

論 文 内 容 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 医学専攻  
生体制御再生医学領域 疼痛制御麻酔科学分野

大学院生 山本 真記子

International Journal of Molecular Medicine 掲載予定

## 目的

腎部分切除術や腎移植術では腎動静脈の虚血再灌流操作を伴う。また心臓外科手術での人工心肺使用下心停止も腎臓の生理的還流を中断する。これらは周術期急性腎機能障害の主要な原因である腎虚血再灌流障害(IRI)を引き起こす。

IRI を和らげるために直前に行うプレコンディショニング操作が報告されており、腎臓組織でも動物実験で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)の腎保護作用が報告された。

IRI に関わるシグナル伝達には 20 塩基程度の小さな non-coding RNA である microRNA(miR)の発現変動が含まれ、プレコンディショニング操作が miR 変動を調節するという報告がある。miR は標的となるシグナル伝達物質の messenger RNA に結合して発現を制御する。

ラット腎臓 IRI モデルにおいても APC と IPC が miR 変動を介して急性腎機能障害を緩和することが予想されるが、両者の効果の強さやメカニズムを比較した報告はまだない。本研究ではセボフルラン APC と IPC によって変動する miR とその標的シグナル伝達物質を比較検討した。

## 方法

体重約  $336 \pm 24$ g の雄 Wistar ラット 28 匹の右腎臓を全身麻酔下で摘出し、無作為に APC 群、IPC 群、IRI 群、sham 群に分類した。IRI 群には左腎臓の 45 分間腎動静脈阻血・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 分間投与した 10 分後に IRI 操作を行い、IPC 群には 2 分間腎動静脈阻血・5 分間再灌流操作 3 サイクルの直後に IRI 操作を行った。実験終了時に左腎臓採取と採血を同時に行い腎臓組織中の既知の 373 種ラット由来 microRNA を RT-PCR で測定した。採血は血清クレアチニン測定に使用した。

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あった miR を Ingenuity Pathway Analysis™ (IPA)に入力して IRI に関わるデータベースから関連深いと予測されるシグナル伝達物質を検索し、該当した物質の腎組織中での発現を western blotting で検出した。

## 結果

実験に使用した全ラットの実験終了時の血清クレアチニン値は、APC 群と IPC 群が sham 群より有意に高く IRI 群より有意に低かった(mean  $\pm$  SD)。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 miR は異なっていたが、IPA は APC 群で変動した miR-17 と miR-27a、IPC 群で変動した miR-19a と miR-34a それぞれとプロテインキナーゼ B(Akt)との関連を予想した。Western blotting で APC 群と IPC 群は IRI 群と比較して PTEN が同等に減少しリン酸化 Akt(pAkt)が同等に増加した。

## 考察

Akt はリン酸化して下位の様々な細胞生存 pathway を活性化するが PTEN は PI3K/Akt

pathway の活性化を上位から抑制されている。APC 群と IPC 群が異なる miR 変動を介して同等の腎保護効果を有した背景として、異なる miR 機能の類似性が考えられた。miR-17 と miR-19a はともに miR-17/92 cluster に属し PTEN のメッセンジャー RNA の 3'末端に結合し発現制御するという報告があり、別の研究報告でも miR-17 増加と miR-19a 増加はどちらも PTEN を抑制した。本研究で APC 群と IPC 群は PTEN 抑制により共通の PI3K/Akt pathway を活性化した可能性がある。PTEN は細胞のアポトーシスに深く関わる caspase3 発現を調節することも報告されている。

APC と IPC 発現経路の相違点も挙げられる。APC 群の miR-27a 減少も PI3K/Akt pathway を活性化した可能性があるが、PI3K も caspase3 を制御することが報告がされている。IPC 群の miR-34a 増加の意義としては、miR-17/92 cluster 発現を促進する cMYC タンパク質を標的に miR-34a が集積するという報告があるため、miR-17/92 cluster の上位シグナル伝達を IPC が調節する可能性もある。

本研究では APC や IPC が PTEN を減少させ pAkt を増加させたが、PI3K/Akt pathway との直接関連や caspase3 pathway との関連の有無については今後の研究課題である。

結語

ラット腎臓において APC と IPC によって同等に PTEN 減少と pAkt 増加を認め、IRI による急性腎機能障害が緩和された。背景として両者が変動させた異なる miR が共通の PTEN/PI3K/Akt pathway を調節した可能性がある。