

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

Specific microRNAs are involved in the reno-protective effects of sevoflurane preconditioning and ischemic preconditioning against ischemia reperfusion injury in rats

ラット腎臓虚血再灌流モデルにおいてセボフルランプレコンディショニングと虚血プレコンディショニングのもたらす腎保護作用には microRNA 変動が関与する

日本医科大学大学院医学研究科 疼痛制御麻酔科学分野
大学院生 山本 真記子

International Journal of Molecular Medicine, 45 (4): 1141-1149, 2020 掲載予定
DOI: 10.3892/ijmm.2020.4477

手術中の腎動静脈の虚血再灌流操作は周術期急性腎機能障害の主要な原因となる腎虚血再灌流障害(IRI)を引き起こす。直前のプレコンディショニング操作は IRI を緩和する効果があることが報告されており、動物実験においては短時間虚血操作による虚血プレコンディショニング(IPC)や麻酔薬プレコンディショニング(APC)に腎保護作用があるとされているが、関わる細胞内メカニズムおよびその両操作の違いについて詳細は不明である。一方、近年、IRI の発症に 20 塩基程度の non-coding RNA の 1 つである microRNA (miRNA) の発現変動が関与することが報告されている。申請者は miRNA に着目し、ラット腎臓 IRI モデルを用いて、吸入麻酔薬セボフルランによる APC および IPC によって変動する miRNA とその標的シグナル経路の変動を比較することで、両操作の腎保護効果に関わる分子機構を検討した。

全身麻酔下で右腎を摘出した雄 Wistar ラットを、IRI 群、APC 群、IPC 群、sham 群に割当てた。IRI 群には 45 分間左腎動静脈阻血・4 時間再灌流操作を行った。APC 群にはセボフルラン 2.2%を 15 分間投与し、10 分後に IRI 操作を行った。IPC 群には 2 分間左腎動静脈阻血・5 分間再灌流操作 3 サイクルの直後に IRI 操作を行った。IRI 操作後、左腎を摘出し、組織中の 373 種の既知ラット miRNA を RT-PCR 法で測定した。同時に採血を行い、腎障害の指標として血清クレアチニンを測定した。相対定量法で IRI 群と APC 群間、または IRI 群と IPC 群間で発現量に有意差がみられた miRNA を用いて、その標的と予測される遺伝子群が関与するシグナル伝達経路を Ingenuity Pathway Analysis (IPA)を用いて探索し、当該経路に関連するタンパク分子の発現変化を western blotting で検討した。

IRI 操作後の血清クレアチニン値は、APC 群と IPC 群は sham 群より有意に増加したが、IRI 群より有意に低下した。APC 群と IPC 群間には有意差がなかった。APC 群と IPC 群で有意に発現変動した miRNA は異なっていたが、IPA から APC 群で変動した miR-17 と miR-27a、IPC 群で変動した miR-19a と miR-34a は、共に PTEN/PI3K/Akt シグナル伝達経路との関連が予想された。Western blotting において検討したところ、PTEN タンパク発現が IRI 群と比べ APC 群および IPC 群で減少し、リン酸化 Akt (pAkt) タンパクが IRI 群と比べ APC 群および IPC 群で増加した。すなわち、APC 群と IPC 群は PTEN を抑制し、共通の PI3K/Akt 経路を活性化する可能性が示唆された。一方、APC 群における miR-27a 減少、あるいは IPC 群における miR-34a 増加に関わるシグナル伝達経路等、両操作で異なる機構も観察された。

以上の結果を踏まえ、申請者はラット腎 IRI モデルにおいて APC と IPC の効果として、miRNA の変動を介した PTEN/PI3K/Akt シグナル伝達経路の制御という共通のメカニズムが関与している可能性があること、加えて両操作で異なるシグナル経路の関与も示唆される、と考察している。

本研究は APC と IPC の腎保護効果について miRNA に着目し、その分子機構の一端を明らかにした点で新規性があり、さらに吸入麻酔薬の新たな作用とこれに基づいた IRI 治療法の開発にも繋がることが期待される。

第2次審査において、他の IRI 実験モデル系の検討、データ解析手法の詳細、光学顕微鏡および電子顕微鏡学的検討の必要性、酸化ストレスとの関連、PC と薬物や低体温等の同時処置、あるいは APC と IPC の併用等による相乗効果の可能性等に関して質問がなされたが、的確な回答が得られ、申請者が本研究に関連する知識を十分に有していることが示された。以上の結果から、学位論文として十分価値あるものと認定した。