

気道由来細胞外小胞 RNA はマウス LPS 誘導性肺傷害の新規バイオマーカーとなりうる Airway extracellular vesicle RNA is a potential biomarker for endotoxin-induced lung injury

井上寿男¹⁾、丸岡秀一郎^{1),2)}、鹿野壮太郎^{1),2)}、黒田和道³⁾、山岸賢司⁴⁾、曾田香織¹⁾、橋本 修^{1),5)}、
権 寧博^{1),2)}

Toshio INOUE¹⁾, Shuichiro MARUOKA^{1), 2)}, Sotaro SHIKANO^{1), 2)}, Kazumichi KURODA³⁾, Kenji
YAMAGISHI⁴⁾, Kaori SODA¹⁾, Shu HASHIMOTO^{1),5)}, Yasuhiro GON^{1),2)}

¹⁾日本大学医学部 内科学系呼吸器内科学分野、²⁾日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター

³⁾日本大学医学部 病態病理学系微生物学分野、⁴⁾日本大学工学部 生命応用化学科バイオインフォマ
ティクス研究室、⁵⁾湘南医療大学

[要旨]

LPS 誘導性肺傷害の BALF の EV 内には、IL-1 β 、CCL3、CXCL10、Lcn2 などの炎症性および抗炎症性の RNA 情報が含まれることを示した。これらの情報は、LPS に反応した肺組織の病態生理的変化と相関しており、さらに末梢血中の細胞外小胞内においても、少なくとも一部においては反映されることを明らかにした。気道および末梢血への細胞外小胞の RNA の選択的な分泌は、LPS への生体応答を反映しており、急性肺傷害におけるバイオマーカーとなる可能性を示唆した。

[背景]

敗血症などを原因とする急性呼吸促迫症候群(ARDS)は、急性肺傷害から著名な呼吸不全を引き起こし、高い死亡率を有する予後不良な病態である。¹⁾ 実臨床において、早期に病態を反映したバイオマーカーは存在せず、早急に克服すべき病態の 1 つである。近年、細胞外小胞(Extracellular Vesicle, EV)は、様々な細胞から放出され、体液中に含まれており、内胞されている mRNA や miRNA を介した細胞間遺伝情報伝達への関与が示唆されている。²⁾ 我々はマウス喘息モデルを用いて、肺胞洗浄液中の EV 内の遺伝子発現が喘息病態を反映するバイオマーカーとなる可能性を報告してきた。^{2), 3)} しかし、気道に分泌される EV が急性肺傷害の病態を反映するかどうかは詳細な検証はなされていない。

[目的]

本研究の目的は、マウス急性肺傷害モデルである LPS(Lipopolysaccharide)経気道曝露により気道および血清中に分泌される EV 内の RNA のプロフィールの解析を行い、肺局所の病態への関与を検討することである。

[対象及び方法]

1) LPS 誘導性肺傷害モデル

マウス(C57BL/6J)に LPS (50 μ g/マウス)を経気道曝露し、24 時間後に気管支肺胞洗浄液(BALF)、

血清および肺組織を採取した。

2) EV 抽出、形態観察および数の定量化

ExoQiuck(SBI)を用いて EV を単離した。EV の形態は電子顕微鏡を用いて観察した。EV 数は qNano(IZON)を用いて測定した。

3) 網羅的遺伝子発現解析

単離した EV から RNA を抽出した後、次世代シーケンサー(Ion PGM Sequencer)を用いて RNA 発現解析を行った。また、肺組織の RNA との発現プロファイルと比較した。データ解析は Partek Genomics Suite、CLC Genomics Workbench、Ingenuity Pathways Analysis (IPA)などを用いて行った。

4) 統計学的解析

データは Graphpad Prism Software(La Jolla, CA, USA)を使用し解析した。実験群間における比較には、正規分布を示すデータはスチューデント *t* 検定を用い、非正規分布を示すデータは Mann-Whitney U 検定を用いて評価した。多群間の比較は one-way ANOVA 検定を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。明記している場合を除いて、数値は平均値±標準誤差値で記載した。

[結果]

BALF から 100 nm の膜小胞が得られた。この膜小胞に EV のマーカーである Alix、teg101 が発現していた。LPS 曝露後 EV の数に変化は認められなかった。コントロール群、LPS 曝露群ともに EV 内の RNA の大部分は小さいサイズ(<200 nucleotides)であった。LPS 曝露後の EV 内の RNA 量は増加していた。BALF 中 EV と肺組織で mRNA 発現の相関は認められなかったが、LPS 刺激により有意に変動した遺伝子群については BALF 中 EV と肺組織で mRNA 発現に正の相関がみられた。その遺伝子群には炎症物質である IL-1 β 、MIP-1 β などが認められた(表 1)。また、血清中エクソソーム内の IL-1 β 、CCL3、CXCL10、Lcn2、Nfkb mRNA においては、LPS 曝露マウス群で増加する傾向があった。

Gene Symbol	RNA-Seq FoldChange	Exosome RNA-Seq (read count (average))		Lung Tissue DNA microarray
		PBS	LPS	FoldChange
CCl3	1440.4	0.3	269.4	112.3
CCl4	150.4	1.8	141.1	6.3
Irg1	145.8	1.0	126.5	87.6
CXCl10	143.3	1.1	189.4	14.9
Il1b	80.1	3.3	153.4	26.9
Nfkbia	66.8	3.3	133.7	2.3
Il1m	50.4	4.6	187.6	14.8
CXCl2	31.7	6.2	137.5	23.9
Lcn2	28.6	6.6	174.0	7.2
Mefv	14.4	21.9	501.3	10.1
Cd274	11.5	7.6	125.6	6.2
Fth1	6.0	457.5	1971.5	1.5

表 1 BALF 中 EV で LPS 刺激により発現が変動し、肺組織でも遺伝子が同様の変動を示す遺伝子群

赤字：炎症促進の報告がある遺伝子群、
青地：炎症抑制の報告がある遺伝子群

[考察]

LPS 誘導性肺傷害の BALF の EV 内には、IL-1 β 、CCL3、CXCL10、Lcn2 などの炎症性および抗炎症性の RNA 情報が含まれることを示した。これらの情報は、LPS に反応した肺組織の病態生理的変化と相関しており、また、このような変化は、末梢血中の細胞外小胞内においても、少なくとも一部においては、反映されることを明らかにした。

[結論]

気道および末梢血への細胞外小胞の RNA の選択的な分泌は、LPS への生体応答を反映しており、急性肺障害において診断のために役に立つバイオマーカーの可能性を示唆した。

[参考文献]

- ¹⁾Confalonieri M, Salton F, Fabiano F :Acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir Rev.* 2017; 26: 160116.
- ²⁾Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 654-659.
- ³⁾Gon Y, Maruoka S, Inoue T, Mizumura K, Kuroda K, Fukano Y, Yamagishi K, Tsuboi E, Hashimoto S: Gene expression analysis in airway-secreting extracellular vesicles upon house dust mite exposure. *Allergol Int.* 2016; 65 Suppl: S53-S55.
- ⁴⁾Gon Y, Maruoka S, Inoue T, Kuroda K, Yamagishi K, Kozu Y, Shikano S, Soda K, Lötvall J, Hashimoto S: Selective release of miRNAs via extracellular vesicles is associated with house dust mite allergen-induced airway inflammation. *Clin Exp Allergy.* 2017; 47(12): 1586-1598.