

令和元年6月11日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10976

研究課題名(和文) 全身麻酔薬による臓器保護作用に関与するマイクロRNAおよびその標的遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of microRNA and their target genes related to organ protection by general anesthetics

研究代表者

片山 浩(Hiroshi, Katayama)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：90161067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では麻酔薬による臓器保護作用に関与するマイクロRNA(miRNA)を見出すことを目的に研究を行った。ラット腎虚血再灌流(IR)モデルから採取した腎を対照群と比較、有意な発現増加・減少を認めたmiRNAを見出し(miR-122-5p)、リアルタイムRT-PCR法、データベース検索よりそのターゲットとしてSLC7A1、RhoAが推測された。これによりSLC7A1やRhoA-ROCK系がIR傷害の機序に関わっていることが強く示唆された。またこれらの発現変動はセボフルランを付加した群において抑制されることが明らかとなり、麻酔薬による腎IR傷害抑制メカニズムの一端を解明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラット虚血再灌流モデルから採取した腎を用い虚血再灌流傷害に関与するマイクロRNAを見出し、リアルタイムRT-PCR法、データベース検索により腎虚血再灌流傷害の機序を解明した。これらの発現変動は吸入麻酔薬セボフルランを付加した群において抑制されており、麻酔薬が腎虚血再灌流傷害に対して保護的に作用するメカニズムを解明できた。

研究成果の概要(英文)：The aim of our study was identification of micro RNA (miRNA) relating to this organ protective effects of anesthetics. We tried to identify miRNA involved in organ injury using rat renal ischemia-reperfusion injury model. With microarray analysis and real-time PCR, we found that miR-122-5p, SLC7A1 and RhoA are involved in ischemia-reperfusion injury in rat kidney. We also found that inhalational anesthetics sevoflurane inhibits the expression of miR-122-5p and SLC7A1, suggesting sevoflurane has the protective effects on the renal ischemia-reperfusion injury.

研究分野：麻酔科学

キーワード：虚血再灌流傷害 マイクロRNA 麻酔薬 臓器保護作用

1. 研究開始当初の背景

1997年、心筋虚血再灌流前にイソフルラン等の吸入麻酔薬を投与しておくことにより心筋の梗塞サイズが有意に減少し、当時すでに知られていた ischemic preconditioning と同様の心筋保護作用が認められることが示された。吸入麻酔薬による臓器保護作用は、腎虚血再灌流による腎障害モデル、中大脳動脈閉塞あるいは総頸動脈閉塞と低酸素による脳傷害モデル等でも報告され、さらに、肝動脈および門脈を遮断した肝切除術患者へのセボフルラン投与により術後の有害事象発生が抑制された、肺切除術時の術側無気肺に見られる炎症性肺傷害がセボフルラン麻酔患者では抑制された、など、臨床においてもその効果が観察されている。一方、これら吸入麻酔薬による薬理的プレコンディショニングあるいはポストコンディショニング効果と同様、プロポフォール等の静脈麻酔薬による臓器保護作用も示唆されている。したがって、患者の臓器保護を目的とした全身麻酔薬の選択が可能となるなど、その有用性が評価されつつある。その作用機序としては、情報伝達系としてアデノシン A1 受容体や プロテインキナーゼ C(PKC)、三量体 GTP 結合タンパク質 Gi の関与やある種の活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)の関与、そしてミトコンドリアおよび細胞膜 KATP チャンネルの関与などが考えられているが、現在までのところ不明な点が多い。特に、セボフルランのわずか 10 分間処置の効果が一年以上有効性を示すなど、長期予後改善のメカニズムについては、ほとんど研究されていないのが現状である。

マイクロ RNA(miRNA)は約 22~23 塩基長の non-coding RNA であり、その存在が知られていた当初はいわゆる“junk”RNA と考えられており、生理的機能は有していないものと考えられていた。しかしながら最近になって、このごく小さな miRNA が、標的遺伝子 mRNA の 3'非翻訳領域(3'UTR)に相互作用してその遺伝子の翻訳を阻害することが見いだされ、新たなタンパク質発現制御因子として、現在多くの研究者に注目されている。さらに最近になって、細胞内でのみ機能すると考えられていたこの miRNA が、エキソソームと呼ばれる膜構造体に封入されて細胞外に分泌され他の細胞の機能を調節するといった細胞間情報伝達に寄与していることが証明されつつある。また、がん患者の血中エキソソームに含まれる miRNA のプロファイリングは健常者と大きな違いが認められるなど、各種疾患の新たなマーカーとして診断や治療への応用に血清 miRNA が注目され始めている。一方、まだまだ研究は始まったばかりであるが、虚血心筋細胞においてある種の miRNA の発現増加が認められ、また血清エキソソーム miRNA が心筋梗塞のマーカーになる可能性など、心筋虚血再灌流傷害における miRNA の関与が示唆されてきた。さらに興味深いことに、ischemic postconditioning 効果における miRNA の関与も示唆されてきている。この miRNA による細胞機能の制御は、エピジェネティック変化と同様、比較的長期間にわたりその効果が持続するものと考えられている。

以上の背景より、全身麻酔薬による臓器保護効果にもこの miRNA が重要な役割を担っており、上述した臨床における長期予後の改善について miRNA の発現変動で説明できるのではないかと考え、本研究計画の着想に至った。

2. 研究の目的

近年、ある種の全身麻酔薬による薬理的プレコンディショニングあるいはポストコンディショニング効果が報告され、麻酔薬による臓器保護作用が認知されつつある。しかし、そのメカニズムについては不明な点が多いのが現状である。一方、これまではその存在意義が不明であったマイクロ RNA (miRNA)が、標的遺伝子の翻訳を制御することにより、多彩な生理反応、病態生理に寄与していることが明らかにされつつある。本研究計画ではこの miRNA に着目して、麻酔薬がもたらす臓器保護作用に関与する miRNA を同定する。さらに、同定した miRNA のターゲット遺伝子を明らかにして、新たな側面から全身麻酔薬による臓器保護作用のメカニズムに迫る。

3. 研究の方法

雄性 Wistar ラットを 3 群(対照(C)群、虚血再灌流(IR)群、セボフルラン(S)群)に分けた。pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) 麻酔下、気管切開、人工呼吸 (一回換気量 8 mL/kg、70 回/min) を行い vecuronium (1 mg/kg/hr, i.v.) にて不動化させ、動脈血圧および動脈血液ガスのモニタリング下、腎動静脈をクランプすることにより両腎を同時に 30 分間虚血状態にした。その後クランプを解放して血流を確認し、両腎を 60 分間再灌流して腎 IR 傷害モデルを作製した。再灌流終了後に両腎を摘出し、一方は RNA later 液中に保存、もう一方は凍結保存した。C 群は開腹操作のみを行った。また S 群は IR 群を同様のプロトコルだが気管切開後の全行程で 2%セボフルランを付加した。

4 . 研究成果

3 群から得られた腎組織を用い、タンパク質サンプルおよび small RNA を含む total RNA サンプルを調製し、解析に用いた。まず、Western blot 解析を用い腎障害マーカーとして知られている LCN2 の測定を行ったところ、IR 群の腎組織において LCN2 発現の有意な増加が認められ、本虚血再灌流モデルにおいて腎障害が引き起こされている可能性が示唆された。次に miRNA マイクロアレイ解析を行ったところ、12 分子種の miRNAs について興味深い発現変動が認められた。この 12 分子種の miRNAs について、IR 群において 4 分子種の発現低下が認められ、そのうちの 1 分子種について S 群におけるリバースが確認できた。

一方、IR 群において 8 分子種の発現増加が認められ、そのうちの 4 分子種について S 群におけるリバースが確認できた。

これら miRNA 分子種のうち、特に著しい発現増加の認められた miR-122-5p に着目して検討を行った。リアルタイム RT-PCR 法を用いて検討を行ったところ IR 群で miR-122-5p の有意な発現増加が確認でき、TarBase 等のデータベース検索よりそのターゲットとして SLC7A1 が推測された。実際に、IR 群の腎組織において SLC7A1 タンパク質発現の有意な低下が認められ、miR-122-5p 発現増加による SLC7A1 発現低下が腎 IR 傷害に参与している可能性が示唆された。

さらに、IR 群で認められたこれら miR-122-5p および SLC7A1 の発現変動は S 群において抑制されることが明らかとなり、セボフルランによる腎 IR 傷害抑制メカニズムの一端を解明することができた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1) Ochi N, Wakabayashi T, Urakami A, Yamatsuji T, Ikemoto N, Nagasaki Y, Nakagawa N, Honda Y, Nakanishi H, Yamane H, Monobe Y, Akisada T, Katayama H, Naomoto Y, Takigawa N. Descending necrotizing mediastinitis in a healthy young adult. Ther Clin Risk Manag. 2018 Oct 17;14:2013-2017.
- 2) Chiba Y, Danno S, Suto R, Suto W, Yamane Y, Hanazaki M, Katayama H, Sakai H. Intranasal administration of recombinant progranulin inhibits bronchial smooth muscle hyperresponsiveness in mouse allergic asthma. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2018 Jan 1;314(1):L215-L223.
- 3) Arimura T, Abe M, Shiga H, Katayama H, Kaizu K, Oda S. Clinical study of blood purification therapy in critical care in Japan: results from the survey research of the Japan Society for Blood Purification in Critical Care in 2013. J Artif Organs. 2017 Sep;20(3):244-251.

〔学会発表〕(計 23 件)

- 1) 日根野谷一, 道田将章, 池本直人, 吉田悠紀子, 落合陽子, 大橋一郎, 片山浩 . 健常人に発症した劇症型 A 群 溶連菌感染症に伴う急性感染性電撃性紫斑病の 1 症例 . 第 46 回日本集中治療医学会学術集会 . 2019 年 3 月 1 日 国立京都国際会館 (京都府京都市)
- 2) 片山浩 . E 型肝炎ウイルスによる劇症肝炎の 1 症例 . 第 46 回救急医学会 . 2018 年 11 月 20 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- 3) 池本直人, 福田直樹, 日根野谷一, 落合陽子, 大橋一郎, 片山浩 . 食道がん術後に全脳虚血所見を伴う脳死となった一例 . 日本麻酔科学会 中国・四国支部 第 55 回学術集会 . 2018 年 9 月 1 日 愛媛県県民文化会館 (愛媛県松山市)
- 4) 藤井茂基, 安達幸佳, 須藤航, 花崎元彦, 片山浩, 酒井寛泰, 千葉義彦 . 気管支平滑筋における MALAT1 を介する RhoA 発現調節および喘息時のその変化 第 60 回日本平滑筋学会総会 .

2018年8月17日 東京慈恵会医科大学(東京都港区)

5) 須藤航, 甲斐友規, 花崎元彦, 片山浩, 酒井寛泰, 千葉義彦. PGD2 は Rho-kinase 活性化を介して気管支平滑筋 Ca²⁺ sensitization を引き起こす. 第 60 回日本平滑筋学会総会. 2018年8月17日 東京慈恵会医科大学(東京都港区)

6) 吉田悠紀子, 大橋一郎, 道田将章, 池本直人, 片山浩. 低侵襲心臓手術における傍脊椎ブロックの検討. 日本区域麻酔学会第5回学術集会. 2018年4月14日. グランキューブ大阪(大阪府大阪市)

7) 安原由里佳, 須藤航, 竹澤菜穂美, 原田梨香, 花崎元彦, 片山浩, 酒井寛泰, 千葉義彦. アレルギー性喘息モデルマウスの気管支平滑筋における Neuroactive ligand-receptor interaction pathway の変化. 日本薬学会 第138年会. 2018年3月28日 ANA クラウンプラザホテル金沢(石川県金沢市)

8) 安達幸佳, 藤井茂基, 須藤航, 花崎元彦, 片山浩, 酒井寛泰, 千葉義彦. マウスアレルギー性喘息時の過敏性気管支平滑筋における Malat1 発現の増加. 日本薬学会 第138年会. 2018年3月28日 ANA クラウンプラザホテル金沢(石川県金沢市)

9) 奥村香央里, 須藤航, 土山実紗規, 花崎元彦, 片山浩, 酒井寛泰, 千葉義彦. アレルギー性気管支喘息モデルマウスの気管支平滑筋における Ccr2 ケモカイン受容体発現の増加. 日本薬学会 第138年会. 2018年3月28日 ANA クラウンプラザホテル金沢(石川県金沢市)

10) 池本直人, 片山浩, 吉田悠紀子, 福田直樹, 那須敬, 日根野谷一, 池田智子, 落合陽子, 大橋一郎. 降下性壊死性縦隔炎と診断され緊急手術施行された一症例. 日本集中治療医学会第2回中国・四国支部学術集会. 2018年1月27日 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

11) 吉田悠紀子, 片山浩, 池本直人, 福田直樹, 那須敬, 池田智子, 日根野谷一, 落合陽子, 大橋一郎. 間質性肺炎で判明した免疫介在性壊死性ミオパチーの一例. 日本集中治療医学会第2回中国・四国支部学術集会. 2018年1月27日 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

12) 日根野谷一, 池本直人, 吉田悠紀子, 福田直樹, 那須敬, 落合陽子, 大橋一郎, 片山浩. Fabry 病患者の僧帽弁置換術後管理. 日本臨床麻酔学会第37回大会. 2017年11月5日 ザ・プリンス パークタワー東京(東京都港区)

13) 吉田悠紀子, 大橋一郎, 池本直人, 福田直樹, 那須敬, 日根野谷一, 池田智子, 落合陽子, 片山浩. 低侵襲心臓手術(MICS: Minimally Invasive Cardiac Surgery)に対する傍脊椎ブロックの検討. 日本麻酔科学会 中国・四国支部 第54回学術集会. 2017年9月2日 徳島大学(徳島県徳島市)

14) 有村 美紀, 安藤 友美, 花崎元彦, 片山浩, 千葉 義彦. ラット虚血再灌流傷害肺における miR-133a-3p 発現低下による RhoA/Rho-kinase 系亢進の可能性. 日本薬学会 第137年会. 2017年3月25日 東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

15) 安藤 友美, 有村 美紀, 花崎元彦, 片山浩, 千葉 義彦. ラット虚血再灌流傷害肺における発現変動遺伝子の網羅的解析. 日本薬学会 第137年会. 2017年3月25日 東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

16) 千葉義彦, 安達幸佳, 須藤航, 山根大和, 花崎元彦, 片山浩, 酒井寛泰. マウスアレルギー喘息時の過敏性気管支平滑筋における long noncoding RNAs 発現の変化. 日本薬学会 第137年会. 2017年3月25日 東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

17) 日根野谷一, 池本直人, 那須敬, 福田直樹, 片山浩, 西海創. トロンボモジュリン(rhTM)及びアンチトロンピン(AT)による持続的血液ろ過透析フィルターライフタイムの影響. 第44回日本集中治療医学会学術集会. 2017年3月11日 ロイトン札幌(北海道札幌市)

18) 池本直人, 片山浩, 吉田悠紀子, 福田直樹, 那須敬, 日根野谷一, 落合陽子, 花崎元彦. 吐下血により救急搬送され非外傷性脾破裂が判明した一救命例. 第44回日本集中治療医学会学術集会. 2017年3月10日 ホテルさっぽろ芸文館(北海道札幌市)

19) 池本直人, 片山浩, 吉田悠紀子, 福田直樹, 那須敬, 落合陽子, 花崎元彦. 門脈気腫症4例の検討. 日本臨床麻酔学会第36回大会. 2016年11月5日 高知市文化プラザかるぽーと

20) 落合陽子, 池本直人, 吉田悠紀子, 福田直樹, 那須敬, 片山浩. -グルコシダーゼ阻害薬による門脈気腫症の一例. 日本麻酔科学会 中国・四国支部 第53回学術集会. 2016年9月10日 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

21) 日根野谷一, 池本直人, 吉田悠紀子, 落合陽子, 片山浩. 劇症型A群 溶連菌感染による敗血症性DICに対する遺伝子組換えヒト可溶性トロンボモジュリン(rhTM)及びアンチトロンピンIII(AT III)製剤投与の効果. 日本麻酔科学会 中国・四国支部 第53回学術集会. 2016年9月10日 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

22) 那須敬, 福田直樹, 日根野谷一, 落合陽子, 花崎元彦, 片山浩. 換気量測定可能な呼吸モニターにより挿管時期の決定ができた一症例. 日本麻酔科学会 中国・四国支部 第53回学術集会. 2016年9月10日 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

23) 片山浩. AKIの診断と管理. 日本麻酔科学会第63回学術集会. 2016年5月26日 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

〔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

<http://kwweb-res.kawasaki-m.ac.jp/kwmhp/KgApp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 千葉 義彦

ローマ字氏名: Chiba, Yoshihiko

所属研究機関名: 星薬科大学

部局名: 薬学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 00287848

研究分担者氏名: 花崎 元彦

ローマ字氏名：Hanazaki, Motohiko

所属研究機関名：国際医療福祉大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：60379790

(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。