

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10525

研究課題名(和文) 全身麻酔薬作用機序における分子生物学的検討

研究課題名(英文) Molecular biological study on action mechanism of general anesthetics

研究代表者

坂本 篤裕 (Sakamoto, Atsuhiko)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：30196084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：他の遺伝子発現を調整する機能を持つmicroRNA (miRNA)が全身麻酔の種類に伴って如何に発現し、あるいは影響されるかを全身重要臓器において測定比較し、従来測定してきた全身麻酔に伴う体内遺伝子発現ならびにタンパク発現変動や代謝産物変動とどう関連するか、また、種々の臓器障害時における麻酔薬の種類による相違を分子生物学的に検討した。脳発達期における麻酔薬曝露、全身性炎症反応、臓器虚血再灌流等の状態における検討、血液と筋組織内miRNA変動の関連付けから、全身麻酔の機序解明におけるmiRNA発現変動ならびに臓器障害時における全身麻酔薬のmiRNA発現変動に及ぼす影響の基本的データを示した。

研究成果の概要(英文)：The effects of general anesthetics themselves and the effects of general anesthetics at various disease states on the changes of internal gene expression, especially microRNA (miRNA) expression were evaluated. How these effects are related to gene expression (messenger RNA: mRNA), protein expression and metabolites affected by general anesthesia were also evaluated. The results obtained from examinations of several conditions such as anesthetic exposure on newborn rats, ischemia-reperfusion injury, systemic inflammatory response syndrome, provided the basic data of miRNA expression for the mechanism elucidation of the general anesthesia.

研究分野：麻酔科学

キーワード：全身麻酔薬 遺伝子発現 microRNA 虚血再灌流障害 全身炎症性反応 神経発達 日内変動

## 1. 研究開始当初の背景

全身麻酔は半世紀以上にわたって使用されているが、その安全性の確認は臨床的予後や使用経験に基づいたものが主体であり、分子生物学的検討が行われることは少なかった。全身麻酔薬自身が全身重要臓器の既知の遺伝子発現に如何に影響するかを明らかにするため、我々はマイクロアレイ法を用いて、セボフルラン麻酔による全身重要臓器における体内遺伝子変化を国内外ではじめて包括的に測定した (Sakamoto A et al. Gene 356,2005)。主な新知見は、1) 脳内日内変動遺伝子発現が抑制されること、2) 肝臓における薬物代謝関連遺伝子発現に影響すること、3) 肺循環系における血管緊張調整遺伝子発現が体循環系と大きく異なり変化すること等であった。この結果を基に、全身麻酔による遺伝子発現に関する我々の研究の主たる新知見は、1) セボフルラン麻酔中に脳内の6つの時計遺伝子発現が抑制され、そのうちの5遺伝子は覚醒後も長期にわたって抑制されること (Kobayashi K et al. Brain Res. 1185,2007)、2) 静脈麻酔薬であるプロポフォールとデクスメトミジンによる全身麻酔では、その日内変動遺伝子発現変動パターンが1遺伝子以外同様であること (Yoshida Y et al. Brain Res Bull. 79,2009)、3) 肝臓における薬物代謝関連遺伝子は麻酔中のみに発現増強し、数種類の遺伝子は長時間にわたり影響が続き、また、静脈麻酔と吸入麻酔ではその変化パターンが異なること (Nakazato K et al. Biomed Res. 30,2009)、4) 吸入麻酔では肺血管系の収縮・弛緩関連遺伝子が同時に発現してくること (Takemori K et al. Br J Anaesth. 100,2008)、5) プロテオーム解析では、静脈麻酔薬と吸入麻酔薬で大きな違いを認め、また、それぞれの種類によっても影響が異なること (Tsuboko Y et al. Biomed Res. 32, 2011)、6) NMR を用いたメタボローム解析では、吸入麻酔薬に比して、静脈麻酔薬が、麻酔自体による代謝産物への影響が大きく、また、時間経過によりその変化が増加し、その主たる代謝物は、酢酸であった (Kawaguchi H et al. PLoS One. 5,2010) 等であった。

次いで、全身麻酔による遺伝子発現変動について、近年注目され、他の遺伝子発現を調整する機能をもつとされる mmicroRNA (miRNA) 発現の測定から従来の messenger RNA (mRNA) と関連を検討した。主な知見として、1) 麻酔薬の違いにより肝臓における miRNA 変動の変動が異なること (Ishikawa M et al. Anesthesiology 117, 2012)、2) 肺においては、疾患に関連する miRNA 発現が特徴的変動を示し miRNA-146a が最も発現増加を認めた (Tanaka S et al. Biomed Res 33, 2012) 3)

海馬においても麻酔薬の違いにより miRNA 変動の変動が異なること (Hori Y et al. Int J Mol Med 32, 2013)、4) 血液においては、益々医薬の違いも認められ、長期にわたって発現が減少する心筋および骨格筋特異的 miRNA を認める (Takeuchi J et al. Int J Mol Med 34, 2014) 等の知見を得た。

そこで、miRNA が全身麻酔薬の種類によって如何に発現し、また、各種病態下における麻酔薬の影響を確認することが、適切な麻酔法・麻酔薬の選択と共に、臨床麻酔・患者管理を安全に行う指針となり得る新たな課題であると考えた。また、临床上使用可能なサンプルである血液を用いた miRNA 測定の臨床応用についても有意義な検討課題と考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 各種病態下に麻酔薬が及ぼす影響を検討するにあたり、日内変動に及ぼす影響を分子生物学的に検討することを基に、麻酔薬効果を検討できる実験系を確立する。

(2) 麻酔薬の効果について、miRNA の発現変動を中心に分子生物学的に検討を行う。各種病態下での他の遺伝子発現を調整する機能をもつとされる miRNA が全身麻酔に伴って如何に発現し、あるいは影響されるかを脳発達期中枢神経系において測定し検討すると共に、各種病態下における麻酔薬の功罪を分子生物学的に検討する。また、異なる麻酔薬による miRNA 変動の相違を確認し、臨床応用へと結びつける。

(3) 麻酔薬の鎮痛作用と miRNA 発現変動を関連づけるため、中枢神経系に影響する病態である神経障害性疼痛モデルにおける mRNA ならびに miRNA 発現変動を検討する。

(4) 全身麻酔時の血液における miRNA 発現を検討することにより、miRNA 測定の臨床応用検討とともに、先行研究における血液および筋組織における miRNA 関連を利用して近年問題となっているプロポフォール症候群の機序解明につなげる基礎的データを獲得する。

## 3. 研究の方法

(1) 麻酔作用効果を安定して検証できる実験系を確立する。マウス Per2 プロモーター制御下でルシフェラーゼを発現するトランスジェニックラットの視交叉上核 (SCN) を含む脳スライス標本作製し、CCD カメラにて定量的に測定する。SCN 内の領域による違い、麻酔薬投与時期による違いおよび GABA 受容体阻害薬存在下での条件で検討

する。マウス視床下部由来の cell line に luc 遺伝子をトランスフェクションし生物発光をリアルタイムで計測し、麻酔薬の投与の有無で比較検討した。

(2) 全身麻酔により既知の miRNA 発現に影響を及ぼすかを、各種病態下において比較検討する。ラットを対象に生後7日齢にセボフルランを3時間曝露し、8日齢に海馬における miRNA 発現を網羅解析した。生後7週齢に新奇環境下における多動性評価および海馬依存性/非依存性学習記憶機能を解析し、8週齢に海馬における rno-miR-632 の標的遺伝子発現を定量評価し、比較検討した。

lipopolysaccharide (LPS) 投与による全身炎症反応ラットモデルを作成し、4時間セボフルラン麻酔した際のバイタルサインおよび肺における miRNA と mRNA 発現変化を検討し、肺保護効果について検討した。ラットの肝動脈・門脈を60分遮断する肝虚血再灌流モデルにおいて、肝臓酵素測定による障害程度の検討と、肝臓の miRNA 発現を包括的に測定した。さらに虚血前に10分間セボフルランを曝露した効果 (anesthetic preconditioning: APC) と、虚血前に10分間虚血再灌流を行った効果 (ischemic preconditioning: IPC) を比較検討した。ラットの腎動静脈遮断による腎虚血再灌流モデルにおいて、クレアチニン測定による腎障害程度の検討と、セボフルランによる APC と IPC の効果を比較検討した。

(3) 神経障害性疼痛モデルにおける mRNA ならびに miRNA 発現変動を検討する。ラット座骨神経に対する chronic constriction incision (CCI) による神経障害性疼痛モデルを作成し、脳前頭前野での Neuropeptide Y (NPY) や IL-18 の mRNA 発現を測定し、電気痙攣刺激 (electric convulsive stimulation: ECS) による治療効果との関連についても検討した。ラットにオキサリプラチンを連日腹腔内投与することにより神経障害性疼痛を発生させ、腰髄後根神経節 (DRG) における miR-15 と BACE1 を定量測定した。また miR-15b を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを DRG に注入した。さらに、レーザーマイクロダイセクション法を用いて発現の局在を確認する。

(4) 全身麻酔時の血液および骨格筋における miRNA 発現を検討する。吸入麻酔薬のセボフルランと静脈麻酔薬のプロポフォールによる麻酔を6時間行い、血液および下肢骨格筋における既知の miRNA 発現を測定し、組織発現の解離と麻酔薬の違いが及ぼす影響を比較検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 麻酔作用効果を安定して検証できる実験系の確立

吸入麻酔薬による Per2 発現抑制効果の実験系を確立し、知見として、SCN 内の全ての領域に及び、Per2 転写に関わる CLOCK プロモーターへの結合性を低下させ、その効果に GABA 受容体が重要であることを示した。

視交叉上核における日内変動遺伝子発現に及ぼす麻酔作用の分子メカニズムを詳細に検討できる、均一の大量細胞を提供できる cell line を用いた in vitro での実験系を確立し、知見として、培養細胞に対して麻酔効果を得るためには、細胞が神経細胞様の特性を持つことが必要であり、GT1-7:6D3 が最も適していることを示した。

(2) 各種状態・病態下における麻酔薬の miRNA 発現に及ぼす影響

幼若期にセボフルラン曝露を行うと、成長後に不安が増強すると考えられた。麻酔曝露は海馬における 248 中の 20 の miRNA 発現に影響を及ぼし、rnomiR-632 が最も大きく増加することを示した。一方で、標的 mRNA は対照群と同様な発現にとどまり、発現変化は一時的なものと考えられた。

LPS 投与により著名な酸化能・ガス交換能の障害を認めたと、セボフルラン麻酔により有意に障害の程度が改善され、肺における炎症性サイトカイン mRNA の増加も抑制された。また、LPS 投与により発現が増加した miRNA のうち、炎症促進的に働く miR-155 発現が抑制され、炎症抑制に働く miR-let7i の発現増加を示した。

肝臓虚血再灌流により AST/ALT が有意に増加したが、APC および IPC では同等に抑制された。また、多くの肝臓 miRNA の発現変動は APC と IPC で同様な変化がみられ、虚血再灌流障害経路の関連するとされる Akt-GSK-cyclin D1 経路の抑制に働く miR-1、miR-17、miR-133、miR-205 は両群に共通して発現低下しており、保護効果が同じ経路を介する可能性を示唆した。

腎臓虚血再灌流によりクレアチニンは増加したが、APC および IPC により同等に障害が抑制された。また、肝臓虚血再灌流と異なり、腎 miRNA 変動は、APC と IPC では異なるものが多かったが、いずれも細胞死に関わる PTEN-PI3K-Akt 経路を標的として作用する miRNA の変動が示された。

(3) 神経障害性疼痛モデルにおける mRNA ならびに miRNA 発現変動

CCI に伴い thermal allodynia および mechanical hyperalgesia を認め、ECS により thermal allodynia が改善した。前頭前野における NPY 発現は CCI により増強したが、ECS により対照に復した。

IL-18 発現は CCI により増強し ECS にて対照より減少し、神経障害性疼痛および ECS の機序解明の基礎的データが得られた。

オキサリプラチン投与により mechanical allodynia が認められ、同時に DRG における miR-15b の過剰発現と標的である BACE1 の発現抑制を認め、また BACE1 阻害薬の投与は用量依存的に mechanical allodynia を引き起こし、一次感覚神経における miR-15b 発現上昇は BACE1 発現抑制を介してオキサリプラチン誘発性神経障害性疼痛に寄与していることを示した。

(4) 血液における miRNA 発現を検討すると、セボフルラン麻酔とプロポフォール麻酔により、80%以上の miRNA が発現減少するが、血液中に発現する 210 種の miRNA のうち、161 種の発現減少を認めたが、その約 90%の miRNA は麻酔覚醒後短時間でその発現量が回復した。14 日間にわたって発現減少が継続する骨格筋特異的 miRNA が認められたが、プロポフォール麻酔においてより多くの miRNA に認められた。一方、先行研究で認められたような血液と骨格筋に関連した miRNA 変動の麻酔薬による違いは明確ではなかった。異なった麻酔薬の血液・骨格筋における miRNA 変動に及ぼす影響およびプロポフォール症候群の機序解明にむけた基礎的データを示した。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Morita T, Ishikawa M, Sakamoto A.: Identical microRNAs regulate liver protection during anaesthetic and ischemic preconditioning in rats: an animal study. PLoS One, 査読あり, Vol. 10, 2015, e0125866.

doi:10.1371/journal.pone.0125866.

Otsuki T, Ishikawa M, Goto G, Sakamoto A.:

Volatile anesthetic sevoflurane ameliorates endotoxin-induced acute lung injury via microRNA modulation in rats. Biomedical Reports, 査読有り, Vol. 3, 2015, pp.408-412.

Kimura Y, Ishikawa M, Hori Y, Okabe T, Sakamoto A.: Effect of electroconvulsive stimulation on messenger RNA expression in the prefrontal cortex in a rat pain model. Biomedical Reports, 査読あり, Vol.3, 2015, pp.802-806.

Fujimoto Y, Ishikawa M, Nagano M, Sakamoto A.: Influence of neonatal sevoflurane exposure on nerve development-related microRNAs and behavior of rats. Biomedical Research, 査読あり, Vol. 36, 2015, pp.347-355.

doi:10.2220/biomedres.36.347.

Matsuo I, Iijima N, Takumi K, Aikawa S, Anzai M, Ishii H, Sakamoto A., Ozawa H.: Characterization of sevoflurane exposure on Per2 expression using ex vivo bioluminescence imaging of the suprachiasmatic nucleus in transgenic rats. Neuroscience Research, 査読あり, Vol. 107, 2016, pp.30-37.

doi:10.1016/j.neures.2015.11.010.

Iwasaki M, Zhao H, Jaffer T, Unwith S, Benzonana L, Lian Q, Sakamoto A., Ma D.: Volatile anesthetics enhance the metastasis related cellular signaling including CXCR2 ovarian cancer cells, Oncotarget, 査読あり, Vol. 7, 2016, pp.26042-26056.

doi:10.18632/oncotarget.8304.

Nagamoto S, Iijima N, Ishii H, Takumi K, Higo S, Aikawa S, Anzai M, Matsuo I, Nakagawa S, Takashima N, Shigeyoshi Y, Sakamoto A., Ozawa H.: Establishment on an in vitro cell line experimental system for the study of inhalational anesthetic mechanism. Neuroscience Letters, 査読あり, Vol. 620, 2016, pp.163-168.

doi:10.1016/j.neulet.2016.04.005.

Ito N, Sakai A, Miyake N, Maruyama M, Iwasaki H, Miyake K, Okada T, Sakamoto A., Suzuki H.: miR-15b mediates oxaliplatin-induced neuropathic pain through BACE1 down-regulation. British Journal of Pharmacology, 査読あり, Vol. 174, 2017, pp.386-395. doi:10.1111/bph.13698.

〔学会発表〕(計 7 件)

森田智教 石川真士 坂本篤裕、肝臓虚血再灌流モデルにおけるセボフルランプレコンディショニングと虚血プレコンディショニングの microRNA 発現変化の比較、第 62 回日本麻酔科学会学術集会、2015 年 5 月 28 日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

木村祐輔 保利陽子 石川真士 坂本篤裕、神経因性障害モデルラットに対する前頭野の messengerRNA 変化の検討、第 62 回日本麻酔科学会学術集会、2015 年 5 月 29 日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

伊藤直美 坂井敦 鈴木秀典 坂本篤裕、オキサリプラチン誘発性神経障害性疼痛における後根神経節でのマイクロ RNA の発現変動、第 62 回日本麻酔科学会学術集会、2015 年 5 月 29 日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

藤本彩子 永野昌俊 石川真士 坂本篤裕、ラット幼若期セボフルラン曝露が発達段階の海馬 microRNA 発現変化へ及ぼす影響、第 62 回日本麻酔科学会学術集会、2015 年 5 月 29 日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

Fujimoto S Nagano M Ishikawa M  
Sakamoto A

Influence of neonatal sevoflurane  
exposure on nerve development-related  
microRNAs and behavior of rats、Annual  
Meeting of American Society of  
Anesthesiologists 2015、2015 年 10 月 26  
日、San Diego, California (USA)

黒木直美 坂本篤裕、一次感覚神経節  
miR-15b のオキサリプラチン誘発性神経障  
害疼痛における解析、第 63 回日本麻酔科学  
会学術集会、2016 年 5 月 27 日、神戸ポ  
ートピアホテル(福岡県福岡市)

永本盛嗣 坂本篤裕、吸入麻酔薬作用機構  
の研究のための cell line を用いた in vitro  
実験系の確立、第 63 回日本麻酔科学会学術  
集会、2016 年 5 月 27 日、神戸ポートピ  
アホテル(福岡県福岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://nms-anesthesiology.jp>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

坂本 篤裕 (SAKAMOTO, Atsuhiro)  
日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：3 0 1 9 6 0 8 4

### (2)研究分担者 無

### (3) 連携研究者 無

### (4) 研究協力者

森田 智教 (日本医科大学大学院生)  
大槻 達郎 (日本医科大学大学院生)  
木村 祐輔 (日本医科大学大学院生)  
藤本 彩子 (日本医科大学大学院生)  
松尾 いずみ (日本医科大学大学院生)  
永本 盛嗣 (日本医科大学大学院生)  
岩崎 雅江 (日本医科大学大学院生)  
伊藤 直美 (日本医科大学大学院生)