

令和元年5月21日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16745

研究課題名(和文)デクスメトミジンによる心筋保護効果をもたらすmicroRNAの探索

研究課題名(英文)Identification of miRNA in Dexmedetomidine-Induced Cardioprotection

研究代表者

吉川 裕介 (Yoshikawa, Yusuke)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40721759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：DEX投与後のmRNAとmiRNAの発現変化を、ラット心筋を用いて網羅的に解析した。さらに、バイオインフォマティクス解析により、DEXによる心保護作用の鍵となりうるパスウェイを探索した。165のmRNAと6のmiRNAがDEX投与により発現変動した。発現変化した全mRNAに対するバイオインフォマティクス解析の結果、MAPキナーゼチロシンスレオニンフォスファターゼ活性などのGO termやp53などのパスウェイが候補としてあげられたが、miRNAのターゲットmRNAでは有意なパスウェイはなかった。DEXの心保護に関するmiRNAは同定できなかったが、いくつかのパスウェイが候補としてあげられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血性心疾患は現代社会において、成人死亡原因の多くを占める疾患であり、その制御戦略の確立が重要であることに疑いの余地はない。デクスメトミジン(DEX)は日常臨床では手術麻酔時の鎮静薬や、集中治療室での鎮静薬として、日常的に広く使用されている薬剤である。したがって、DEXの心保護作用について解明することは、急性期医療において虚血性心疾患の予後を改善することにつながるため、重要である。本研究により、新規の新たなDEXの心保護における機序が推定された。今後更なる研究を行うことにより、虚血性心疾患の予後を改善するきっかけとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We studied differentially expressed mRNAs and miRNAs after DEX administration in rat hearts by comprehensive analysis. Additionally, bioinformatics analysis was applied to explore candidate genes and pathways that might play important roles in DEX-induced cardioprotection. The results of microarray analysis showed that 165 mRNAs and 6 miRNAs were differentially expressed after DEX administration. Through bioinformatics analysis using differentially expressed mRNAs, gene ontology (GO) terms including MAP kinase tyrosine/serine/threonine phosphatase activity and pathways including the p53 pathway were significantly enriched in the down-regulated mRNAs. On the other hand, no significant pathway was found in the target mRNAs of deregulated miRNAs. The results indicated some possible key genes and pathways that seem to be of significance in DEX-induced cardioprotection, although miRNAs seem to be unlikely to contribute to cardioprotection induced by DEX.

研究分野：麻酔科学

キーワード：デクスメトミジン 虚血再灌流障害 心保護

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心臓における虚血再灌流障害 (IRI) は周術期を通して様々な状況で生じるため、IRI に対する臓器保護戦略の構築は重要である。デクスデメトミジン (DEX) は 2 アドレナリン受容体作動薬であり、鎮静薬として周術期に広く用いられているが、DEX には鎮静作用の他にも IRI に対する臓器保護作用があることが近年報告されている。機序としてはない内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) や mitogen-activated protein kinase (MAPK) の関与が現在までに報告されているが、その詳細については明らかとなっていない。

マイクロ RNA (miRNA) は 21-23 塩基程度のタンパク質をコードしない短い RNA であるが、近年では miRNA は吸入麻酔薬によるプレコンディショニング作用や虚血プレコンディショニング作用などの臓器保護効果に密接に関与していることが報告されているが、DEX による新保護効果と miRNA との関連については未知である。

2. 研究の目的

本研究では、ラットの心臓を用いて、DEX の投与により発現変動する mRNA と miRNA を網羅的に解析し、バイオインフォマティクス解析を用いて、DEX による心保護効果の機序となりうる遺伝子やパスウェイを提唱する。

3. 研究の方法

(1) 動物

オスの Wistar ラット (250-350 g) を用いた。

(2) in-vivo 心臓 IRI モデル

ラットをセボフルラン、ブトルファノールで麻酔したのちに、気管挿管を行い、人工呼吸管理とした。左第 4 肋間を開胸し、左前下行枝を 25 分間結紮し、その後 60 分間再灌流した。

(3) 実験プロトコール

in vivo における DEX の心保護効果を検証するために実験 1 を行なった。ラットをコントロール群と DEX 群に分け (各群 n=7)、DEX あるいは生理食塩水を 30 分間経静脈的に持続投与したのちに IRI を行い、再灌流終了後に心臓を摘出した。

次に、DEX による mRNA と miRNA の発現変化を検証するために実験 2 を行った。ラットをコントロール群と DEX 群に分け (各群 n=5)、DEX あるいは生理食塩水を 30 分間経静脈的に持続投与したのちに心臓を摘出した。

(4) 心筋梗塞サイズ (IS) 測定

実験 1 で採取した摘出心筋を用いて、TTC 染色により IS を測定した。

(5) total RNA 抽出

実験 2 で採取した摘出心筋を用いて、左室前壁心筋から small RNA を含む total RNA を抽出した。

(6) mRNA, miRNA マイクロアレイ

(5) で抽出した total RNA を用いて、3D-Gene Rat Oligo chip 20K, 3D-Gene Rat miRNA Oligo chip (東レ) を使用して、mRNA、miRNA それぞれにおいてマイクロアレイ実験を行った。P < 0.05、発現変動比 > 1.5 の遺伝子を有意とみなした。

(7) miRNA のターゲット遺伝子

はじめに、miRWalk2.0 を用いて、有意に変動した miRNA のターゲット遺伝子候補を推定した。そして、推定されたターゲット遺伝子と mRNA マイクロアレイ実験結果とを照合し、さらに発現変化した miRNA と逆相関にある遺伝子を、最終的なターゲット遺伝子とした。

(8) GO, KEGG パスウェイ解析

発現変動した遺伝子に対して、DAVID6.8 オンラインツールを用いて、GO と KEGG パスウェイ解析を行った。

(9) PPI ネットワーク

発現変化した遺伝子のコードするタンパク質間の相互作用を検証するために、STRING Ver.10.5 を用いて、PPI ネットワークを構築した。構築されたネットワークは Cytoscape3.7.0 を用いて可視化した。

(10) miRNA/mRNA 統合解析

発現変動した miRNA とそのターゲット遺伝子の相互作用を Cytoscape3.7.0 を用いて可視化した。

(11) qRT-PCR

マイクロアレイ実験結果の確認として、一部の遺伝子について qRT-PCR を行い、結果の確認を行った。

4. 研究成果

(1) DEX はラットにおける in vivo 心臓 IRI を軽減した

虚血前 30 分間の DEX 投与は IS を有意に減少させた (コントロール群: 57% ± 3%, DEX 群: 28% ± 5%, p = 0.0002)。

(2) DEX 投与による mRNA, miRNA それぞれにおける発現変化

DEX 投与により、165 個の mRNA (発現増加: 14, 発現低下: 151) の発現変動が観察された。一方、miRNA に関しては 6 個の miRNA (発現増加: 3, 発現低下: 3) の発現変化が観察された。

(3) miRNA のターゲット遺伝子の同定

3つの発現増加したmiRNAに対するターゲット遺伝子として2078の遺伝子が、3つの発現低下したmiRNAに対するターゲット遺伝子として1671の遺伝子が候補として選出された。このうちmiRNAの発現変動と逆相関を呈する遺伝子を選択することにより、最終的に発現増加したmiRNAに対する19のターゲット遺伝子が、発現低下したmiRNAに対してはただ1つのターゲット遺伝子が同定された。

(4) 発現変動遺伝子 (mRNA) におけるGO, KEGGパスウェイ, PPIネットワーク解析

発現増加したmRNAにおいて、リボソーム機能に関するGOが検出され、KEGGパスウェイではRibosomeのみが有意に検出された。PPIネットワーク解析ではリボソームタンパクのみが選択された。

一方で、発現低下したmRNAにおいては、タンパク質のリン酸化やプロテインキナーゼの活性化、セリンスレオニンキナーゼの活性化、MAPKフォスファターゼの活性化など、多種のGOが検出され、KEGGパスウェイにおいては、心保護に関する報告されているp53 signaling pathwayが検出された。PPIネットワーク解析では、4つのハブ遺伝子が検出され、そのうちのひとつであるAtmはp53 signaling pathwayに関与する遺伝子であった。

(5) 発現変動miRNAとターゲット遺伝子におけるGO, KEGGパスウェイ, PPIネットワーク解析, miRNA/mRNA統合解析

3つの発現増加したmiRNAに対する19のターゲット遺伝子における解析では、細胞死やプロテインキナーゼの活性化に関するGOが検出されたが、KEGGパスウェイにおいては有意なパスウェイは検出されなかった。PPI解析では1つの相互作用が検出されるにとどまり、miRNA/mRNA統合解析では、2つのmRNAのみが、複数のmiRNAから制御されていた。

3つの発現低下したmiRNAのターゲット遺伝子は1つのみであったので、さらなる解析は行わなかった。

(6) qRT-PCR

マイクロアレイ実験結果の検証として、MAPKを脱リン酸化するフォスファターゼであるDusp1に対してqRT-PCRを行った。DEXはDusp1の発現レベルを有意に減少させた (Control群: 1.00 ± 0.13 , DEX群: 0.40 ± 0.06 , $p = 0.0031$)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoshikawa Y, Hirata N, Terada H, Sawashita Y, Yamakage M. Identification of Candidate Genes and Pathways in Dexmedetomidine-Induced Cardioprotection in the Rat Heart by Bioinformatics Analysis. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr 1;20(7). pii: E1614. doi: 10.3390/ijms20071614.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。