

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22647

研究課題名(和文) 嘔吐するモデル動物スンクスの戻し交配で解明するPONVの遺伝学的機序

研究課題名(英文) Backcross of inbred Suncus for Elucidating the Genetic Mechanism in Postoperative Nausea and Vomiting

研究代表者

杉野 繁一 (Sugino, Shigekazu)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号：00423765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：術後悪心嘔吐(PONV)は手術後に生じる不快な合併症の1つである。だが麻酔科医はその発症を完全に予防できていない。本研究の目的は遺伝学的に吐きにくい因子を持つCongenic系スンクスを戻し交配によって新たに創出し、従来の吐きやすいスンクスとゲノム配列を比較することで、吐きにくさと関連がある遺伝子群を探索し、PONV予防薬の創薬に繋げることである。30か月かけて10世代の戻し交配を行い4匹のCongenic系スンクスを獲得した。現在、われわれは下腹部手術後の嘔吐行動を評価した後、全ゲノムシーケンスを行い、多型解析を推進中である。

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30-80%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疫学研究ですでに明らかになっており、周術期管理に影響を与えている。しかし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ても多い。本研究では行動解析の結果から、嘔吐耐性に関連する遺伝的因子がBackground系統に導入されていると推測できた。この知見は近い将来、国際誌に原著論文として発表予定である。今後は候補遺伝子やタンパクを同定し、機能解析を経て、次の創薬のプロジェクトを企画・立案する予定である。

研究成果の概要(英文)：Postoperative nausea and vomiting (PONV) is an unpleasant complication after surgery. However, anesthesiologists cannot fully prevent the occurrence of PONV. Musk shrews (*Suncus murinus*) have been used for emetic research and they have been bred as experimental animals in East Asia. We performed backcrossing of an inbred strain of shrews that show low response to emetic stimuli in order to produce a novel congenic strain. The aim of this study is to identify the genetic effects of PONV-resistant molecules in the congenic strain of the shrew. We acquired four female congenic shrews at 30 months after the first backcross. The genetic trait of resistance to PONV can be transferred by backcrossing 10 times. We will compare genetic variations in the two strains at the genome-wide level in the near future.

研究分野：麻酔科学・疼痛医学

キーワード：術後悪心嘔吐 スンクス 次世代DNAシーケンサー

1. 研究開始当初の背景

術後悪心嘔吐(PONV)は術後の合併症の中でも 30-80%の高い頻度で起こる不快な合併症の1つであるが、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てもいいことも多い。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、効果の高い制吐薬や予防法の開発が待望されている(2018年当時)。しかしながら PONV などの嘔吐に関する基礎研究はあまり行われてはいない。その原因の1つに、頻用される実験動物である齧歯類は嘔吐できないという事実がある。実際、ラットやマウスは脳幹の嘔吐中枢が未発達で、いかなる嘔吐刺激を加えても嘔吐行動はまったく出現しない。そこでわれわれは最も嘔吐しやすい哺乳類であるスンクス(*Suncus murinus*, 食虫目トガリネズミ科)に注目した。

2. 研究の目的

目的は遺伝学的に吐きにくい因子を持つ Congenic 系スンクスを戻し交配によって新たに創出し、従来の吐きやすいスンクスとゲノム配列を比較することで、吐きにくさと関連がある遺伝子群を探索し、PONV 予防薬の創薬に繋げることである。

3. 研究の方法

(1) 戻し交配を用いた Congenic 系スンクスの創出

世界でも本邦の紀和実験動物研究所でのみ維持されている Ler 系(Low emetic response: 吐きにくい)と Her 系(High emetic response: 吐きやすい)の近交系スンクスを使用した。まず Ler 系のオス(ブリーダー)と Her 系のメス(レシピエント)を交配させ、生まれたオスのうち、催吐物質ベラトリン(0.25mg/kg)で 30 分間、嘔吐を起こさなかった個体を次のブリーダーとして Her 系のメスと戻し交配させた。戻し交配を 10 世代繰り返すことで、Ler 系が従来持つ「吐きにくい遺伝的因子」を、遺伝的背景が均一な Her 系に導入した。

(2) スンクス PONV モデルを用いた嘔吐行動解析

Congenetic 系スンクス(N = 4)と比較対照である Her 系のスンクス(N = 6)に、下腹部手術を行った。手術では 5%イソフルラン麻酔下に背臥位としたラットの下腹部に、10 mm の皮膚切開を行い、次に小腸を 30 秒間スワブで鈍的に掻き回して腸管麻痺を作成した。その後、皮膚と筋層をナイロン糸で閉鎖した。

嘔吐行動評価は行動出現数(エピソード数)の測定で行った。1 エピソードはリズムカルな腹部収縮の出現とし、吐物の有無は区別しなかった。嘔吐エピソードの間隔が 2 秒以上の場合は別のエピソードとして数えた。嘔吐行動は手術から 30 分間観察した。嘔吐エピソードの数、嘔吐エピソードの総持続時間、最初のエピソードが出現するまでの潜時、覚醒後歩行を開始するまでの潜時、の 4 つを測定した。

(3) 全ゲノムシーケンシによる遺伝子多型解析

嘔吐行動を測定した直後の個体の延髄孤束核から、全量 RNA を抽出した。次に次世代 DNA シーケンサーを用いて全ゲノムシーケンシを行った。ライブラリは TruSeq DNA PCR Free キットを用いて作成した。イルミナ社の NovaSeq シーケンサーで 150bp の pair-end リードをサンプル当たり 600M リード、配列を読んだ。シーケンシの結果は bowtie2 で参照ゲノムにマッピングした。参照ゲノムは脊椎動物ゲノムプロジェクト(Nature 2021;592:737)でアノテーションまで決定された *Suncus etruscus* (white-toothed pygmy shrew) の配列を利用することにした。われわれは *murinus* と *etruscus* のゲノム配列の違いを明らかにしたうえで、*etruscus* のアノテーションを残したまま、違いのある配列を、*etruscus* から *murinus* の配列に置換してしまう疑似スンクス参照ゲノムのデータを新たに作り出した。今後はマッピングで得られた BAM ファイルから変異解析を行い、ゲノムワイド関連解析を実行する予定である。

4. 研究成果

(1) 新規の Congenic スンクスは 10 世代の交配に 30 か月を要した。

10 世代の戻し交配はラットやマウスと違い、時間を要し、30 か月の時間を必要とした。最終的に 4 匹の Congenic 系スンクスを獲得した。

(2) Congenic 系スンクスは嘔吐エピソードが少ない傾向があった。

嘔吐行動解析では Congenic 系スンクスは嘔吐エピソードが少ない傾向があった(図 1A)。総持続時間、最初のエピソードが出現するまでの潜時、覚醒後歩行を開始するまでの潜時も同様に傾向があった(図 1B-D)。統計学的有意差は得られていないが、これらの観察からは嘔吐耐性に関与する遺伝的因子が Background 系統に導入されていると推測できる。

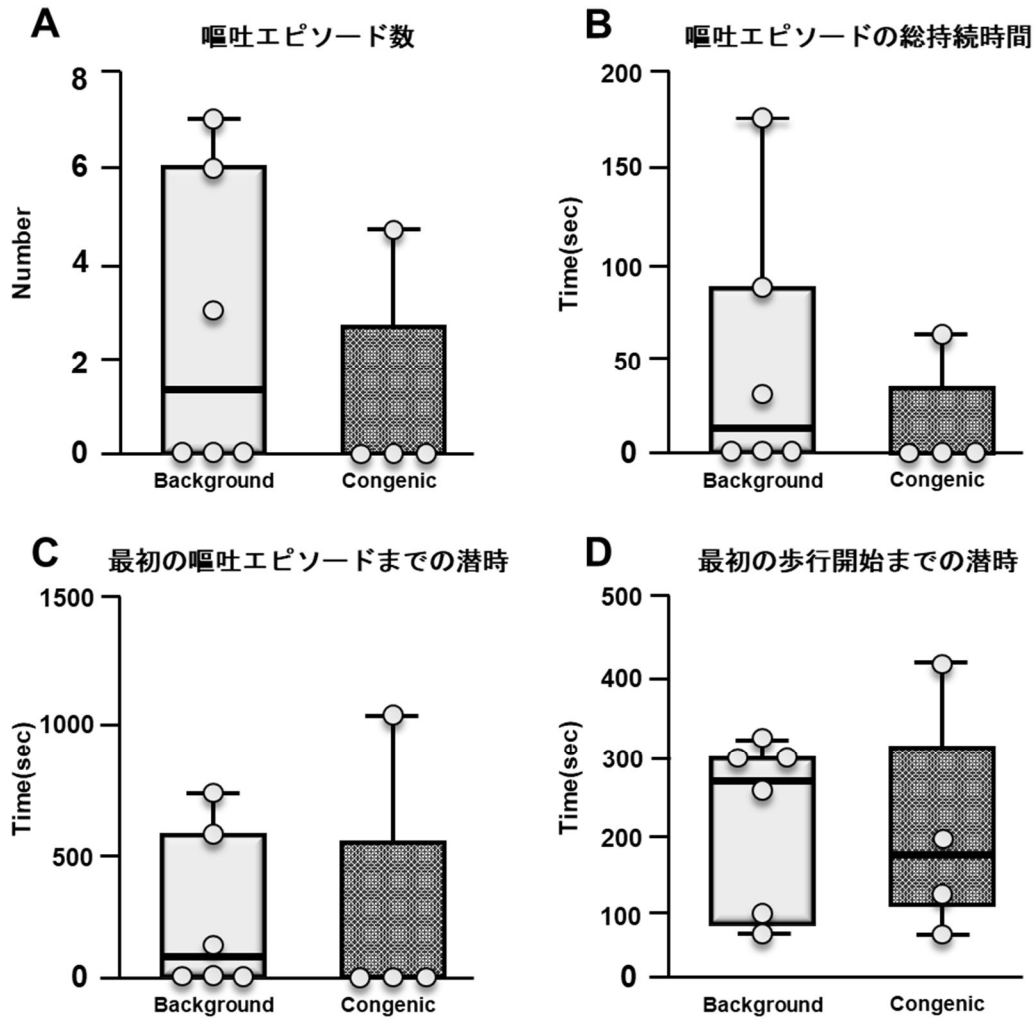


図1 スクスPONVモデルの嘔吐行動. 点は測定値を表す. Boxは中央値と25-75パーセントイルを表す. エラーバーは最大値と最小値を表す.

(3) 全ゲノムシーケンスによる遺伝子多型解析は解析中

現在, *in silico* でシーケンスの結果を解析中である. 2023 年中に候補遺伝子やタンパクを同定し, 機能解析を経て, 次の創薬のプロジェクトを企画・立案する予定である.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sugino Shigekazu, Konno Daisuke, Kawai Yosuke, Nagasaki Masao, Endo Yasuhiro, Hayase Tomo, Yamazaki-Higuchi Misako, Kumeta Yukihiko, Tachibana Shunsuke, Saito Katsuhiko, Suzuki Jun, Kido Kanta, Kurosawa Nahoko, Namiki Akiyoshi, Yamauchi Masanori	4. 巻 14
2. 論文標題 Long non-coding RNA MIR4300HG polymorphisms are associated with postoperative nausea and vomiting: a genome-wide association study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Genomics	6. 最初と最後の頁 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40246-020-00282-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugino Shigekazu, Konno Daisuke, Abe Junko, Imamura Kawasawa Yuka, Kido Kanta, Suzuki Jun, Endo Yasuhiro, Yamauchi Masanori	4. 巻 20
2. 論文標題 Crucial involvement of catecholamine neurotransmission in postoperative nausea and vomiting: Whole transcriptome profiling in the rat nucleus of the solitary tract	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes, Brain and Behavior	6. 最初と最後の頁 e12759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gbb.12759	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Konno Daisuke, Sugino Shigekazu, Shibata Tomoko F, Misawa Kazuharu, Imamura Kawasawa Yuka, Suzuki Jun, Kido Kanta, Nagasaki Masao, Yamauchi Masanori	4. 巻 28
2. 論文標題 Antiemetic effects of baclofen in a shrew model of postoperative nausea and vomiting: Whole transcriptome analysis in the nucleus of the solitary tract	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CNS Neuroscience & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 922-931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cns.13823	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Abe J, Sugino S, Konno D, Imamura-Kawasawa Y, Kido K, Yamauchi M
2. 発表標題 Whole transcriptome profiling in the nucleus of the solitary tract for antiemetic drug discovery in a rat model of postoperative nausea and vomiting
3. 学会等名 Euroanaesthesia 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Konno D, Sugino S, Misawa K, Shibata TF, Janicki PK, Imamura KY, Kido K, Nagasaki M, Yamauchi M
2. 発表標題 EGR1 gene expression in the nucleus of the solitary tract in a shrew model of postoperative nausea and vomiting
3. 学会等名 ANESTHESIOLOGY 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 紺野大輔, 杉野繁一, 鈴木潤, 山内正憲
2. 発表標題 スunks術後悪心嘔吐モデルにおけるバクロフェンの制吐効果
3. 学会等名 日本麻酔学会第67回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉野繁一
2. 発表標題 ゲノムレベルで周術期合併症のメカニズムを解き明かす
3. 学会等名 日本麻酔学会第69回学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関根智宏, 杉野繁一, 紺野大輔, 鈴木潤, 片桐法香, 山内正憲
2. 発表標題 スunksPONVモデルにおける孤束核単細胞の全遺伝子発現特性
3. 学会等名 日本麻酔学会第69回学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	山内 正憲 (Yamauchi Masanori) (00404723)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究 分担者	三澤 計治 (Misawa Kazuharu) (10525885)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	紺野 大輔 (Konno Daisuke) (20876479)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究 協力者	鈴木 潤 (Suzuki Jun)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究 協力者	関根 智宏 (Sekine Tomohiro)	東北大学・医学系研究科・大学院生 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------