

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16030

研究課題名(和文) 麻酔感受性に関わる環境因子の同定とエピゲノム解析

研究課題名(英文) Identification of environmental factors that affect the anesthetic susceptibility and its association with epigenetics

研究代表者

塚本 篤士 (Tsukamoto, Atsushi)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：00647175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では麻酔薬の感受性に影響をおよぼす環境因子を同定するとともに、麻酔感受性差の発現機構を小型げっ歯類において検証した。その結果、生育環境、特に個体のストレスレベルや同居個体とのインタラクションが麻酔感受性差の発現要因になることが明らかとなった。また、環境因子による脊髄、海馬の遺伝子発現の変化が麻酔感受性差の発現機構に關与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

麻酔薬に対する感受性差は実験動物学分野や医療分野における麻酔管理の重要課題となっている。本研究で得られた知見は、げっ歯類における麻酔管理の向上に寄与するとともに、人医療における麻酔感受性差の機序解明の一助となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the influence of environmental factors on the sensitivity of anesthetic agent, and assessed its mechanism in rodents. The growing environment, especially the stress level and the interaction of individuals influences the sensitivity of anesthetic agent in rodents. It is suggested that changes of gene expression pattern in spinal cord and hippocampus is involved in the difference of anesthetic sensitivity.

研究分野：実験動物医学

キーワード：麻酔 エピジェネティクス Refinement

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物実験における適正な麻酔は、実験動物福祉の理念を遵守する上で重要な苦痛軽減措置である。近年の実験動物福祉に対する社会的関心の高まりや、動物管理施設における第三者認証の普及に伴い、動物実験における麻酔法の整備が我が国で求められている。国外に目を向けても、動物実験の国際認証機関において、実験動物の麻酔法を適正化することが求められている。このような背景を受け、実験動物における麻酔管理の標準化は、国内外における重要課題となっている。

マウスなどの小型げっ歯類で麻酔を行う際に、個体による効き方の違い、すなわち麻酔感受性差がしばしば認められる。この感受性差には、遺伝的バックグラウンドをはじめとする個体要因が関与しているケースがある。しかしながら、遺伝的バックグラウンドが同じ近交系マウスの間においても、麻酔感受性に顕著な差を認めることがある。この感受性差は、実験データのノイズにつながり、マウスの麻酔管理の標準化における課題となっている。一方、人医療現場においても、麻酔感受性異常に伴う麻酔関連死が臨床的な重要課題となっている。医療分野を含め、これまで使用されてきたいずれの麻酔薬も、その作用機序に不明な点が多く、麻酔感受性差の発現機構は十分に解明されていないのが現状である。

一般に、塩基配列によってコードされた先天的な遺伝情報は、個体の性質を決めるうえで重要な要因となるが、その遺伝子発現パターンについては、DNAのメチル化やヒストンのアセチル化による後天的なエピゲノム修飾によって制御を受け、それが個体形質に反映される。これまでに、環境因子がDNAのメチル化を変化させ、感覚、精神活動をはじめとする脳機能や、薬剤感受性など、様々な個体形質を決定づけることが明らかとなっている(Feil R. *Nature*. 2012)。特に、「痛覚」と後天的なエピゲノム修飾については近年注目されており、多くの知見が報告されている。母体におけるストレスが、胎子のグルココルチコイド受容体のプロモーター領域のDNAメチル化を変化させ、出生子の痛覚に影響を及ぼすとされている(Diorio J. *J Psychiatry Neurosci*. 2007)。また、疼痛発生において中心的な役割を果たす内因性オピオイドシステムについても、DNAメチル化による後天的な制御を受けることが明らかとなっている(Buchheit T. *Pain Med*. 2012)。このように、痛覚の変化については、ストレスをはじめとする環境要因による遺伝子のエピゲノム修飾が関与していることが明らかとなっている。痛覚は麻酔感受性における重要な構成要素の一つであることから、麻酔感受性の制御機構に、環境要因によるエピジェネティックな制御機構が関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では麻酔感受性差を引き起こす環境因子を同定し、その制御機構を解明する。本研究では生育環境と麻酔感受性の関連性という新たな角度から麻酔研究にアプローチすることで、従来の概念では説明のつかなかった麻酔感受性差の発現要因を解明し、マウスの麻酔管理の標準化ならびに医療分野の麻酔管理の進展に対して基盤情報を提供することを目的とする。

3. 研究の方法

1. 麻酔感受性に関わる環境因子の同定

まず、麻酔感受性に影響をおよぼす環境因子を同定するために、以下の検討を実施した。

1-1: マウスの麻酔感受性に関わる環境因子

同腹のC57BL/6Jマウスをさまざまな環境下で飼育した後、イソフルランに対する麻酔感受性について、麻酔導入時間と最小肺胞内濃度(MAC)を指標に検討した。イソフルラン吸入麻酔下でバイタルサイン(直腸温度、心拍数、呼吸回数、 SpO_2)を計測した。また、各個体において尿中コルチコステロン濃度をELISAで測定し、各個体のストレスレベルを評価した。

1-2: ラットの麻酔感受性に関わる環境因子

Long Evansラットを3週間にわたり各環境下にて飼育を行った。まず、同居個体の存在の影響を検証するために、単独飼育と群飼育における麻酔感受性ならびに術後の疼痛レベルを比較した。麻酔感受性については麻酔導入時間とMACを指標に評価した。術後の疼痛レベルについては開腹手術後のRat Grimace Scale(RGS)によって評価した。次に、痛みの情動伝染が周術期において成立するかを検討した。ラットをペア飼育し、片方のラットをデモンストレーター、もう片方のラットをオブザーバーとした。デモンストレーターに開腹手術を行った後、オブザーバーと同居させた。同居後のオブザーバーにおいて、麻酔感受性ならびに術後の疼痛レベルの変化を検討することで、痛みの情動伝染の成立要因を検証した。

2. 麻酔感受性差の発現機構における脊髄・海馬の遺伝子発現ならびにDNAメチル化の関連性

麻酔感受性が異なるマウスよりそれぞれ海馬・脊髄を採材し、得られたTotal RNAを用いてRNA-seqを行い、遺伝子発現量の差異を網羅的に解析した。シーケンスライブラリーを構築後、HiSeq 2500 (Illumina)を用いてRNA-seqを実施した。シーケンス解析によって得られたリード配列をもとに、遺伝子発現解析を行った。マッピングで得られたゲノム位置情報から解析ソフトGenedate Profiler Genome(ジーンデータ社、スイス)を用いてアノテーションを行い、遺伝子

毎、転写産物毎に発現量の算出を行った。有意な発現量の変化を認めた遺伝子のリストから、Gene Ontology 解析と Pathway 解析を行った。次に、RNA-seq を実施した個体と同一個体の海馬・脊髄より得た組織サンプルから DNA を抽出し、Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) を実施により DNA のメチル化領域を網羅的に評価した。RRBS で得られた結果と RNA-seq の解析データの統合解析を行い、遺伝子発現の制御機構における DNA メチル化の関連性を検証した。

4. 研究成果

1. 麻酔感受性に関わる環境因子の同定

1-1: マウスの麻酔感受性に関わる環境因子

まず、マウスにおいて単独飼育と群飼育におけるストレスレベルと麻酔感受性を検討したところ、単独飼育では麻酔導入時間の延長が認められた。次に、ストレスレベルの異なるケージ内環境下で群飼育した個体において麻酔感受性を比較した。その結果、コルチコステロン濃度の高い群では、低い群と比較して MAC の有意な上昇が認められた。環境エンリッチメントの使用が麻酔感受性に与える影響を検討したところ、有意な変化を認めなかった。

以上の検討結果から、生育環境がマウスの麻酔感受性に一定の影響を及ぼし、特にストレスレベルがイソフルラン吸入麻酔に対する感受性差の発現要因となることが明らかとなった。

1-2: ラットの麻酔感受性に関わる環境因子

ラットにおいて同居個体の有無による麻酔感受性の変化を検証したところ、雌では単独飼育時に麻酔導入時間が延長する傾向がみられた。MAC に関しては雄雌いずれにおいても両飼育条件間での有意差を認めなかった。麻酔感受性への影響が緩徐であった一方で、RGS による術後疼痛の評価結果では、雌雄いずれにおいても単独飼育時の方が群飼育よりも RGS の有意な上昇を認めた。次に、痛みの情動伝染が周術期において成立するか検討した。その結果、デモンストレーターとの同居により、麻酔導入時間の延長と MAC の上昇がみられた。RGS による術後疼痛の評価では、雌雄いずれにおいても 30 分間の同居によってオブザーバーの疼痛レベルが有意に上昇した。一方、一晚同居させた場合は、RGS の上昇が認められなかった。

これらの結果より、同居個体とのインタラクションが麻酔作用や術後痛に対する感受性を変化させることが明らかとなり、それには個体間における痛覚の同期化、すなわち痛みの情動伝染が関与することが示唆された。

2. 麻酔感受性差の発現機構における脊髄・海馬の遺伝子発現ならびに DNA メチル化の関連性

1-1 で麻酔感受性差が認められた個体間において、脊髄ならびに海馬の遺伝子発現を R RNA-seq によって解析した。RNA-seq の結果より、GABA receptor や TRPV1、ウロコルチンなど、麻酔感受性や疼痛に関連する遺伝子の発現量に変化が認められた。Gene Ontology 解析ではエピソード関連するタームが得られ、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC7 の遺伝子発現が変動していた。次に RRBS を実施し、RNA-seq のデータとの統合解析を行ったところ、発現が変化した遺伝子の内、DNA メチル化に変化が認められた割合は 1% 程度であった(図 1, 表 1)。また、麻酔感受性に関連する遺伝子の近傍領域における DNA メチル化には変化を認めなかった。

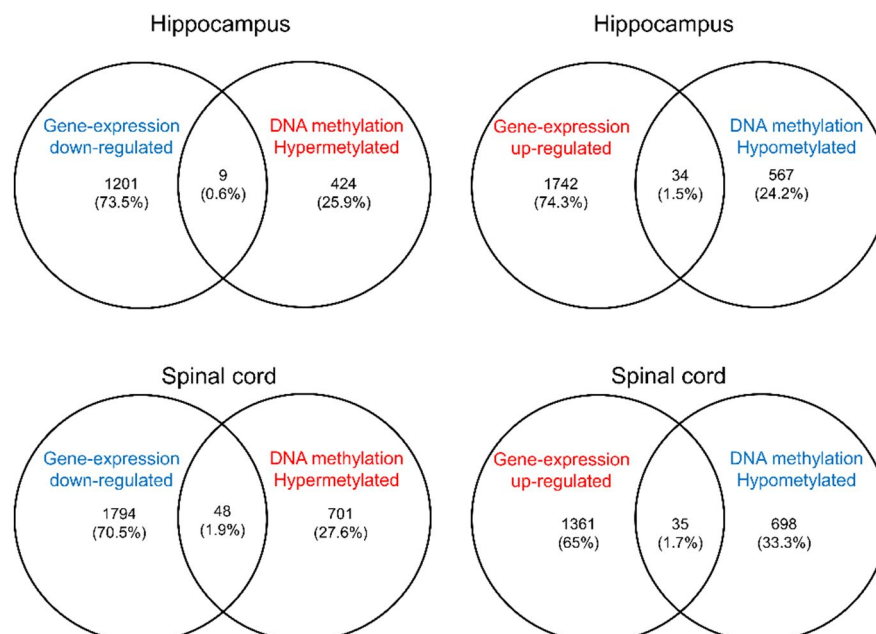


図 1. RNA seq と RRBS で変動を認めた遺伝子数.

表 1. 各組織の遺伝子における発現量と DNA メチル化頻度の関連性.

Tissue	Gene Name	Gene expression	DNA methylation
Hippocampus	Drd3	↑	↓
Hippocampus	Hdac7	↑	↓
Hippocampus	Lamp5	↑	↓
Hippocampus	Erg	↓	↑
Hippocampus	H4-16	↓	↑
Spinal cord	Drd4	↑	↓
Spinal cord	Mc3r	↑	↓
Spinal cord	P2ry10b	↑	↓
Spinal cord	Abca12	↓	↑
Spinal cord	Tmc4	↓	↑

5. まとめ

本研究より、生育環境のストレスレベルの違いや個体間のインタラクションが麻酔感受性差の発現要因となりうるということが明らかとなった。また各環境因子による遺伝子発現の変化が、麻酔感受性差の発現機構に関与することが示唆された。一方、この遺伝子発現に対する DNA メチル化の関連性については見出すことができなかった。本研究では麻酔感受性の異なる個体間においてヒストン蛋白や HDAC の遺伝子発現に差異が認められていることから、今後はヒストンのアセチル化を含めたエピジェネティクス制御の関連性を検証することが望まれる。

本研究で得られた知見は、げっ歯類における麻酔管理の向上に寄与するとともに、人医療で認められる麻酔感受性差の機序解明の一助となるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川口美帆、安達明、伊藤智、岩花倫生、島津徳人、塚本篤士
2. 発表標題 各麻酔法が術後疼痛の発現動態に及ぼす影響
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚本篤士、海老澤春佳、安達明、伊藤智、岩花倫生
2. 発表標題 イソフルランの麻酔感受性に対する飼育環境の影響
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚本篤士、河合一樹、安達明、伊藤智、猪股智夫
2. 発表標題 バイタルサインを指標としたマウスにおけるイソフルラン長時間麻酔の特性
3. 学会等名 日本実験動物技術者協会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達明、伊藤智、三浦桜子、川口美帆、前田侑亮、白井明志、塚本篤士
2. 発表標題 同居動物の存在が麻酔感受性・術後疼痛に与える影響
3. 学会等名 日本獣医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦桜子, 安達明, 伊藤智, 寺澤虹太, 川口美帆, 前田侑亮, 塚本篤士
2. 発表標題 デクスメデトミジンをベースとしたラットにおける新規バランス麻酔の確立
3. 学会等名 日本獣医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本篤士
2. 発表標題 齧歯類の吸入麻酔
3. 学会等名 日本実験動物技術者協会関東支部 手技講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本篤士
2. 発表標題 マウス・ラットの周術期管理 -手術麻酔・疼痛管理のエビデンス-
3. 学会等名 静岡実験動物研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------