

背景

肝臓の虚血再灌流障害は肝切除術、肝移植術などの肝臓手術術後合併症として問題となる。これに対しセボフルランなどの麻酔薬を虚血の前に短時間投与する麻酔プレコンディショニング(Anesthetic preconditioning: 以下 APC)と短時間の虚血を行う虚血プレコンディショニング(Ischemic preconditioning: 以下 IPC)は心臓、脳、腎臓などの臓器の虚血再灌流障害に対して保護効果があると報告されている。microRNA(以下 miR)は 21~23 塩基の非コード RNA であり mRNA の翻訳抑制をすることで遺伝子発現の制御をする。我々の施設の検討では麻酔薬の投与により肝臓において多数の mRNA 発現、タンパクの発現変化がもたられることがわかっており、それらの麻酔薬による遺伝子発現変化には多数の miR が関連することも判明した。また、最近の報告では miR とその標的遺伝子が肝臓虚血再灌流に関与していることがわかっている。しかし、虚血再灌流障害に対しての APC/IPC の肝臓保護効果の詳細な機序は分かっていない。今回我々は Taqman Low Density Array (TLDA) を用いて miR の網羅解析を施行し、IPC/APC 間で miR の発現変化、臓器保護因子経路の違いを検討する。

方法

ラットは 300g の雄を使用しコントロール群・APC 群・IPC 群の 3 群に分けた。腹腔内にペントバルビタールを投与後挿管後酸素濃度を 40%下で人工呼吸器管理とした。麻酔薬投与、輸液を行うため尾静脈よりラインを確保し、観血的動脈圧は左大腿動脈よりカテーテルを挿入し測定した。APC 群、IPC 群ではそれぞれ虚血の前に 2%セボフルランを 10 分間吸入しその後 10 分間中止、10 分間の先行虚血を施行し 10 分間の再灌流を施行した後、全てのラットで 60 分の虚血、180 分の再灌流を行った。肝臓虚血は過去の多くの研究でも使用されている 70%虚血モデルを使用した。70%虚血モデルでは、まず腹部正中切開を施行し肝鎌状間膜を切開し肝門部を露出する。腸管うっ血を防ぐため左、中葉へ還流する肝動脈、門脈のみをブルドッグ鉗子にて遮断した。虚血操作の成功の可否は目視で肝臓のチアノーゼを観察した。再灌流の終了後に左、中葉の肝臓の検体を採取し、total RNA を抽出し miR を Taqman low-density array(以下 TLDA)を用いて miR 384 種を同時に定量 PCR 解析した。データ解析は $\Delta\Delta$ CT 法を使用し各 miR の発現倍率を評価した。APC/IPC 群でコントロール群と比較し 2 倍以上発現変化のある miR はさらに Ingenuity Pathway Analysis (以下 IPA)を使用しパスウェイ解析を行った。IPA ではマイクロアレイ、プロテオミクス、RNA-Seq などの実験より得られた 200,000 以上の論文データを基にした Ingenuity Knowledge Base を使用し生物学的な機能解釈やパスウェイ解析を行うソフトウェアであり、今回の実験では発現変化を示した miR と既知の経路との関連を調べた。また、血液検体は虚血前・再灌流後で採取し肝障害の指標として AST/ALT を測定した。

結果

各群で虚血前後、再灌流後で血行動態に有意な差はなかったが、虚血再灌流後の AST/ALT はコントロール群(ALT/AST : 503.7/587.7 units per litre)と比較し APC 群(ALT/AST : 231.3/240.4 units per litre, $p < 0.05$)、IPC 群(ALT/AST : 259.5/332.0 units per litre, $p < 0.05$)で優位に低くかった。APC、IPC 群間での有意差は認めなかった。miR の網羅解析ではコントロール群と比較し APC 群で 114 個の発現抑制、3 個の発現促進、IPC 群ではそれぞれ 205 個、3 個であった。発現変化のあった miR のうち 112 個の miR は両群で共通の変化を示した。また APC/IPC 群でコントロール群と比較し 2 倍以上発現変化のあった 213 個の miR をさらに IPA 使用下で過去の虚血再灌流障害と関連のある経路と関与があるか調べた。その結果両群で発現の低下していた mir-1, miR-17, miR-133, miR-205 の 4 つの miR は Akt-GSK-cyclin D1 経路の抑制に関連することが分かった。

考察

今回の我々の研究では APC、IPC 群ではコントロール群と比較し血行動態は変化しないものの虚血再灌流後の AST/ALT は低くなっており肝臓保護効果を示した。また、両群で多くの共通の miR の発現変化を認め、それらの中に過去に虚血再灌流障害の抑制と関連があると指摘されている Akt-GSK-cyclin D1 経路の抑制と関連する miR があることが分かった。過去の報告では miR-1 の発現増低下は活性化 Akt の増加に関与し、miR-133、miR-205 も Akt の発現/活性化を抑制することがわかっている。また、miR-1、miR-17、miR-133 の発現低下は cyclinD の発現増加を促すことがわかっている。Akt-GSK-cyclin D1 経路は肝臓虚血再灌流障害の重要な要因の一つとなっている。

Akt-GSK-cyclin D1 経路と肝臓虚血再灌流障害の関係はまず Akt が活性化されることにより GSK-3 β が抑制され、mPTP の開口によるミトコンドリアを介したアポトーシスを防止し虚血再灌流障害を抑制する。次に、GSK-3 β の抑制は CyclinD1 の活性化につながり肝細胞の増殖を促進し、これも虚血再灌流障害を抑制に関与する。つまり、虚血再灌流障害を抑制する経路を抑制する miR の発現低下により肝臓保護効果があると考えられた。このことより今回の研究では APC と IPC は Akt-GSK-cyclin D1 経路の抑制する miR の発現を低下させることにより経路の活性が起り、肝臓保護効果を発揮すると考えられた。