

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08870

研究課題名(和文) microRNAを介した全身麻酔作用機序の検討

研究課題名(英文) The effects of general anesthesia via microRNA

研究代表者

石川 真士 (Ishikawa, Masashi)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30714745

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)：本研究では、全身麻酔薬について筋障害の機序・バイオマーカー、虚血性腎障害の保護作用、癌細胞への影響を研究した。筋障害では血液中にバイオマーカーとなるmiRNAを発見することができなかった。一方で、虚血性腎障害においてセボフルランは、miR-17pの発現亢進、miR-27aの発現抑制を介して保護作用に重要な役割を果たすPTEN/Akt経路を誘導していた。また、卵巣癌細胞に対してセボフルランはmiR-138/210の抑制を介し、癌細胞の活動亢進をもたらすHIF-1の発現を促進していた。以上より、麻酔薬は疾患によって異なる作用を示すことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身麻酔はその使用経験、臨床研究の結果に基づき使用されているが、その作用は不明な点が多い。本研究では麻酔薬に関して筋障害の機序とバイオマーカー、虚血性腎障害の保護作用、癌細胞への影響を検討した。吸入麻酔薬は虚血性腎障害に対して保護作用を示す一方で、卵巣癌細胞に対しては癌細胞の活動を促進する効果を示した。麻酔薬は疾患によって異なる作用を示すことが明らかになり、各手術に適した麻酔方法があると考えられる。本研究の結果は周術期管理の安全だけでなく長期予後の改善につながる麻酔方法の確立の一助となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated anesthetics about the mechanism of muscle injury, the protective effect against ischemic-reperfusion renal injury and pro-cancer effects. We could not find the biomarker miRNA of muscle injury by anesthetics in the blood. In ischemic-reperfusion renal injury, sevoflurane induced the PTEN/Akt pathway, which plays an important role in the protective effect, via miR-17p upregulation and miR-27a downregulation. In addition, sevoflurane accelerated SKOV3 cell activity via HIF-1a upregulation induced by miR-138/210 suppression. We revealed the various effects of anesthetics depending on the diseases.

研究分野：麻酔

キーワード：microRNA 麻酔 筋障害 腎障害 癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔はその使用経験、臨床研究の結果に基づき使用されているが、分子生物学的検討が行われることは少なく、その機序は不明な点が多い。麻酔薬による各疾患、癌への影響を検討することは、周術期管理の安全だけではなく長期予後の改善につながり、未だ詳細が不明な麻酔薬の機序を明らかにする一助になると考えた。

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* 356:39-48,2005)。主な発見は、1) 脳内日内変動遺伝子発現の抑制、2) 肝臓における薬物代謝関連遺伝子発現に影響、3) 肺循環系における血管緊張調整遺伝子発現等であった。この結果を基に、realtime RT-PCR 法を用いて各全身麻酔薬暴露による遺伝子発現変化を詳細に検討した。それにより肝臓で薬物代謝関連遺伝子が発現増強し、静脈麻酔と吸入麻酔でその変化パターンが異なること (Nakazato K et al. *Biomed Res.* 30:17-24,2009)、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.* 100:190-4,2008) 等を明らかにした。次に、genomics のみではなく、proteomics および metabolomics を用い、全身麻酔による分子生物学的影響を検討した。しかし、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が見いだせなかった。この研究の過程で、小分子 RNA が翻訳過程でタンパク発現を修飾する現象が明らかになり、麻酔薬の作用にも関係していることが示唆された。microRNA (miRNA) は messenger RNA (mRNA) の翻訳制御など遺伝子発現を調整する機能を有する。miRNA 発現に関して、肝臓、肺、脳および血液において包括的に測定し、吸入麻酔薬セボフルランによる影響をそれぞれの臓器において検討した (Ishikawa M et al. *Anesthesiology* 2012; 117(6): 1245-52; Tanaka S et al. *Biomed Res* 2012; 33(5): 255-63.; Goto G et al. *Mol Med Rep* 2014; 5(5): 1715-22.; Takeuchi J et al. *Int J Mol Med* 2014; 34(1): 291-8.)。すべての臓器において、麻酔薬により 50~80% の miRNA に発現変化を認めた。また、血液試料では筋肉特異的 miRNA 発現が減少し、一方で、骨格筋や心筋では増加し、骨格筋障害や心筋障害時のパラメータへと応用できる可能性が推察された。これら結果より、麻酔薬により誘導される miRNA の発現変化が臓器障害、癌など疾患に対する影響を明らかにすることが本研究の課題となった。

2. 研究の目的

本研究では、麻酔薬による筋障害発生について、疾患として虚血性腎障害および癌細胞への影響について分子生物学的に検討する。

(1) 臨床応用に向けた血液中変動 miRNA と筋障害機序解明

プロポフォールは筋肉に作用しプロポフォール注入症候群という致死的な合併症をおこしうることが知られている。麻酔薬の筋組織への影響を明らかにするため、プロポフォールが骨格筋と心筋組織、ならびに、血液中に分泌される筋組織特異的 miRNA の発現変化を測定する。これによって、血液中の miRNA が、プロポフォール注入症候群の診断パラメータとなりうるか検討する。

(2) 腎虚血再灌流障害に対する麻酔薬作用の解明

臓器障害に対する miRNA を介した麻酔薬の作用を明らかにする。麻酔薬は心筋、腎などの虚血再灌流障害に対し保護作用を示すことが知られている。腎虚血再灌流モデルを対象に、虚血プレコンディショニング、麻酔薬によるプレコンディショニングにおける miRNA 発現変化を検討し、保護作用の機序解明につなげる。

(3) 癌細胞に対する麻酔薬作用の解明

癌細胞に対する麻酔薬の作用を検討する。臨床研究にて麻酔方法によって癌再発や転移率が異なり、予後に影響を与えることが報告されている。全身麻酔、特に吸入麻酔薬は手術侵襲軽減により安全な手術に必須なものであるが、癌細胞の活性化につながる可能性が示唆されている。しかし、その機序は不明であり、本研究では miRNA を介した作用に着目し研究する。

3. 研究の方法

(1) 臨床応用に向けた血液中変動 miRNA と筋障害機序解明

(実験群と方法)

Wistar 系雄性ラットを用いて、対照群とプロポフォール群の 2 群にわけ、プロポフォールによる全身麻酔を 6 時間実施し、血液中、左室心筋および下肢骨格筋を採取する。プロポフォールによる血液中、各筋組織における筋組織特異性 miRNA (miR-1, miR-133a, miR-133b, miR206) の発現変化を検討する。

(測定装置および方法)

リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems 7900HT real time PCR system) を用いて miRNA 遺伝子プロファイリングを行う。一連の操作は従来の real time RT-PCR 法と同様であり、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て行う。

実際には、得られたサンプルを液体窒素下に粉砕し、組織と細胞からの miRNA を回収 (mirVana miRNA Isolation kit) する。その後、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 array kit

(TaqMan Rodent MicroRNA A and B Arrays) を用いて遺伝子プロファイリングを行う。

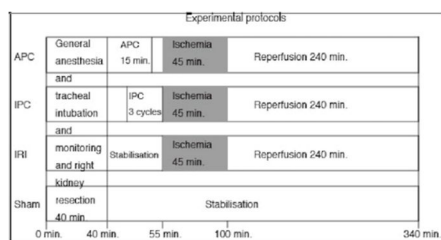
(結果解析と検討)

得られた miRNA 遺伝子プロファイリングから、部位別の発現変化を比較し、血中 miRNA 発現変化が筋組織障害のバイオマーカーとなるか検討する。

(2) 腎虚血再灌流障害に対する麻酔薬作用の解明

(実験群と方法)

対照群および虚血再灌流群 (IRI)、セボフルランプレコンディショニング群 (APC)、一過性虚血プレコンディショニング群 (IPC) の 4 群で比較検討する。一過性虚血プレコンディショニング群は、血流遮断前に 2 分間の血流遮断と 5 分間の再灌流を 3 サイクル行ってから、本遮断を行う。セボフルランプレコンディショニング群には 15 分間 2.2%セボフルラン(約 1MAC)を投与し 10 分間の wash out を行ってから本遮断を開始する。各群について、右腎臓を摘出後、左腎動脈を 45 分間血流遮断する。左腎動脈遮断解除後鎮静下で 4 時間再灌流し、その後に腎臓を摘出し miRNA 測定を行う。



(測定装置および方法)

試料採取後の遺伝子発現測定は、「臨床応用に向けた血液中変動 miRNA と筋障害機序解明」と同様である。

(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、一過性虚血、麻酔薬の影響を比較検討する。また、保護作用を示す群において共通の変化をみつけることで、その機序解明につなげる。さらに、虚血再灌流障害群で大きく変化したものから障害の原因、治療対象となる miRNA 発現変化について検討する。

(3) 癌細胞に対する麻酔薬作用の解明

(実験群と方法)

癌合併ラットを用いて、コントロール群、対象(外科侵襲)群、セボフルラン群、プロポフォール群の 4 群で比較検討する。鎮静後、気管挿管、ライン確保などの処置を行う。全身麻酔群では、セボフルラン 2MAC、プロポフォール 2×ED50 全身麻酔下に対照群と同様の外科侵襲を加える。各群プロトコル終了後に血液、癌組織を摘出し miRNA を測定する。

まずは対象とする卵巣癌 SKOV3 細胞と肺癌 A549 細胞に関して、細胞実験レベルで麻酔薬の癌細胞遊走能、増殖能への影響から作用機序を検討し、in vivo 研究へとつなげる。

(測定装置および方法)

卵巣癌 SKOV3 細胞と肺癌 A549 細胞を用いて、対象群、セボフルラン群の 2 群で比較検討する。薬剤暴露は 2 時間とする。癌細胞の活動性は、麻酔前、麻酔 24 時間後、48 時間後において細胞周期(蛍光免疫染色法: Ki67 染色)、増殖能(CCK8 アッセイ)、遊走能評価(創傷治癒アッセイ)を行う。6 時間後に癌進展に関わる miRNA を qRT-PCR で測定する。さらに下流 pathway は、発現変化していた miRNA と関連のあるタンパクについて麻酔 24 時間後に Western blot 法にてタンパク質の発現変化を解析する。

その後、それぞれの癌細胞をラットに移植し、in vivo 研究として麻酔薬の癌細胞への作用について検討する。

(結果解析と検討)

得られた結果より、麻酔薬による miRNA 発現変化、その下流 pathway のタンパク発現変化を比較検討する。これにより癌細胞に対する麻酔薬の影響を解明し、癌細胞へ影響の少ない麻酔方法の探索や、影響回避の方法を検討する。

4. 研究成果

(1) 臨床応用に向けた血液中変動 miRNA と筋障害機序解明

プロポフォールの骨格筋・心筋への影響、筋障害のバイオマーカーを明らかにするため血液を用いて筋特異的 miRNA に注目し測定した。まず、miRNA array kit を用いて遺伝子プロファイリングを行ったが、各筋・血液で miRNA の発現にばらつきが大きく、特異的な miRNA 発現変化やパターンを見出すことができなかった。

既報より、短時間でのプロポフォール投与でも筋特異的な miRNA の発現誘導や血液バイオマーカーとしての検出が可能であると予想していた。しかし、臨床においてプロポフォール注入症候

群はより長期かつ大量投与時に発症する。本研究のプロトコルでは投与時間や量が不足、安定した結果が得られなかったのではないかと推測している。

(2) 腎虚血再灌流障害に対する麻酔薬作用の解明

腎虚血再灌流障害 (IRI) において麻酔薬の miRNA を介した保護作用機序について検討した。ラット腎虚血再灌流モデルに対しセボフルランを投与したところ、腎障害の軽減が確認された。遺伝学的な検討ではセボフルラン投与により miR-17p は発現亢進、miR-27a は発現抑制された。一方で、虚血プレコンディショニングは miR-19a の発現亢進をもたらした。これら miRNA は PI3K/Akt pathway に関与する (図 1) ことが知られおり、Westernblot 法にて PI3K/Akt タンパク発現変化を確認した。その結果、IRI においてセボフルランと虚血プレコンディショニングは PTEN を減少させ、pAkt を増加することが確認できた (図 2)。

以上より、セボフルランは miR-17 と miR-27a を、虚血プレコンディショニングは miR-19a を介して IRI における腎保護効果を示すと考える。

図 1 : miRNA を介した腎保護機序

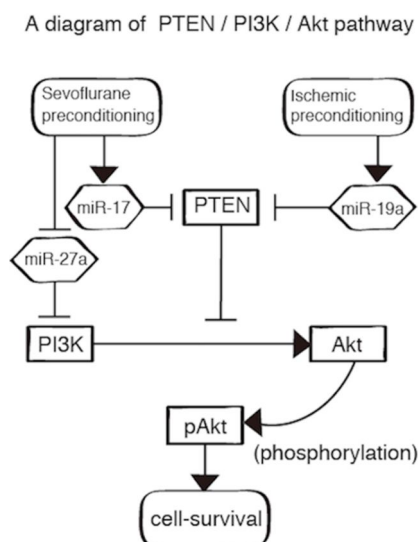
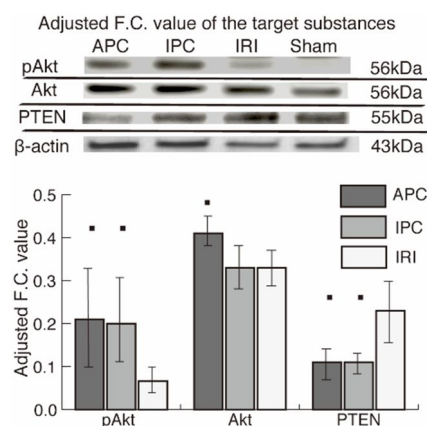


図 2 : PTEN/pAkt 発現



(3) 癌細胞に対する麻酔薬作用の解明

予備実験として卵巣癌 SKOV3 細胞について、細胞実験レベルで麻酔薬セボフルランの癌細胞遊走能、増殖能への影響を検討した。遊走能は創傷治癒アッセイにて、増殖能は CCK-8 assay および Ki67 の免疫染色にて評価した。SKOV3 細胞において吸入麻酔薬セボフルランは遊走能、増殖能を促進した (図 1,2,3)。

図 1 : 創傷治癒アッセイ

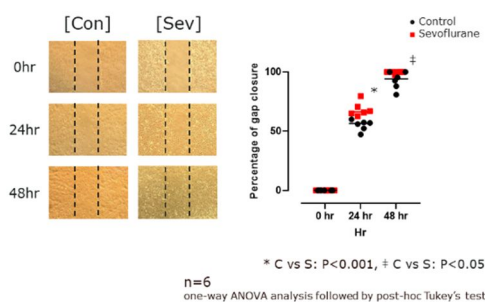


図 2 : CCK-8 assay

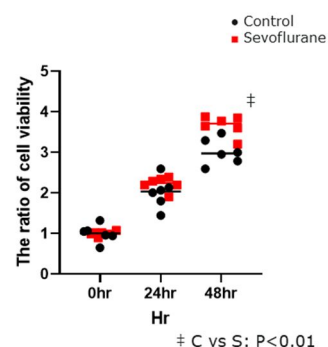
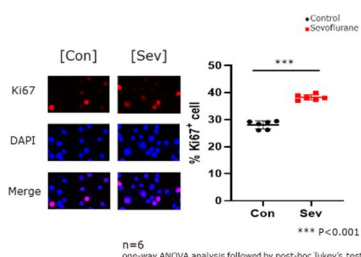


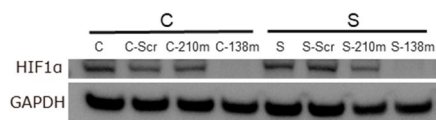
図 3 : 免疫蛍光染色 : Ki67



n=6
one-way ANOVA analysis followed by post-hoc Tukey's test

その機序を検討するために miRNA を PCR 法にて、タンパクを westernblot 法にて測定した。セボフルラン投与にて SKOV3 細胞では癌増殖因子である HIF-1 が発現亢進していた (図 4)。また、HIF-1 をターゲットとする miR-138/210 が発現低下していた。さらに、miR-138/210 mimic 投与により、セボフルランによる HIF-1 発現亢進は抑制された。以上より、miR-138/210- HIF-1 pathway がセボフルランの腫瘍促進効果における重要な経路と考えた。この結果をもとに、細胞レベルでのさらなる機序の解明、in vivo 実験を計画している。

図 4 : 免疫蛍光染色



(4) 発表論文

Yamamoto M, Morita T, Ishikawa M, Sakamoto A. Specific microRNAs are involved in the reno-protective effects of sevoflurane preconditioning and ischemic preconditioning against ischemia reperfusion injury in rats. *Int J Mol Med.* 2020 Apr;45(4):1141-1149.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto M, Morita T, Ishikawa M, Sakamoto A.	4. 巻 45
2. 論文標題 Specific microRNAs are involved in the reno-protective effects of sevoflurane preconditioning and ischemic preconditioning against ischemia reperfusion injury in rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Med.	6. 最初と最後の頁 1141-1149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijmm.2020.4477.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamamoto M, Morita T, Ishikawa M, Sakamoto A.
2. 発表標題 Regulating renal protection from ischemic reperfusion injury by specific microRNAs after sevoflurane or ischemic preconditioning procedure
3. 学会等名 Euroanaesthesia 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	坂本 篤裕 (Sakamoto Atsuhiro) (30196084)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山本 真記子 (Yamamoto Makiko) (50874468)	日本医科大学・医学部・助教 (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------