

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16585

研究課題名（和文）シングルセル解析による外傷後肺障害の病態解明

研究課題名（英文）Pathophysiology of Post-Traumatic Lung Injury through Single-Cell Analysis

研究代表者

千田 篤（Senda, Atsushi）

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・助教

研究者番号：00728040

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）：腸の虚血再灌流障害は腸由来のメディエーターを介して炎症反応を引き起こし、腸上皮細胞から分泌されるエクソソームが全身性炎症に関与しています。我々の研究で、虚血刺激後のエクソソーム内で脂質代謝関連タンパク質発現が増加し、miRNAレベルが変化し、不飽和脂肪酸含有リソホスファチジルコリン濃度が増加することを発見しました。これにより、虚血再灌流障害に関連するエクソソーム成分の変化がNF- κ B経路を含む炎症を活性化することが示唆されました。現在、単一細胞解析技術を用いて各細胞成分と炎症の関係を調査しています。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究成果は腸管虚血が全身性の炎症をきたす病態の解明に寄与をしました。脂質解析、タンパク定量、mRNAについて包括的な解析を行い、提示することにより本病態に関与するあらゆる仮説に対して有益な基礎的な情報を提示しました。また、代謝ネットワークに関するin silicoな解析を行うことにより、上記で得られたデータの持つ意義について提示を行いました。以上のように個体レベルで起きる変化について得られた情報をより詳細に解析するため細胞レベルでの変化を調べるための実験系を確立し、今後より詳細な病態解明に繋げる手法を開発しました。

研究成果の概要（英文）：Intestinal ischemia-reperfusion injury leads to proinflammatory responses via gut-derived mediators, and accumulating evidence suggests that exosomes secreted by intestinal epithelial cells are involved in the development of systemic inflammation. Our study elucidated the multiple changes that simultaneously occur in exosomes after ischemic stimulation. We found that lipid metabolism-related protein expression was upregulated, miRNA levels were slightly altered, and unsaturated fatty acid-containing lysophosphatidylcholine concentration increased after hypoxia and reoxygenation injury; this suggested that the changes in exosomal components associated with ischemia-reperfusion injury activate inflammation, including the NF- κ B pathway. Based on the above, we are currently gathering data on the relation between each cell component and the provoked inflammation utilizing the techniques of single-cell analysis.

研究分野：外傷

キーワード：外傷出血性モデル 虚血再還流 多臓器不全

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸管を虚血状態にしたのち再灌流すると腸間膜リンパ液に炎症を惹起するエクソソームが出現し、その後臓器障害に至る事が知られている。外傷出血性ショック後、腸間膜リンパ液が急性肺障害を始めとする全身性炎症を起こす事が知られているが、詳しい機序は未解明であった。

2. 研究の目的

腸間膜リンパ液中の細胞外小胞であるエクソソームが炎症の原因である事までは研究開始前までに捉えられていたが、この際起きる詳細は全く未解明であったため、エクソソーム内、および標的細胞、標的臓器に起きる変化を捉えることを本研究の目的とした。具体的にはエクソソームおよび標的臓器内で起きる代謝物質の変化を捉えること、そしてより詳細な病態を把握することを目的とし、シングルセル解析を行いラット虚血再還流モデルにて腸管上皮細胞がエクソソームを放出する過程およびエクソソームを受け取った肺組織が臓器障害に至る過程を経時的に調べる事を目的とした。

3. 研究の方法

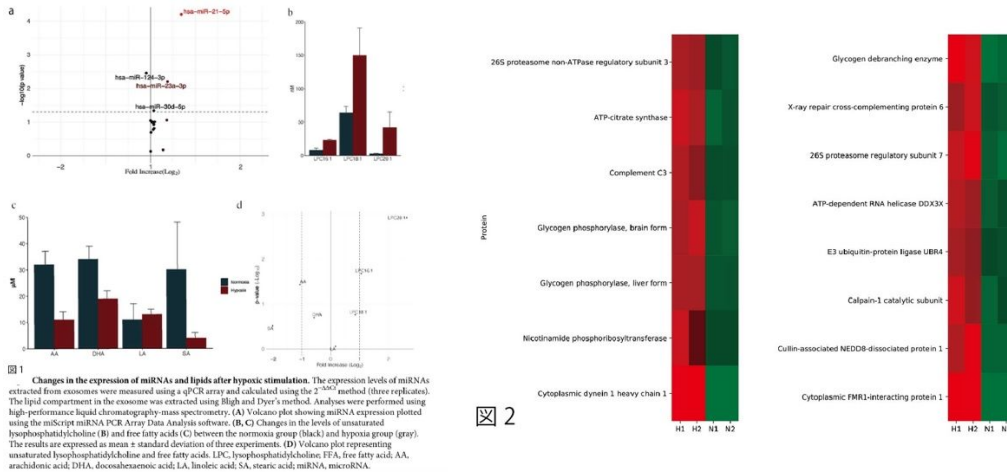
(1) 分化したヒト腸管 Caco-2 (ATCC HTB37) 細胞を 5%CO₂ と 95%空気 (常酸素群) または 5%O₂、5%CO₂、90%N₂ (低酸素群) に 6 時間曝露した。その後、培地を交換し、各群を出血性ショック中の再灌流期に類似した環境に置くために、常酸素環境 (5%CO₂ と 95%空気) で 24 時間培養した。各群の条件付き培地を収集し、IEC 由来のエクソソームを分離した。次に、生物機能アッセイを単球性 NF- κ B レポーター細胞を用いて実施し、プロテオーム分析を高速液体クロマトグラフィー・質量分析 (HPLC-MS) を使用して行い、miRNA の定量化を qPCR で行った。

(2) 上記で得られたデータを包括的に理解するため脂質解析、プロテオーム解析、miRNA 解析に加えて GO 解析、タンパクネットワーク解析を施行することによりエクソソーム内容物総体として起きている変化を捉えた。

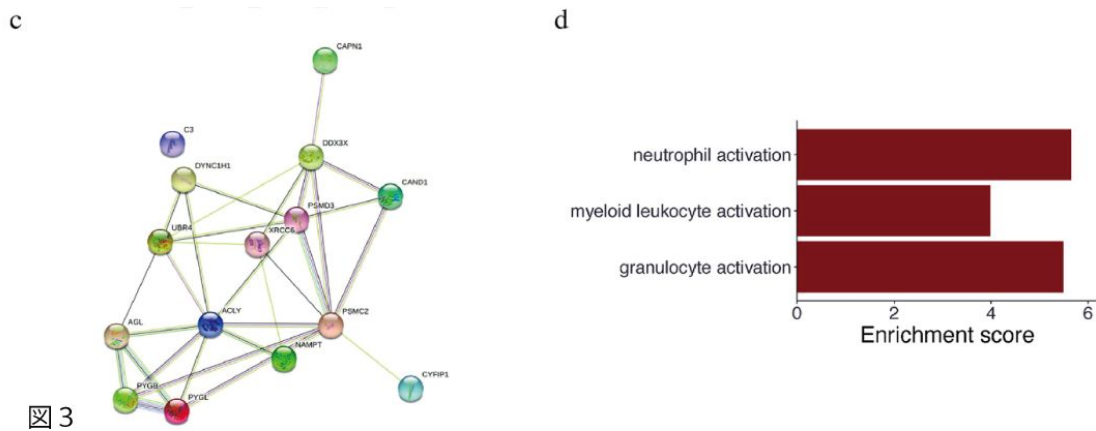
(3) 個体レベルで観察された変化を細胞レベルの変化としてより詳細に捉えるため細胞種毎に虚血再還流刺激をおこし、起きる変化をシングルセル解析にて解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 図 1 にあるように、エクソソーム内で miRNA と脂質変化が起きていることが確認された。具体的には hsa-miR-21-5p、hsa-miR-23a-3p、hsa-miR-124-3p、および hsa-miR-30d-5p の発現量の変化が見られた。脂質においては不飽和 LPC と遊離脂肪酸の量に変化が認められ、過去の研究結果と整合する炎症を惹起すると考えられる脂質変化が起きている事が確認された。また図 2 に示すように、複数のタンパクにおいて著しい発現量の変化が観察され、以上から虚血再還流において miRNA、脂質、タンパク質のそれぞれに変化が起きており、複合的で複雑な相互作用の上で炎症が惹起されている事が示唆された。



(2) GO 解析、タンパクネットワーク解析の結果から、上記の結果からエクソソーム内で起きている変化についての相互関係を解析した。また、これらの結果から好中球、単球、顆粒球の活性が惹起されている事が in silico な実験系で調べることができた。



(3) 個体レベルで観察された変化を細胞レベルの変化としてより詳細に捉えるため細胞種毎に虚血再還流刺激を行なった上で single cell 解析を行なったが、エクソソームの採取量が微小であり in vivo な実験系で変化を捉えることが困難であった。そこで、Caco-3 および Calu-3 細胞による in vitro 系と in vivo で得られたリンパ液との相互作用を調べることで上記実験系に対応する病態の再現ができることが確認された。今後上記実験系にて single cell における解析結果からこれまでの実験成果と照合し、研究を進める予定である。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Senda Atsushi, Kojima Mitsuaki, Watanabe Arisa, Kobayashi Tetsuyuki, Morishita Koji, Aiboshi Junichi, Otomo Yasuhiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Profiles of lipid, protein and microRNA expression in exosomes derived from intestinal epithelial cells after ischemia-reperfusion injury in a cellular hypoxia model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0283702
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0283702	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakatsutsumi Keita, Morishita Koji, Yagi Masayuki, Doki Sanae, Watanabe Arisa, Ikegami Nahoko, Kobayashi Tetsuyuki, Kojima Mitsuaki, Senda Atsushi, Yamamoto Kouhei, Aiboshi Junichi, Coimbra Raul, Otomo Yasuhiro	4. 巻 91
2. 論文標題 Vagus nerve stimulation modulates arachidonic acid production in the mesenteric lymph following intestinal ischemia-reperfusion injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Trauma and Acute Care Surgery	6. 最初と最後の頁 700 ~ 707
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/TA.0000000000003345	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
---------	---------