

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791606

研究課題名(和文) エピゲノム網羅関連解析による術後悪心嘔吐の性差の機序解明

研究課題名(英文) Investigation about the sex differences and postoperative nausea and vomiting using epigenome-wide association study.

研究代表者

早瀬 知 (Hayase, Tomo)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：20579007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：術後悪心嘔吐(PONV)がヒトTACR1遺伝子の一塩基多形(SNP)と関連するか検討した。その結果TACR1遺伝子上のエストロゲン応答配列上のSNPの変異はPONVの発症頻度と強く関連し、ハプロタイプ解析によって特定のハプロタイプを持つ患者においてPONV発症頻度が減少する可能性が示唆された。TACR1遺伝子のプロモーター領域のメチル化について検索し、また手術モデルマウスを作製しエストロゲンにより嘔吐行動が誘発されるか検討した。女性においてはメチル化率が高いほどPONVの強度が減弱することが示され、また手術モデルマウスにおいてエストロゲンとモルヒネ投与によって嘔吐行動が増強することが示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the TACR1 gene are associated with postoperative nausea and vomiting (PONV). We found that an SNP within the estrogen response element of the TACR1 gene was strongly associated with decreased frequency of PONV occurrence. Haplotype analysis revealed that patients with a specific haplotype showed lower frequency of PONV occurrence and PONV of less intensity. To determine the association between estrogen and PONV occurrence, we analyzed the methylation rate of the promoter region of the TACR1 gene in humans and investigated whether estrogen promotes the pica behavior in operation model mice. In humans, the intensity of PONV was decreased by methylation of the promoter region of the TACR1 gene. In mice, estrogen and mu-opioid additively promoted pica behavior.

研究分野：麻酔科学

キーワード：性差

1. 研究開始当初の背景

術後悪心嘔吐(PONV)には性差があることは臨床的に良く知られているが、その分子生物学的な機序は不明である。悪心嘔吐の機序として、ニューロキニンなどの神経ペプチドが消化器・前庭・情動興奮などの因子により延髄孤束核と最後野にある化学受容器を刺激し、一部海馬などの構造に投射しつつ誘発することが知られている。近年化学療法後悪心嘔吐の治療薬としてニューロキニン1受容体拮抗薬が臨床使用可能となったが、その効果に性差が存在することが示唆されていたため、ニューロキニン1受容体をコードする遺伝子である TACR1 遺伝子の遺伝子多形・遺伝子発現の調節因子として知られるプロモーター領域のメチル化および性差について検討することとした。

2. 研究の目的

術後悪心嘔吐(PONV)は20~30%の患者に発症する、全身麻酔後に起こる最も頻度の高い合併症である。近年のメタ解析では女性であることが最も高リスクであることが指摘された。ニューロキニン1(NK1)受容体は脳内の嘔吐中枢に広く分布し、悪心嘔吐との関連が指摘されている。化学療法領域において、制吐剤として高い効果を認められているNK1受容体拮抗薬は、海外の臨床研究においてPONVに予防効果が認められている一方で、女性において男性よりも有効性が高い可能性が指摘されている。私は本研究においてNK1受容体をコードする遺伝子であるTACR1遺伝子の一塩基多型(SNP)はPONVの発症に関与し、かつ性差の機序を説明する可能性があると考えた。本研究の目的はTACR1遺伝子のSNPとPONVとの関連について検討し、女性においてPONVの発症頻度が高い機序を予測することである。また、ヒトにおけるfMRIの知見から、近年悪心嘔吐の発症メカニズムの一つとして被殻と扁桃体において悪心嘔吐は知覚され、古典的な嘔吐中枢と考えられている最後野や孤束核において悪心嘔吐が強化されると示唆された。とくに被殻においては、NK1受容体の発現量およびNK1受容体のリガンドであるサブスタンスPの結合能に明らかな性差が認められている。本研究のもう一つの目的は被殻・最後野・孤束核におけるTACR1-mRNAの発現量およびNK1受容体の発現量がエストロゲンによって増強するか検討することである。

3. 研究の方法

1) TACR1 遺伝子の遺伝子多型と PONV の発症の関連解析
20-85歳のASA-PS分類が1-2である予定手術患者で、婦人科下腹部開腹手術を受ける患者を対象とした。術前診察時に研究について文書および口頭による十分な説明を行い、患者の自由意志による同意を得た。研究に組み入れた患者は麻酔導入前に全血2mLを採血し、同日中にゲノムDNAを抽出した。抽出したゲ

ノムDNAはbisulfite conversion後にhigh melting resolution profile(MS-HRM)法によりTACR1遺伝子の転写開始点の上流100塩基から下流6塩基までのメチル化率を測定した。PONVの評価として、術後6時間時点の嘔気嘔吐の強さを0-100mmのヴィジュアルアナログスケール(VAS)で評価した。またTACR1遺伝子のSNPとPONVの関連を検討するため、Hapviewソフトウェア(ver 4.1)によりTACR1遺伝子全長を含む範囲で32のSNPsを選択し、9ブロックのハプロタイプを作成し、PONVのVASと関連するか解析した。

2) マウス脳と血中におけるTACR1遺伝子プロモーター領域のメチル化率の比較

はじめにマウスにおけるPONVモデルを作製するため、吸入麻酔薬およびげっ歯類において嘔気を誘発する薬剤として知られるモルヒネを用い性差を確認した。以下全ての実験には生後7-9週、体重20-25gのC57BL6マウスを使用した。以下の3群につき、雌雄各8匹を用いて検討した。naïve群: control群、Sev群: 100%酸素および5%セボフルランを1時間吸入させた。M群: 塩酸モルヒネ20mg/kgを腹腔内投与した。処置開始より24時間後にマウスにおける悪心嘔吐の間接的な指標として知られるパイカ行動(食餌以外の物質を食べる異食行動)を観察するため、無味であるカオリンペレットの摂取量を測定した。

3) 雌マウスにおけるエストロゲンのパイカ行動に対する影響

雌マウス(各群n=8)について以下の4群を設定した。naïve群: control群、Vehicle群: 100%酸素および5%セボフルランを1時間吸入後、塩酸モルヒネ20mg/kgを腹腔内投与した。E2群: 100%酸素および5%セボフルランを1時間吸入後、塩酸モルヒネ20mg/kgおよびエストロゲン1μg/bodyを腹腔内投与した。E2+ICI群: 100%酸素および5%セボフルランを1時間吸入後、塩酸モルヒネ20mg/kg、エストロゲン1μg/bodyおよびエストロゲンのアンタゴニストであるICI182,780を20mg/kgを腹腔内投与した。先の実験と同様にカオリンペレットの摂取量を測定した。

4) 最後野・孤束核・被殻におけるTACR1遺伝子のmRNA発現量の測定

雌マウスを上述した4群に割り付けた(naïve群、Vehicle群、E2群およびE2+ICI群;各群n=8)。セボフルラン投与終了後2時間経過した時点で断頭し、最後野・孤束核および被殻を含む10μmのスライスをそれぞれ作製した。Alexa488-conjugated NeuN抗体でニューロンを染色し、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションによりニューロンを単離した。得られたニューロンからtotal RNAを抽出し、TACR1遺伝子に特異的なTaqManプローブを用いてqRT-PCRによりTACR1-mRNA発現量を定量した。

5) 被殻におけるNK1受容体タンパク発現量の測定

雌マウスを同様に naïve 群、Vehicle 群、E2 群、E2+ICI 群に割り付けた(各群 n=8)。naïve 群は任意の時点で、その他の群についてはセボフルラン投与終了後 2 時間経過した時点で断頭し被殻を含むブロックを抽出し、ウサギ抗 NK1 受容体抗体に反応させた。その後 TaqMan Protein Assay Open Kit を用いて NK1 受容体タンパク発現量を定量した。

4. 研究成果

ヒトにおいて今回作成した 9 ハプロタイプブロックのうち、ブロック 4 に含まれる rs3755468-SNP は変異することにより有意に術後 6 時間時点での PONV の強度を減弱させ、かつブロック 4 において TT ハプロタイプを持つ患者群では有意に PONV の程度が軽いことを発見した(図 1)。また女性においてメチル化率が高いほど PONV の強度が小さいことを発見した(図 2)。

動物実験においては雌マウスにおいてモルヒネによるカオリン摂取量の増大を認められたが、雄マウスではモルヒネ投与後もカオリン摂取量の増加を認めなかった。

TACR1-mRNA の発現量について、最後野・孤束核においてセボフルラン投与終了後 2 時間経過した時点での TACR1-mRNA の発現量は群間差を認めなかった。被殻においては E2 群で naïve 群および E2+ICI 群と比較して有意に TACR1-mRNA の発現量の約 6 倍の増大を認めた。NK1 受容体タンパクの発現量は、E2 群で naïve 群および E2+ICI 群と比較して NK1 受容体タンパクの発現量は約 1.5 倍に増大した。エピゲノム状態全体について網羅的に解析することは本研究期間内では不能であったものの、一部遺伝子のエピゲノム状態が性差や臨床症状に関連する可能性が本研究によって示唆された。

よってわれわれの研究成果をまとめると、
1) TACR1 遺伝子の SNP は PONV の強さに影響を与える可能性があり、その様式にはエストロゲンによる遺伝子転写が修飾される可能性がある。

2) 被殻は悪心嘔吐を知覚する神経核である可能性があり、エストロゲンはオピオイドの存在下に TACR1 遺伝子の発現および NK1 受容体タンパクの発現を増大させ、女性においてエストロゲン自体が PONV を増悪させる因子の一つである可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Hayase T, Sugino S, Moriya H, Yamakage M. TACR1 gene polymorphism and sex differences in postoperative nausea and vomiting. *Anaesthesia* 2015. 70(10); 1148-59.

[学会発表](計 4 件)

1. Tachibana S, Hayase T, Yamakage M. Possible Mechanism of Neuroinflammation

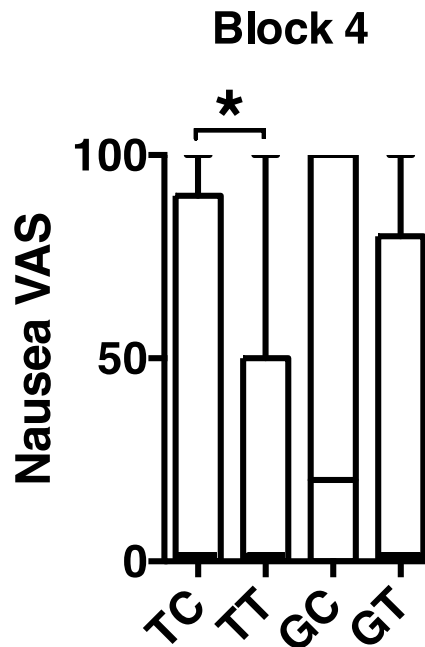


図 1 術後 6 時間時点における TACR1 遺伝子のブロック 4 ハプロタイプと悪心嘔吐の強さの比較(VAS: ヴィジュアルアナログスケール)

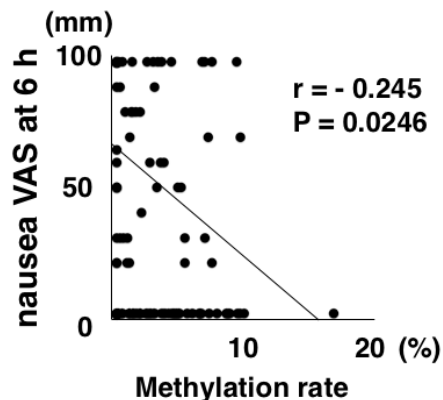


図 2 TACR1 遺伝子プロモーター領域のメチル化率と術後悪心嘔吐の強さとの関係(VAS: ヴィジュアルアナログスケール)

Induced by Surgical Procedure in the Mouse Hippocampus Determined by Using Transcriptome Analysis. The Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2015 年 10 月 24 日~28 日、米国 San Diego 市

2. Hayase T, Tachibana S, Yamakage M. Prediction of the Molecular Mechanism of Postoperative Nausea and Vomiting Using Transcriptome Analysis. The Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2015 年 10 月 24 日~28 日、米国 San Diego 市

3. Hayase T, Sugino S, Tachibana S, Yamakage M. Estradiol Enhances Female Pica Behavior Through TACR1 Expression in the Caudate Putamen. The Annual Meeting of

American Society of Anesthesiologists
2014年10月11日～15日、米国New Orleans
市

4. Hayase T, Sugino S, Tachibana S,
Yamakage M. TACR1 Gene Polymorphism Is
Associated With Gender Difference in
Postoperative Nausea and Vomiting. The
Annual Meeting of American Society of
Anesthesiologists 2014年10月11日～15
日、米国New Orleans市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早瀬 知 (HAYASE TOMO)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：20579007

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

山蔭 道明(YAMAKAGE MICHIAKI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：70285005