

令和 2 年 8 月 3 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11426

研究課題名(和文) 出血性ショック後臓器障害における分泌型microRNA・運搬体エキソゾームの関与

研究課題名(英文) Involvement of secreted microRNA and carrier exosomes in organ injury after hemorrhagic shock

研究代表者

増野 智彦 (MASUNO, TOMOHIKO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：00318528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分泌型microRNA(miRNA)および運搬体であるエキソゾームに着目し、出血性ショック後遠隔臓器障害の発生に、腸管からリンパ液中に産生されるmiRNAおよびエキソゾームが関与するのかを検討した。本研究より、ラット腸管リンパ液中にmiRNAが存在することが確認された。miRNAは想定されていたエキソゾームのみならず非のう胞分画からも検出され、エキソゾーム以外の方法でも遠隔臓器へ運ばれる可能性が示唆された。腸間膜リンパ管より注入したエキソゾームは肺に有意に集積しており、腸管より産生されたmiRNAを内包するエキソゾームは肺を主要標的臓器とすることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

出血性ショック後に生じる多臓器不全による死亡率は依然高いままであり、その発生機序は未だ解明されていない。本研究結果において、腸管からリンパ液中に産生されるmiRNAはエキソゾームに内包される形で主要標的臓器である肺へと運ばれ、組織内に取り込まれることが明らかとなった。本研究結果は、出血性ショック後急性肺障害をはじめとする遠隔臓器障害発生の病態解明に新たな展開をもたらすと考えられる。

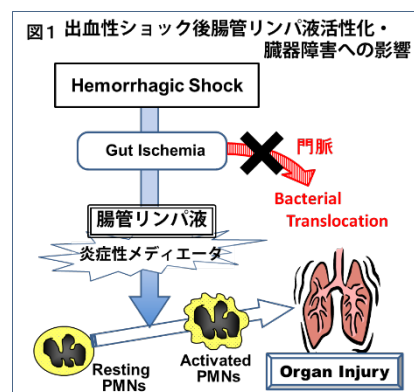
研究成果の概要(英文)：Gut ischemia following hemorrhagic shock elaborates inflammatory mediators into the mesenteric lymph which result in subsequent distant organ injury. However, it is not clear how the mediators are transported to distant organs while maintaining their bioactivity. This study focused on secreted microRNAs (miRNAs) and exosomes as carriers of miRNAs to determine that exosome encapsulated miRNAs produced in mesenteric lymph are involved in the development of distant organ injury. miRNAs were present in rat mesenteric lymph and were found in the exosomes, as expected, but were also detected in the non-vesicle-associated fraction, suggesting that miRNAs may have alternative way to be transported other than the exosome-associated forms. Rat intestine epithelial cell line ICE6-derived exosomes injected from the mesenteric lymphatics were significantly accumulated in the lung, indicating that the lung was the primary target for exosomes encapsulating miRNAs produced from the intestine.

研究分野：救急医学

キーワード：出血性ショック 臓器障害 腸管リンパ液 microRNA exosome

## 1. 研究開始当初の背景

外傷初期診療の進歩にもかかわらず、出血性ショック後に生じる多臓器不全による死亡率は依然高いままであり、その発生機序は未だ解明されていない。これまでの研究により、出血性ショック後に生じる遠隔臓器障害の発生には、臓器低灌流、特に腸管血流の低下が深く関わっていることが示されている<sup>1)-3)</sup>。我々は出血性ショック後に虚血腸管から産生され、肺・体循環へと流れ込むショック後腸管リンパ液中に、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>等の脂質メディエータを含む炎症性メディエータが存在すること、これらの炎症性メディエータは好中球および血管内皮細胞を活性化すること、また、腸管リンパ液の持つ生理活性はショックの深度・期間に相関すること<sup>4)</sup>、生理活性は動物種によらず保たれていることを報告してきた<sup>5)</sup>。出血性ショック後に生じる肺障害が腸間膜リンパ管を離断することにより抑制されたとのDeitchらの報告<sup>6)</sup>も、炎症性メディエータの主要運搬経路として門脈ではなく腸管リンパ液に注目することになった理由である。これらの結果より、ショック後リンパ液には蛋白・脂質メディエータやDAMPsなどのDanger Signals等が含まれ、複数の因子が生理活性発現に関与しており、好中球の活性化を介して遠隔臓器障害を生じると考えられる(右図1)。しかし、これらの因子が遠隔臓器障害を生じるためには、生理活性を保ったまま安定して遠隔まで運ばれる必要があるが、いずれも不安定であるこれらの因子がいかに安定性を保ったまま遠隔標的の細胞まで運ばれるかの説明にはこれまで至っていなかった。



そこで出血性ショック後の遠隔臓器障害発生機序を説明するため、近年細胞間情報伝達物質として注目されている分泌型microRNA(miRNA)、およびその運搬体であるエクソゾームに着目した。miRNAは22塩基程度の蛋白に翻訳されないノンコーディングRNAであり、標的mRNAの3' UTRに結合することによりmRNAの翻訳の阻害と切断という2つのプロセスにより標的となる複数の遺伝子を制御している。miRNAは通常細胞内に存在するが、エクソゾームに封入される形で細胞外に分泌され、体液内のヌクレアーゼにより分解されることなく安定して遠隔臓器の細胞まで移動でき、標的細胞内で機能を発揮する。エクソゾームはあらゆる体液で確認されており、癌の発症・転移、様々な疾患との関連が報告されている。しかし、腸管リンパ液に分泌されるmiRNA、およびリンパ液内でのエクソゾームの存在ならびにその動態に関してはこれまで研究が行われていない。分泌細胞の環境変化(ex. 腸管の虚血再灌流)が、エクソゾームに封入されたmiRNAの発現変化という形で標的細胞(肺などの遠隔臓器)に伝達され、標的細胞にたどり着いたmiRNAが細胞内へ移動してその活性を発揮するという方法は、生理活性物質そのものを介した情報伝達に比べ、遠隔へ安定した情報を伝える方法として有利であると考えられ、腸管虚血→腸管リンパ液を介した情報伝達→遠隔臓器障害をうまく説明できる可能性がある。

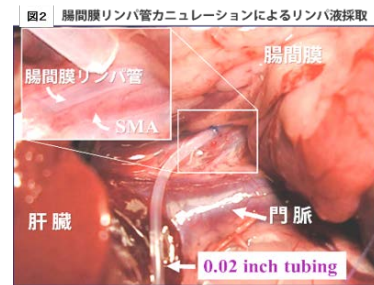
## 2. 研究の目的

出血性ショック後に生じる遠隔臓器障害の発生に、虚血腸管からエクソゾームに内包される形でリンパ液中に産生されるmiRNAが関与するのかを明らかとするため、①腸管から分泌され遠隔標的の組織内で炎症反応を調節するmiRNAが腸管リンパ液中に存在するのか、また②腸管由来のエクソゾームがmiRNAを封入し、安定したまま遠隔標的の組織まで到達するのか、を検討した。

### 3. 研究の方法

**研究 I** 腸管から分泌される miRNA が腸管リンパ液中に存在するのかを明らかにするため、正常ラットを用いて腸管リンパ液および血液を採取し、miRNA プロファイリングを比較した。

(ラット腸管リンパ液・血液の採取) オス Sprague-Dawley rat を使用。ペントバルビタール(50mg/kg)+キシラジン (10mg/kg) 腹腔内投与にて麻酔した後、腹部正中切開をおき、右図 2 のごとく上腸間膜動脈根部に沿って走行する腸間膜リンパ管に 0.02 inch シリコンチューブをカニューレーションし、冷水槽内に留置した EDTA 添加ヌクレアーゼフリーマイクロチューブ内に腸管リンパ液を経時的に採取した。採取したリンパ液は直ちに遠心し細胞成分を除去した。同様に大腿静脈に留置したカニューレより採血を行い、血漿を分離した。本研究は日本医科大学動物実験管理委員会の承認を得て行った。



(Total RNA の抽出) リンパ液および血漿に ISOGEN-LS を添加し遠心後、RNA 水層を取り出し、isopropanol および共沈剤とともに再度遠心し Total RNA を抽出した。

(miRNA のプロファイリング) : 抽出された RNA を TaqMan MicroRNA Assay Rodent Panels (A and B, ver. 3.0,) を用いて 7900HT Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)にて測定し、miRNA のプロファイリングを行った。

**研究 II** 腸管リンパ液中の miRNA がエキソゾーム内に存在するのかを明らかにするため、腸管リンパ液を超遠心し、各細胞内小器官分画を回収した後、それぞれの分画内の miRNA (miR-150) の含有量を realtime PCR にて定量解析した。

Pellet A : 2,000 x g 10 min, 4°C 分画内容 cells, nuclei

Pellet B : 20,000 x g 30 min, 4°C 分画内容 mitochondria, lysosomes, peroxisomes

Pellet C : 100,000 x g 70 min, 4°C 分画内容 exosomes, microsomes

Pellet D : 150,000 x g 180 min, 4°C 分画内容 ribosomes, large macromolecules

**研究 III** 腸管由来のエキソゾームが、安定したまま遠隔標的組織まで安定して到達し、組織内に取り込まれるのかを検討した。まずラット腸管上皮細胞 ICE-6 にラットで発現していない線虫 miRNA (*cel-miR-238-3p*) を導入し、その培養上清液から *cel-miR-238-3p* を含有したエキソゾームを作成した。作成したエキソゾームをラット腸間膜リンパ管より注入し、30 分後に血管内を生理食塩水にて十分灌流し、摘出した臓器 (肺、肝臓、脾臓、腎臓) より RNA を抽出後、realtime PCR にて各臓器内の *cel-miR-238-3p* の取り込みを定量解析した。

### 4. 研究成果

**研究 I** 正常ラット腸管リンパ液および血漿中の miRNA を RT-qPCR based array を用いて解析を行った結果、array に搭載された 375 種類の miRNA のうち、腸間膜リンパ液中には 287 種類の miRNA が検出された。そのうち 256 種は血漿中にも認められたが、31 種は腸管リンパ液中のみで検出された。血漿中のみで検出された miRNA は 11 種であった。腸管リンパ液と血漿における miRNA 発現の比較において、19 種の miRNA は血漿に比べ腸管リンパ液中で有意に多く発現していた。一方、2 種の miRNA は血漿に有意に多く発現がみられ

た (表 1)。

研究 II 上記方法のごとく腸管リンパ液を超遠心し、各細胞内小器官分画中の miRNA(miR-150) の含有量を realtime PCR にて定量解析した。予想されていたようにエクソゾームを含む Pellet C 分画中に miRNA は検出された (図 3)。更に細胞基質を含む Pellet D および最終上清中にも miRNA は検出された。この結果より、これまで考えられていたとおり miRNA はエクソゾーム内に存在するが、エクソゾームに内包される以外のかたちでリンパ液中 miRNA は存在しうる可能性が考えられた。

研究 III 上記方法のごとく、ラットで発現していない線虫 miRNA (*cel-miR-238-3p*) をマーカーとして導入したラット腸管上皮細胞 ICE-6 を作成し、その培養上清液から *cel-miR-238-3p* を含有したエクソゾームを作成した。抽出した腸管由来エクソゾームをラット腸間膜リンパ管より注入し、遠隔臓器内への取り込みを解析したところ、図 4のごとく肺、肝臓、腎臓、脾臓のいずれからでも *cel-miR-238-3p* が検出されたが、肺において他の臓器に比べ有意に多くの取り込みが認められた。本結果より腸管由来エクソゾームは肺を主要標的臓器とし、内包する miRNA を運搬することが確認された。

本研究より、ラット腸間膜リンパ液中に miRNA が存在することが確認された。また、多くのリンパ液 miRNA は血漿 miRNA に比べ高発現していることが示された。細胞外 miRNA はこれまで考えられていたようにエクソゾームの豊富な小胞体層内に存在していたが、小胞成分を取り除いた非囊胞分画からも検出され、エクソゾームに内包される以外の方法でも遠隔臓器へ運ばれる可能性が示唆された。腸管上皮細胞由来エクソゾームを腸間膜リンパ管より注入し、体内動態を解析した結果からは、腸管由来エクソゾームは肺に最も集積しており、腸管より産生された miRNA がエクソゾームを介して肺に運ばれ、肺障害の発生に関与している可能性が示唆された。現在、出血性ショックモデルにおいても同様の解析を進めている。本研究結果は、出血性ショック後急性肺障害をはじめとする遠隔臓器障害発生の病態解明に新たな展開をもたらすと考えられる。

<引用文献>

- 1) Hassoun HT et al, Shock (2001): Post-injury multiple organ failure. The role of the gut.
- 2) Reilly PM et al, Shock (2001): The mesenteric hemodynamic response to circulatory shock.
- 3) Gonzalez RJ et al, J Trauma (2001): Mesenteric lymph is responsible for post-hemorrhagic shock systemic neutrophil priming.
- 4) Masuno T et al, Shock (2006): Bioactivity of postshock mesenteric lymph depends on the depth and duration of hemorrhagic shock.
- 5) Salin EL, Masuno T et al, J Trauma (2004): Systemic neutrophil priming by lipid mediators in post-shock mesenteric lymph exists across species.
- 6) Magnotti LJ et al, Ann Surg (1998): Gut-derived mesenteric lymph but not portal blood increases endothelial cell permeability and promotes lung injury after hemorrhagic shock.

表 1 腸管リンパ液および血漿中miRNA発現の差異

Differentially expressed miRNAs*	Fold change (Lymph/Plasma)	P value
<i>miR-29a</i>	69.88 ↑	0.046
<i>miR-29c</i>	62.17 ↑	0.046
<i>miR-195</i>	45.84 ↑	0.046
<i>miR-361</i>	34.54 ↑	0.046
<i>miR-532-5p</i>	32.75 ↑	0.046
<i>miR-342-3p</i>	31.22 ↑	0.046
<i>miR-384-5p</i>	30.89 ↑	0.043
<i>miR-139-5p</i>	23.77 ↑	0.028
<i>miR-215</i>	21.18 ↑	0.046
<i>miR-140-3p</i>	15.12 ↑	0.046
<i>miR-30a</i>	14.50 ↑	0.043
<i>miR-203</i>	12.08 ↑	0.046
<i>miR-30d</i>	11.89 ↑	0.046
<i>miR-218</i>	10.63 ↑	0.046
<i>miR-30e</i>	10.19 ↑	0.046
<i>miR-200c</i>	8.11 ↑	0.046
<i>miR-204</i>	8.08 ↑	0.028
<i>miR-192</i>	7.66 ↑	0.046
<i>miR-187</i>	6.96 ↑	0.043
<i>miR-872</i>	0.45 ↓	0.028
<i>miR-196b</i>	0.34 ↓	0.043

図 3 腸管リンパ液中miRNA分画

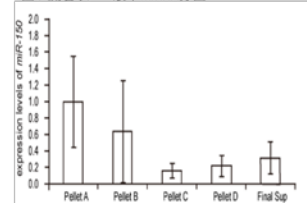
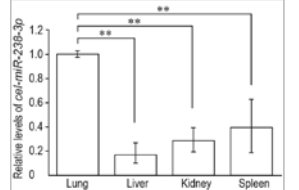


図 4 腸管リンパ液を介した腸管由来エクソゾームの体内動態



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wakako Sakamoto, Tomohiko Masuno, Hiroyuki Yokota, Toshihiro Takizawa	4. 巻 15
2. 論文標題 Expression profiles and circulation dynamics of rat mesenteric lymph microRNAs	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 MOLECULAR MEDICINE REPORTS	6. 最初と最後の頁 1989-1996
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2017.6259	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂本 和嘉子
2. 発表標題 腸間膜リンパ液mRNAはショック後肺障害のキープレーヤーか
3. 学会等名 第45回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 54. 坂本 和嘉子, 増野 智彦, 塚本 剛志, 朝倉 隆之, 趙 東威, バニヤータン・ナイン, 瀧澤 俊広, 横田 裕行
2. 発表標題 正常ラット腸間膜リンパ液のmiRNAの安定性
3. 学会等名 日本Shock学会総会
4. 発表年 2016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	塚本 剛志 (TSUKAMOTO TAKESHI) (20626270)	日本医科大学・大学院医学研究科・研究生  (32666)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	横田 裕行  (YOKOTA HIROYUKI)  (60182698)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授    (32666)	
研究 分担者	新井 正徳  (ARAI MASATOKU)  (60267127)	日本医科大学・医学部・講師    (32666)	