

令和元年5月29日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10951

研究課題名(和文) 嘔吐するモデル動物スunksのトランスクリプトーム解析によるPONVの機序解明

研究課題名(英文) Whole transcriptome analysis of the brain in a shrew model of postoperative nausea and vomiting

研究代表者

杉野 繁一 (Sugino, Shigekazu)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00423765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：術後悪心嘔吐(PONV)は全身麻酔覚醒後に生じる合併症の1つである。だがその分子的機序は明らかになっていない。スunksはラットやマウスと違い、容易に嘔吐行動が生じる哺乳類である。本研究はこのスunksに全身麻酔下で下腹部手術を施し、スunksPONVモデルを確立した後に、脳幹の嘔吐中枢である孤束核(NTS)のゲノム網羅的な遺伝子発現変化(トランスクリプトーム解析)を行い、PONVの分子遺伝学的機序を解明するものである。行動学的研究ではPONVモデルでの嘔吐行動を出現させることができた。トランスクリプトーム解析ではゴナドトロピン刺激ホルモンシグナル伝達系とEGR1転写因子との関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PONVは術後の合併症の中でも20-30%の高い頻度で起こる不快な合併症の1つである。PONVの臨床的危険因子は大規模研究ですでに明らかになっており、全身麻酔法の決定に影響を与えているが、PONVを完全に予防することは困難で、患者の医療に対する満足度を下げってしまうことも多い。それにもかかわらず、本邦の周術期医療では保険診療上、制吐薬の使用は選択肢があまりなく、効果の高い新規の制吐薬の開発が待望されている。本研究ではEGR1転写因子をはじめとした複数の制吐薬の標的候補を同定できた。今後は新たな制吐薬と手術後での使用を視野に入れて、さらに研究を推進したい。

研究成果の概要(英文)：Postoperative nausea and vomiting (PONV) is a serious complication after emergence from general anesthesia. However, the molecular mechanisms underlying PONV have not been fully elucidated. Musk shrews are used for emetic research worldwide because standard laboratory animals, such as rats and mice, are not capable of vomiting. The aims of this study were to determine changes in gene expression in the shrew brainstem and to try to determine the causative genes for PONV. The results of a behavioral study showed that emetic episodes occurred in the PONV model shrews but not in naive shrews. Whole transcriptome sequencing showed that EGR1 gene expression levels in the gonadotropin-releasing hormone signaling pathway were significantly altered in the PONV model. We focused on EGR1 transcription factor as a candidate associated with PONV. The findings suggested that the change in EGR1 gene expression level may be involved in the molecular mechanisms underlying the development of PONV.

研究分野：麻酔科学

キーワード：術後悪心嘔吐 PONV スunks 次世代DNAシーケンサー トランスクリプトーム解析 孤束核

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

術後悪心嘔吐(Postoperative Nausea and Vomiting: PONV)は術後患者の30%程度に出現し、満足度を著しく低下させる。PONVは延髄最後野と孤束核を中心とした嘔吐中枢が主体となっていると考えられているが、その分子レベルでの機序は未だ不明である。ラットやマウスなどの齧歯類は嘔吐中枢が未発達であるため、嘔吐することがない。そのためPONVだけではなく嘔吐の研究そのものがあまり進展してこなかった。

2. 研究の目的

われわれは哺乳類の中でもっとも容易に嘔吐行動を起こすスンス(Suncus murinus)に着目して、下腹部切開縫合とモルヒネ投与による手術後モデルを作成し、スンスの嘔吐行動を世界ではじめて観察する。さらに嘔吐中枢におけるゲノム網羅的な遺伝子発現変化(トランスクリプトーム変化)を観察し、PONVに関与する未知の遺伝子やタンパクの同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) スンス PONV モデルの確立

イソフルラン麻酔下で、Jic:SUN-Her(嘔吐高感受性系統)の雌性スンスに1cmの腹部正中切開を加える。その後、腹部筋層、皮膚を縫合する。手術終了後にモルヒネ1mg/kgを皮下注射(Surgery群)、麻酔覚醒後の嘔吐エピソード数を記録する。麻酔導入後1時間で評価する。対照は無処置のスンス(Naive群)、イソフルラン麻酔のみのスンス(Sham群)、ニコチン5mg/kgを投与した陽性対照(Nicotine群)を用いる。

(2) スンス PONV モデルにおける嘔吐中枢のトランスクリプトーム解析

スンスの嘔吐エピソードを記録後に抜脳し、延髄孤束核(NTS)から全量RNAを抽出する。次世代DNAシーケンサでRNA-seqを行い、群間で発現量に差のある遺伝子を同定する。さらにパスウェイ解析を用いて、候補遺伝子を絞り込む。

(3) 遺伝子発現実験による検証

候補遺伝子の発現変化をデジタルPCRで確認する。

(4) スンス PONV モデルにおける嘔吐行動減少の確認

同定した遺伝子・タンパクのインヒビターやsiRNAで嘔吐行動が減少するかをスンスPONVモデルで確認する。

4. 研究成果

(1) スンス PONV モデルの確立

われわれが確立したPONVモデル(右図A, Surgery群)では、生理状態では生じない嘔吐行動が惹起された。われわれはこれをPONV動物モデルとして用いることにした。

(2) スンスにおける嘔吐中枢のトランスクリプトーム解析

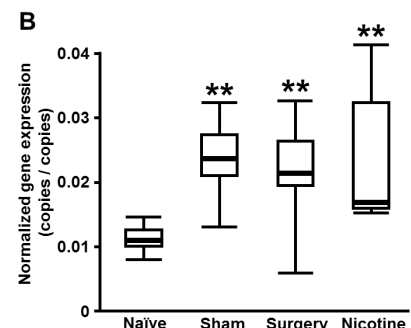
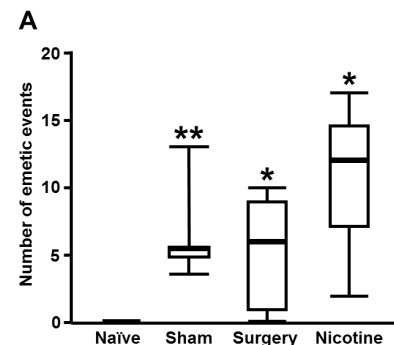
RNA-seqで発現差が大きかったトップ100の遺伝子をパスウェイ解析したところ、ゴナドトロピン刺激ホルモンシグナル伝達系がPONVと関連することが示唆された。

(3) 遺伝子発現実験による検証

ゴナドトロピン刺激ホルモンシグナル伝達系のEGR1転写因子に着目し、デジタルPCRで遺伝子発現量を検証したところ、嘔吐行動とよく相関した発現変化を測定できた。PONVモデルではEGR1-mRNAは増加した(右図B, Surgery群)。

(4) スンス PONV モデルにおける嘔吐行動減少の確認

現在、研究中である。すでにsiRNAを設計、合成しており、現在、スンスの脳室内投与と標的となるNTSニューロンへの導入を試行しているところである。EGR1遺伝子ノックダウンが確認できれば、嘔吐行動が減少するかを確認して、本研究を完遂させる予定である。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Sugino S, Farrag M, Ruiz-Velasco V: G 14 subunit-mediated inhibition of voltage-gated Ca²⁺ and K⁺ channels via neurokinin-1 receptor in celiac-superior mesenteric ganglion neurons. J Neurophysiol 2016; 115: 1577-86.

〔学会発表〕(計4件)

Konno D, Sugino S, Misawa K, Shibata FT, Janicki PK, Imamura-Kawasawa Y, Kido K, Nagasaki M, Yamauchi M: EGR1 gene expression in the nucleus of the solitary tract in a shrew model of postoperative nausea and vomiting. ANESTHESIOLOGY2019, Orlando.

Konno D, Sugino S, Shibata FT, Misawa K, Imamura-Kawasawa Y, Kido K, Nagasaki M, Yamauchi M: Nine candidate genes involved in postoperative nausea and vomiting: transcriptome analysis in the nucleus of the solitary tract of the musk shrew. Neuroscience Meeteing 2018, San Diego.

Konno D, Sugino S, Kawai Y, Nagasaki M, Yamauchi M: Long Non-coding RNA MIR4300HG Polymorphisms Are Involved in Postoperative Nausea and Vomiting in the Japanese Population: Genome-wide Association Study. ANESTHESIOLOGY2017, Boston.

紺野大輔, 杉野繁一, 早瀬知, 河合洋介, 長崎正朗, 山内正憲: 日本人特有の遺伝子変異に着目したゲノムワイド関連分析で同定した長鎖非翻訳 RNA 遺伝子の一塩基多型と術後悪心嘔吐との関連. 日本麻酔学会第64回学術集会, 神戸, 2017年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 紺野 大輔

ローマ字氏名: (KONNO, Daisuke)

研究協力者氏名: 鈴木 潤

ローマ字氏名: (SUZUKI, Jun)

研究協力者氏名: 三澤 計治

ローマ字氏名: (MISAWA, Kazuharu)

研究協力者氏名: 柴田 朋子

ローマ字氏名: (SHIBATA, Tomoko)

研究協力者氏名: 河合 洋介

ローマ字氏名: (KAWAI, Yosuke)

研究協力者氏名: 今村 百可

ローマ字氏名: (IMAMURA, Yuka)

研究協力者氏名: 長崎 正朗

ローマ字氏名：(NAGASAKI, Masao)

研究協力者氏名：城戸 幹太

ローマ字氏名：(KIDO, Kanta)