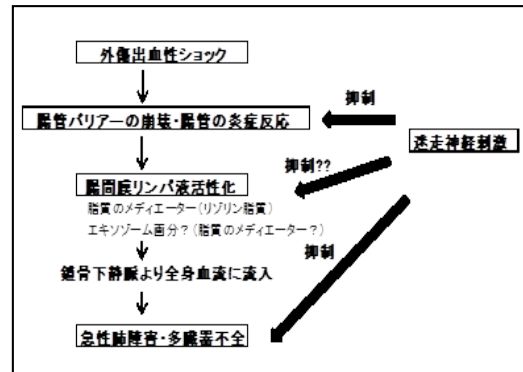
頸部迷走神経の電氣的刺激は、そのコリン性抗炎症作用により、外傷出血性ショックモデルにおいて急性腸管障害および肺障害を抑制することが知られている。外傷出血性ショック後の腸間膜リンパ液は、虚血腸管で産生された脂質のメディエーターをはじめとした炎症惹起性物質を多く含み、急性肺障害や多臓器障害の発症機序に重要な役割を果たす。本研究の目的は、頸部迷走神経への電氣的刺激という手法を用い、腸間膜リンパ液中の脂質のメディエーター機能への影響を分析することにより、コリン性抗炎症作用の新たな役割を解明することであった。

- (1) 頸部迷走神経への5Hzの電氣的刺激はマウスやラットの熱傷や外傷出血性ショックモデルにおいて、侵襲により引き起こされる腸管障害、腸間膜リンパ液の活性および急性肺障害を抑制する事が知られている (Levy G, et al. Shock, 2013) (Morishita K, et al, J Trauma Acute Care Surg, 2014)。
- (2) 外傷出血性ショックにより腸管虚血が引き起こされ、その後輸液や輸血により虚血腸管に再灌流が起こると腸管で産生された炎症惹起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はじめとした多臓器障害を引き起こすと考えられている。腸間膜リンパ液中にはアラキドン酸をはじめとした脂質のメディエーターが存在することは知られていたが、申請者らは外傷出血性ショック後の腸間膜リンパ液中の新たな脂質のメディエーターである不飽和脂肪酸含有リゾリン脂質の Lyso-phosphatidylcholine (LPC) および Lyso-phosphatidylethanolamine (LPE) が増加することを発見した (Morishita K, et al. J Trauma Acute Care Surg, 2012)。
- (3) エキソゾームは細胞間のコミュニケーションに関与すると考えられており、ホスホリパーゼ A2, C, D、エイコサノイド、リン脂質群を含み、ターゲット細胞へ脂質のメディエーターの運搬に重要な役割を果たすと考えられている (Subra C, et al. J. Lipid Res, 2010)。
- (4) 迷走神経は現在、抗炎症作用を期待され、方形波、5V、5Hz、10分間が動物実験で使用されているが (Levy G, et al. Shock, 2013)、その電氣刺激条件に関してのエビデンスはまだ明らかになっていない部分が多い。

2. 研究の目的

以上の様な今までの研究結果背景から、今回、外傷出血性ショックに続発する多臓器障害の発症機序の一つである「腸間膜リンパ液の脂質メディエーターとエキソゾーム」に焦点を絞り、「迷走神経刺激」の果たす役割に関

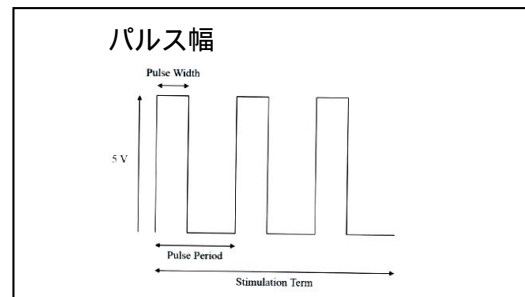
して、質量分析装置、フローサイトメトリーおよび様々な生体計測装置（血圧、心拍数など）を駆使して検証し、最終的には抗炎症作用に最適な電氣刺激を見出すことを目的とした。



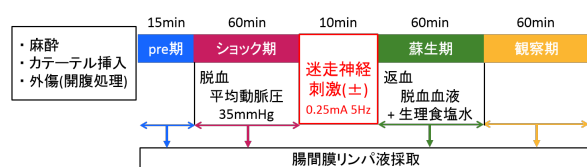
3. 研究の方法

研究期間に研究代表者は共同研究者とともに以下の研究を行った。

- (1) 雄性 SD ラットを吸入麻酔（イソフルラン）後、頸部の皮膚切開し迷走神経を露出した後、刺激装置の電極を用い迷走神経への様々な刺激条件（周波数、パルス幅、電圧、刺激時間）の変化に伴う、循環動態の変化の評価。（担当者：森下・植野）



- (2) 雄性 SD ラットは吸入麻酔後、大腿静脈のカニューレシオンを行った後、外傷の侵襲を加えるため腹部を正中切開し閉腹した。ショック群では、毎分 1ml の速度で脱血し、平均血圧 35mmHg、60 分間維持した。その後脱血した血液と生理食塩水を 2 時間かけて投与し蘇生し 4 時間経過観察した。またシャム群はショックおよび蘇生輸液はなしとした。頸部迷走神経電氣刺激 (0.25mA, 5Hz 10 分間) は、出血性ショック後に行った。実験グループはシャム群、ショック群、シャム+迷走神経刺激群、ショック+迷走神経刺激群に振り分け、以下の項目について検討した。



腸間膜リンパ液中の脂質のメディエーターの測定: 質量分析を用いて(迷走神経刺激による出血性ショック後の腸間膜リンパ液の脂質メディエーターリゾリン脂質群: LPC)の抑制効果の解析。(担当者: 森下・小林)
 外傷出血性ショック後の腸間膜リンパ液中のエクソゾームの同定。(担当者: 森下・小林)

4. 研究成果

(1) 迷走神経電気的刺激による循環動態への影響。

パルスの出力電圧は5Vで一定として、周波数・パルス幅を変えて血压の変化を測定したところ、下図のごとく、周波数やパルス幅は血压の変化に影響を与えことが判明した。下図1の上段の周波数は14.9Hzが血压変化に最も影響を与えることが判明した。またパルス幅は増やすほど血压の変化が見られた。

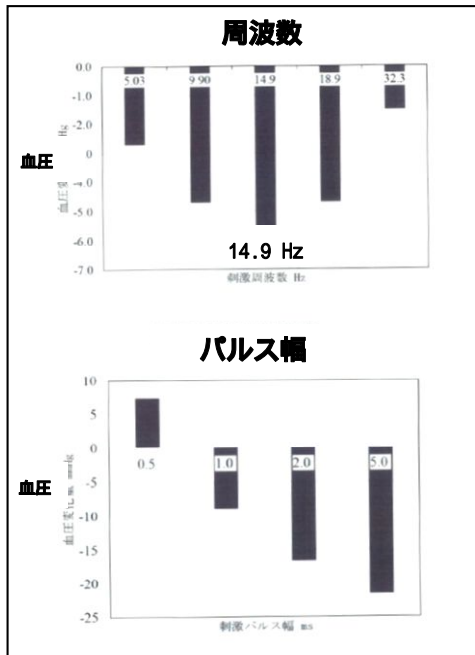


図1 迷走神経電気的刺激による循環動態への影響

(2) 腸間膜リンパ液中の脂質のメディエーターの測定:

質量分析(リゾリン脂質群: LPC)迷走神経刺激による出血性ショック後の腸間膜リンパ液の脂質メディエーターへの影響。SDラットに出血性ショックを与え、その後0.25mA、5Hzの条件で10分間の電気的刺激を与えショック前およびショック後蘇生期の腸間膜リンパ液を用いて質量分析を用いて脂質メディエーターを分析した。図2ごとく、今回の結果は予想していた結果と異なり、今回設定した迷走神経刺激条件(0.25mA、5Hz 10分間)は腸間膜リンパ液中

の脂質のメディエーターに明らかな影響を与えないことが判明した。その他の迷走神経刺激条件が腸間膜リンパ液中の脂質メディエーターに影響を与える可能性もあるため、今後、その他の刺激条件下での脂質メディエーターの変化を確認する必要がある。

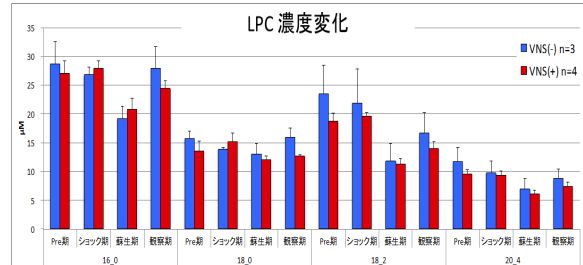


図2 迷走神経電気的刺激による腸間膜リンパ液中の脂質メディエーター(LPC)の変化

外傷出血性ショックラットの腸間膜リンパ液を採取し、エクソゾーム画分を抽出するために、超遠心分離を行い、western blotを行い、マーカー蛋白であるHsp70を確認することができた。腸間膜リンパ液中の存在を証明することができたため、今後は侵襲時、迷走神経刺激時の変化を確認する予定である。

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)

[雑誌論文](計4件)

Langness S, Costantini TW, Morishita K, Eliceiri BP, Coimbra R. Modulating the Biologic Activity of Mesenteric Lymph after Traumatic Shock Decreases Systemic Inflammation and End Organ Injury. PLoS One. 2016 Dec 15;11(12):e0168322. (査読あり)

相星 淳一, 森下 幸治, 小林 哲幸, 大友 康裕. 急性炎症病態におけるカルシウム非依存性ホスホリパーゼ A2 の役割. 日本外傷学会雑誌 (1340-6264)30 巻 2 号 Page47-55(2016.05). (査読あり)

Kojima M, Gimenes-Junior JA, Langness S, Morishita K, Lavoie-Gagne O, Eliceiri B, Costantini TW, Coimbra R. Exosomes, not protein or lipids, in mesenteric lymph activate inflammation: Unlocking the mystery of post-shock multiple organ failure. J Trauma Acute Care Surg. 2017 Jan;82(1):42-50. (査読あり)

森下 幸治, 相星 淳一. 遠隔臓器障害に腸

間膜リンパ液は関与する? (ショック管理 : ショックと臓器障害連関のメカニズム) -- (ショック時の多臓器障害症候群を考える) . 救急・集中治療 29(5・6), 369-375, 2017 総合医学社 .(査読あり)

〔学会発表〕(計 9 件)

森下幸治ほか . 外傷性出血性ショックによる腸管虚血再灌流生涯における迷走神経刺激による治療の可能性 . 第 115 回日本外科学会定期学術集会 . 2015 年 4 月 16 日 . 名古屋国際会議場 (名古屋)

森下幸治ほか . 耳介迷走神経刺激による抗炎症治療法の可能性 . 第 43 回日本集中治療医学会学術集会 . 2016 年 2 月 12 日 . 神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル (神戸)

八木雅幸、森下幸治ほか . 外傷治療における次回迷走神経刺激の可能性 . 第 30 回日本外傷学会 . 2016 年 5 月 31 日 . 御茶ノ水ソラシティー (東京)

Langness SM, Coimbra R, Morishita K, et al. Extracellular Microvesicles as Potential Mediators of the Gut-Derived Systemic Inflammatory Response. Clinical Congress of American College of Surgeon. Chicago, IL, U.S.A. 2015.10.06

Langness MS, Costantini TW, Morishita K, et al. Modulating the biologic activity of mesenteric lymph after traumatic shock decreases systemic inflammation and end organ injury. 74th Annual Meeting of the American Association for the Surgery of Trauma & Clinical Congress of Acute Care Surgery. Wynn Las Vegas, Las Vegas, NV. U.S.A. 2015.09.09

Yagi M, Morishita K, Ueno A, et al. Electrical vagus nerve stimulation modulates the intestinal blood flow after trauma/hemorrhagic shock. World Trauma Congress. New Delhi, India. 2016.08.18

Kojima M,..., Morishita K,...,et al. Exosomes, not protein or lipids, in mesenteric lymph active inflammation: Unlocking the mystery of post-shock multiple organ failure. 75th Annual Meeting of the American Association for the Surgery of Trauma & Clinical Congress of

Acute Care Surgery. Hawaii, U.S.A. 2016.09.15

八木雅幸、森下幸治ほか . ラット外傷性出血ショックにおける迷走神経刺激の腸管血流改善効果 . 第 8 回日本 Acute care surgery 学会学術集会 . 2016 年 9 月 23 - 24 日 . 大阪国際会議場 (大阪)

Yagi M, Morishita K, et al. Electrical vagus nerve stimulation improves the intestinal blood flow after trauma/hemorrhagic shock. 76th Annual Meeting of the American Association for the Surgery of Trauma and Clinical Congress of Acute Care Surgery, Baltimore, MD, U.S.A. 2017.9.13

〔その他〕

ホームページ等

http://www.tmd.ac.jp/accm/research/60_4_e3b457a97b4f/index.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森下幸治 (MORISHITA, Koji)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 40456207

(2)研究分担者

小林哲幸 (KOBAYASHI, Tetsuyuki)

お茶の水女子大学・基幹研究院・教授
研究者番号 : 50178323

(3)連携研究者

植野彰規 (UENO, Akinori)

東京電機大学・工学部・教授
研究者番号 : 20318158