

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K08882
研究課題名(和文) 腸間膜リンパ液中のエクソソームに対する迷走神経電氣的刺激による抗炎症作用の解明

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

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・講師

研究者番号：40456207
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)：腸管虚血再灌流障害後の多臓器障害のメカニズムを解明するために、腸間膜リンパ液中のエクソソーム画分を調査したところ、エクソソーム画分は生物活性(NF- κ B活性)を有し不飽和脂肪酸(C18:2, C20:4)含有lysophosphatidylcholines (LPC)を有することを明らかにすることができた。また、頸部迷走神経の腸管への作用を調べたところ、頸部の迷走神経刺激は腹部の迷走神経に電氣的活動を伝播し、血中のノルアドレナリンの効果調節しながら腸管の血流を増加させ、腸管の障害を軽減し腸管の保護作用を有することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
救急現場(外傷など)において、腸管虚血再灌流障害による多臓器障害は未だ致命率が高い病態であるが、今回の研究にてその病態を腸間膜リンパ液のエクソソームの脂質のメディエータ(リゾリン脂質群であるlysophosphatidylcholines)の関与の観点から明らかにすることができた。さらには、頸部迷走神経の電氣的刺激が腸管の血流に作用し腸管保護作用がある事を明らかにすることができ、動物実験ではあるが、腸管虚血再灌流障害による多臓器障害の新たな治療戦略になるためのエビデンスの1つとなった。

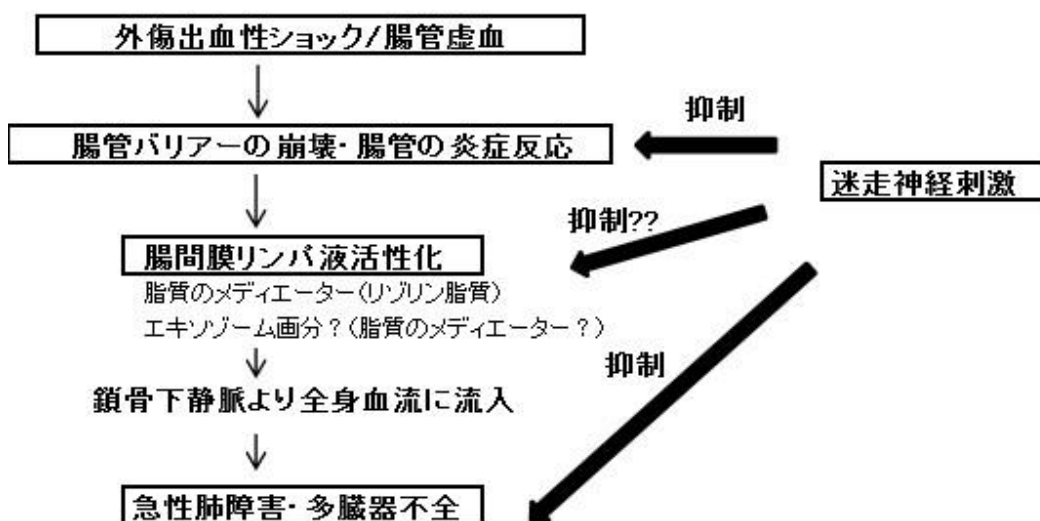
研究成果の概要(英文)：Mesenteric lymph exosome-induced NF- κ B activation significantly increased after intestinal ischemia, and lipid analysis revealed a significant increase in the concentration of polyunsaturated fatty acids (C18:2, C20:4)-containing lysophosphatidylcholines. Cervical vagal nerve stimulation evoked abdominal vagal nerve activity and relieved the trauma/hemorrhagic shock-induced impairment in intestinal blood flow by modulating the vasoconstriction effect of noradrenaline.

研究分野：救急医学

キーワード：エクソソーム 腸間膜リンパ液 脂質メディエーター 腸管虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

外傷出血性ショック後に産生される腸間膜リンパ液は、多臓器障害の誘因となる炎症作用を有することが報告されているが、腸間膜リンパ液の急性炎症における詳細な役割は未だ明らかになっていない事が多い。申請者らは最近、ショック蘇生後の腸間膜リンパ液中にはエクソソーム (Kojima M, Morishita K et al. J. Trauma Acute Care Surg. 2017) や炎症性の脂質メディエータであるリゾリン脂質群のリゾフォスファチジルコリン (lysophosphatidylcholine: LPC) 含むことを証明し (Morishita K et al. J. Trauma Acute Care Surg. 2012)、これが全身性炎症反応症候群や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 100 nm 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。しかし侵襲前後の腸間膜リンパ液中のエクソソーム中の脂質の変化については明らかになっていなかった。頸部迷走神経電気刺激に関しては、急性炎症モデルにて抗炎症作用を有することが過去の研究で報告されていた。腸間膜リンパ液に対する迷走神経刺激の作用に関しては、リンパ液中の生物活性 (活性酸素の産生) を制御し出血性ショック後の急性肺障害を抑制することは知られていたが、迷走神経刺激の腸間膜リンパ液エクソソーム中のメディエータへの関与は明らかになっていなかった。



2. 研究の目的

本研究の目的は、出血性ショックに続発する多臓器障害に関する新たなメカニズムと治療法を解明することであった。そこで、多臓器障害の発現に関係する「腸間膜リンパ液のエクソソーム中の脂質のメディエータの役割の解明」と「治療法としての迷走刺激の可能性」に注目し、ラットの出血性ショック/腸管虚血再灌流後の腸間膜リンパ液中のエクソソームにおける炎症惹起性脂質メディエータの解析および頸部迷走神経の電気刺激によるその効果に関して研究を行った。

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) 腸間膜リンパ液中のエクソソーム画分の脂質のメディエータの解明

雄性SDラットをイソフルランにて吸入麻酔を行い、腸管虚血再灌流モデル (IR model) を行った。開腹手術を行い、腸間膜リンパ管を同定しリンパ液をドレナージし、その後、上腸間膜動脈をクリップにて遮断し腸管虚血を 60 分間行った。その後、クリップを開放し 120 分間の再灌流を行った。腸間膜リンパ管からドレナージされたリンパ液を上腸間膜動脈遮断前 (侵襲前: Pre-IR) のリンパ液と再灌流後 (侵襲後: Post-IR) のリンパ液を回収した。腸間膜リンパ液中のエクソソーム画分は超遠心分離を用いたペレットダウン法にて抽出した。エクソソーム画分の確認のため、ウェスタンブロッティングによるエクソソームマーカータンパク質の確認とゼータサイザーにより粒度分布の確認を行った。さらに侵襲前後の腸間膜リンパ液の生物活性の測定 (単球における NF- κ B 活性測定) および質量分析 (脂質の分析) を行った。

(2) 頸部迷走神経刺激による腸間膜リンパ液の脂質のメディエータへの影響の解明

雄性SDラットをイソフルランにて吸入麻酔を行った後、頸部の迷走神経を露出し、腸管虚血再灌流障害モデル (IR model) を行った。迷走神経刺激群では、頸部の迷走神経に電気刺激 (刺激条件 5 V, 0.5 Hz, 20 分) を行った。腸間膜リンパ管からドレナージされたリンパ液を上腸間膜動脈遮断前 (侵襲前: Pre-IR) のリンパ液と再灌流後 (侵襲後: Post-IR) のリンパ液で比較検討

した。

(3) 頸部迷走神経電気の刺激による腸管の保護作用の機序の解明

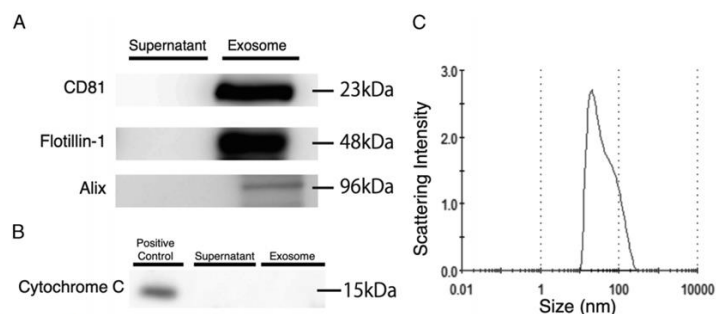
SDラットをイソフルランにて吸入麻酔を行った後、頸部の迷走神経と腹部の迷走神経を露出し、頸部の迷走神経を電気刺激し、腹部の迷走神経の電气的活動を記録し、頸部から腹部へ迷走神経刺激が伝わっているかを確認した。また、頸静脈から血液を脱血し出血性ショックモデルを作成し、その後、頸部迷走神経電気刺激を行い腸管の血流の変化を確認した。

4. 研究成果

(1) 腸間膜リンパ液中のエクソソーム画分の脂質のメディエータの同定

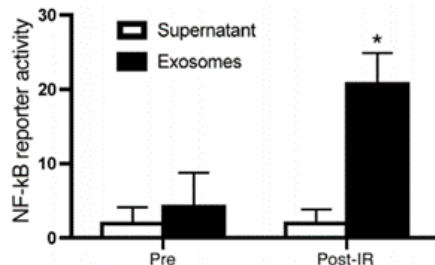
腸管虚血再灌流障害モデル(IR model)を作成し、抽出された腸間膜リンパ液中のエクソソーム画分に関しては、エクソソームマーカータンパク質 (CD81, Flotillin-1, Alix) が存在していることをウエスタンブロッティングにて確認 (図 1 A) した。ネガティブコントロールの cytochrome c は検出されなかった (図 1 B) さらにゼータサイザーにてその粒度分布を確認した (94.30 ± 16.42 nm) (図 1 C)。

図 1



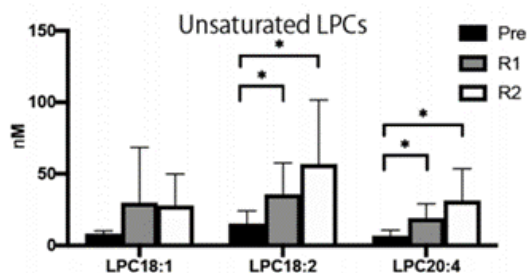
腸間膜リンパ液中のエクソソーム画分の生物活性測定 (NF- κ B 活性) を侵襲の前後 (Pre-IR vs post-IR) で比較したところ、上清に比べて、Post-IR のエクソソーム画分に高い NF- κ B 活性を認めた (図 2)。

図 2



腸管虚血再灌流後に腸間膜リンパ液中のエクソソームの不飽和脂肪酸含有 (C18:2, C20:4) 含有 LPC が有意に増加することが明らかとなった (図 3)。

図 3



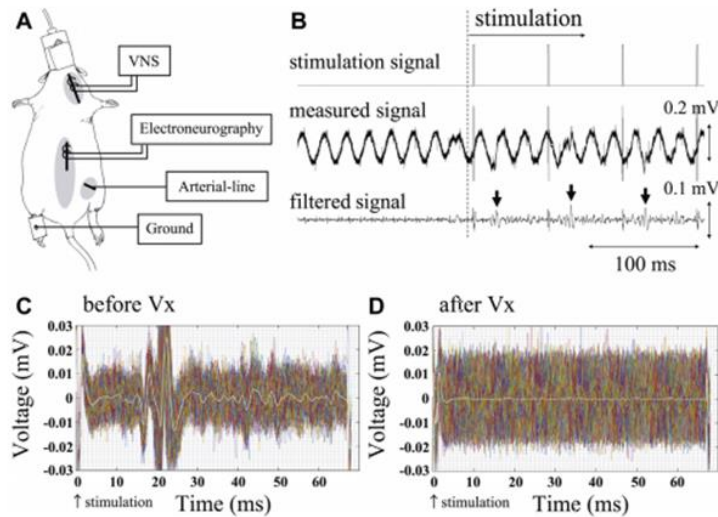
以上の研究により、腸管虚血再灌流後の腸間膜リンパ液中のエクソソーム画分には脂質のメディエータである不飽和脂肪酸含有の LPC を有することが明らかとなった。これらの成果は、国際学会 (Academic Surgical Congress, Dallas, TX, U. S. A. 2019) での発表お

よび論文報告 (Senda A, Morishita K, et al. J Traum Acute Care surgery, 2020)をおこなった。

(2) 頸部迷走神経刺激による腸間膜リンパ液の脂質のメディエータへの影響
 頸部迷走神経刺激は腸間膜リンパ液において脂質のメディエータである腸管虚血再灌流障害後に増加したアラキドン酸の産生を制御することが明らかとなった。その成果は国際学会にて報告を行った (Annual Meeting of AAST and Clinical Congress of Acute Care Surgery, Dallas, TX, U. S. A, 2019)。腸間膜リンパ液中のエクソソーム画分におけるアラキドン酸をはじめとした遊離脂肪酸の測定は現在、精度の問題から行えていないため今後の課題となっている。

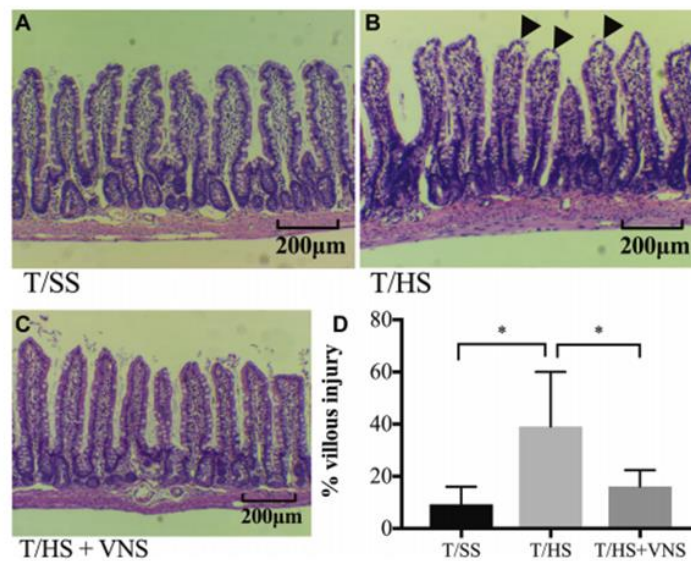
(3) 出血ショックモデルにおける頸部迷走神経電気刺激による腸管保護作用
 頸部迷走神経刺激をする (図 4A) と腹部の迷走神経にて電気的な活動を同定することが出来た (図 4B, C)。頸部と腹部の間の迷走神経を切離するとその遠位の腹部の迷走神経の電気的活動を同定することが出来なかったため (図 4D)、頸部における電気的な迷走神経刺激は腹部に伝わっていると考えられた。

図 4



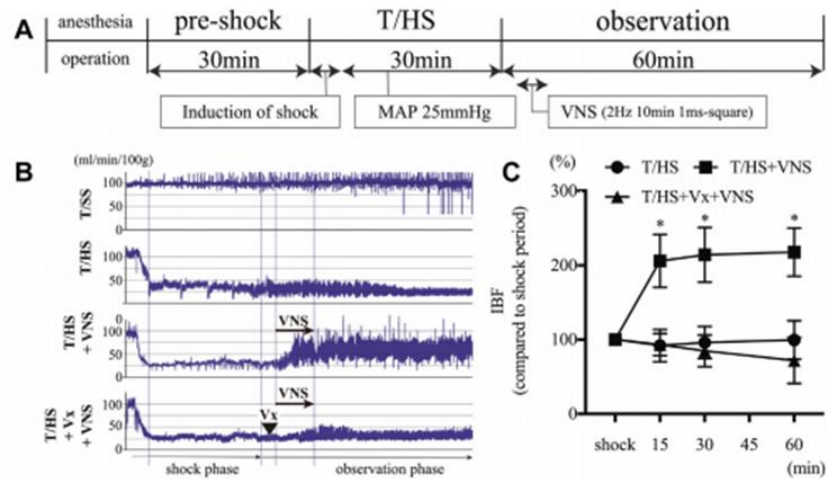
外傷出血性ショックラット (T/HS) に頸部迷走神経に電気刺激を与え、腸管の粘膜障害の程度を評価すると腸管保護作用を認めた。(図 5)

図 5



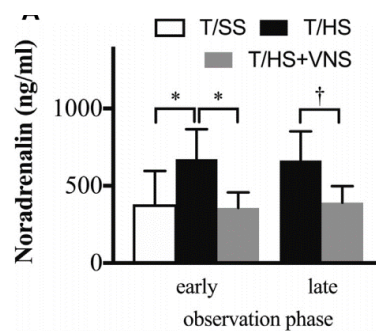
ドップラーフローメトリー (OMEGA WAVE, 東京) を用いての腸管血流の変化を調べたところ、迷走神経刺激により腸管の血流の増加を認めた。(図 6A, B, C)

図 6



迷走神経刺激はショック依存性に増加した門脈血中のノルアドレナリンの濃度を低下させた(図 7)。

図 7



以上より、頸部迷走神経の電氣的刺激は、腹部の迷走神経に電氣刺激を伝播し、ノルアドレナリンの濃度を調節しながら、腸管血流を増加させることにより腸管の保護作用を起こすことが明らかとなった。

この成果は国際学会発表 (Annual Meeting of AAST and Clinical Congress of Acute Care Surgery. Baltimore, MD, U.S.S, 2017) および原著論文発表をおこなった (Yagi M, Morishita K, et al, Surgery. 2020)。

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9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Yagi M, Morishita K, Kojima M, Senda A, Doki S, Taylor B, Shinjyo Y, Kobayashi T, Aiboshi J, Otomo Y.
2. 発表標題 VAGUS NERVE STIMULATION REGULATES ARACHIDONIC ACID PRODUCTION IN THE MESENTRIC LYMPH AFTER INTESTINAL ISCHEMIA REPERFUSION INJURY
3. 学会等名 78th Annual Meeting of AAST and Clinical Congress of Acute Care Surgery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakatsutsumi K, Morishita K, Tang Y, Yagi M, Kojima M, Senda A, Aiboshi J, Kobayashi T, Otomo Y.
2. 発表標題 ELECTRICAL VAGAL NERVE STIMULATION MODULATES BALANCE BETWEEN OMEGA 3 AND OMEGA 6 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS AFTER INTESTINAL ISCHEMIA REPERFUSION INJURY
3. 学会等名 79th Annual Meeting of AAST & Clinical Congress of Acute Care Surgery (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yagi M, Morishita K, Ueno A, Aiboshi J, Nakamura H, Akabori H, Kojima M, Senda A, Otomo Y.
2. 発表標題 Neuroenteric axis modulates the intestinal circulation after trauma/hemorrhagic shock
3. 学会等名 77th Annual Meeting of the American Association for the Surgery of Trauma and Clinical Congress of Acute Care Surgery & 4th World Trauma Congress (国際学会)
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關与する。
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

1. 発表者名 Senda A, Morishita K, Kojima M, Doki S, Yagi M, Kobayashi T, Aiboshi J, Otomo Y
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 2019年

1. 発表者名 Kojima M, Morishita K, Aiboshi J, Otomo Y
2. 発表標題 Exosomes as mediators of immune-inflammatory responses after severe trauma
3. 学会等名 7th Pan-Pacific Trauma Congress 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura H, Ueno A, Yagi M, Morishita K, Otomo Y
2. 発表標題 Measurement System for Detecting Action Potential to Electrical Vagus Nerve Stimulation
3. 学会等名 2018 11th Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Senda A, Kojima M, Morishita K, Yagi M, Shoko T, Otomo Y.
2. 発表標題 ALTERED PROTEIN AND MICRO RNA EXPRESSION PROFILES OF INTESTINAL EPITHELIAL CELL-DERIVED EXOSOMES DUE TO HYPOXIA/REOXYGENATION INJURY.
3. 学会等名 79th Annual Meeting of AAST & Clinical Congress of Acute Care Surgery (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Imazawa W, Nakamura H, Yagi M, Morishita K, Otomo Y, Ueno A.
2. 発表標題 Measurement of Vagus Nerve Response to Transcutaneous Electrical Ear Canal Stimulation in Anesthetized Rat
3. 学会等名 42nd Annual International Conferences of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科歯科大学 救急災害医学分野/救命救急センター 研究内容 基礎研究
http://www.tmd.ac.jp/accm/research/60_4e3b457a97b4f/index.html

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	植野 彰規 (Ueno Akinori) (20318158)	東京電機大学・工学部・教授 (32657)	
研究分担者	小林 哲幸 (Kobayashi Tetsuyuki) (50178323)	お茶の水女子大学・基幹研究院・教授 (12611)	

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