

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592318

研究課題名(和文) 体内遺伝子発現変動からみた全身麻酔の機序解明

研究課題名(英文) Mechanism elucidation of the general anesthesia from a view point of the changes in the internal gene expression

研究代表者

坂本 篤裕 (SAKAMOTO, Atsuhiko)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30196084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：全身麻酔あるいは中枢神経系の病態変化により、重要臓器におけるmicroRNA (miRNA)発現に影響を及ぼすかをTaqMan Low-density Array (TLDA)分析を主に検討した。麻酔により各臓器(肺、肝、海馬、脊髄、血液)におけるmiRNA発現に影響を及ぼすこと、麻酔薬の違いによりその発現変化に相違があること、および中枢神経系の病態変化によりmiRNA発現変動が起こることを明らかにし、全身麻酔の機序解明におけるmiRNA発現変動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 on the changes of internal gene expression, especially microRNA (miRNA) expression were evaluated mainly by TaqMan Low-density Array (TLDA) analysis. The main results are as follows. (1) The general anesthetics affect miRNA expression in the vital organs (lung, liver, blood, brain and supine). (2) The different anesthetics show the different influence on miRNA expression. (3) The pathologic changes of the central nervous system influence the expression of some miRNAs. These results provide 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 遺伝子発現 microRNA TLDA 吸入麻酔薬 静脈麻酔薬

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

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。通常の臨床指標にはあらわれてこない麻酔薬による細胞・組織への影響を包括的かつ詳細に検討することは、患者管理をより安全に行うための指針になり得ると考え、また、未だ詳細が不明な全身麻酔の機序を明らかにする一助になり得ると考えた。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. Influence of inhalation anesthesia assessed by comprehensive gene expression profiling. *Gene* 356:39-48, 2005) ラットの7つの重要臓器において、既知の約10,000遺伝子のうち、1.5%に有意な変化を見いだした。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、realtime RT-PCRを用いて各全身麻酔薬暴露による経時的变化および暴露中止後の遺伝子発現変化を詳細に検討した。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間にわたって抑制されること(Kobayashi K et al. Circadian gene expression is suppressed during sevoflurane anesthesia and the suppression persists after awakening. *Brain Res.* 1185:1-7, 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. The influences of propofol and dexmedetomidine on circadian gene expression in rat brain. *Brain Res Bull.* 79:441-4, 2009)、3) 肝臓における薬物代謝関連遺伝子のほとんどは麻酔中のみ発現増強するものの、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. Expressions of genes encoding drug-metabolizing enzymes are altered after sevoflurane, isoflurane, propofol or dexmedetomidine anesthesia. *Biomed Res.* 30:17-24, 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. Expression of pulmonary vasoactive factors after sevoflurane anaesthesia in rats: a quantitative real-time polymerase chain reaction study. *Br J Anaesth.* 100:190-4, 2008) 等であった。特に全身麻酔機序解明との関連を重視し、genomicsのみでなく、proteomics および metabolomics も駆使し、全身麻酔による分子生物学的影響を検討した。プロテオーム解析による蛋白発現分析では、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若干影響が異なることを解明した

(Tsuboko Y et al. Propofol anesthesia alters the cerebral proteome differently from sevoflurane anesthesia. *Biomed Res.* 32: 55-65, 2011)。また、NMRを用いたメタボローム解析では、吸入麻酔薬であるイソフルランに比して、静脈麻酔薬のプロポフォールが、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、脳内で鎮痛作用を増強するとされる酢酸であった(Kawaguchi H et al. Pattern recognition analysis of proton nuclear magnetic resonance spectra of brain tissue extracts from rats anesthetized with propofol or isoflurane. *PLoS One.* 5:e11172, 2010)。

以上の結果から、全身麻酔に伴う分子生物学的変動を包括的に検討してきたが、遺伝子同士の相互作用、遺伝子発現から蛋白発現さらには代謝物変動へとの一連の関連性が見いだせないままであり、この二つのテーマが次の課題となった。今回はまず、全身麻酔による遺伝子発現変動についてその相互作用をより関連づけることを取り上げ、近年注目されてきたmicroRNA (miRNA) 発現の測定から従来の messenger RNA (mRNA) と関連づけることを目的とした。

2. 研究の目的

(1) 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全身重要臓器、特に中枢神経系において包括的に測定し、従来測定してきた全身麻酔に伴う体内遺伝子発現変化 (mRNA) とどう関連するかを検討する。

また、異なった麻酔薬による miRNA 変動の相違と覚醒後の影響持続を確認する。

(2) 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 miRNA 発現変動を検討する。

3. 研究の方法

(1) 全身麻酔により既知の miRNA 発現に影響を及ぼすかを、麻酔薬別、部位別 (肝臓、肺、脊髄、海馬、血液) に検討する。Wistar 系ラットを対象に、対照群と麻酔群に分類する。セボフルラン吸入麻酔は 2MAC 濃度を、プロポフォール静脈麻酔は $2 \times ED_{50}$ 投与量を基準に、過去の我々の投与基準 (Nakazato K et al. Expressions of genes encoding drug-metabolizing enzymes are altered after sevoflurane, isoflurane, propofol or dexmedetomidine anesthesia. Biomed Res. 30:17-24, 2009) に基づいて全身麻酔を行う。麻酔時間は 6 時間とし、麻酔前、麻酔 6 時間後、覚醒 6 時間後でサンプルを摘出する。(測定装置及び方法) mRNA 遺伝子変動は、リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems 7900HT realtime PCR system) を用いて、mRNA 遺伝子プロファイリングを行う。miRNA 遺伝子発現は、包括的に TaqMan Low Density Array (TLDA) を用いて、miRNA プロファイリングを行う。一連の操作は従来の realtime RT-PCR と基本的に同様であり、検出量の少ないことが予想される miRNA 専用の増幅反応を追加し行う。実際には、得られたサンプルを液体窒素下に粉碎し、組織と細胞からの miRNA を回収 (mirVana miRNA Isolation kit) し、miRNA の逆転写 (TaqMan miRNA RT Kit) およびプレアンプリフィケーションを行い (Megaplex RT primers Pools)、約 700 の既知 miRNA のアレーキット (TaqMan Rodent MicroRNA A and B Arrays) を用いて半定量し、遺伝子プロファイリングを行う。(結果解析と検討) 得られた miRNA 遺伝子プロファイリングから、発現が大きく変化したものおよび、部位別の発現変化において、従来測定してきた RNA 発現変化と関連の認められるものを、ピックアップする。

(2) 脊髄及び海馬における遺伝子発現変

動を上記研究の方法 (1) と同様な方法で mRNA、miRNA の測定ならびにプロファイリングを行う。疼痛モデルとして、座骨神経を緩く結紮して神経障害性疼痛を引き起こす chronic constriction injury (CCI) と、足底に complete Freund's adjuvant (CFA) を注入して炎症性疼痛を引き起こすモデルを用いて、比較検討する。

4. 研究成果

(1) 全身麻酔の体内 miRNA 発現に及ぼす影響

- ① 肝臓における miRNA 発現を検討すると、セボフルラン麻酔により対照群に比して、16 種が発現増加し、11 種が発現減少した。一方、プロポフォール麻酔では、31 種が増加し、8 種が減少した。20 種が両麻酔薬で同様の变化であったが、3 種は発現変動が異なり、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を示した。
- ② 異なった濃度 (2% と 4%) のセボフルラン麻酔でも肺における miRNA 発現に関しては、同様な特徴的変動を示した。変動した miRNA には、喘息や肺線維症、肺高血圧に関連するとされるものが含まれ、特に LPS による肺障害を改善するとする miRNA-146a が最も発現増加を認めた。
- ③ 海馬における miRNA 発現を検討すると、セボフルラン麻酔により対照群に比して、4 種が発現増加し、12 種が発現減少した。一方、プロポフォール麻酔では、11 種が増加した。1 種が両麻酔薬で同様の变化であったが、14 種は発現変動が異なり、麻酔薬の違いにより海馬における miRNA 変動の変動が異なることを示した。
- ④ 血液における miRNA 発現を検討すると、セボフルラン麻酔により、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 92% にあたる 148 種の miRNA は麻酔覚醒後短時間でその発現量が回復した。一方で、4 種の心筋および骨格筋特異的 miRNA が 14 日間にわたって発現減少が継続した。

(2) 疼痛障害による中枢神経系変動に伴う miRNA の変動

座骨神経結紮による chronic constriction injury (CCI) による脊髄後角における miRNA 発現変動を検討すると、対照に比して 111 種の miRNA が変動を示し、36 種は神経系腫瘍の増殖あるいは神経変性疾患の進展に関与する miRNA であった。また、神経因性疼痛に関与されると報告されている miRNA-500、-221、-21 を含んでいた。

CCIによる海馬におけるmiRNA発現変動を検討すると、海馬で発現した237種のうち、対照群に比して51種が発現変動を認めた。疼痛メカニズムに重要とされるmiRNA-125bは7日目に減少した後、14日目には増加し、miRNA-132は減少し続けた。疼痛メカニズムに関与するとされる10種のmRNA変動は、miRNA変動に付随して変動を示した。

CCIと同様な臨床上の慢性疼痛を示す足底部炎症性障害モデル(CFA足底部注入)を用いて、海馬におけるmiRNA発現変動の相違を検討すると、両群で同様な疼痛行動を示した。一方、miRNA発現変動において、CCIラットでは、対照群に比して54種が発現変動を示し、7種は発現が減少していた。CFA注入ラットでは、対照群に比して、40種のmiRNA発現変動を認め、25種では発現減少を示した。20種では2群で同様な変動を認めたが、他ではその発現変動が異なっていた。

(3) 全身麻酔に最も影響を受けたmiRNAの順番にそのmiRNA発現レンチウイルス粒子とantisense miRNA発現レンチウイルス粒子を用いて、全身麻酔下に投与し、麻酔作用への影響を測定する予定であったが、中枢神経系に選択的に到達可能なウイルス粒子が存在せず、また、現時点では作成不能であり、新たな検討課題とした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計8件)

- ① Ishikawa M, Tanaka S, Arai M, Genda Y, Sakamoto A.: Differences in microRNA changes of healthy rat liver between sevoflurane and propofol anesthesia. *Anesthesiology*, 査読あり, Vol. 117, 2012, pp. 1245-1252. doi:10.1097/ALN.0b013e3182746676
- ② Tanaka S, Ishikawa M, Arai M, Genda Y, Sakamoto A.: Changes in microRNA expression in rat lungs caused by sevoflurane anesthesia: a TaqMan low-density array study. *Biomedical Research*, 査読有り, Vol. 33, 2012, pp. 256-263.
- ③ Genda Y, Arai M, Ishikawa M, Tanaka S, Okabe T, Sakamoto A.: microRNA changes in the dorsal horn of the spinal cord of rats with chronic constriction injury: A TaqMan low density array study. *International Journal of Molecular Medicine*, 査読あり, Vol. 31, 2012, pp. 129-137. doi:10.3892/ijmm.2012.1163
- ④ Arai M, Genda Y, Ishikawa M, Tanaka S, Okabe T, Sakamoto A.: The miRNA and mRNA changes in rat hippocampi after chronic constriction injury. *Pain Medicine*, 査読あり, Vol. 14, 2013, pp. 720-729. doi:10.1111-pme.12066
- ⑤ Hori Y, Goto G, Arai-Iwasaki M,

Sakamoto A.: Differential expression of rat hippocampi microRNA in two rat models of chronic pain. *International Journal of Molecular Medicine*, 査読あり, Vol. 32, 2013, pp. 1287-1292. doi:10.3892/ijmm.2013.1504

- ⑥ Mori K, Iijima N, Higo S, Aikawa S, Matsuo I, Takumi K, Sakamoto A, Ozawa H.: Epigenetic suppression of mouse Per2 expression in the suprachiasmatic nucleus by the inhalation anesthetic, sevoflurane. *PLoS One*, 査読あり, Vol. 9, 2013, e87319. doi:10.1371/journal.pone0087319
- ⑦ Goto G, Hori Y, Ishikawa M, Tanaka S, Sakamoto A.: Changes in the gene expression levels of microRNAs in the rat hippocampus by sevoflurane and propofol anesthesia. *Molecular Medicine Reports*, 査読あり, Vol. 9, 2014, pp. 1715-1722. doi:10.3892/mmr.2014.2038
- ⑧ Takeuchi J, Sakamoto A, Takizawa T.: Sevoflurane anesthesia persistently downregulates muscle-specific microRNAs in rat plasma. *International Journal of Molecular Medicine*, 査読あり, Vol. 34, 2014, pp. 291-298. doi:10.3892/ijmm.2014.1739

〔学会発表〕 (計11件)

- ① 源田雄紀 他、Chronic constriction injury rat 脊髄後角のmicroRNA変化の検討-TaqMan Low Density Arrayを用いたmicroRNA網羅解析、第59回日本麻酔科学会学術集会、2012年6月7日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)
- ② 石川真士 他、ラット肝臓microRNA発現に対するセボフルラン、プロポフォールの影響、第59回日本麻酔科学会学術集会、2012年6月7日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)
- ③ 田中俊輔 他、Changes in microRNA expression in rat lungs by sevoflurane anesthesia、第59回日本麻酔科学会学術集会、2012年6月7日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)
- ④ Goto G et al., Changes in gene expression on rats hippocampus、Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2012、2012年10月14日、Washington DC (USA)
- ⑤ Hori Y, et al., Differential expression of hippocampi microRNAs in rat chronic pain models、Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2012、2012年10月13日、Washington DC (USA)
- ⑥ Mori K, et al., Epigenetic regulation of Period2 expression in the mouse suprachiasmatic nucleus by sevoflurane、Annual Meeting of American Society of

- Anesthesiologists 2013、2013年10月12日、San Francisco (USA)
- ⑦ Otsuki T, et al., Sevoflurane ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury and changes microRNA expression, Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2013、2013年10月15日、San Francisco (USA)
- ⑧ Takeuchi J et al., Sevoflurane anesthesia downregulates circulation muscle-derived miRNA, Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2013、2013年10月15日、San Francisco (USA)
- ⑨ Morita T et al., Common microRNAs regulate liver protection of anesthetic and ischemic preconditioning, Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2014、2014年10月13日、New Orleans (USA)
- ⑩ Kimura Y et al., Changes of messenger RNA expression in the prefrontal cortex of pain model rats by electroconvulsive stimulation, Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2014、2014年10月11日、New Orleans (USA)
- ⑪ 大槻達郎 他、ラット急性肺障害モデルにおける麻酔薬の作用と microRNA の発現変化、日本麻酔科学会第 61 回学術集会、2014 年 5 月 15 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

〔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：30196084