

【目的】

腸間膜リンパ液は小腸からの脂肪、間質から水分、電解質などの吸収、輸送、また免疫細胞の循環などを行い、体内の恒常性を維持する役割を担っている。また、外傷の分野では、出血性ショック後肺障害をはじめとする遠隔臓器障害の発現に、虚血腸管より産生される腸間膜リンパ液が重要な役割を担うことが報告されている。

MicroRNA (miRNA) は蛋白質をコードしていない低分子 RNA の 1 つであり、その塩基配列に対して相補的な標的 mRNA に結合し、その翻訳を抑制することで遺伝子ネットワークを制御している。miRNA は exosome などの miRNA 輸送体を介して細胞外に放出され、体液(血液、尿など)中に存在し、近傍および遠隔の細胞に取り込まれ、そのレシピエント細胞内でも機能することが示唆されている。腸間膜リンパ液中の脂質、蛋白質などの組成は報告されているが、miRNA のプロファイルは明らかにされていない。

今回、正常ラット腸間膜リンパ液中の miRNA (リンパ miRNA) の発現プロファイリングとその生化学的特徴付けを行うとともに、腸間膜リンパ管本幹を介したリンパ miRNA の体内配分解析を行った。

【方法】

Sprague-Dawley 系雄ラット(8~10 週齢)の腸間膜リンパ管よりリンパ液(n=6)を採取し細胞成分を除いた細胞成分フリーリンパ液と同ラットの血漿を用いて、定量的 RT-PCR (realtime PCR) 法に基づく TaqMan Rodent MicroRNA Array により、miRNA の網羅的かつ定量的発現プロファイル比較解析を行った。次に、リンパ miRNA の安定性を調べるために細胞成分フリーリンパ液を室温で 24 時間まで放置し、リンパ miRNA (*miR-145*、*miR-150*) の安定性を realtime PCR にて定量解析した。さらに、リンパ液のどの分画に miRNA が存在するか、超遠心機を用いて各細胞内小器官分画を回収し、リンパ *miR-150* の含有量を realtime PCR にて定量解析した。最後に、腸間膜リンパ管を経由したリンパ miRNA の臓器への取り込みを解析するために、ラット小腸上皮細胞株 IEC-6 にラットで発現していない *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 exosome を作製した。同 exosome をラット腸間膜リンパ管本幹より注入し、30 分後に血液を生食で灌流し、臓器(肺、肝臓、脾臓、腎臓)の摘出を行った。各臓器より RNA 抽出し、realtime PCR にて *cel-miR-238-3p* の取り込み量を定量解析した。

【結果】

アレー解析から、アレーに搭載されている 375 種類の miRNA のうち、正常ラット腸間膜リンパ液に 287 種の miRNA が検出された。そのうち 256 種は血漿にも認められたが、31 種はリンパ液のみに検出された。血漿のみに認められた miRNA は 11 種であった。血漿とリンパ液での発現に有意に差を認めた miRNA は 21 種であり、そのうちリンパ液に有意に高く発現していたものは 19 種であった。

次に、リンパ miRNA の生化学的特徴付けとして安定性を解析したが、リンパ液中の *miR-145*、*miR-150* の発現量は室温放置により、徐々に分解され、24 時間後では放置開始時(0 時間)の 20% 以下に有意に減少した。また、ラット血漿 miRNA も放置開始時の 30% 以下に有意に減少した。さらに、超遠心機を用いて回収した分画(細胞・核、ミトコンドリア・ライゾゾーム

ム、マイクロソーム、細胞基質の各分画)において*miR-150*の含有量を定量解析してみると、細胞・核分画に一番多くの含有を認めるとともに、*exosome*を含むマイクロソーム分画に*miR-150*が検出された。また、細胞基質を含む分画にも*miR-150*が検出された。

最後に、*cel-miR-238-3p*を含有した IEC-6 *exosome*を用いて腸間膜リンパ管本幹を介したリンパ *miRNA* の体内配分解析を行ったが、解析した臓器(肺、肝、脾、腎)全てに *cel-miR-238-3p* が検出され、特に肺組織に最も多く取り込まれた。

【考察】

今回の網羅的発現解析から、ラット腸間膜リンパ液中の *miRNA* 発現プロファイルを初めて明らかにすることができた。検出されたリンパ *miRNA* の多くは、血漿 *miRNA* と共通していたが、有意に発現差異を認めた 21 種の *miRNA* を同定することができた。

リンパ *miRNA* の特徴付けから、リンパ液中の細胞由来の *miRNA* の他に、他の体液と同様に *exosome* (細胞外小胞)に *miRNA* が存在していることが確認された。さらに、リンパ液中の細胞成分フリー *miRNA* として非小胞由来の *miRNA* も存在していることが示唆された。ヒトの血漿 *miRNA* は室温で長時間安定であることが報告されているが、今回のラットリンパ *miRNA* および血漿 *miRNA* は急速には分解されないが、ヒト血漿 *miRNA* より不安定である結果を示しており、種間の相違によるものとも考察されるが、その非安定性の機序、さらには非小胞由来の *miRNA* 結合分子の同定が今後の課題として残された。

今回の腸間膜リンパ管本幹を介した *exosome* 由来のリンパ *miRNA* の体内配分解析から、肺組織はリンパ *miRNA* を取り込む主要な組織であることを明らかにした。ラット尾静脈より *exosome* を注入して体内配分を調べた以前の報告では、*exosome* 由来の *miRNA* は肝臓や脾臓に多く取り込まれ、次いで肺に取り込まれていた。リンパ管経由と静脈経由による *miRNA* の体内配分の違いは、リンパ液中の何らかの成分により *miRNA* を含む *exosome* が影響(凝集など)を受けている可能性や、実験に用いた細胞株の違いによる *exosome* 表面分子の特性の違いによる可能性も推測され、さらなる解析が必要である。腸間膜リンパ管本幹を介したリンパ *miRNA* の肺組織への集積の新知見は、リンパ *miRNA* が肺を構成している細胞に取り込まれ、その遺伝子発現を修飾する可能性を示唆しており、出血性ショック後肺障害発生の病態解明に新たな展開をもたらす可能性を秘めている。今後、出血性ショックモデルラットを用いて、出血性ショック後肺障害におけるリンパ *miRNA* の役割解明に努めたい。