

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 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：2013～2015

課題番号：25462459

研究課題名(和文) 全身麻酔薬による臓器保護作用発現に関与するマイクロRNAの同定

研究課題名(英文) Identification of micro RNA involved in organ protective effects of general anesthetics.

研究代表者

片山 浩 (Katayama, Hiroshi)

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：麻酔薬による臓器保護作用の報告が散見されるがその機序は不明である。近年、マイクロRNA (miRNA) が多彩な生理反応、病態生理に寄与していることが明らかになってきた。本研究では麻酔薬による臓器保護作用に関与する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モデルから採取した腎を対照群と比較し、有意な発現増加、減少を認められたmiRNAを見出し、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系が腎虚血再灌流傷害の機序に関わっていることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that anesthetics used during surgery have protective effects on organs. However, the mechanism of organ protective effects of anesthetics is still unclear. 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 SLC7A1 and RhoA are involved in ischemia-reperfusion injury in rat kidney.

研究分野：麻酔科学

キーワード：麻酔薬 臓器保護 マイクロRNA 周術期管理

## 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 A<sub>1</sub> 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 K<sub>ATP</sub> チャ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 (8 週齢) を 3 群に (対照 (C) 群、虚血再灌流 (I/R) 群、セボフルラン (S) 群) に分けた。

ペントバルビタール (40 mg/kg) を腹腔内投与して麻酔したのち、頸部の動静脈路を確保、気管切開をしたのち人工呼吸器を接続した。(一回換気量 8 mL/kg、70 回/min)。ベクロニウム投与にて不動化させ、右内頸動脈より動脈血圧をモニタリングし、動脈血液ガス分析を行った。

開腹して両側の腎門部で動静脈を遮断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、遮断を解除して血流を確認し、両腎を 60 分間再灌流した。

再灌流終了後に両腎を摘出し一方は RNeasy Lysis Buffer 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 I/R 群と同様のプロトコルであるが、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

マイクロ RNA アレイ解析を行ったところ、I/R 群で C 群に対して 30 種類以上のマイクロ RNA に 2 倍以上の発現増加あるいは減少が認められた。リアルタイム RT-PCR 法を用いて検討を行い、データベース検索よりターゲットとして SLC7A1、RhoA が推測された。

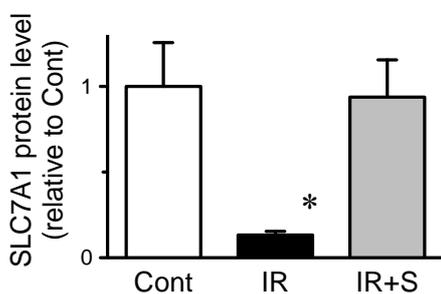


Fig. 1. Effect of sevoflurane (S) on the down-regulation of SLC7A1 protein induced by ischemia-reperfusion (IR) in the rat kidneys.

実際に I/R 群の腎組織において SLC7A1 タン

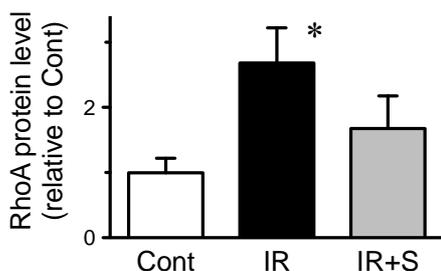


Fig. 2. Effect of sevoflurane (S) on the up-regulation of RhoA protein induced by ischemia-reperfusion (IR) in the rat kidneys.

パク質発現の有意な低下(Fig. 1)と RhoA 発現の有意な増加(Fig. 2)が認められた。これにより SLC7A1 や RhoA-ROCK 系が腎虚血再灌流傷害の機序に関わっていることが強く示唆された。

現在は I/R 群と S 群、および C 群と S 群について同様の手法で解析を行っており、これらを総合的に評価した論文を執筆する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. 片山浩, 福田直樹, 片山大輔, 落合陽子, 花崎元彦: AKI 重症患者における腎機能代替療法 (Renal replacement therapy: RRT). ICU と CCU (査読無). 2015; 39(1):45-52  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020362926>

2. 高岡宗徳、繁光薫、山辻知樹、落合陽子、花崎元彦、片山浩、山根弘路、猶本良夫: 食道癌術後合併症に伴う血小板減少症に対し、ステロイド投与が奏功した症例. ICU と CCU (査読有). 2014; 38: 10: 710-712  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020250135>

3. 片山浩、松三絢弥、落合陽子、花崎元彦. High flow CHDF, High volume CHF. VIII 章 急性血液浄化; 最近の話題. 救急・集中治療 (査読無) 2014; 26: 3・4: 530-536.  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020362926>

[学会発表](計 30 件)

1. 千葉義彦、和田真理奈、森下智紀、花崎元彦、片山浩. ラット腎虚血再灌流傷害における miR-340-5p 発現低下による RhoA up-regulation の可能性. 日本薬学会第 136 年会. 2016 年 3 月 27 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

2. 千葉義彦、森下智紀、和田真理奈、花崎元彦、片山浩. ラット腎虚血再灌流傷害における miR-122-5p を介する SLC7A1 発現低下の可能性. 日本薬学会第 136 年会. 2016 年 3 月 27 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

3. 千葉義彦、多田沙織、太田康介、川田朋、須藤航、岩崎雄介、酒井寛泰、花崎元彦、片山浩. マウス抗原誘発過敏性気管支平滑筋における RhoA 発現変動に及ぼす低メチル供与食餌の影響. 日本薬学会第 136 年会. 2016 年 3 月 27 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

4. 千葉義彦、太田康介、多田沙織、川田朋、須藤航、岩崎雄介、酒井寛泰、花崎元彦、片山浩. 喘息マウスの気管支平滑筋における RhoA 発現に及ぼす複数世代抗原曝露の影響. 日本薬学会第 136 年会. 2016 年 3 月 27 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

5. 千葉義彦、川田朋、太田康介、多田沙織、須藤航、岩崎雄介、酒井寛泰、花崎元彦、片山浩. 抗原誘発過敏性気管支平滑筋における収縮関連タンパク質を制御する miRNAs

の発現変動．日本薬学会第 136 年会．2016 年 3 月 27 日 パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

6．千葉義彦，三好亮麻，佐々木佳奈，須藤航，岩崎雄介，酒井寛泰，花崎元彦，片山浩．アレルギー性鼻炎時の鼻粘膜組織における miRNA を介する NF- B シグナリング増強の可能性．日本薬学会第 136 年会．2016 年 3 月 27 日 パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

7．千葉義彦，佐々木佳奈，三好亮麻，須藤航，岩崎雄介，酒井寛泰，花崎元彦，片山浩．アレルギー性鼻炎マウスの鼻粘膜組織における RhoA 発現に及ぼす複数世代抗原曝露の影響．日本薬学会第 136 年会．2016 年 3 月 27 日 パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

8．日根野谷一，吉田悠紀子，福田直樹，那須敬，片山大輔，落合陽子，花崎元彦，片山浩．MSSA (Methicillin-Susceptible Staphylococcus Aureus) が起炎菌と考えられる劇症肺炎の一例．第 43 回日本集中治療医学会学術集会．2016 年 2 月 12 日．神戸国際展示場（兵庫県神戸市）

9．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．持続腎代替療法 (CRRT) -Japanese Way- ．(教育講演) ．第 43 回日本集中治療医学会学術集会．2016 年 2 月 12 日．神戸国際展示場（兵庫県神戸市）

10．那須敬，福田直樹，片山大輔，落合陽子，花崎元彦，片山浩．スガマデクス投与後に再挿管を必要とし、再クラーレ化が疑われた一例．日本麻酔科学会 中国・四国支部第 52 回学術集会．2015 年 09 月 5 日 岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）

11．須藤航，田上元，須藤怜奈，花崎元彦，片山浩，酒井寛泰，千葉義彦．Interleukin-17A 経鼻的気管内投与による気管支平滑筋収縮反応性の増強とそのメカニズム．第 57 回日本平滑筋学会総会（2015 年 8 月 26 日 山口大学小串キャンパス、山口県宇部市）

12．千葉義彦，鈴木薫平，三好亮麻，酒井寛泰，花崎元彦，片山浩．マウス抗原誘発過敏性鼻粘膜組織における miRNA 発現変動に及ぼす高メチル供与食餌の影響．日本薬学会第 135 年会．2015 年 3 月 27 日 兵庫医療大学（兵庫県神戸市）

13．千葉義彦，齊藤有紀，清田佳奈，酒井寛泰，花崎元彦，片山浩．マウス抗原誘発鼻粘膜炎症に及ぼす高メチル供与食餌の影響．日本薬学会第 135 年会 2015 年 3 月 27 日 兵庫医療大学（兵庫県神戸市）

14．千葉義彦，東陽子，團野駿太，川田明，酒井寛泰，花崎元彦，片山浩．マウスにおけるアレルギー性気道炎症発現に及ぼす高メチル供与食餌の影響．日本薬学会第 135 年会．2015 年 3 月 27 日 兵庫医療大学（兵庫県神戸市）

15．千葉義彦，小早川智帆，田上元，多田沙織，酒井寛泰，花崎元彦，片山浩．マウスにおけるアレルギー性気道炎症発現に及ぼす親世代抗原曝露の影響．日本薬学会第 135 年会．2015 年 3 月 27 日 兵庫医療大学（兵庫県神戸市）

16．千葉義彦，高橋理子，和田真理奈，酒井寛泰，花崎元彦，片山浩．マウス抗原誘発過敏性気管支平滑筋における miRNA 発現変動に及ぼす高メチル供与食餌の影響．日本薬学会第 135 年会．2015 年 3 月 26 日 神戸学院大学（兵庫県神戸市）

17．千葉義彦，野口佳奈子，須藤怜奈，森下智紀，酒井寛泰，花崎元彦，片山浩．培養ヒト気管支平滑筋細胞の RhoA 発現レベルに及ぼす interleukin-33 の影響．日本薬学会第 135 年会．2015 年 3 月 26 日 神戸学院大学（兵庫県神戸市）

18．千葉義彦，飯田尊寛，須藤航，太田康介，酒井寛泰，花崎元彦，片山浩．マウス抗原誘発過敏性気管支平滑筋における RhoA 発現変動に及ぼす高メチル供与食餌の影響．日本薬学会第 135 年会．2015 年 3 月 26 日 神戸学院大学（兵庫県神戸市）

19．福田直樹，片山大輔，花崎元彦，落合陽子，片山浩．診断確定に 5 回の造影 CT 検査が必要であった多発性動脈解離の症例．第 42 回日本集中治療医学会学術集会．2015 年 2 月 9 日 ホテルグランパシフィック LE DAIBA（東京都港区）

20．福田直樹，片山大輔，落合陽子，花崎元彦，片山浩．双胎間輸血症候群に対する胎児鏡下レーザー凝固術におけるデクスメデトミジンによる鎮静．日本臨床麻酔学会第 34 回大会．2014 年 11 月 1 日 グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール（東京都港区）

21．Hanazaki M, Katayama H, Nakatsuka H, Fujita Y, Chiba Y．Up-regulations of RhoA and CPI-17 in lungs with ischemia-reperfusion injury in rats. ASA2014 Annual Meeting．2014 年 10 月 13 日 ニューオーリンズ（アメリカ合衆国）

22．花崎元彦，片山浩．肺虚血再灌流傷害の新規制御法の確立．川崎医科大学学術集会．

2014年8月2日 川崎医科大学(岡山県倉敷市)

23. 千葉義彦、須藤航、清水一樹、須藤怜奈、田上元、團野駿太、中原孝史、加藤靖菜、安藤桂子、松本麻友美、酒井寛泰、成田年、花崎元彦、片山浩。アレルギー性気管支喘息時の気管支平滑筋 RhoA 発現に及ぼす TSLP の役割。日本薬学会第 134 年会。2014 年 3 月 30 日 熊本大学黒髪キャンパスエリア(熊本県熊本市)

24. 千葉義彦、須藤怜奈、清水一樹、須藤航、田上元、團野駿太、中原孝史、加藤靖菜、安藤桂子、松本麻友美、酒井寛泰、成田年、花崎元彦、片山浩。培養ヒト気管支平滑筋細胞における RhoA 発現に対する LIGHT の効果。日本薬学会第 134 年会 2014 年 3 月 30 日 熊本大学黒髪キャンパスエリア(熊本県熊本市)

25. 千葉義彦、中原孝史、清水一樹、須藤怜奈、須藤航、田上元、團野駿太、加藤靖菜、安藤桂子、松本麻友美、酒井寛泰、成田年、花崎元彦、片山浩。アレルギー性気管支喘息時の気管支平滑筋 TLR4 up-regulation における miR-140-5p の役割。日本薬学会第 134 年会。2014 年 3 月 30 日 熊本大学黒髪キャンパスエリア(熊本県熊本市)

26. 千葉義彦、田上元、清水一樹、須藤怜奈、須藤航、團野駿太、中原孝史、加藤靖菜、安藤桂子、松本麻友美、酒井寛泰、成田年、花崎元彦、片山浩。アレルギー性気管支喘息時の気管支平滑筋過敏性発現における interleukin-17 の役割。日本薬学会第 134 年会。2014 年 3 月 30 日 熊本大学黒髪キャンパスエリア(熊本県熊本市)

27. 千葉義彦、田上元、清水一樹、須藤怜奈、須藤航、團野駿太、中原孝史、松本麻友美、加藤靖菜、安藤桂子、酒井寛泰、成田年、花崎元彦、片山浩。培養ヒト気管支平滑筋細胞における interleukin-17A による RhoA タンパク質発現の増加。第 87 回日本薬理学会年会。2014 年 3 月 21 日 仙台国際センター(宮城県仙台市)

28. Hanazaki M, Yoshioka N, Fujita Y, Nakatsuka H, Katayama H, Chiba Y. Effect of rocuronium-sugammadex clathrate on rat airway smooth muscle contraction. ASA2013 Annual Meeting. 2013 年 10 月 12 日 サンフランシスコ(アメリカ合衆国)

29. 田村悠希、花崎元彦、松三絢弥、落合陽子、片山浩。頸髄損傷患者に対する胸腺癌摘出術の麻酔経験。日本麻酔科学会 中国・四国支部第 50 回学術集会。2013 年 9 月 14 日 サンポートホール高松(香川県高松市)

30. 花崎元彦、片山浩、吉岡直紀。肺移植術後の気道過敏性亢進メカニズムの解明。川崎医科大学学術集会。2013 年 8 月 3 日 川崎医科大学(岡山県倉敷市)

〔図書〕(計 2 件)

1. 花崎元彦、片山浩:総合医学社 2013 年。集中治療専門医テキスト(電子版)。Acte kidney injury(AKI)腎傷害患者における薬物投与、薬効力学的アプローチ。pp1543 - 548

2. 片山浩、花崎元彦、落合陽子、土井ゆみ子:日本臨床社 2012 年。別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ NO.18 腎臓症候群(第 2 版)下~その他の腎臓疾患を含めて~。術後急性腎不全。pp125-130

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
<http://kwweb-res.kawasaki-m.ac.jp/kwmp/KgApp>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
片山 浩(KATAYAMA HIROSHI)  
川崎医科大学・医学部・教授  
研究者番号:90161067

(2)研究分担者  
千葉 義彦(CHIBA YOSHIHIKO)  
星薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号:00287848

(3)連携研究者  
研究者番号: