

スunks孤束核のトランスクリプトーム解析による術後悪心嘔吐の分子機序の解明

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

外科病態学講座 麻酔・周術期医学分野

紺野 大輔

## 目次

1	略語	4
2	要約	5
3	研究背景	7
4	研究目的	12
5	研究方法	13
5.1	モデル動物スunks	13
5.2	unks術後悪心嘔吐モデルの作成	13
5.3	嘔吐中枢からの全量 RNA の抽出	16
5.4	次世代 DNA シークエンサーを用いた RNA シークエンス	17
5.5	スーパーコンピューターを用いたインシリコ解析	18
5.6	パスウェイ解析を用いた術後悪心嘔吐と関連する遺伝子の推定	19
5.7	GABA <sub>B</sub> 受容体作動薬のunks嘔吐行動への効果	19
5.8	統計解析	20
6	研究結果	22
6.1	unks PONV モデルの確立	22
6.2	PONV モデルの孤束核における全 52381 個の mRNA の発現量測定	23
6.3	GABA <sub>B</sub> 受容体シグナル伝達経路と PONV の関連	24
6.4	GABA <sub>B</sub> 受容体作動薬バクロフェンによるunks嘔吐行動の抑制	25

7	考察	27
7.1	研究結果の小括	27
7.2	本研究にて作成した動物モデルの新規性	27
7.3	トランスクリプトーム解析による PONV 関連遺伝子の模索	31
7.4	GABA <sub>B</sub> 受容体作動薬バクロフェンによる嘔吐行動の抑制機序	35
7.5	今後の展望と限界	40
8	結論	43
9	謝辞	44
10	参考文献	46
11	図説	57
12	図	64
13	表	81

## 1. 略語

PONV	Postoperative nausea and vomiting
5-HT <sub>3</sub>	5-hydroxytryptamine 3
NNT	Number needed to treat
NK1	Neurokinin 1
FDA	Food and Drug Administration
RNA	Ribonucleic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
mRNA	Messenger RNA
MAC	Minimum alveolar concentration
cDNA	Complementary DNA
CDS	Coding sequence
UTR	Untranslated region
FPKM	Fragments per kilobase of exon per million reads mapped
GABA	Gamma-aminobutyric acid
FDR	False discovery rate
GERD	Gastroesophageal reflux disease

## 2. 要約

全身麻酔下に手術を受けた患者の 30%程度に術後悪心嘔吐 (Postoperative nausea and vomiting: PONV) が生じる。しかしどのような脳内の機序で PONV が惹起されるのか、また手術および全身麻酔薬による侵襲が PONV の発症機序をどのように修飾するのかはほとんど判っていない。本研究の目的は、1) 容易に嘔吐するモデル動物スunksで下腹部手術を行い、麻酔覚醒後の嘔吐行動を観察して、スunks PONV モデルを確立すること、2) スunksの全脳を摘出して嘔吐中枢である孤束核を切り出し、抽出した全量 RNA (Ribonucleic acid) サンプルを用いて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) を測定し、PONV で発現が変化する遺伝子を同定すること、3) さらに PONV に関連すると予想される生物学的パスウェイを同定すること、4) 最後に PONV 発症と関連するパスウェイに作用する物質を用いて、スunks PONV モデルで嘔吐行動が減少するかを検証することにより、PONV の分子機序を解明することである。

まず、イソフルラン麻酔下に下腹部手術を行い、覚醒後に嘔吐行動を起こすスunks PONV モデルを確立した (手術群:  $n = 9$ )。対照として吸入麻酔暴露のみの麻酔群 ( $n = 6$ )、処置を行わない覚醒群 ( $n = 6$ ) を設定した。覚醒群では嘔吐行動を認めなかった。麻酔群の嘔吐行動回数は、6 (1) [中央値 (四分範囲)] 回で、覚醒群と比べて有意に増加した ( $P = 0.005$ )。手術群の嘔吐行動回数は 6 (8) 回で、覚醒群と比べて有意に増加した ( $P = 0.02$ )。次にスunks脳の孤束核から抽出した全量

RNA を、次世代 DNA (Deoxyribonucleic acid) シークエンサーを用いて RNA シークエンスを行い、トランスクリプトーム解析を行った。発現を認めた mRNA (messenger RNA) は 52381 個あり、それぞれの発現量を定量した。覚醒群と手術群の間で発現量の差が大きい 100 個の遺伝子については、パスウェイ解析を行い、PONV との関連が示唆された 14 の細胞内シグナル伝達経路 (パスウェイ) を同定した。特に、GABA (Gamma-aminobutyric acid) <sub>B</sub> 受容体シグナル伝達経路と手術群で発現が減少した GABBR1 遺伝子に注目し、GABA<sub>B</sub> 受容体の刺激による GABA<sub>B</sub> 受容体シグナル伝達の活性化がスunks の嘔吐行動の回数を減らすと仮説を立てた。

そこで、スunks PONV モデルに GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬であるバクロフェンを腹腔内投与 (5 mg/kg) したバクロフェン群 (n = 6) と、溶媒のみを腹腔内投与する溶媒対照群 (n = 6) を設定し、術後の嘔吐行動の変容を観察した。溶媒対照群での嘔吐行動回数は 6 (4) 回であったが、バクロフェン群では 0 (0) 回であった ( $P = 0.003$ )。

本研究ではスunks PONV モデルの孤束核におけるトランスクリプトーム変化を測定した。PONV の発症には GABA<sub>B</sub> 受容体が関与しており、GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬であるバクロフェンは新しい機序の PONV の治療薬となる可能性が示唆された。

### 3. 研究背景

揮発性吸入麻酔薬を用いた全身麻酔は、急性期の手術医療で広く一般的に行われているが、全身麻酔下に手術を受けた患者の 30 %程度に術後悪心嘔吐(Postoperative nausea and vomiting: PONV) が生じる。この PONV は、患者満足度を大きく低下させる合併症であり、術後回復の遅延、入院期間の延長、医療費の増加に繋がるが、現在の麻酔医療・周術期医療ではその発症を完全に抑制することはできない<sup>1,2</sup>。その理由として、PONV の多くは術直後から 4 時間までに発症し、24 時間以内に軽減するとされているが、数日に渡り遷延する患者もいることが挙げられる<sup>3</sup>。

欧米では PONV に対する治療薬として、セロトニン (5-hydroxytryptamine 3: 5-HT<sub>3</sub>) 受容体拮抗薬が用いられているが、オンダンセトロンの悪心に対する統計学的治療必要数 (Number needed to treat: NNT) はおよそ 7、嘔吐に対する NNT はおよそ 6 とされており、PONV に対して十分な治療効果を得られているとはいえない<sup>4</sup>。同時に高価な薬剤であり、たとえ欧米でもすべての症例に 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬を用いているわけではない。本邦では抗悪性腫瘍剤投与に伴う消化器症状のみの保険適応であり、PONV に対する治療薬としての保険承認はない。一方、選択的 Neurokinin 1 (NK1) 受容体拮抗薬であるアプレピタントも 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬と同等の効果があると言われているが<sup>5,6</sup>、5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬と同様に、抗悪性腫瘍剤投与に伴う消化器症状のみの保険適応で、PONV に対する保険承認はない。ステロイド薬であるデキサメサゾンや、抗精神病薬であるオランザピンも有効であると

されているが<sup>1,3,4</sup>、やはり PONV に対する保険承認がない。本邦で PONV に対する保険承認のある制吐薬としては、メトクロプラミド、プロクロルペラジン、ヒドロキシジン注射薬、ドロペリドールが挙げられるが、メトクロプラミド、プロクロルペラジン、ヒドロキシジン注射薬に関しては大規模研究の結果、効果は十分でないとされており、またドロペリドールは有効ではあるものの、QT 延長を招く危険があり、米国では Food and Drug Administration (FDA) が使用を認可していない。つまり本邦においては、PONV に対して安全かつ有効な治療がほとんど行えないのが現状であり、新たな PONV に対する治療薬・制吐薬が待望されている。

これまでの臨床研究では、PONV の危険因子として、女性、非喫煙、医療用麻薬の投与、笑気の投与、腹腔鏡を用いた手術、動揺病の既往、PONV の既往等が明らかになっているが、セボフルランやイソフルラン、デスフルランなどの吸入麻酔薬の使用は、プロポフォールを用いた全静脈麻酔に比べ、PONV の発生リスクを 19 % 上昇させ、術後の制吐薬使用量も有意に増加させる<sup>2,5,6</sup>。以上のように臨床研究レベルでは PONV の危険因子は同定されてはいるものの、どのような機序でそれらの危険因子が PONV を惹起するのか、また手術の侵襲が PONV の発症機序をどのように修飾するのかはほとんど判っていない。

ヒトの嘔吐中枢は脳幹に存在する孤束核にあると言われており、前庭迷路系からの第Ⅷ脳神経を介する動揺刺激、消化管粘膜からの迷走神経を介した刺激、最後野からの化学受容器引金帯を介する刺激、心理的な要因など大脳辺縁系を介する刺激、視覚



中枢からの刺激による多数の情報入力、孤束核に収束する (図 1) <sup>11</sup>。孤束核からの出力は腕傍核を経て体性感覚・内臓感覚皮質、視床に投射され、感覚として嘔気を生じる。また、その出力は消化器系や呼吸器系にも投射され、行動として反射的に嘔吐を生じさせる。孤束核は悪心嘔吐において脳内で中心的な役割を果たしていると言え、悪心嘔吐研究の標的として孤束核は非常に重要であると言える。

近年の研究において、吸入麻酔薬の暴露は、短期間で脳における遺伝子発現を変化させるという報告が散見されるようになった。Luh らは、マウスの脳障害モデルを作成する際に 15 分間の単回のイソフルラン暴露が脳における mRNA の発現を変化させると報告しており、また Lasarzik は健康なマウスにイソフルランをたった 1 分間吸入させただけでも、脳における mRNA 発現が変化すると報告している <sup>12,13</sup>。また、PONV の最大の危険因子が PONV の既往であり、80%程度の患者に PONV が再発する一方で、全く嘔吐しない患者も存在する。ヒトにおける吸入麻酔薬の効果は個体差なく同等である反面、PONV の発症に個体差があるという事実は遺伝子 (もしくはその発現) に差があることを示唆しており、実際に PONV との関連が示唆されている遺伝子も報告されている <sup>14</sup>。つまり、PONV を研究するにあたり、孤束核における遺伝子発現変化つまり mRNA を検討することは大変肝要であると言える。

しかし、悪心嘔吐の研究領域は、近年の分子生物学の技術革新にもかかわらずあまり進展がみられない。その理由の 1 つとして、実験動物として広く一般的に用いられているラットやマウスなどの齧歯類は嘔吐中枢の発達が未熟、あるいは進化の過程で

退化したため、いかなる嘔吐刺激でも嘔吐することがないことが挙げられる<sup>11,15</sup>。そのため歴史的にサル、ネコ、イヌ、フェレットなどが嘔吐に関わる実験に用いられてきたが、大型であること、飼育の煩雑さ、高い価格などが嘔吐研究の障害となってきた。

スunks (Suncus murinus) は、哺乳綱・トガリネズミ目・トガリネズミ科・シヤコウネズミ属に分類される哺乳類であり、薬物刺激に対し容易に嘔吐する実験動物である (図 2)<sup>16-18</sup>。スunksは毛づくろいをする習性が無く、ネコのように毛玉を飲み込んで嘔吐することもないことから、薬物刺激や動揺刺激と無関係に嘔吐することがない点で有用である。また、イヌは手術後の嘔吐の頻度が高くなく 30 %程度と言われており、嘔吐しなかった場合の考察が困難となる<sup>19</sup>。嘔吐研究において最も一般的に用いられるフェレットは、他の動物に比べ胴が長く、嘔吐の際の腹部の蠕動運動の観察が容易であるという利点があるが、催吐剤への感受性が低く、揮発性吸入麻酔薬で嘔吐を生じにくいという点が、PONV 研究を行う際の最大の問題であり、PONV モデル動物として非常に用いにくい<sup>20</sup>。一方で、スunksは吸入麻酔薬の暴露により容易に嘔吐行動を生じ、また、スunksの嘔吐反応はネコやフェレットと異なり、ヒトと同様にほぼ全身を使った協調的な反射運動であり、あくびや流涎とは明確に区別できる点で有利である。さらに、スunksは催吐物質であるベラトリンを利用した選抜交配を繰り返すことで、遺伝的に高頻度に嘔吐する近交系が本邦で作成・維持されており、精度の高い嘔吐行動実験を行うことが可能である。

そこで本研究では、このスunksを用い、他の実験動物や齧歯類では作成できない PONV 動物モデルを作成して、嘔吐行動による孤束核でのすべての遺伝子発現変化 (トランスクリプトーム変化) を解析することで、PONV に関連する遺伝子やパスウェイを同定し、新たな PONV 治療薬・制吐薬の候補物質を探索することとした。これまでに PONV に関連したトランスクリプトーム解析をスunksで行った研究は存在せず、PONV の関連遺伝子を同定することで、治療薬の創薬に繋がる可能性がある。

#### 4. 研究目的

図 3 に研究の概要を示す。本研究の目的は、スunksを用いて齧歯類では作成できない PONV 動物モデルを作成し、嘔吐行動による孤束核でのすべての遺伝子発現変化(トランスクリプトーム変化)を解析し、PONV に関連する遺伝子やパスウェイを同定することで、PONV 発症メカニズムの解明を試みる事である。また、発症機序を明らかにすることで、新たな PONV 治療薬・制吐薬の候補物質を探索することである。

本研究の新規性として、これまでになかった全身麻酔下の手術後に高頻度で嘔吐行動を呈する PONV 動物モデルを作成したこと、また、はじめて PONV に関連したトランスクリプトーム解析をスunksで行った研究であること、PONV の関連遺伝子を同定することで、治療薬の創薬に繋がる可能性があることが挙げられる。

## 5. 研究方法

### 5.1. モデル動物スunks

全ての動物実験は、「東北大学における動物実験等に関する規定」に従い（承認番号: 2017 医動-236, 2019-医動-020）実施した。

本研究では、生後7から10 週齢（体重35 gから50 g）の雌性JIC:SUN-Her/KwI系（嘔吐高感受性系統）スunks（紀和実験動物研究所, 和歌山）を用いた。スunksの飼育環境に関しては、C57BL/6系マウスを同時に飼育し、その囀マウスを微生物モニタリングに提出して、*Citrobacter rodentium*, *Salmonella* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Corynebacterium kutscheri*の培養検査, Sendai virus, *Mycoplasma pulmonis*, Mouse hepatitis virus, *Clostridium piliforme*の血清検査, Intestinal protozoa, Ectoparasites, Pinwormの検鏡検査を行い、全てのSPF項目について陰性であることを確認した。

すべてのスunksは室温が  $22 \pm 2$  °C, 湿度が  $55 \pm 5$  %, 全新鮮空気による換気回数は 10 ~15 回/時, 照明時間は 12 時間サイクルで, 8:00~20:00 を明とし, 他の時間帯を暗の条件に設定した。微生物学的グレードはコンベンショナルで, 水と餌は自由摂取とした。附属動物実験施設で 1 週間以上飼育して, 環境への馴化に努めた。

### 5.2. スunks術後悪心嘔吐モデルの作成

スunksにおけるイソフルランの最小肺胞内濃度 (Minimum alveolar concentration: MAC) に関する報告はないため, Eger らの方法や Niemann らの方法に準じて手術に必要なイソフルランの吸入濃度を計算し決定した<sup>21,22</sup>。即ち、スunksの麻酔導入用の容器 (縦 10 cm, 横 15 cm, 高さ 10 cm) に移送し、酸素を毎分 3 L の流量で投与しながらイソフルラン (ファイザー株式会社, 東京) を吸入させ, 30 分後に容器内で尻尾を鉗子で挟み (尻尾遮断試験), 1 分以内に疼痛のため四肢を動かす, 若しくは頭部を挙上させた場合は麻酔不十分と判断し, イソフルラン濃度を 2 割上昇させて 30 分後に再検した。1 %の吸入濃度より開始して繰り返し行い, 鉗子による疼痛刺激を 1 分間継続しても体動が生じない濃度を本実験系に必要なイソフルランの MAC であると判断した。この試験を 3 検体で行い, 平均値を計算し, その 1.5 倍の吸入濃度を手術に適切な吸入濃度とした。

手術モデルは, Martin らのラット手術モデルを一部, 改変して設計した<sup>23,24</sup>。実験に先立ち, 研究開始 30 分前に, 飼育ケージから観察用の透明アクリル製円筒 (直径 20 cm, 高さ 30 cm) の内側へスunksを移送し, 30 分間, 実験観察環境に馴化させることに努めた (図 4A)。本研究では, 嘔吐行動を容易に観察できるよう, 処置前に絶飲食期間は設定しなかった。次にスunksを麻酔導入用の容器に移送し, 酸素を毎分 3 L の流量で投与しながらイソフルランの濃度を徐々に 4 %にまで上昇させ, 5 分間かけて緩徐に麻酔を導入した (図 4B)。

次に手術台にスunksを移送, 仰臥位にて保定した。マスクで酸素を毎分 1 L の流

量で投与しながら自発呼吸下に 5 %イソフルランを吸入させて麻酔を維持し、下腹部を剃毛の後、70 %エタノールと 10 %ポピドンヨードを用いて腹部を消毒した。保定と剃毛及び消毒は 3 分間で行った。下腹部正中をメスで 1 cm縦切開して腹腔内に到達し、綿棒にて小腸を 30 秒間攪拌した後、筋層、皮膚をそれぞれ 3-0 のサージロン (Covidien Ltd., Minneapolis, MN, USA) で縫合した。手術は 7 分間で行った (図 5)。

手術後、スunksを観察用の透明アクリル製円筒へ静かに移送し、麻酔後の嘔吐行動開始までの時間、嘔吐行動の回数と継続時間、覚醒して体動を開始するまでの時間を 30 分間計測した。本研究では明らかな体動の開始を、麻酔からの覚醒と定義した。吐物を伴わないが、嘔吐時に生じる腹部の収縮を起こすだけのレッチングも嘔吐として数えた。間隔が 2 秒以上ある嘔吐行動は別個の嘔吐行動として数えた。観察用円筒の背面には鏡を 2 枚配置し、前方および上方から 2 台のデジタルビデオカメラを用いて嘔吐行動を記録して、後日、嘔吐回数を再度計測した (図 4C)。このイソフルラン麻酔下に手術を行い、麻酔終了後に嘔吐行動を計測した実験条件をスunks PONV モデルと考え、手術群と定義した ( $n = 9$ )。モデルの典型例を図 4D (6 分 19 秒の動画)で示す。

比較対照として麻酔群 ( $n = 6$ ) と覚醒群 ( $n = 6$ ) の 2 群を設定した (図 6, 図 7)。麻酔群は、30 分間馴化の後、手術モデルと同様に緩徐に麻酔を導入し、3 分間で保定と下腹部の剃毛、消毒を行い、5 %イソフルランを 7 分間吸入した後、手術を

せずに観察用円筒に移送した実験条件で、介入は麻酔単独だけのシャム手術と考えた。覚醒群は、馴化の後、麻酔導入用の容器に移送して、麻酔薬の投与は行わず、酸素のみを毎分 3 L の流量で 5 分間投与し、観察用円筒へ移送した実験条件で、無処置（ナীব）であり、陰性対照と考えた。2 つの対照においても手術群と同様に、処置後の嘔吐回数を計測し、後日ビデオカメラを用いて嘔吐回数を再度計測した。なお、この嘔吐行動実験の測定系開発にあたっては、過去の研究でスunksに嘔吐を惹起することが明らかな、超純水で溶解したニコチン酒石酸塩（Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA）5 mg/kg をスunks背部に皮下投与し、観察用円筒で嘔吐回数を計測することで、実験系の妥当性を確立した（n = 3）<sup>16</sup>。

### 5.3. 嘔吐中枢からの全量 RNA の抽出

覚醒群は酸素投与開始から 60 分後、麻酔群と手術群は酸素およびイソフルラン投与開始から 60 分後に 10%二酸化炭素を吸入させて、ギロチンで断頭して、迅速にスunks全脳を摘出した。液体窒素で冷却したイソペンタン（富士フィルム和光純薬株式会社、大阪）に全脳を浸して凍結させ、ラット脳地図を基に、低温実験室で孤束核を en bloc に切り出し（図 8）、20  $\mu$ L の RNA later（Qiagen N.V., Venlo, Nederland）に浸漬させ、-20℃で保存した。

後日、冷凍保存した孤束核組織片から、NucleoSpin RNA/Protein Kit（Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany）を用いて、全量 RNA を



抽出した。孤束核組織片をホモジナイズして作成した懸濁液から、シリカメンブレンを用いて核酸のみを取り出し、リコンビナント DNase を用いて DNA を分解除去し、全量 RNA 溶液を 50  $\mu$ L 作成した。微量吸光光度計 (NanoDrop2000, Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, MA, USA) を用いて、A260:A280 比が 1.9 以上であることを確認した後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

その後、覚醒群、麻酔群、手術群から無作為に 3 検体ずつ抽出し、蛍光光度計 (Qubit3.0 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific) の高感度モードを用いて計測した濃度を基に、250 ng の全量 RNA を計量して、次の RNA シークエンス実験に供した。

#### **5.4. 次世代 DNA シークエンサーを用いた RNA シークエンス**

それぞれの検体を次世代 DNA シークエンサー (HiSeq 2500 system, Illumina, Inc, San Diego, CA, USA) を用いて RNA シークエンスを行った。cDNA ライブラリーの調製には、NEXTFLEX Illumina Rapid Directional RNA-Seq Library Prep Kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いた。オリゴ (dT) ビーズを用いて、mRNA 分画を抽出した。次に、断片化、逆転写、3'末端のアデニル化、およびアダプター配列結合を行った。得られた cDNA ライブラリーを Polymerase chain reaction (PCR) で増幅させ、BioAnalyzer 高感度 DNA キット (Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA, USA) を用いて、サイズ分布と濃度を

測定した。すべてのライブラリーをプールして、2 nM の濃度に希釈して一本鎖にした。その後、10 pM の濃度に希釈し、TruSeq v2 Rapid flow cell にロードして、次世代 DNA シークエンサー (Illumina HiSeq 2500, Illumina, Inc) でシークエンスを行った。シークエンスリードは FASTQ 形式ファイルで作成した。

## 5.5. スーパーコンピューターを用いたインシリコ解析

図 9 にインシリコ解析の概要を示す。東北大学東北メディカルメガバンク機構のスーパーコンピューターを用いてインシリコ解析を行った。Phase2 システムの公開区画 10 TB を使用した。OS は RedHat Enterprise Linux 7 で、GCC および Intel Parallel Studio XE 2018 Composer Edition for Fortran & C++ Linux コンパイラでコンパイルした。シークエンスリードは Dropbox (Dropbox, Inc, San Francisco, CA, USA) を経由して、東北大学東北メディカルメガバンク機構のスーパーコンピューターにダウンロードした。FastQC ソフトウェア (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) を用いて、シークエンスリードの精度を検証した。次に Bowtie2 ソフトウェア (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA) を用いてシークエンスデータをスunks参照ゲノム (Ous:KAT-227c 系, Coding sequence + Untranslated region (CDS+UTR) 配列, 日本スunksゲノムプロジェクト, 2019 年 8 月時点で未出版) ヘマッピングし、SAM 形式ファイルを作成した<sup>25</sup>。さらに TIGAR2 ソフトフェ

ア (東北大学東北メディカルメガバンク機構, 宮城)を用いて, データをアSEMBルしてスプライシングバリエーションの違いも考慮した mRNA の発現量を, 100 万リードにつき, 1 kb あたりにマップされ, 正規化されたリード数 (Fragments per kilobase of exon per million reads mapped: FPKM) で定量した<sup>26</sup>。

覚醒群と手術群, 麻酔群と手術群, 覚醒群と麻酔群についてそれぞれ発現差異解析を行った。edgeR ソフトウェア ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) を用いて, 個々の遺伝子や mRNA の発現量について確率分布 (負の二項分布) を推定して, 群間の差を検定した<sup>27,28</sup>。比較結果を, MA プロットで可視化した<sup>27,28</sup>。

## 5.6. パスウェイ解析を用いた術後悪心嘔吐と関連する遺伝子の推定

発現差異解析の結果から, 覚醒群と手術群間で差があった上位 100 の遺伝子に着目して, IPA ソフトウェア (Ingenuity Pathway Analysis, Qiagen N.V.) を用いてパスウェイ解析を行い, PONV との関連が示唆されるパスウェイを同定した<sup>29,30</sup>。引き続き解析で注目したパスウェイに関しては, パスウェイを構成する分子をコードする遺伝子の発現量 (FPKM 値で表す) を覚醒群, 麻酔群, 手術群のそれぞれについて算出した。

## 5.7. GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬のスunks嘔吐行動への効果

パスウェイ解析の後にスunks PONV モデルに Gamma-aminobutyric acid

(GABA)<sub>B</sub>受容体作動薬であるバクロフェン塩酸塩を投与して、嘔吐行動の変化を観察した。バクロフェン塩酸塩（富士フィルム株式会社，大阪）を1 mol/L塩酸（関東化学株式会社，東京）に溶解し，等量の1 mol/L水酸化ナトリウム液（関東化学株式会社）で中和して，濃度1 g/Lのバクロフェン塩酸塩溶液（基剤は1 mol/Lの塩化ナトリウム水溶液）を作成した。手術群に対し，消毒後にバクロフェン塩酸塩溶液を0.2 mL（バクロフェン5 mg/kg）上腹部に腹腔内投与し，1分間の間隔を置いた後，下腹部を先述の如く7分間で手術した。術後，観察筒に移送して覚醒後の嘔吐行動を観察した（バクロフェン群：n = 6）。また，対照として，手術群に対し，消毒後に1 mol/L塩化ナトリウム水溶液を0.2 mL上腹部に腹腔内投与し，1分間の間隔を置いた後，下腹部を先述の如く7分間で手術する，溶媒対照群（n = 6）を設定した。手術後，嘔吐行動の計測は最初の嘔吐行動実験と同様に行った。

## 5.8. 統計解析

データは中央値（四分位範囲）で表した。行動実験の統計解析は，EZRソフトウェア（自治医科大学埼玉医療センター，埼玉）を用いて行った。EZRソフトウェアは，RソフトウェアにおけるRコマンドーのカスタマイズ機能を利用して，多彩な統計解析機能を組み込んだ統計ソフトであり，S言語に基づくスク립トを入力する事無く，解析を行うことを可能にしたソフトウェアである<sup>31</sup>。

嘔吐行動の解析には、二群間の比較には Mann-Whitney U 検定を行い、3 群間以上の比較には Kruskal-Wallis 検定を行い、Steel-Dwass 検定で多重比較を行った。P 値 0.05 未満を統計学的有意とした。発現差異解析では、多重比較であるため、偽陽性率 (False discovery rate: FDR) も算出した。パスウェイ解析の結果比較は Fisher の正確確率検定を行い、P 値 0.01 未満を統計学的有意とした。

## 6.研究結果

### 6.1. スンクス PONV モデルの確立

3 検体における尻尾遮断試験の結果, 体動を生じたイソフルランの吸入濃度は, それぞれ 2.5 %, 3 %, 3 %であったため, 本実験系におけるスンクスの MAC を 2.83 % とし, 手術を施行するのに適切なイソフルラン濃度は 4.25 % と決定された。

予備的に行われたニコチン酒石酸塩投与後のスンクスでは嘔吐行動は 12 (7) 回であった。ニコチン酒石酸塩投与後の嘔吐行動までの潜時は 320 (45) 秒で, 嘔吐行動の継続時間は 220 (145) 秒であった。図 10 に嘔吐行動回数の結果を示す。覚醒群では, 嘔吐行動を認めなかった。麻酔群の嘔吐行動は, 6 (1) 回であった。手術群の嘔吐行動は 6 (8) 回であった。3 群間で比較すると, 手術群および麻酔群で覚醒群に比べ有意に嘔吐回数が多く, 手術群と麻酔群では嘔吐回数に有意差がなかった [ $P = 0.007$ ,  $P = 0.02$  (覚醒群 vs. 手術群),  $P = 0.005$  (覚醒群 vs. 麻酔群),  $P = 0.97$  (手術群 vs. 麻酔群)] (図 10)。図 11 に行動実験における手術群と麻酔群での, 嘔吐行動を認めた時間および体動を開始するまでの時間を表したグラフを示す。麻酔終了から最初の嘔吐までの潜時は, 手術群において 130 (105) 秒, 麻酔群において 180 (87.5) 秒であり, 2 群間に有意差はなかった ( $P = 0.95$ )。嘔吐行動の継続時間は, 手術群において 80 (175) 秒, 麻酔群において 130 (35) 秒であり, 2 群間に有意差はなかった ( $P = 0.68$ )。麻酔終了後, 覚醒し体動を開始するまでの時間は, 手術群において 240 (130) 秒, 麻酔群において 145 (40) 秒であり, やや

手術群において長い傾向があるが、2群間に統計学的有意差はなかった ( $P = 0.06$ )。

手術操作において、麻酔死、手術死、出血等の合併症は生じなかった。

## 6.2. PONV モデルの孤束核における全 52381 個の mRNA の発現量測定

RNA シークエンスへ供した各群 3 検体ずつにおける覚醒までの時間および嘔吐回数はそれぞれ覚醒群で 0 回, 0 回, 0 回, 手術群で 1 回 (覚醒までの時間 130 秒, 潜時 130 秒, 継続時間 5 秒間), 6 回(覚醒までの時間 240 秒, 潜時 430 秒, 継続時間 80 秒間), 9 回 (覚醒までの時間 180 秒, 潜時 170 秒, 継続時間 160 秒間), 麻酔群で 4 回(覚醒までの時間 60 秒, 潜時 210 秒, 継続時間 40 秒間), 6 回(覚醒までの時間 150 秒, 潜時 170 秒, 継続時間 120 秒間), 6 回(覚醒までの時間 210 秒, 潜時 200 秒, 継続時間 300 秒間)であった (図 11)。

RNA シークエンスに用いた全量 RNA 溶液 ( $n = 9$ ) の濃度は 38.6 (24.6) ng/ $\mu$ L であった。シーケンスされた各検体のリード数の平均は 94605072 であった。平均の GC 含量 (塩基配列中に占めるグアニンとシトシンの割合) は 49.5 %であった。リードのトリミングは行わなかった。Bowtie2 ソフトウェアによるマッピング率は 59.7 %であった。TIGAR2 ソフトウェアを用いて発現を確認できた mRNA は全部で 52381 個あり、それぞれについて発現量を測定した。edgeR ソフトウェアですべての mRNA のうち、覚醒群と手術群では発現量の差が大きかった上位 100 の mRNA を同定した (図 12, 表 1)。FDR が 0.05 未満の mRNA は 19 個であった (表 1)。

麻酔群と手術群について行った発現量解析では  $P$  値が 0.05 未満の mRNA は 920 あり, その中で FDR が 0.05 未満のものは ITM2C, KIF1B, SDC3 の 3 遺伝子であった。覚醒群と麻酔群について行った発現量解析では  $P$  値が 0.05 未満の mRNA は 855 あり, その中で FDR が 0.05 未満のものは ITM2B, LOC101992430, APLP1, KCNAB2, KIF1C の 5 遺伝子であった。それぞれについて MA プロットを用いた手法で発現量を可視化した (図 13)。

### 6.3. GABA<sub>B</sub> 受容体シグナル伝達経路と PONV の関連

表 1 で表記した 100 個の遺伝子について IPA ソフトウェア (QIAGEN N.V.) を用いてパスウェイ解析を行った (図 9)。Fisher の正確確率検定において有意 ( $P < 0.05$ ) と算出されたパスウェイは 71 ヒットした。その中で特に  $P$  値が 0.01 未満のパスウェイは 14 であり、本研究においてはまずこの 14 から絞って検討することとした (表 2)。各パスウェイを構成するタンパクをコードする遺伝子は 100 個のうち 15 個であった (表 2 および表 3)。14 のパスウェイのうち 5 つ以上のパスウェイで関与する遺伝子は CACNB1, ADCY1, HRAS, AKT2 であった。この 4 つの遺伝子が翻訳するタンパクを PONV 治療薬の標的分子と考えるなら、パスウェイ間でのクロストークが増えるため薬の作用機序や刺激伝達経路が混線し、副作用が増大する可能性があると予想し、本研究においては先ずこの 4 つの遺伝子を標的として薬物を投与することは避け、必要に応じて今後の研究にて順に検証を行っていく計画とした。



今回は恣意的に、残りの 11 遺伝子のうち、GABBR1 遺伝子に着目して、14 のパスウェイの中のGABA<sub>B</sub>受容体シグナル伝達経路を検討することにした。図 14 にGABA<sub>B</sub>受容体シグナル伝達経路の概要と図 15 に覚醒群、手術群、麻酔群の GABA<sub>B</sub> 受容体シグナル伝達経路に関与する 3 つの遺伝子 (GABBR1 遺伝子, CACNB1 遺伝子, ADCY1 遺伝子) の発現を示す。いずれの遺伝子でも発現量において、統計学的有意差を認められなかったものの、3 群間で発現量がやや異なる傾向を認めた [GABBR1;  $P = 0.12$ ,  $P = 0.27$  (覚醒群 vs. 手術群),  $P = 0.97$  (覚醒群 vs. 麻酔群),  $P = 0.09$  (手術群 vs. 麻酔群), CACNB1;  $P = 0.054$ ,  $P = 0.09$  (覚醒群 vs. 手術群),  $P = 0.28$  (覚醒群 vs. 麻酔群),  $P = 0.27$  (手術群 vs. 麻酔群), ADCY1;  $P = 0.09$ ,  $P = 0.28$  (覚醒群 vs. 手術群),  $P = 0.11$  (覚醒群 vs. 麻酔群),  $P = 0.77$  (手術群 vs. 麻酔群)]。

#### 6.4. GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬バクロフェンによるunks嘔吐行動の抑制

図 16 に嘔吐行動回数の結果を示す。バクロフェン群では術後に嘔吐行動を認めなかった。溶媒対照群の嘔吐行動は 6 (4) 回であり、unksにおける術後の嘔吐行動はバクロフェンを併用することで有意に減少した ( $P = 0.003$ )。図 17 に行動実験における溶媒対照群とバクロフェン群での、嘔吐行動を認めた時間および体動を開始するまでの時間を示す。嘔吐までの潜時は麻酔終了から 343 (254) 秒で、嘔吐行動は 95 (83) 秒間継続した。覚醒までの時間はバクロフェン併用手術群で 250 (160)

秒, バクロフェン不併用手術群で 225 (34) 秒であり, 2 群間に有意差はなかった ( $P = 1$ ) 。

## 7. 考察

### 7.1. 研究結果の小括

容易に嘔吐する実験動物スunksを用いて、再現性のあるPONVモデルを作成し、その嘔吐中枢である孤束核でゲノム網羅的な遺伝子発現解析を行うことにより、PONVとの関連が示唆される遺伝子や生物学的パスウェイを同定した。さらに、GABA<sub>B</sub>受容体シグナル伝達経路に着目して、GABA<sub>B</sub>受容体作動薬であるバクロフェンがスunks PONVモデルで嘔吐行動を抑制することを確認した。

### 7.2. 本研究にて作成した動物モデルの新規性

揮発性吸入麻酔薬を使用した全身麻酔は、広く一般的に行われている麻酔方法であるが、その作用機序は完全には解明されておらず、揮発性吸入麻酔薬による意識消失の機序ですら完全には解明されていない。ゆえに揮発性吸入麻酔薬によるPONV発症機序も解明されていなかったが、今回、手術後、麻酔覚醒後に実際に嘔吐する動物モデルを作成することにより、PONVに関連するトランスクリプトーム変化を世界で初めて計測した。

研究の最初の段階で、再現性をもって嘔吐行動をする、スunksを用いたPONVモデルの作成に初めて成功した。スunksはアジアを中心に広く生息する動物であり、近年、実験動物として使用されているが、驚くべきことに本邦では、嘔吐高感受性系統スunksが確立・維持されている。先述の通りこの嘔吐高感受性系統スunksは、

サル, ネコ, フェレットに比べ小型で価格も安く, しかも他の動物と比較して高頻度で嘔吐することから, 本研究で確立したスunksの術後嘔吐行動モデルは, 今後のPONV研究において広く適用することができる点で, 非常に意義のある実験モデルであると考えられる。

先述した通り, スunksにおけるイソフルランのMACに関する報告はないため, 麻酔条件を新規に設定する必要があった。スunksとほぼ同体格の齧歯類であるマウスのイソフルランのMACはおよそ1.3%から1.7%で, ラットのMACもほぼ同じおよそ1.4%程度であり, 本研究で使用したイソフルランの吸入濃度はラットやマウスの実験動物に比して高濃度であったが, 尻尾遮断試験によって計算した簡易的なMACが2.86%であったこと, スunksの鼻は尖っており, マスクのフィットが悪く横から外気を吸入する恐れがあることを鑑みると, 麻酔維持で5%のイソフルランを用いる事は妥当であると判断した<sup>32,33</sup>。今回の麻酔濃度の設定は, 容器内のガス濃度をガスクロマトグラフィーにて計測していないため正確な値ではないが, スunksの吸入麻酔への感受性は低い可能性があると考えられた。

本研究では, 嘔吐行動の観察時間を30分間に設定し, 麻酔導入から60分後, すなわち手術終了45分後に二酸化炭素を用いて昏睡状態にさせ, 断頭して嘔吐中枢を摘出し, RNAを抽出しているが, この時点で脳を摘出した根拠として, 1) いずれのスunksにおいても, 嘔吐行動を示す場合, 嘔吐行動が麻酔終了より100秒から600秒の間に起きていること, 2) 予備実験において, 麻酔導入から60分後まではじっ

として動かず、反応も緩慢であり、その時点までは麻酔の影響が残存していると考えられたこと、3) 同様に麻酔導入から 90 分後までには通常通り餌を摂取し始め、反応も機敏になるため、その時点では既に麻酔の影響および悪心が軽減していると考えられたこと、4) PONV は手術終了直後から発症するため、遺伝子発現変化が生じるならば覚醒直後から既に発現の変化は生じていると考えられることから、麻酔導入から 60 分後が適切であると判断したためである。

安楽死の際に、10 %二酸化炭素を投与して昏睡状態を得た後に断頭するという方法を選択した理由として、頸椎脱臼では延髄周囲の脳組織を挫滅させる可能性があり、孤束核を正確に切り出すことが困難となる可能性があること、また、機敏に動く小さな動物であるため、延髄を傷つけず正確に断頭するには鎮静状態が必要であったこと、覚醒群は麻酔に暴露せずに切り出す必要があったことが挙げられる。

麻酔終了から嘔吐行動開始までの潜時は、手術群において 130 (105) 秒、麻酔群において 180 (87.5) 秒であった。Horn らの報告ではスunksに 0.5~3 %の濃度のイソフルランを吸入させた場合、潜時はおよそ 120 秒で、濃度が高い程潜時が長くなる傾向があった<sup>20</sup>。本研究では手術を行う必要があったため、先行研究に比して麻酔濃度を高く維持していたことを考慮すると、今回の結果は妥当だと考えられた。また、手術群における嘔吐回数の中央値は、麻酔群の嘔吐回数と差はないが、個体差が大きかった。本研究における嘔吐回数の中央値は、吸入麻酔暴露のみである Horn らの先行研究ともほぼ一致している<sup>20</sup>。その報告では術後の嘔吐行動は、手術内容よ

り寧ろ揮発性吸入麻酔薬の暴露によって規定されていると述べられている<sup>20</sup>。PONVの最大の危険因子が、疾患や手術術式より寧ろPONVの既往であることから、吸入麻酔薬の暴露がPONV発症の主な原因であると推測でき、麻酔群における本研究の結果は妥当であると言える。しかし、実際の臨床では、麻酔のみ施行し手術を行わないことは皆無であり、麻酔後悪心嘔吐という考え方は麻酔領域において一般的ではなく、ヒトにおいて麻酔のみで嘔吐を誘発するかという研究はあまり意味を持たない。実際に、一方で、手術群における嘔吐回数、嘔吐までの潜時、嘔吐継続時間のいずれにおいても値の分散が大きいことは、手術操作がPONVの発症に何らかの機序で関与していることが示唆される。実際に、内耳の手術や脳手術、乳腺、腹腔鏡下の手術はPONVの危険因子であると知られており、乳腺手術後のPONVの発生頻度は他の手術に比して有意に高く、47%~80%に上るとされている<sup>34</sup>。また、婦人科の手術もPONV発症の危険因子であることは広く知られており、雌性スunksの下腹部手術がPONVの発症に影響を与えた可能性がある<sup>35</sup>。図13で示した通り、麻酔群と手術群での遺伝子発現のプロファイルは異なっており、術後悪心嘔吐の要因は麻酔薬に起因するところが大きいとは思われるものの、手術要素も遺伝子発現を変える要因となることを示していると考えられる。そこで、GABA<sub>B</sub>受容体シグナル伝達経路に関与するタンパクをコードする3つの遺伝子、すなわちGABBR1遺伝子、CACNB1遺伝子、ADCY1遺伝子の3つの遺伝子の発現を、覚醒群、手術群、麻酔群の3群で検討した(図15)。実際に、RNAシーケンスを行ったサンプルで発現量を比較すると、

今回注目した GABA<sub>B</sub> 受容体遺伝子の発現量は麻酔群では覚醒群と差がなかったが、手術侵襲が加わった手術群では大きく発現が抑制される傾向にあった。また、CACNB1 遺伝子、ADCY1 遺伝子でも発現量に変化している傾向にあった。この結果は、吸入麻酔薬による遺伝子発現プロファイルの変化を、さらに手術侵襲が変容させる可能性を示し、何らかの手術術式とそれに伴う一定の様式の手術侵襲が PONV の発症に関与している可能性を示唆している。これは臨床での知見とも合致しており、本研究結果が PONV 発症の遺伝子レベルでの機序の一部であることを示唆している。

また、本研究における行動実験及びトランスクリプトーム解析に用いた動物のサンプルサイズは、動物実験の原則である 3R (Replacement, Reduction, Refinement) の原則の考えに則り、最小限の個体数で結果を出せるよう、行動実験では当初は各群 6、トランスクリプトーム解析では各群 3 で設定した。手術群のみ個体数が 9 となった理由は、切り出した孤束核から抽出できた mRNA の量がやや少ない可能性があり、追加で個体数を 3 追加したためである。実際は手術群の 9 検体全てで解析を続行するに十分な mRNA を抽出できていた。行動実験においては、統計学的に有意差を生じていることもあり、十分な設定数だったと考えられる。トランスクリプトーム解析においても、必要最小限のサンプルサイズとして各群三つ組みで解析し、整合性を確保した。

### 7.3. トランスクリプトーム解析による PONV 関連遺伝子の模索

RNA シークエンスに供した計 9 検体はランダムに抽出した。手術群においては嘔吐行動を生じなかった個体も認めたが、今回は手術群の 3 検体も全例嘔吐した個体から抽出されていた。次に孤束核より抽出した全量 RNA に対し、次世代 DNA シークエンサーを用いて行った RNA シークエンスに引き続き、スーパーコンピューターを用いてインシリコ解析を行った。インシリコとは、*in vivo* (生体内で) や、*in vitro* (ガラス、即ち試験管内で) などに準じて作られた用語で、文字通りには *in silico* (シリコン内で) という意味であるが、実際には「コンピューターを用いて」という意味であり、バイオインフォマティクスなどの研究で頻繁に認める表現である。

マッピングに使用するソフトウェアは、TopHat, TopHat2, HISAT, HISAT2, BWA, Bowtie, Bowtie2 でなどが広く用いられている<sup>36-38</sup>。今回私が Bowtie2 を選択した理由は、発現量の推定に用いる TIGAR2 ソフトウェアとの連携が容易であったためである。TIGAR2 ソフトウェアは、東北大学東北メディカルメガバンク機構で設計されたプログラムであり、非モデル生物の解析も可能な高精度な遺伝子発現量ソフトウェアである。TIGAR2 は、既存ツールである TopHat/Cufflinks, RSEM との比較では、転写量が小さい転写産物でも正確に転写量の推定が可能である<sup>26</sup>。

解析を始めるにあたり、2018 年 3 月の時点でスunksの参照ゲノム配列は一般公開されていなかったため、当初は、次世代シークエンサーを用いて得られたシークエンスデータを元に、Trinity ソフトウェアを用いて *de novo* で作成した配列を参照としてマッピングを行う計画であった<sup>39</sup>。しかし、スunksゲノムコンソーシアムの



メンバーである埼玉大学大学院理工学研究科 生命科学部門 教授 坂井貴文先生, 坂田一郎先生のご厚意で, コンソーシアムメンバーのみの使用に限られていた未公開のスunks参照ゲノムデータの使用を許可していただけることとなったため, 本研究の精度を格段に向上させることが出来た。本研究におけるリードのマッピングではマッピング率が 59.7 %であったが, これは使用した参照配列が CDS+UTR (所謂エクソン領域) に限られた配列であり, mRNA のイントロン領域に相当するリードがマッピングされなかった結果と判断し, マッピングの精度が低いことを意味しないと考えた。

edgeR を用いて, 覚醒群と手術群, 麻酔群と手術群, 覚醒群と麻酔群のそれぞれにつき mRNA の発現量比較を行った (図 12 および図 13)。麻酔群と手術群の比較では  $P$  値が 0.05 未満の mRNA は 920 あり, その中で FDR が 0.05 未満のものは ITM2C, KIF1B, SDC3 の 3 遺伝子であった。覚醒群と麻酔群の比較では  $P$  値が 0.05 未満の mRNA は 855 あり, その中で FDR が 0.05 未満のものは ITM2B, LOC101992430, APLP1, KCNAB2, KIF1C の 5 遺伝子であった。上述した通り, 麻酔群と手術群では行動実験における嘔吐回数に差が無かったが, 遺伝子発現という観点からすると発現プロファイルは異なる傾向を認めた。覚醒群と麻酔群でも発現に違いがある事から, 覚醒群, 手術群, 麻酔群の 3 群それぞれが異なった遺伝子発現を示した結果となった。これは麻酔暴露により生じる遺伝子発現変化を手術要素がさらに修飾し, 手術群では麻酔群とも異なるプロファイルとなったと考えられる。ここで,

3 群でそれぞれの群間で差のある遺伝子を同定し、その分子に対する作動薬および阻害薬を投与する方法も考慮したが、本研究での目的は PONV を抑制する分子を同定し、それにより PONV の機序を解明することであることから、麻酔暴露のみの要因で発現量が変化した遺伝子を標的とするよりも手術要素を加えた群と覚醒群を比較することが肝要と判断し、以下の検討は覚醒群と手術群の比較で進めていく方針とした。

edgeR を用いた覚醒群と手術群の発現差異解析では差が大きかった、FDR が 0.05 未満の mRNA は 19 個であった。それぞれの遺伝子につき、文献を検証したところ、癌や腫瘍と関連の報告があるもの (RALGDS, AATK, HRAS) , イオンチャネル (KCNIP4, CACNB1) , 中枢神経および神経伝達に関与するもの (KIF1C, MYRF, DENND5A) などがあることが判明した<sup>40-47</sup>。当初は、それぞれの遺伝子につき、発現が増加している分子に対しては阻害薬を、発現が減少している分子に対しては作動薬を投与し、嘔吐行動に変容を認められるかを順に検証していく計画も立案したが、過去の文献を鑑みると、嘔気嘔吐との関連を示唆するような報告がないことから、先ずはこの結果のみで判断することを避け、本研究ではパスウェイ解析から検証を開始する事とした。

パスウェイ解析は、数百から数千にも及ぶ発現変動遺伝子を網羅的に判断するためのツールであり、遺伝子の相互作用を生物学的パスウェイに当てはめて考え、代謝経路や細胞内シグナル伝達や代謝経路における分子の繋がりを検討する手法である<sup>29,30</sup>。本研究ではパスウェイ解析に IPA ソフトウェアを用いた。IPA は博士号を持つ

科学者が、500以上の医学雑誌から人力でヒト、マウス、ラットの分子生物、遺伝子、遺伝子産物、低分子情報を抽出したデータベースを使用しており、信頼性の高いソフトウェアである。パスウェイ解析に投入する遺伝子セットは、検定する2群間において発現に有意差のあるもので構成するが、その優位水準は報告により様々で、FDRが0.05未満のRNAのみの報告から、発現比の絶対値を2倍以上とする報告、発現差をP値で0.05未満とする報告、上位数百とする報告などがある<sup>29,30,48,49</sup>。本研究でIPAに投入した遺伝子セットは有意差の大きい上位100と設定したが、2群間の発現比は2倍以上かつP値は0.001であり先行研究に矛盾しない。パスウェイ解析は投入する遺伝子の数を増やすほどヒット数が増え、有意なパスウェイの見逃しが減少するため、多数の遺伝子データセットを投入するべきであるが、本研究において投入するRNAのデータセットを上位100とした理由は、有意差の小さな多数の遺伝子を投入すると偽陽性の危険性が増し、検出されたパスウェイの検証が困難になると考えたためである。仮にFDR < 0.05である19の遺伝子名のみを投入するとFisherの正確確率検定においてP < 0.05と算出されるパスウェイは24ヒットし、その中には今回注目したGABA<sub>B</sub>受容体に関わるパスウェイは含まれなかった（偽陽性を恐れるがあまり、投入する遺伝子データセットが少なくなり有意なパスウェイを見逃してしまうということ。この事実は研究結果の項で示していない）。投入するトランスクリプトを増やすとヒットするパスウェイも増加するが、有意差が上位のパスウェイに変化はないため、今回は上位100の結果で検討を続けることとした。最終的には

GABA<sub>B</sub> 受容体シグナル伝達経路に着目した。その理由を 7.4.にて詳細に説明する。

#### 7.4. GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬バクロフェンによる嘔吐行動の抑制機序

GABA は中枢神経系における主要な抑制性神経伝達物質の 1 種であり、GABA 受容体にはイオンチャネル型の GABA<sub>A</sub> 受容体と、G タンパク質共役型受容体である GABA<sub>B</sub> 受容体が存在する。

GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬であるベンゾジアゼピン系薬剤やプロポフォールは、強力な鎮静作用を有しており、抗不安薬、睡眠導入薬、全身麻酔薬として広く使用されている。特にプロポフォールは制吐作用を有するとされており、PONV の既往がある患者に対する全身麻酔に用いられている。しかし、プロポフォールを用いても PONV の発症を完全に抑えることは出来ない<sup>1,9</sup>。また麻酔効果に個体差がある事、肝代謝であり肝機能が低下している患者に使用できない事、プロポフォール注入症候群（横紋筋融解、急性腎障害、乳酸アシドーシス、異常高体温、脂質異常症を呈する致死的合併症）を発症する危険性があるなど、使用には注意が必要である。また、同様に GABA<sub>A</sub> 作動薬であるベンゾジアゼピン系薬剤の制吐作用は強くないとされており、GABA<sub>A</sub> 受容体の制吐作用は未だはっきりと解明されていない。

今回の研究におけるパスウェイ解析の結果では、手術群のスunksでは GABA<sub>B</sub> 受容体遺伝子発現が減少すると算出された。図 14 に示すように GABA<sub>B</sub> 受容体は G タンパク質共役型受容体であり、それぞれ 7 回膜貫通型タンパクである GABA<sub>B1</sub> サブユ

ニットと GABA<sub>B2</sub> サブユニットの二量体で構成されている。今回発現が抑制された GABBR1 は GABA<sub>B1</sub> サブユニットをコードしており、その GABA<sub>B1</sub> サブユニットは細胞外ドメインを介してリガンドを認識する機能を有している。GABA<sub>B</sub> 受容体が活性化すると、G タンパクのサブユニットである Gai を介してアデニル酸シクラーゼ活性を低下させる。また、Gβγ複合体を介して電位依存性カルシウムチャネルを閉口させる。そのため、神経終末では活動電位が到達しても伝達物質の放出が起こりにくくなり、GABA 作動性神経終末においては、自ら放出した GABA によってその後の放出を抑制する自己受容体 (auto receptor) として働く。また、GABA<sub>B</sub> 受容体を介した反応は、GABA<sub>A</sub> 受容体であるイオンチャネル型受容体よりも遅く、長い時間の抑制作用を持っており、結果として強かに神経活動を低下させる。図 14 で示すように、IPA によるパスウェイ解析の結果、手術群では GABBR1 および CACNB1 の発現量が減少し、ADCY1 の発現量が増加していると算出された。GABBR1 は GABA<sub>B</sub> 受容体の B1 サブユニットを、CACNB1 はカルシウムチャネルを、ADCY1 はアデニル酸シクラーゼをそれぞれコードしているので、手術群では GABA<sub>B</sub> 受容体とカルシウムチャネルの発現量が減少し、アデニル酸シクラーゼの発現量が増加していることが予想された。

シナプス後細胞の GABA<sub>B</sub> 受容体数の減少は、GABA を介する神経のシグナル伝達を低下させる可能性がある。細胞内へのカルシウムイオンの流入が GABA 放出のトリガーであることから、カルシウムチャネルの減少は GABA の放出を減少させ、GABA を介する神経シグナルを更に低下させる可能性がある。また、GABA を介する神経シ

グナルはアデニル酸シクラーゼ活性を低下させ、続くシグナルを抑制する作用を持つが、手術群では GABA 刺激自体が減少しているのみならず、アデニル酸シクラーゼ自体も増加しているため、全体として GABA を介する抑制系シグナル伝達が強力に低下している可能性がある。

最後の嘔吐行動実験で用いたバクロフェンは GABA の誘導体で、GABA<sub>B</sub> 受容体に選択的に結合する薬剤である。脊髄の単シナプス及び多シナプス反射の両方を抑制し、 $\gamma$ -運動ニューロンの活性を低下させる抗痙縮剤である<sup>50</sup>。痙性麻痺患者において他動的伸展反射及び誘発筋電図法による検討の結果、クローヌス等の減少及び H 波回復曲線の改善作用が認められている<sup>51</sup>。また、バクロフェンは分子量 213.661 g/mol と小さな分子であるため、ネコやブタを用いた実験で、腹腔内や静脈内に投与されると血液脳関門を容易に通過し、鎮痛覚閾値を上昇させ、鎮痛作用を有するとされている<sup>52,53</sup>。临床上、バクロフェンは、既存治療で効果不十分な脳脊髄疾患に由来する重度の痙性麻痺に適応のある薬であり、四肢の痙縮や拳上障害、こわばり感、痛み、歩行障害等に対して高い改善が認められている。また、近年アルコール依存症に対する有用性が示唆されており<sup>54</sup>、中脳辺縁ドーパミン経路を抑制的に調節し、依存状態を改善すると考えられている<sup>54</sup>。

ヒトにおいて通常の治療量として用いられるバクロフェンの投与量は、50  $\mu$ g (髄腔内投与)から 25 mg (内服)である。ヒトの場合、200 mg 程度以上の過量投与で呼吸抑制や痙攣が生じるという報告があるが、ラットを用いた実験で通常用いられる投与量は 1

mg/kg 以上で、致死量は 145mg/kg とされている<sup>55-57</sup>。ラットに対し 114 mg/kg を投与して痙攣を観察した研究や、上述のようにネコやブタを用いた研究からも、ヒトと実験動物とではバクロフェンの特異性が異なっていると考えられる<sup>52,57</sup>。スunks におけるバクロフェンの特異性を観察した研究はないが、本研究でのバクロフェンの投与量はラットへの投与量を参考にした。

近年の研究で、バクロフェンが GERD 患者において下部食道括約筋弛緩を阻害し、胃食道逆流の症状を軽減する報告がなされている<sup>52,58-61</sup>。バクロフェンの 40 mg の内服は GERD 患者において食道内の pH 低下を抑制することが報告された<sup>62</sup>。また、健常者においても、バクロフェンは一過性の下部食道括約筋弛緩を阻害し、食道の pH を低下させないという報告もある<sup>60</sup>。河合らは、バクロフェンが心身障害児における嘔吐の発症頻度を低下させることを報告した<sup>62</sup>。孤束核は嘔吐中枢であると同時に、咽頭や胃からの求心性刺激による下部食道括約筋の弛緩を制御していると考えられている。GABA は中枢神経系における重要な抑制性神経伝達物質であるが、GABA<sub>B</sub> 受容体は孤束核の迷走神経求心性末端に豊富に存在しており、GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬であるバクロフェンは一過性に生じる下部食道括約筋の弛緩を制御することで嘔吐行動を抑制していると考えられる。

これらの報告から、本研究において PONV を抑制する可能性のある分子の標的として、GABA<sub>B</sub> 受容体シグナル伝達経路に着目するに至った。GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬は、本研究におけるスunks 手術モデルにおいても嘔吐を抑制できる可能性があると思

説を立て、実際に手術モデルに投与し、結果として実際に嘔吐行動を抑制できたのは、上述の機序の通りであると考えられる。

PONV の危険因子の一つに動揺病の既往が挙げられるが、前庭から孤束核への刺激伝達は GABA<sub>B</sub> 受容体を介しており、GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬が動揺病の症状を改善するという報告がある<sup>1,2,63</sup>。14 のパスウェイのうちバクロフェンは嘔吐行動のみならず全身麻酔術後の悪心をも軽減している可能性がある。

バクロフェンの主な副作用として、呼吸抑制と意識障害が挙げられ、過量投与により症状が悪化するとされている<sup>57</sup>。また、催眠鎮静薬、抗不安薬、麻酔薬との相互作用によっても中枢神経抑制作用が強くなることが知られている<sup>64</sup>。今回の制吐作用が、バクロフェンの過量投与および麻酔薬との相互作用による過鎮静状態で引き起こされた可能性も鑑別に上げる必要があるが、図 17 にて示した通り、手術終了後に覚醒し動き回るまでの時間は、バクロフェン投与下手術群で 250 (160) 秒、バクロフェン非投与下手術群で 225 (34) 秒であり、2 群間に有意差はなく ( $P = 1$ )、バクロフェン非投与下手術群において未覚醒のまま嘔吐する個体も 1 体いたことから、鎮静作用のみで制吐作用が生じている訳ではないと考えられる。

## 7.5. 今後の展望と限界

本研究では嘔吐中枢における遺伝子発現の変化をゲノム網羅的に捉え、PONV と関連する可能性のある遺伝子、タンパク、パスウェイを同定したことは、今まで不明で



あった PONV の機序解明に大いに貢献したと言えるかもしれない。また、今までの制吐薬とは異なる作用機序で制吐作用を得ることが出来たことは、既存薬物の新たな治療適応の可能性や、新薬の創薬の可能性に繋がるかもしれない。今後、この可能性をさらに追求するために、パスウェイ解析の結果で得られた残り 13 のパスウェイに関しても更なる検討を加えていく予定である。現在、表 2、表 3 の候補遺伝子のうち、とくに EGR1 遺伝子に興味を抱いている。EGR1 遺伝子は転写因子であり、全身の様々な臓器に発現し多岐に渡る機能を有しているが、嘔吐に関連した報告はない。パスウェイ解析の結果からは手術群における EGR1 遺伝子の発現量は、覚醒群と比較して有意に増加していることが分かっている。今後、EGR1 遺伝子の発現を減少させることで手術群における嘔吐行動が減少するかを確認する実験を計画しているところであり、PONV に対する核酸医薬の開発に繋がるかもしれない。

また、edgeR を用いて計算した、FDR < 0.05 の遺伝子 19 について、本研究では更なる検討を加えなかった。NCBI のデータベースに蓄積された先行研究には PONV との関連を示唆する分子は無かったが、本研究で検出された遺伝子単体でも PONV を抑制できる可能性はあり、今後、それぞれ作動薬や阻害薬の投与を検討する必要がある。

本研究において、スルクス手術モデルにおけるバクロフェンの制吐作用の機序は、孤束核における迷走神経求心性末端における GABA 作動によるとのものであると考察したが、この仮説は証明できていない。実際に孤束核における GABA<sub>B</sub> 受容体の発現

が低下しているかを検証するために、PCR 法による RNA 発現量の定量、ウェスタンブロット法による GABA<sub>B</sub> 受容体の定量、延髄レベルの脳切片の免疫組織染色による検証等を計画する必要がある。また、GABA<sub>B</sub> 受容体拮抗薬であるサクロフェンを同時に投与し、嘔吐行動に変容が認められるかも併せて行う必要がある。

また、GABA<sub>B</sub> 受容体シグナル伝達経路に関与するタンパクをコードする遺伝子において、手術群と覚醒群で発現差の大きかった GABBR1 遺伝子、CACNB1 遺伝子、ADCY1 遺伝子の 3 つの遺伝子の発現の検討は、RNA シークエンスに供した各 3 検体における FPKM 値でのみ行っている。発現プロファイルが異なることを示すためには全検体において PCR 法にて各遺伝子の発現量について検証する必要がある。これらの遺伝子における FPKM 値は大きくないため、定量に正確を期するためには PCR 法の中でも特にデジタル PCR 法を選択すべきである。ここで、スunksにおけるこれらの遺伝子の配列はマウスやラット、ヒトとも異なっており既存の PCR 用のプライマーは使用できないため、改めて自己設計する必要がある。そのため確実に増幅できない可能性があること、またその検証が煩雑であること、いずれにせよ行動実験を行う計画であったことから本研究では施行していない。

この研究の限界として、スunksの嘔吐行動が、嘔気を伴っているかは判断できず、嘔吐行動を抑制しても、悪心を抑制できているかを検討できない事が挙げられる。また、今回作成したスunksの PONV モデルは下腹部手術モデルであり、内耳の手術や脳手術、婦人科・乳腺の手術、腹腔鏡下の手術など PONV の危険因子となる手術によ

る嘔吐を抑制できるかは不明である。更に、麻酔暴露から 60 分後という RNA 抽出のタイミングが適切ではなく、他の有意な関連遺伝子を見逃している可能性がある事などが挙げられ、更なる検討が必要である。

## 8. 結論

スunks PONV モデルを確立して、嘔吐行動の観察に成功した。PONV モデルの孤束核で 52381 個の mRNA の発現量を測定した。発現差異解析とパスウェイ解析を用いて、GABA<sub>B</sub> 受容体シグナル伝達経路と PONV の関連に着目した。GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬バクロフェンはスunks嘔吐行動を抑制した。本研究ではスunks PONV モデルの孤束核におけるトランスクリプトーム変化が明らかになり、バクロフェンは新しい機序の PONV の治療薬となる可能性が示唆された。

## 9. 謝辞

本研究は日本学術振興会科学研究費基盤 (C) (16K10951) の助成を受けて行われた。

本研究を遂行するにあたり、終始適切な助言を賜り、丁寧に指導して下さった山内正憲教授に深く感謝いたします。また本研究に直接のご指導・ご鞭撻を頂いた杉野繁一先生を始めとした東北大学麻酔科学・周術期医学分野の皆様にも厚く御礼を申し上げます。

今村百可先生 (Dept. of Pharmacology, Biochemistry and Molecular Biology, Pennsylvania State University College of Medicine, Hershey, PA, USA) におかれましては、検体のRNAシーケンスを施行していただき、心より感謝申し上げます。また快くインシリコ解析の機会を与えて下さった長崎正朗先生 (東北メディカルメガバンク・バイオメディカル情報解析分野)、解析の基礎から丁寧に指導くださった柴田朋子先生 (東北メディカルメガバンク・バイオメディカル情報解析分野)、三澤計治先生 (東北メディカルメガバンク・バイオメディカル情報解析分野)、パスウェイ解析につきご助言を頂いた山下理宇先生 (国立がん研究センター東病院先端医療開発センター トランスレーショナルインフォマティクス分野)、植野和子先生 (東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学)、コンピューターの使用につき協力して下さった石沢興太先生 (東北メディカルメガバンク機構)、志藤光介先生 (東北大学大学院医学系研究科 皮膚科学分野)、太田悠自

様（東北大学医学部学生）におかれましては、スーパーコンピューターに関し全く無知であった私にも丁寧に解説下さり、心より感謝申し上げます。

スunksの参照配列につきまして、坂井貴文先生（埼玉大学理工学研究科 生命科学部門）、坂田一郎先生（埼玉大学理工学研究科 生命科学部門）におかれましては、ご厚意でコンソーシアムメンバーのみの使用に限られていた未公開配列の使用を快諾頂き、感謝申し上げます。

また、研究を通じて、大竹誠一様（東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設）、森川正喜様（東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設）におかれましては、研究科附属動物実験施設がスunksの飼養保管施設ではなかったにもかかわらず、認可の新規申請から実際の飼育に至るまでご尽力頂き、感謝申し上げます。

## 10. 参考文献

1. Gan TJ, Diemunsch P, Habib AS, et al. Consensus guidelines for the management of postoperative nausea and vomiting. *Anesth Analg*. 2014;118:85-113.
2. Gupta A, Stierer T, Zuckerman R, et al. Comparison of recovery profile after ambulatory anesthesia with propofol, isoflurane, sevoflurane and desflurane: a systematic review. *Anesth Analg*. 2004;98:632-641.
3. DREAMS Trial Collaborators and West Midlands Research Collaborative. Dexamethasone versus standard treatment for postoperative nausea and vomiting in gastrointestinal surgery: randomised controlled trial (DREAMS Trial). *BMJ*. 2017;357:j1455.
4. Tramèr MR, Reynolds DJ, Moore RA, et al. Efficacy, dose-response, and safety of ondansetron in prevention of postoperative nausea and vomiting: a quantitative systematic review of randomized placebo-controlled trials. *Anesthesiology*. 1997;87:1277-1289.
5. Diemunsch P, Gan TJ, Philip BK, et al. Single-dose aprepitant vs ondansetron for the prevention of postoperative nausea and vomiting: a randomized, double-blind phase III trial in patients undergoing open abdominal surgery. *Br J Anaesth*. 2007;99:202-211.

6. Scuderi PE, White PF. Novel therapies for postoperative nausea and vomiting: Statistically significant versus clinically meaningful outcomes. *Anesth Analg*. 2011;112:750-752.
7. Navari RM, Qin R, Ruddy KJ, et al. Olanzapine for the Prevention of Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting. *N Engl J Med*. 2016;375:134-142.
8. Mizukami N, Yamauchi M, Koike K, et al. Olanzapine for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting in patients receiving highly or moderately emetogenic chemotherapy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Pain Symptom Manage*. 2014;47:542-550.
9. Tramèr M, Moore A, McQuay H. Meta-analytic comparison of prophylactic antiemetic efficacy for postoperative nausea and vomiting: propofol anaesthesia vs omitting nitrous oxide vs total i.v. anaesthesia with propofol. *Br J Anaesth*. 1997;78:256-259.
10. Apfel CC, Korttila K, Abdalla M, et al. A factorial trial of six interventions for the prevention of postoperative nausea and vomiting. *N Engl J Med*. 2004;350:2441-2451.
11. Horn CC. Why is the neurobiology of nausea and vomiting so



- important? *Appetite*. 2008;50:430-434.
12. Luh C, Gierth K, Timaru-Kast, et al. Influence of a brief episode of anesthesia during the induction of experimental brain trauma on secondary brain damage and inflammation. *PLoS One*. 2011;6:e19948.
  13. Staib-Lasarik I, Kriege O, Timaru-Kast, et al. Anesthesia for euthanasia influences mRNA expression in healthy mice and after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2014;31:1664-1671.
  14. Horn CC, Wallisch WJ, Homanics GE, Williams JP. Pathophysiological and neurochemical mechanisms of postoperative nausea and vomiting. *Eur J Pharmacol*. 2014;722(1):55-66.  
doi:10.1016/j.ejphar.2013.10.037
  15. Horn CC, Kimball BA, Wang H, et al. Why can't rodents vomit? A comparative behavioral, anatomical, and physiological study. *PLoS One*. 2013;8:e60537.
  16. Horn CC, Meyers K, Oberlies N. Musk shrews selectively bred for motion sickness display increased anesthesia-induced vomiting. *Physiol Behav*. 2014;124:129-137.
  17. Horn CC, Henry S, Meyers K, et al. Behavioral patterns associated with chemotherapy-induced emesis: a potential signature for nausea in

- musk shrews. *Front Neurosci.* 2011;5:88.
18. Horn CC, Meyers K, Lim A, et al. Delineation of vagal emetic pathways: intragastric copper sulfate-induced emesis and viral tract tracing in musk shrews. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2014;306:R341-R351.
  19. Torrente C, Viguera I, Manzanilla EG, et. Prevalence of and risk factors for intraoperative gastroesophageal reflux and postanesthetic vomiting and diarrhea in dogs undergoing general anesthesia. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 2017;27:397-408.
  20. Horn CC, Meyers K, Pak D, et al. Post-anesthesia vomiting: impact of isoflurane and morphine on ferrets and musk shrews. *Physiol Behav.* 2012;106:562-568.
  21. Eger EI, Saidman LJ, Brandstater B. Minimum alveolar anesthetic concentration: a standard of anesthetic potency. *Anesthesiology.* 1995;26:756-763.
  22. Niemann CU, Stabernack C, Serkova N, et al. Cyclosporine can increase isoflurane MAC. *Anesth Analg.* 2002;95:930-934.
  23. Martin TJ, Kahn WR, Eisenach JC. Abdominal surgery decreases food-reinforced operant responding in rats: relevance of incisional pain.

- Anesthesiology*. 2005;103:629-637.
24. Kawano T, Yokoyama M. Relationship between analgesic dose of morphine and vomiting in rat model of postoperative acute pain. *PAIN Res*. 2012;27:227-231.
  25. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9:357-359.
  26. Nariai N, Hirose O, Kojima K, et al. TIGAR: transcript isoform abundance estimation method with gapped alignment of RNA-Seq data by variational Bayesian inference. *Bioinformatics*. 2013;29:2292-2299.
  27. Anders S, McCarthy DJ, Chen Y, et al. Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat Protoc*. 2013;8:1765-1786.
  28. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010;26:139-140.
  29. Krämer A, Green J, Pollard J, et al. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics*. 2014;30:523-530.
  30. Khatri P, Sirota M, Butte AJ. Ten years of pathway analysis: current approaches and outstanding challenges. *PLoS Comput Biol*.

2012;8:e1002375.

31. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48:452-458.
32. Sonner JM, Gong D, Li J, et al. Mouse strain modestly influences minimum alveolar anesthetic concentration and convulsivity of inhaled compounds. *Anesth Analg*. 1999;89:1030-1034.
33. de Wolff MH, Leather HA, Wouters PF. Effects of tramadol on minimum alveolar concentration (MAC) of isoflurane in rats. *Br J Anaesth*. 1999;83:780-783.
34. Sun R, Dai W, Liu Y, et al. Non-needle acupoint stimulation for prevention of nausea and vomiting after breast surgery: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98:e14713.
35. Gan TJ. Risk factors for postoperative nausea and vomiting. *Anesth Analg*. 2006;102:1884-1898.
36. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*. 2015;12:357-360.
37. Kim D, Pertea G, Trapnell C, et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene

- fusions. *Genome Biol.* 2013;14:R36.
38. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25:1754-1760.
  39. Grabherr MG., Haas BJ, Moran Y, et al. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nat Biotechnol.* 2013;29:644-652.
  40. Agapova LS, Volodina JL, Chumakov PM, et al. Activation of Ras-Ral pathway attenuates p53-independent DNA damage G2 checkpoint. *J Biol Chem.* 2004;279:36382-36389.
  41. Lee S, Bang S, Song K, et al. Differential expression in normal-adenoma-carcinoma sequence suggests complex molecular carcinogenesis in colon. *Oncol Rep.* 2006;16:747-754.
  42. Geyer FC, Li A, Papanastasiou AD, et al. Recurrent hotspot mutations in HRAS Q61 and PI3K-AKT pathway genes as drivers of breast adenomyoepitheliomas. *Nat Commun.* 2018;9:1816.
  43. Tang Y-Q, Liang P, Zhou J, et al. Auxiliary KChIP4a suppresses A-type K<sup>+</sup> current through endoplasmic reticulum (ER) retention and promoting closed-state inactivation of Kv4 channels. *J Biol Chem.* 2013;288:14727-14741.

44. Hogan K, Greg RG, Powers PA. Structure and alternative splicing of the gene encoding the human beta1 subunit of voltage dependent calcium channels. *Neurosci Lett*. 1999;277:111-114.
45. Dor T, Cinnamon Y, Raymond L, et al. KIF1C mutations in two families with hereditary spastic paraparesis and cerebellar dysfunction. *J Med Genet*. 2014;51:137-142.
46. Kurahashi H, Azuma Y, Masuda A, et al. MYRF is associated with encephalopathy with reversible myelin vacuolization. *Ann Neurol*. 2018;83:98-106.
47. Han C, Alkhatir R, Froukh T, et al. Epileptic encephalopathy caused by mutations in the guanine nucleotide exchange factor DENND5A. *Am J Hum Genet*. 2016;99:1359-1367.
48. Xu H, Qing T, Shen Y, et al. RNA-seq analyses the effect of high-salt diet in hypertension. *Gene*. 2018;677:245-250.
49. Yu J, Gu X, Yi S. Ingenuity Pathway Analysis of gene expression profiles in distal nerve stump following nerve injury: insights into wallerian degeneration. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:274.
50. Penn RD, Savoy SM, Corcos D, et al. Intrathecal baclofen for severe spinal spasticity. *N Engl J Med*. 1989;320:1517-1521.

51. Macdonell RAL, Talalla A, Swash M, et al. Intrathecal baclofen and the H-reflex. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1989;52:1110-1112.
52. Bolser DC, DeGennaro FC, O'Reilly S, et al. Peripheral and central sites of action of GABA-B agonists to inhibit the cough reflex in the cat and guinea pig. *Br J Pharmacol*. 1994;113:1344-1348.
53. Malcangio M. GABAB receptors and pain. *Neuropharmacology*. 2018;136:102-105.
54. Agabio R, Colombo G. GABAB receptor ligands for the treatment of alcohol use disorder: preclinical and clinical evidence. *Front Neurosci*. 2014;8:140.
55. Leung NY, Whyte IM, Isbister GK. Baclofen overdose: defining the spectrum of toxicity. *Emerg Med Australas*. 2006;18:77-82.
56. Chartier M, Malissin I, Tannous S, et al. Baclofen-induced encephalopathy in overdose - Modeling of the electroencephalographic effect/concentration relationships and contribution of tolerance in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018;86:131-139.
57. Chartier M, Tannous S, Benturquia N, et al. Baclofen-induced neuro-respiratory toxicity in the rat: contribution of tolerance and characterization of withdrawal syndrome. *Toxicol Sci*. 2018;164:153-

- 165.
58. Lidums I, Lehmann A, Checklin H, et al. Control of transient lower esophageal sphincter relaxations and reflux by the GABA(B) agonist baclofen in normal subjects. *Gastroenterology*. 2000;118:7-13.
59. Li S, Shi S, Chen F, et al. The effects of baclofen for the treatment of gastroesophageal reflux disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Gastroenterol Res Pract*. 2014;2014:307805.
60. Curcic J, Schwizer A, Kaufman E, et al. Effects of baclofen on the functional anatomy of the oesophago-gastric junction and proximal stomach in healthy volunteers and patients with GERD assessed by magnetic resonance imaging and high-resolution manometry: a randomised controlled double-blind st. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40:1230-1240.
61. Scarpellini E, Ang D, Pauwels A, et al. Management of refractory typical GERD symptoms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13:281-294.
62. Kawai M, Kawahara H, Hirayama S, et al. Effect of baclofen on emesis and 24-hour esophageal pH in neurologically impaired children with gastroesophageal reflux disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;38:317-323.



63. Cohen B, Dai M, Yakushin SB, et al. The neural basis of motion sickness. *J Neurophysiol.* 2019;121:973-982.
64. Cohen S, Bueno de Mesquita M, Mimouni FB. Adverse effects reported in the use of gastroesophageal reflux disease treatments in children: a 10 years literature review. *Br J Clin Pharmacol.* 2015;80:200-208.

## 11. 図説

### 図 1. 嘔気嘔吐の発生機序

嘔気嘔吐の伝達経路は大きく 5 つある。即ち、血液中の化学刺激を伝える最後野からの経路、消化管刺激を伝える迷走神経求心路、前庭器官からの動揺刺激を伝える第Ⅷ脳神経からの経路、心理的な要因など大脳辺縁系を介する経路、視覚中枢からの経路であるが、いずれ求心路も孤束核に到達して終止する。

### 図 2. スンクス

スンクス(学名 : *Suncus murinus*) は、哺乳綱・トガリネズミ目・トガリネズミ科・ジャコウネズミ属に分類される哺乳類である。体長は 12-16cm、体重は雄が 45-80g、雌が 30-50g。腹側や体側に匂いを出す分泌腺(ジャコウ腺)を持つことからジャコウネズミとも呼ばれる。肉食性の強い雑食性で昆虫類、節足動物、ミミズ等を食べる。繁殖形態は胎生で、交尾排卵である。1 回に 3-6 匹の幼体を出産する。子育ての時には幼体は別の幼体や親の尾の基部を咥え、数珠繋ぎになって移動する(キャラバン行動)。

図 3. 研究概要 (動物モデルの作成～RNA の抽出～コンピューター解析～阻害薬を用いた行動実験の再検証)

#### 図 4. スンクス嘔吐行動実験の環境

A) 術後観察用透明アクリル製円筒。開始 30 分前に円筒にスンクスを移送、実験環境に馴化させた、B) 麻酔導入用容器。透明のプラスチック製容器で、毎分 3L の酸素を投与しながらイソフルランの濃度を 4%まで上昇させて、緩徐に麻酔を導入した、C) 嘔吐行動観察のための機器配置。観察用円筒の背面に鏡を 2 枚配置し前面からビデオカメラで撮影することで、前後左右から死角無く嘔吐行動を観察した。円筒の上方からもビデオカメラで撮影した。D) 嘔吐行動の観察動画。手術手技及び嘔吐行動の解説を動画にした(<https://youtu.be/3nE52TshZjA>)。

#### 図 5. 手術群の作成のシエーマ

実験開始前に、観察用の透明アクリル製円筒へスンクスを移送し、30 分間、実験観察環境に馴化させた。次にスンクスを麻酔導入用の容器に移送し、酸素を毎分 3 L の流量で投与しながらイソフルランの濃度を徐々に 4 %にまで上昇させ、5 分間かけて緩徐に麻酔を導入した。次に手術台にスンクスを移送、仰臥位にて保定し、マスクで酸素を毎分 1 L の流量で投与しながら自発呼吸下に 5 %イソフルランを吸入させて麻酔を維持し、下腹部を剃毛の後、70 %エタノールと 10 %ポピドンヨードを用いて腹部を消毒した。保定と剃毛及び消毒は 3 分間で行った。下腹部正中をメスで 1 cm縦切開して腹腔内に到達し、綿棒にて小腸を 30 秒間攪拌した後、筋層、皮膚を縫合した。手術後、スンクスを観察用の透明アクリル製円筒へ静かに移送し、麻酔後

の嘔吐行動開始までの時間，嘔吐行動の回数と継続時間，覚醒して体動を開始するまでの時間を 30 分間計測した。

#### 図 6. 麻酔群の作成のシエーマ

実験開始前に，観察用の透明アクリル製円筒へスunksを移送し，30 分間，実験観察環境に馴化させた。次にスunksを麻酔導入用の容器に移送し，酸素を毎分 3 L の流量で投与しながらイソフルランの濃度を徐々に 4 %にまで上昇させ，5 分間かけて緩徐に麻酔を導入した。次に手術台にスunksを移送，仰臥位にて保定し，マスクで酸素を毎分 1 L の流量で投与しながら自発呼吸下に 5 %イソフルランを吸入させて麻酔を維持し，下腹部を剃毛の後，70 %エタノールと 10 %ポピドンヨードを用いて腹部を消毒した。保定と剃毛及び消毒は 3 分間で行った。麻酔群には手術処置をせずに 5 %イソフルランを 7 分間吸入した後，観察用の透明アクリル製円筒へ静かに移送し，麻酔後の嘔吐行動開始までの時間，嘔吐行動の回数と継続時間，覚醒して体動を開始するまでの時間を 30 分間計測した。

#### 図 7. 覚醒群の作成のシエーマ

実験開始前に，観察用の透明アクリル製円筒へスunksを移送し，30 分間，実験観察環境に馴化させた。次にスunksを麻酔導入用の容器に移送し，酸素のみを毎分 3 L の流量で 5 分間投与した後，観察用の透明アクリル製円筒へ静かに移送し，嘔吐

行動の回数と継続時間を 30 分間計測した。

#### 図 8. スンクス孤束核の切り出し

A: ラット脳の冠状断像, B: ラット脳の体軸断像

(Paxinos G, Watson C: The rat brain in stereotaxic coordinates hard cover edition. Access Online via Elsevier, Elsevier Inc, Amsterdam, Nederland, 2006; Figure 74, Figure 96 より改変引用) 青色の部分が孤束核、赤色の部分が最後野である。スンクスには一般的な脳地図が存在しないためラットの脳地図と、スンクスの嘔吐中枢を同定した Horn らの報告を参考にスンクスの孤束核を切り出した<sup>9</sup>。

#### 図 9. コンピューター解析の概要

黒文字は得られたデータ、白文字は解析に用いたソフトウェアを表す。

発現量の定量は、東北メディカルメガバンクのスーパーコンピューターを用いて行った。定量した発現量データから手術群と覚醒群を抽出し、二群間比較を行うことで、吸入麻酔下での手術を受けることによる遺伝子発現変化を検討できると考えた。二群間で発現量に特に差のある上位 100 の RNA を抽出し、パスウェイ解析を行った。その結果、嘔吐との関連が示唆される有意なパスウェイを 14 個検出することが出来た。

#### 図 10. 嘔吐行動実験の結果

嘔吐回数をドットプロットで示した。\* :  $P < 0.05$  vs. 覚醒群, \*\* :  $P < 0.01$  vs. 覚醒群。

図 11. 行動実験における手術群と麻酔群での、嘔吐行動を認めた時間および体動を開始するまでの時間

棒グラフはそれぞれの個体における嘔吐行動を認めた時間帯を表し、三角形はその個体における覚醒した時点を表す。手術群では 2 例に嘔吐行動を認めなかった。

図 12. edgeR を用いて描画した手術群と覚醒群の比較における全 mRNA の MA プロット

縦軸は  $\log_2$  変換されたシグナル値の差であり、横軸は  $\log_2$  変換されたシグナル値の平均値を示す。つまり  $\log_{FC} > 1$  は、ある遺伝子における覚醒群に対する手術群での発現量が 2 倍を超えて増加していることを意味し、 $\log_{FC} < -1$  は、ある遺伝子における覚醒群に対する手術群での発現量が 0.5 倍未満に減少していることを意味する。FDR  $< 0.05$  である 19 の mRNA を赤いプロットで記した (19 の遺伝子は表 1 において太字で示した上位 19 個を意味する)。

図 13. edgeR を用いて描画した麻酔群と手術群の比較、覚醒群と麻酔群の比較における全 mRNA の MA プロット

A: 麻酔群と手術群における mRNA の発現比較。FDR < 0.05 である 3 個の mRNA を赤いプロットで記した。

B: 覚醒群と麻酔群における mRNA の発現比較。FDR < 0.05 である 5 個の mRNA を赤いプロットで記した。

麻酔群と手術群, 覚醒群と麻酔群の比較においても孤束核における遺伝子発現は異なることが分かった。

#### 図 14. GABA 受容体伝達経路のシエーマ

緑は発現量が減少した分子、橙は発現量が増加した分子を表す。

IPA によるパスウェイ解析の結果, 手術群では GABBR1 および CACNB1 の発現量が減少し, ADCY1 の発現量が増加していると算出された。GABBR1 は GABA<sub>B</sub> 受容体の B1 サブユニットを, CACNB1 はカルシウムチャンネルを, ADCY1 はアデニル酸シクラーゼをそれぞれコードしているので, 手術群では GABA<sub>B</sub> 受容体とカルシウムチャンネルの発現量が減少し、アデニル酸シクラーゼの発現量が増加していることが予想された。

シナプス後細胞の GABA<sub>B</sub> 受容体数の減少は、GABA を介する神経のシグナル伝達を低下させる可能性がある。細胞内へのカルシウムイオンの流入が GABA 放出のトリガーである事から、カルシウムチャンネルの減少は GABA の放出を減少させ、GABA を介する神経シグナルを更に低下させる可能性がある。また、GABA を介する神経シグ

ナルはアデニル酸シクラーゼ活性を低下させ、続くシグナルを抑制する作用を持つが、手術群では GABA 刺激自体が減少しているのみならず、アデニル酸シクラーゼ自体も増加しているため、全体として GABA を介する抑制系シグナル伝達が強力的に低下している可能性がある。

#### 図 15. GABA 受容体伝達経路を構成する RNA の発現量

RNA シークエンスへ供した各群 3 検体における GABBR1, CACNB1, ADCY1 それぞれの発現量を FPKM 値で示した。いずれの遺伝子の発現量においても、三群間に統計学的有意差を認めなかった。

#### 図 16. バクロフェン投与による術後嘔吐行動の変化

嘔吐回数をドットプロットで示した。\* :  $P < 0.05$  vs. 溶媒対照群, \*\* :  $P < 0.01$  vs. 溶媒対照群。

#### 図 17. 行動実験における溶媒対照群とバクロフェン群での、嘔吐行動を認めた時間および体動を開始するまでの時間

棒グラフはそれぞれの個体における嘔吐行動を認めた時間帯を表し、三角形はその個体における覚醒した時点を表す。バクロフェン群では全例で嘔吐行動を認めなかった。



表 1. 手術群と覚醒群の比較において遺伝子発現量の差が大きい上位 100 遺伝子

手術群と覚醒群における発現差が大きい遺伝子を、その発現差が大きい順にソートした。この遺伝子データセットを用いてパスウェイ解析を行った。複数ある遺伝子はスプライシングバリエーションであり、同一遺伝子から異なった配列の mRNA が転写されたことを意味している。

表 2. IPA ソフトウェアによって算出された、手術群と覚醒群の比較において Fisher の正確確率検定による  $P$  値が 0.01 未満である上位 14 のシグナル伝達経路

シグナル伝達の名称, Fisher の正確確率検定による  $P$  値, シグナルを構成する全分子の中で該当した、本研究でパスウェイ解析に投入した遺伝子を示す。閾値を  $P$  値が 0.05 とすると 71 のシグナルがヒットしたが、検証は先ず、特に有意差の大きい 14 のパスウェイから行うこととした。14 のパスウェイを構成する遺伝子は 15 種類であった。表 3 にその詳細を示す。

表 3. 表 2 で示した各シグナルを構成する分子 (遺伝子) の詳細

各パスウェイを構成するタンパクをコードする遺伝子は、解析に投入した 100 の遺伝子データセット中、15 であった。順位は表 1 における有意差の順を表す。EGR1 はスプライシングバリエーションが 2 種あるため、それぞれの順位を示す。



12. 図

図 1. 嘔気嘔吐の発生機序

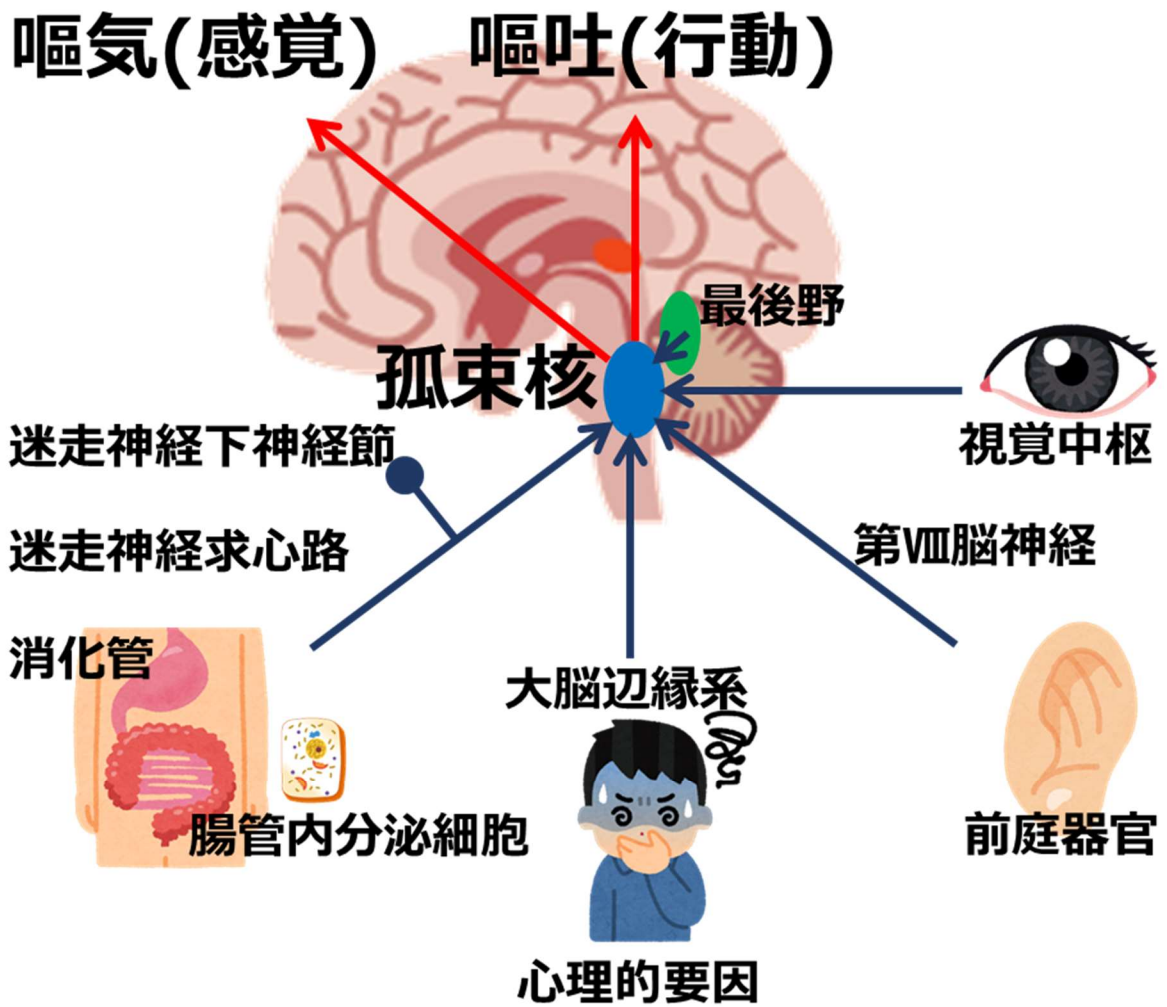


図2. スンクス



図 3. 研究概要

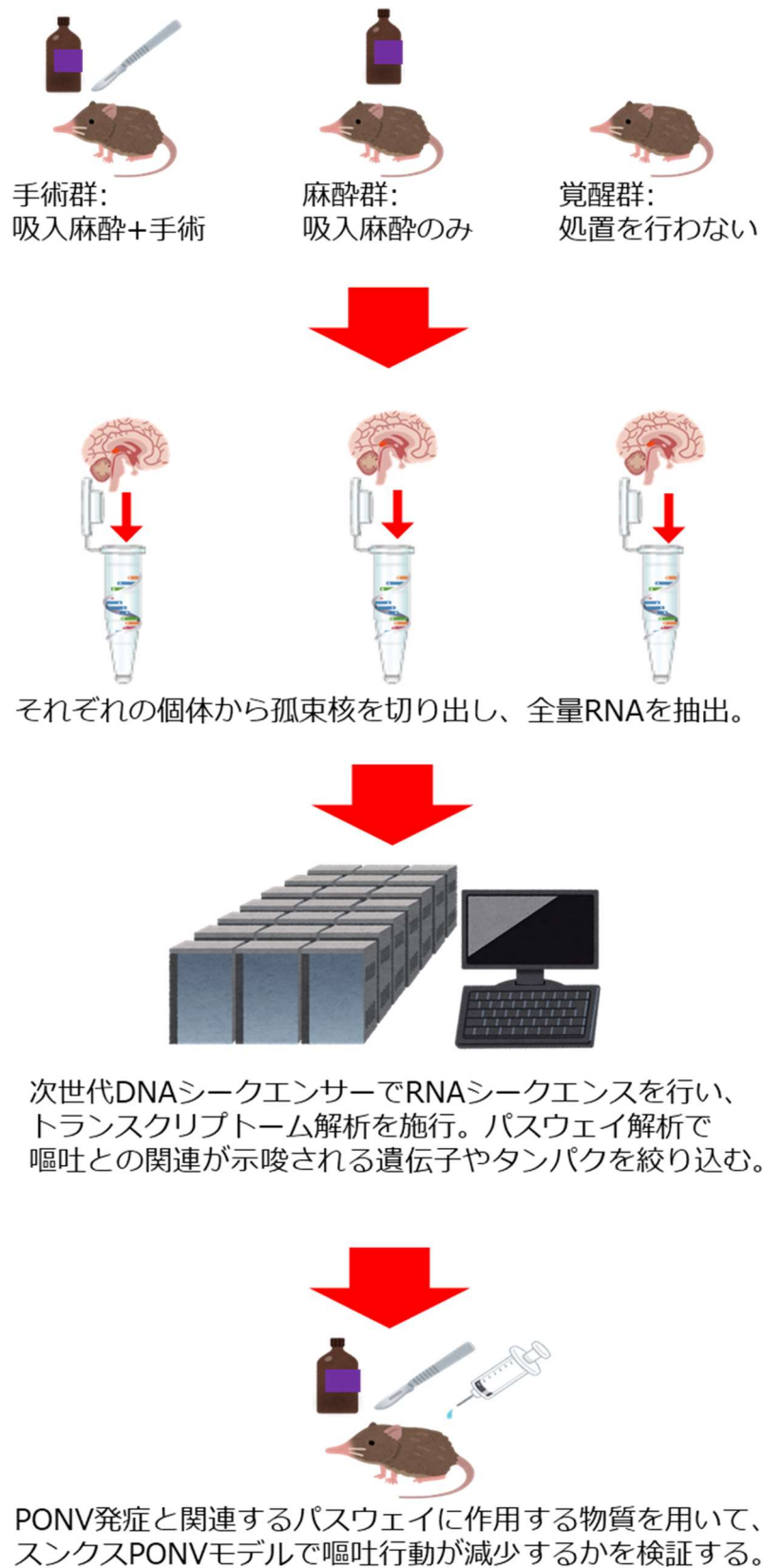
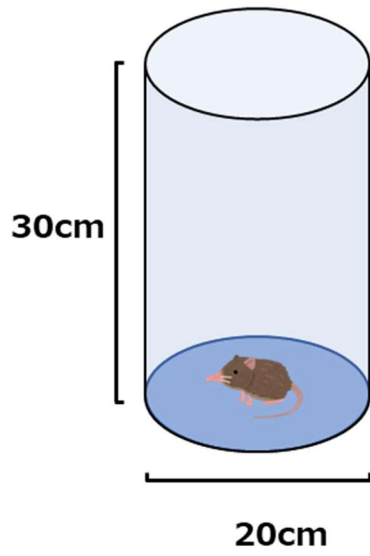
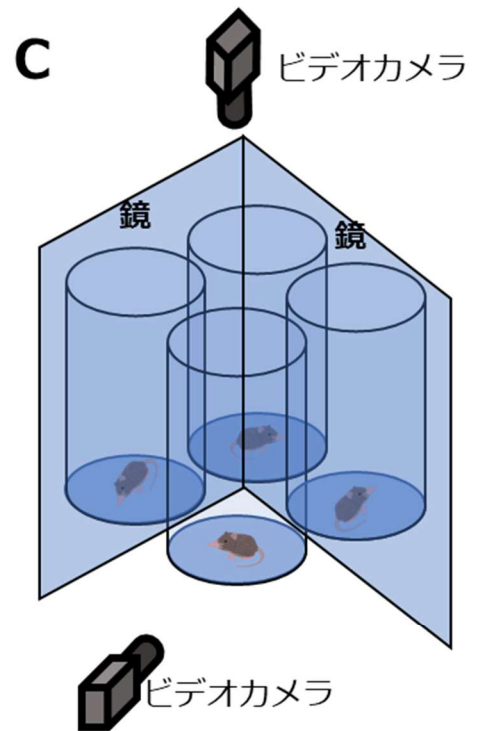


図 4. スンクス嘔吐行動実験の環境

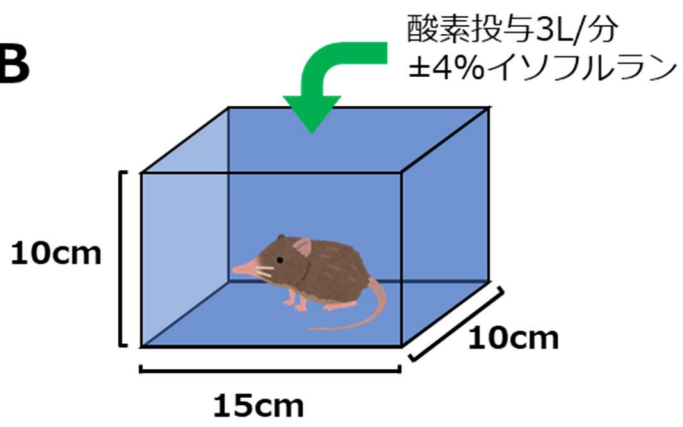
A



C



B



D



図 5. 手術群の作成

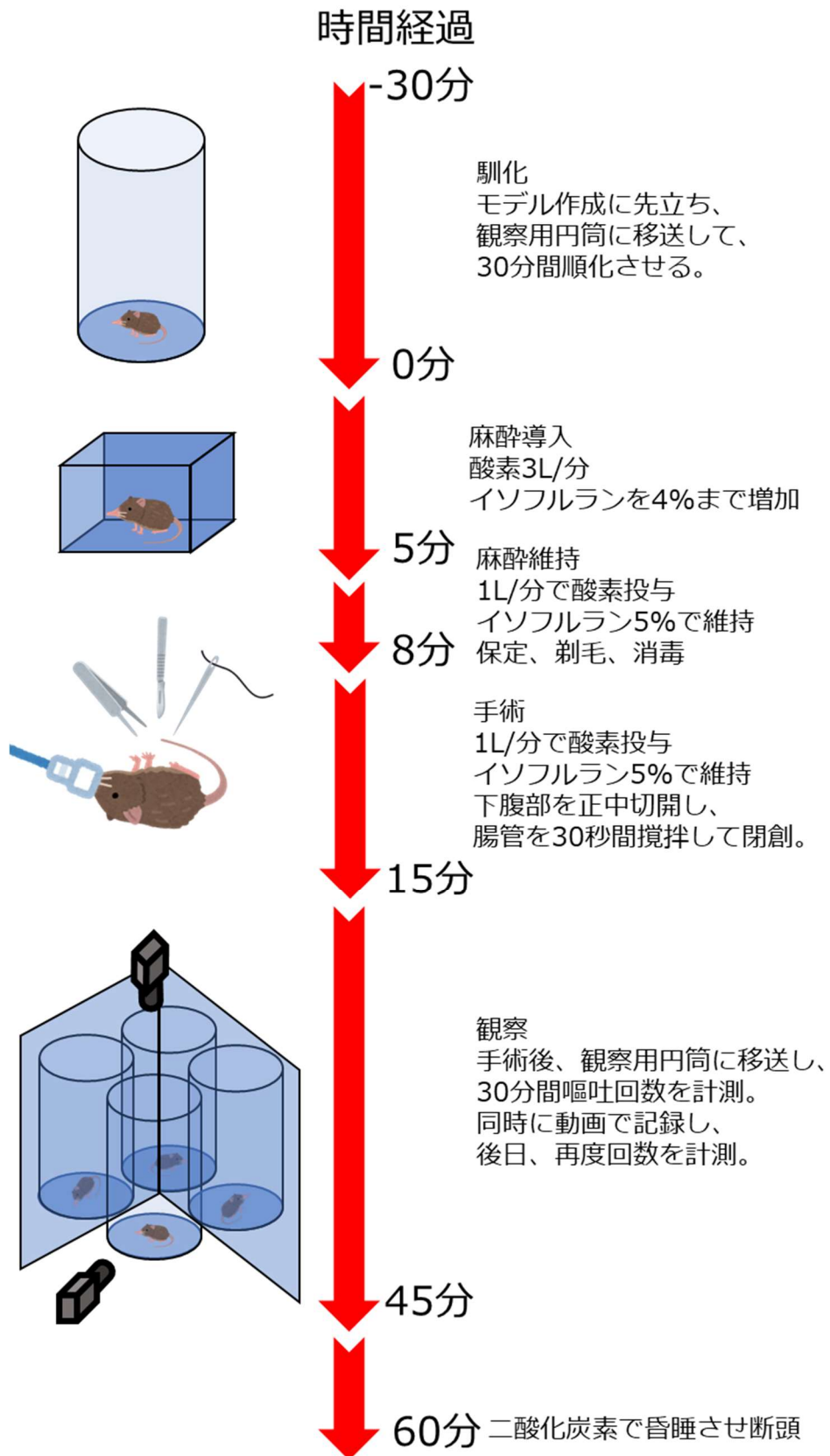


図 6. 麻醉群の作成

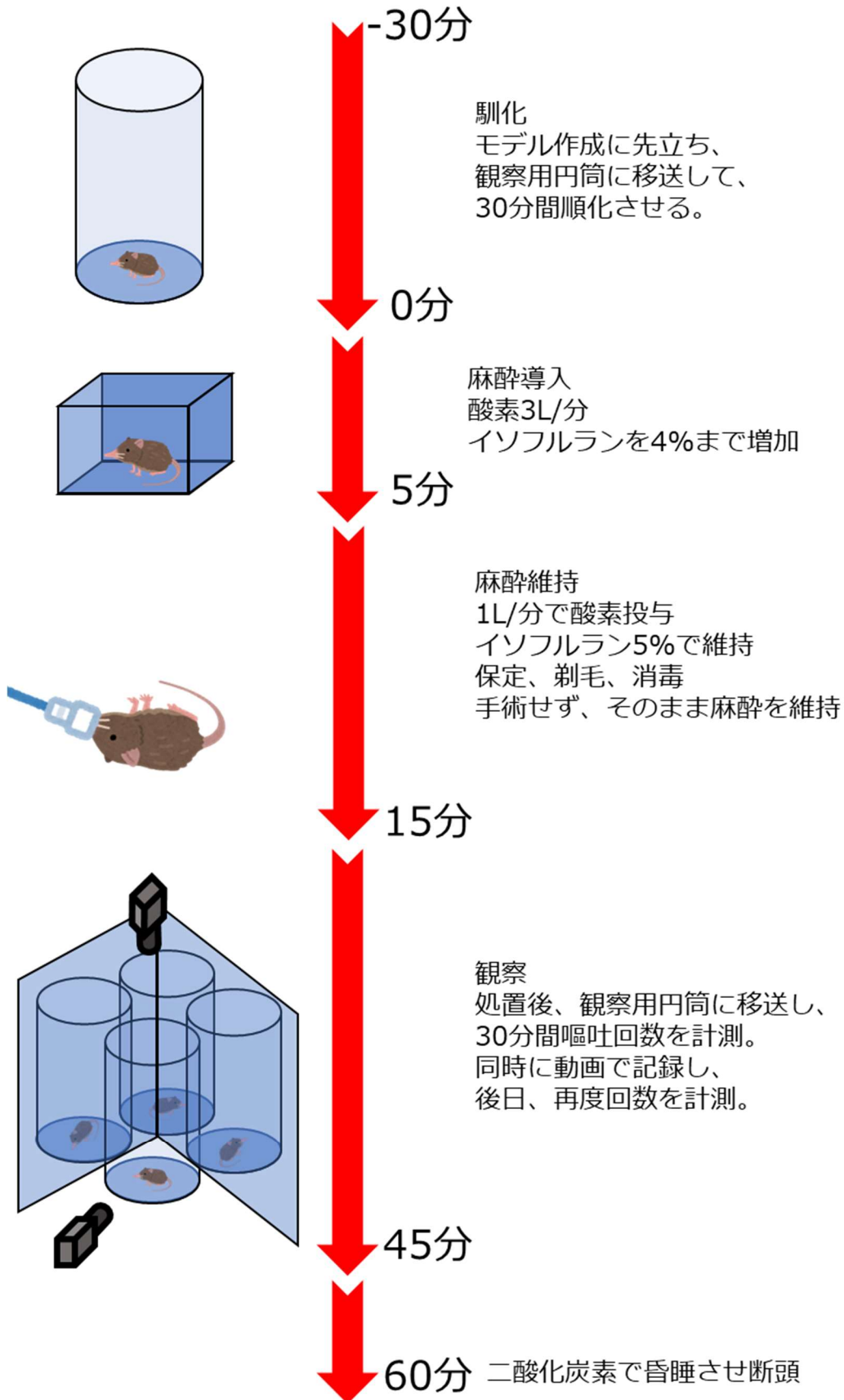




図 7. 覚醒群の作成

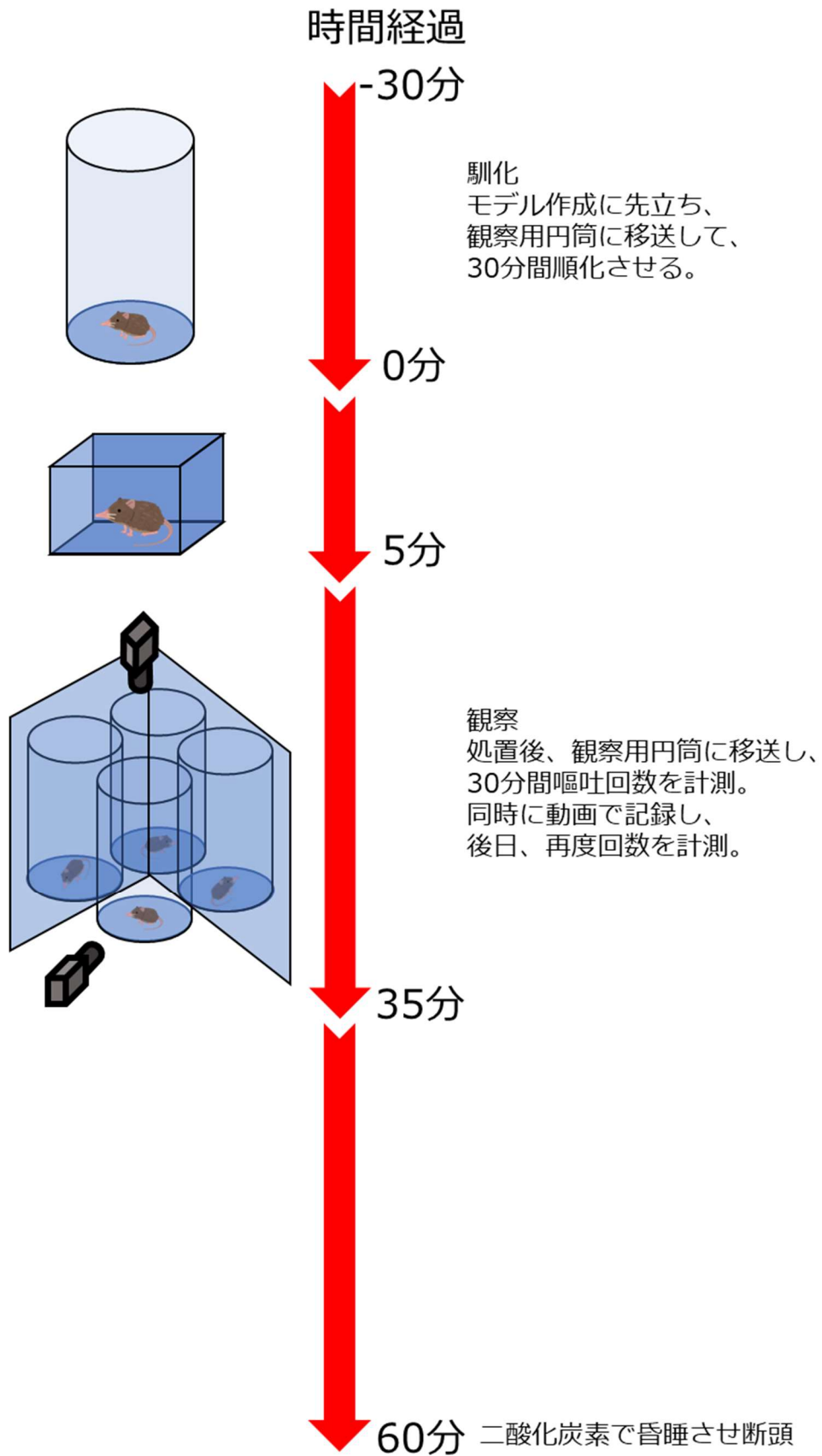




図 9. コンピューター解析の概要

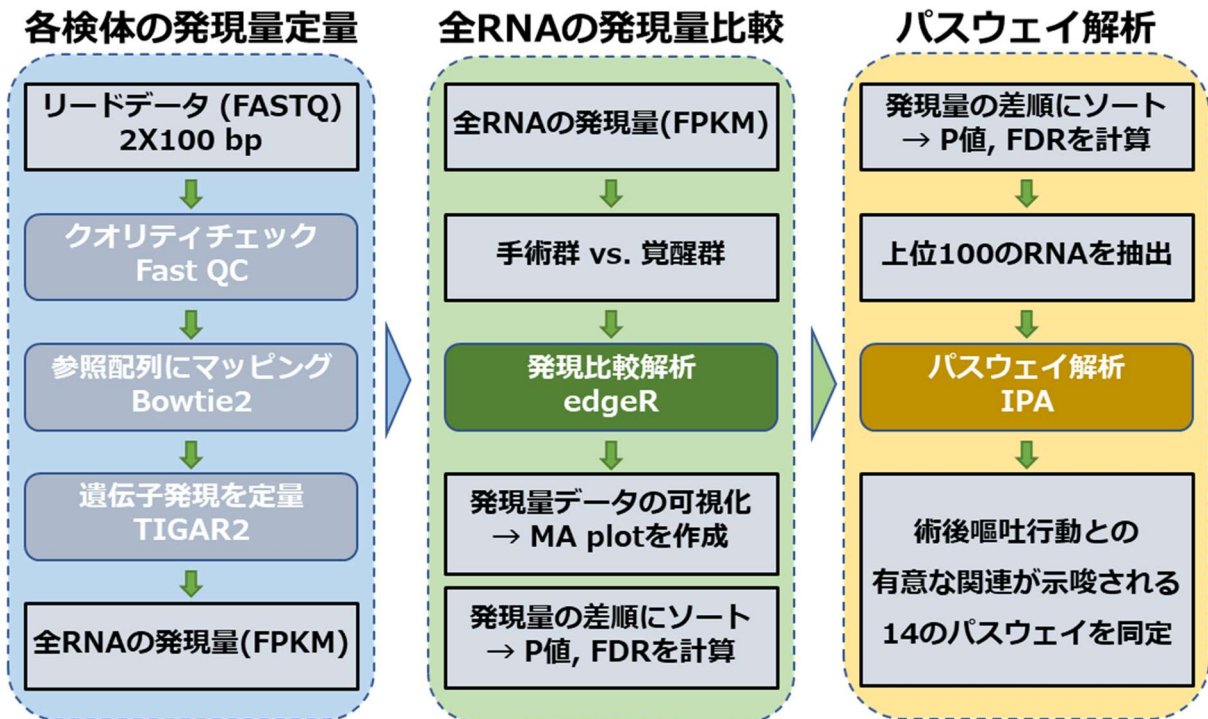


図 10. 嘔吐行動実験の結果

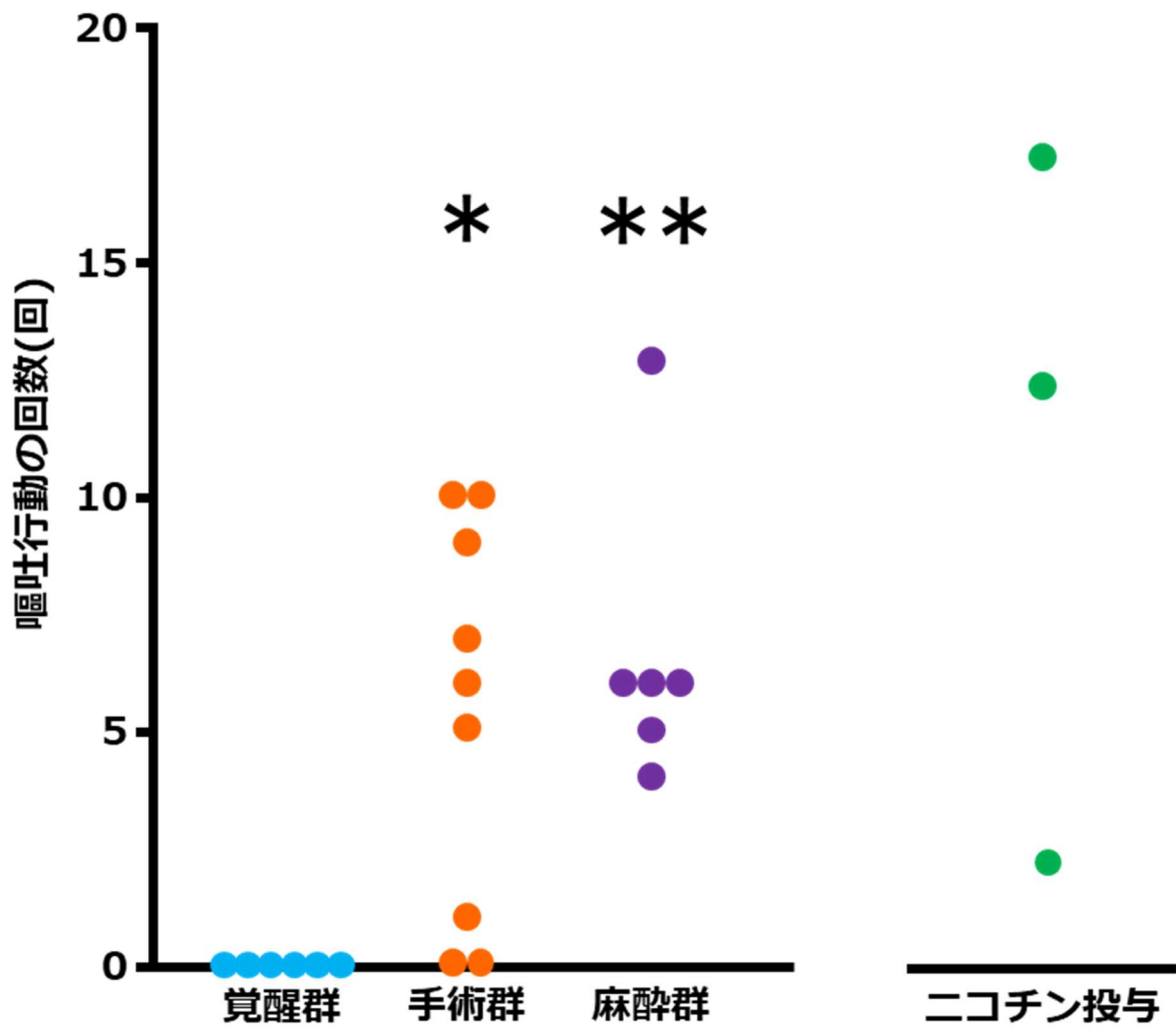


図 11. 行動実験における手術群と麻酔群での、嘔吐行動を認めた時間および体動を開始するまでの時間

開始するまでの時間

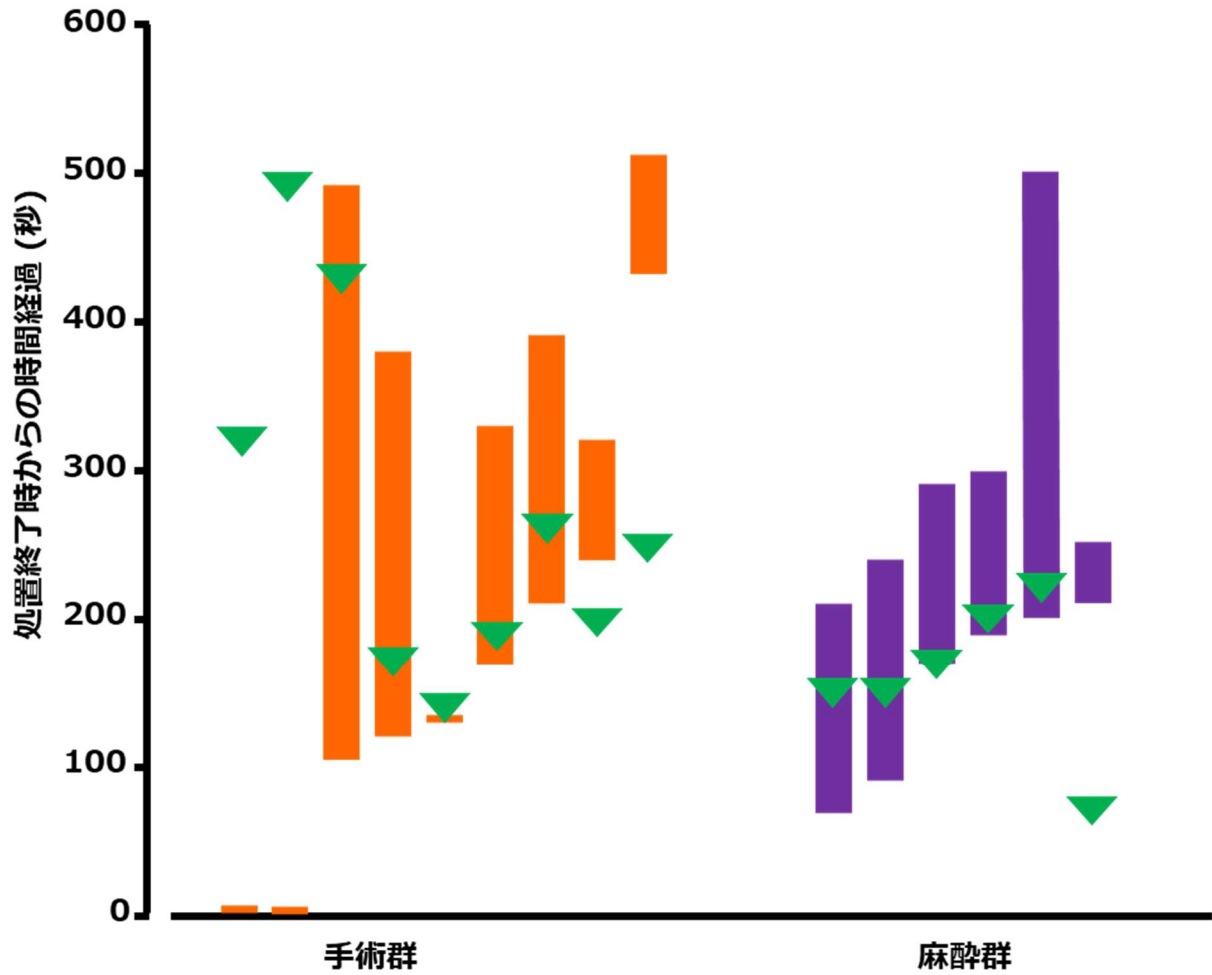


図 12 edgeR を用いて描画した手術群と覚醒群の比較における全 mRNA の MA プロ

ット

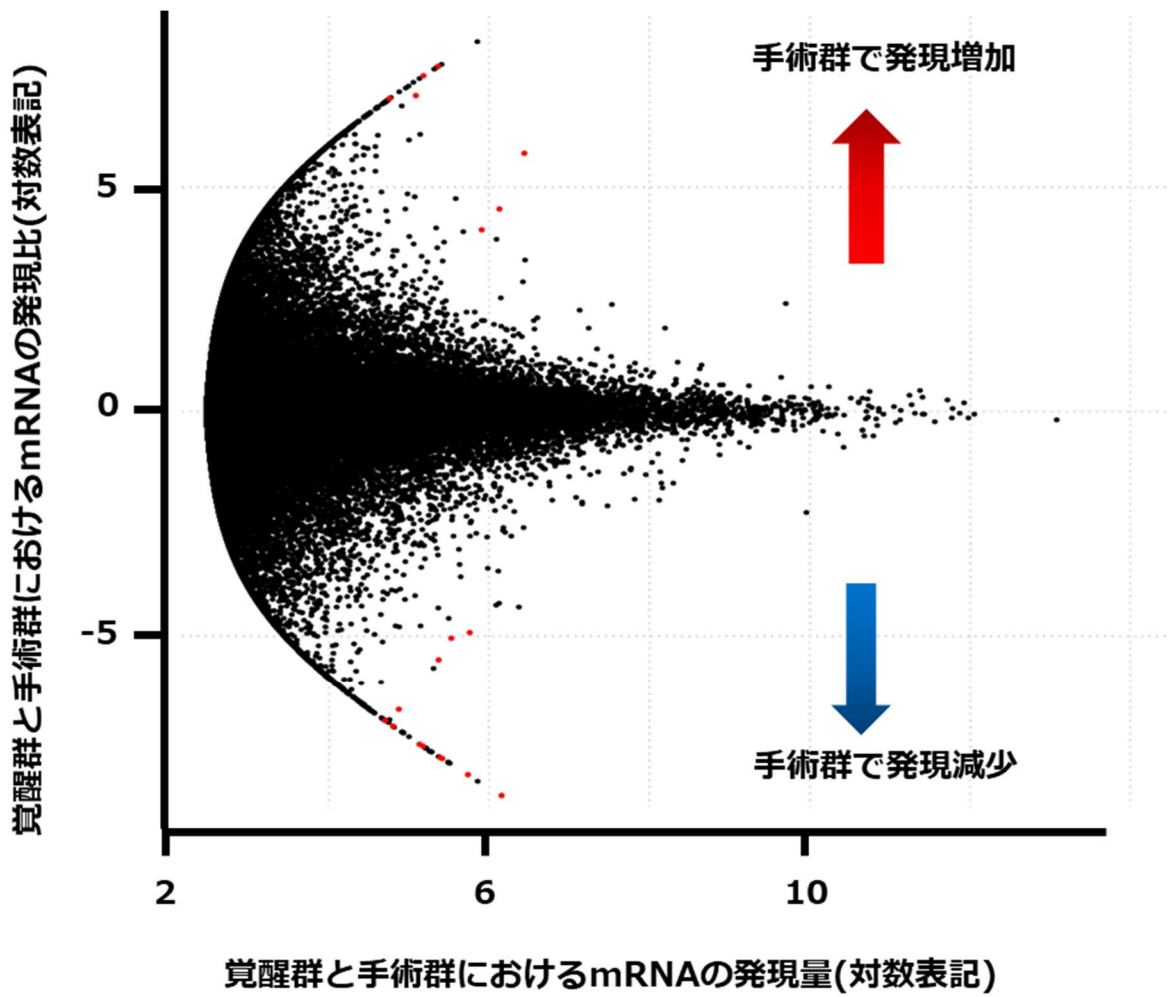


図 13 edgeR を用いて描画した麻酔群と手術群の比較, 覚醒群と麻酔群の比較における全 mRNA の MA プロット

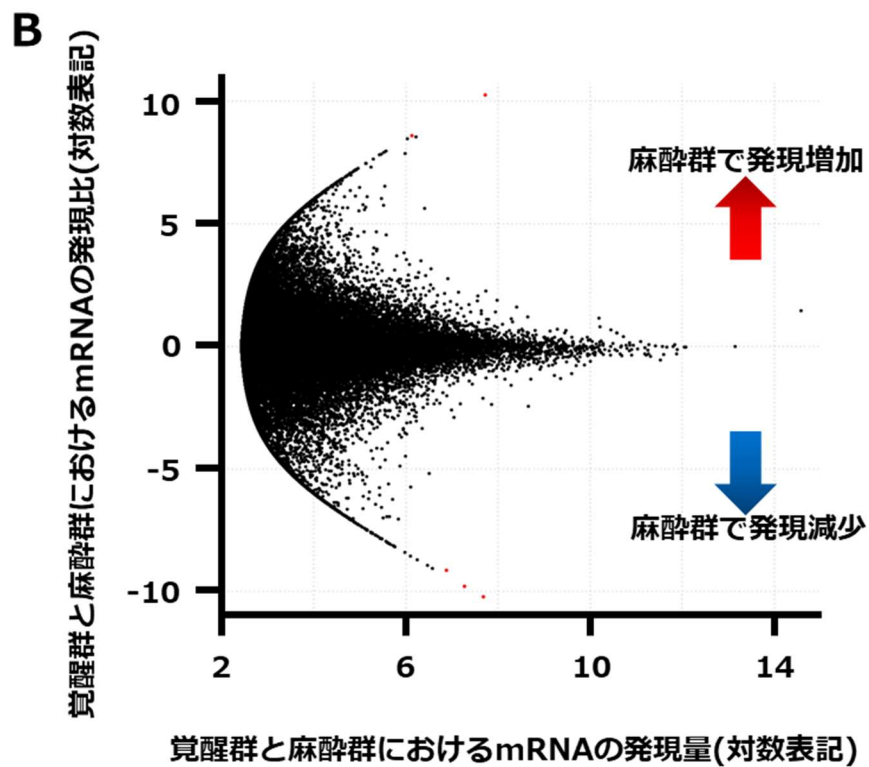
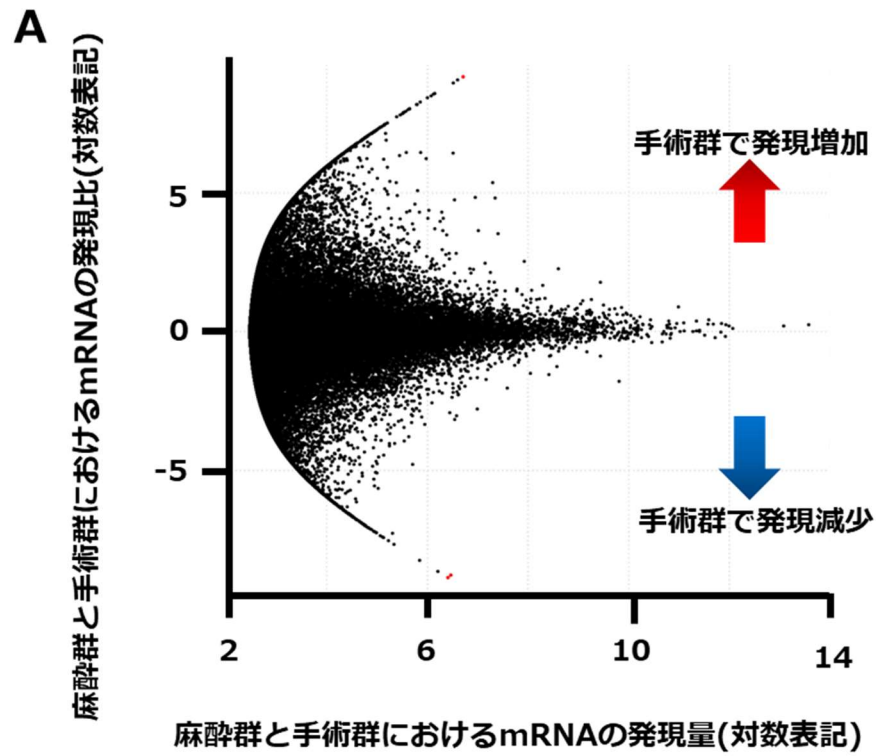


図 14. GABA<sub>B</sub> 受容体伝達経路のシエーマ

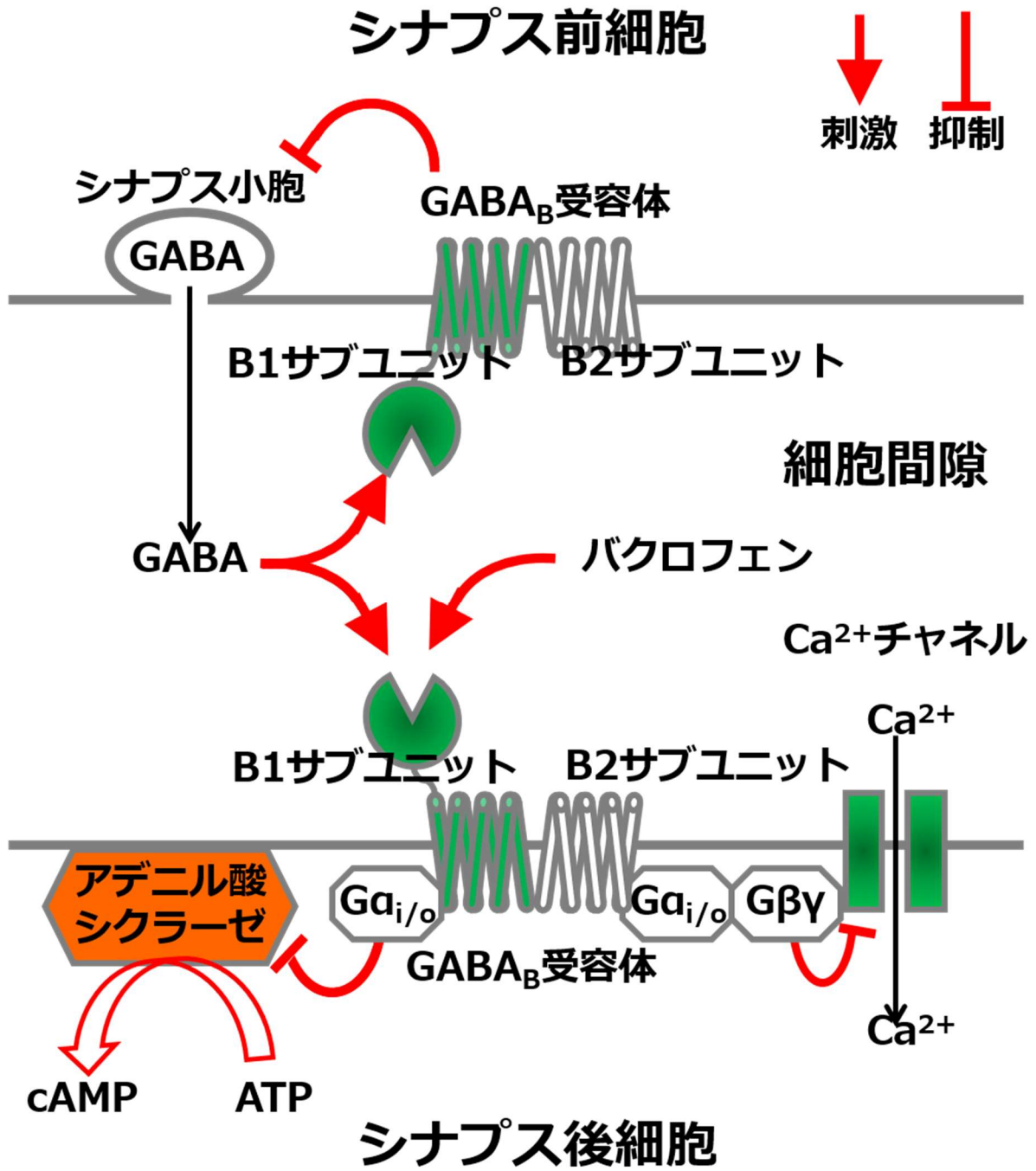




図 15. GABA<sub>B</sub> 受容体伝達経路を構成する RNA の発現量

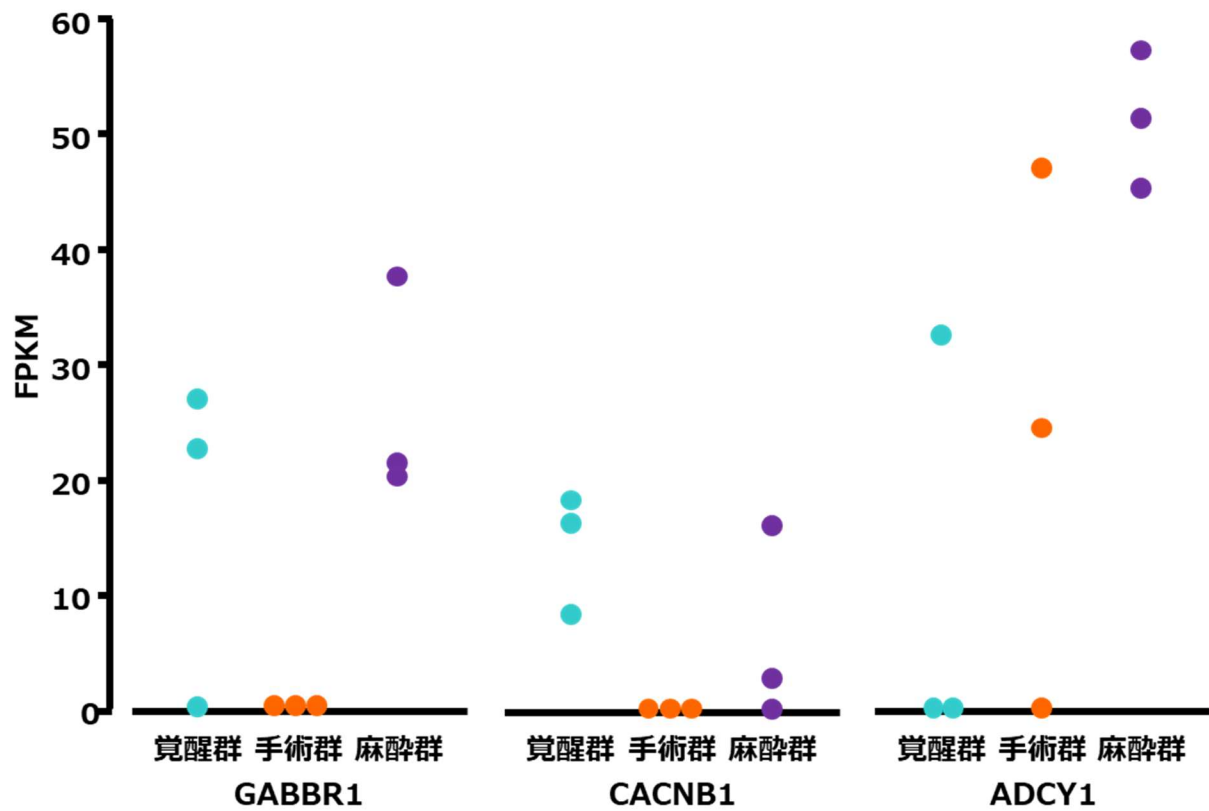


図 16. バクロフェン投与による術後嘔吐行動の変化

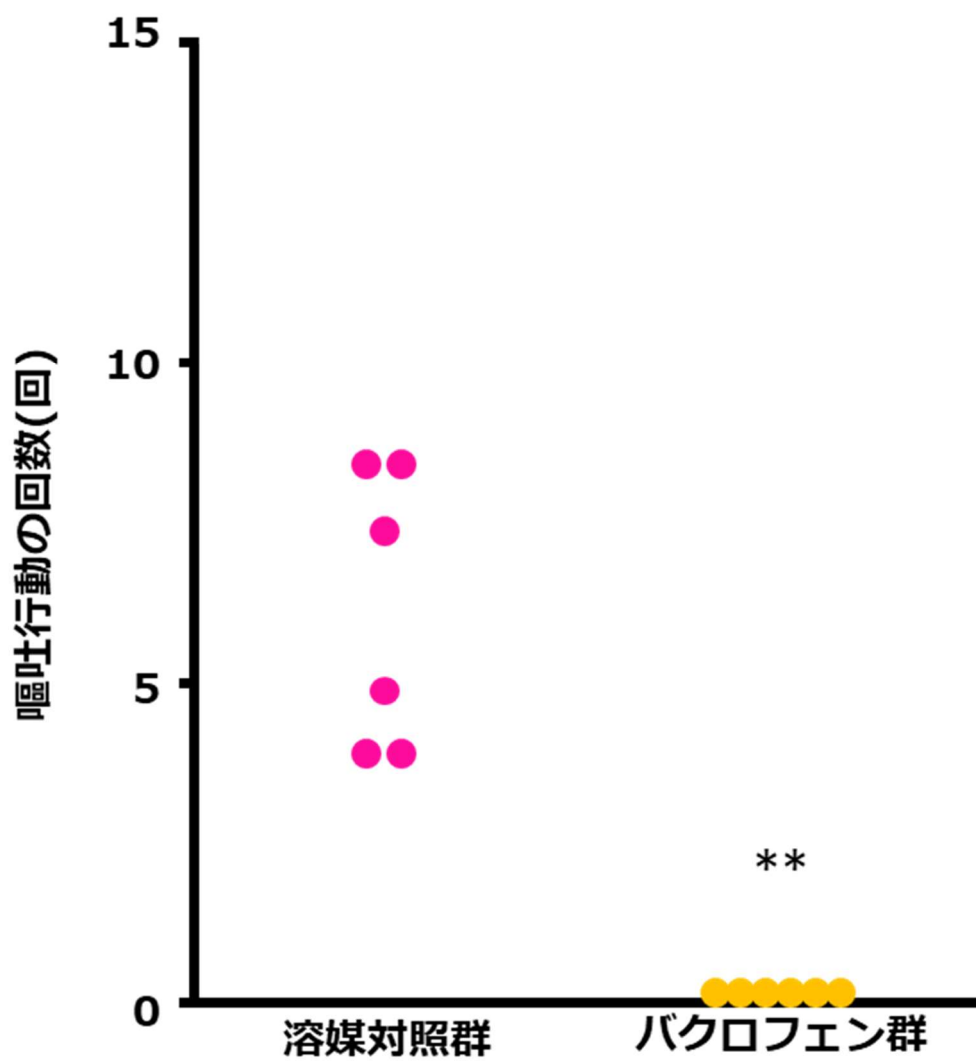
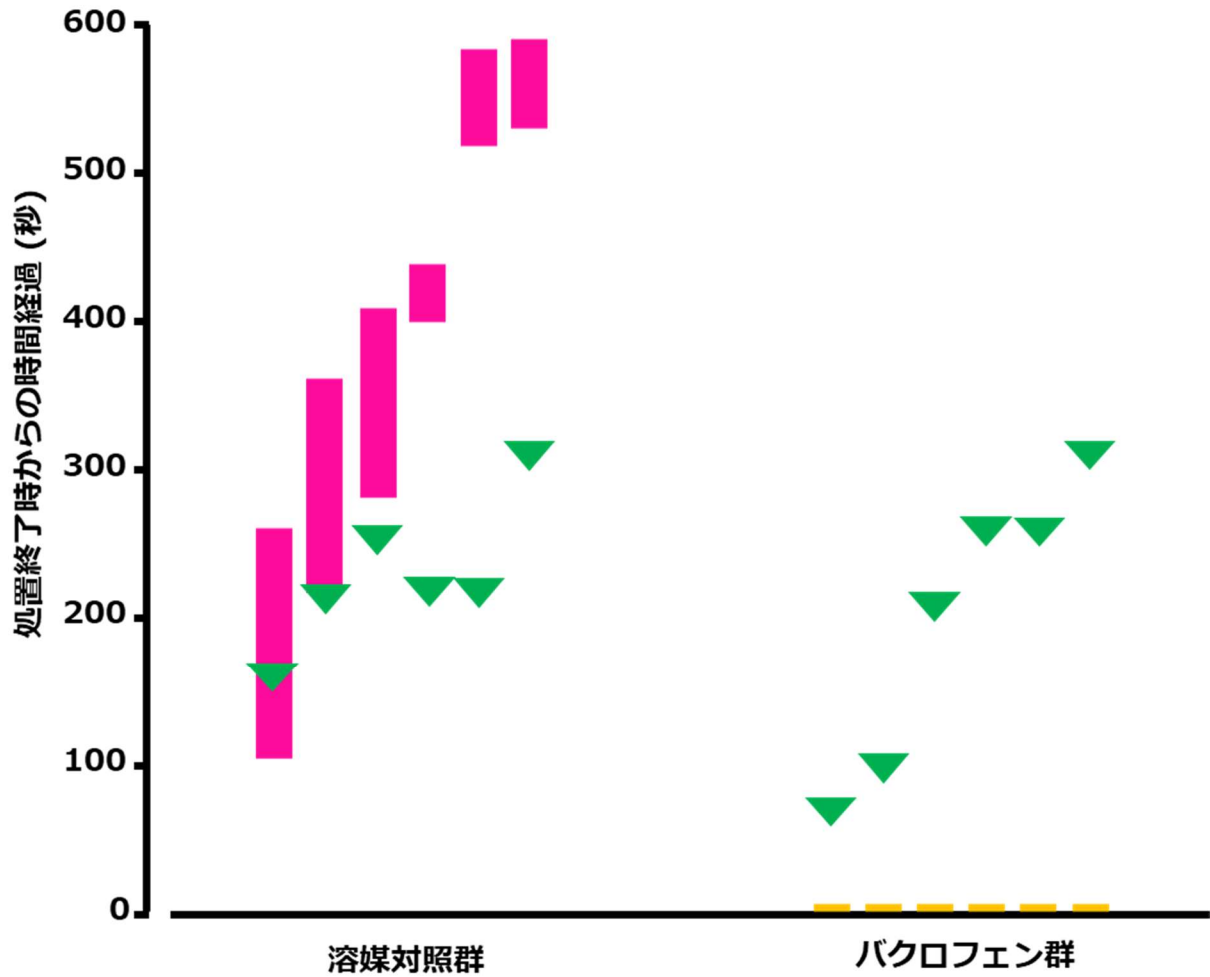


図 17 行動実験における溶媒対照群とバクロフェン群での、嘔吐行動を認めた時間お

よび体動を開始するまでの時間



### 13. 表

表 1. 覚醒群と手術群の比較において遺伝子発現の差が大きい上位 100 遺伝子

	遺伝子ID	遺伝子シンボル	logFC	logCPM	P値	FDR
1	G00391	KIF1C	-8.57	6.15	3.64E-10	0.00002
2	G13504	Ralgds	-8.11	5.73	1.86E-09	0.00005
3	G01246	SDC3	5.76	6.44	2.54E-08	0.00044
4	G19987	MYRF	-7.72	5.39	1.16E-07	0.00138
5	G08751	SNAP91	7.69	5.36	1.32E-07	0.00138
6	G11831	Itm2c	-7.75	5.41	2.05E-07	0.00179
7	G13133	EHMT2	-5.53	5.37	7.98E-07	0.00567
8	G05627	KCNIP4	7.03	5.08	8.65E-07	0.00567
9	G10161	HSD17B12	7.48	5.18	1.17E-06	0.00681
10	G06600	SH3GLB2	-7.47	5.18	2.17E-06	0.01117
11	G20428	UNC119	-7.42	5.13	2.35E-06	0.01117
12	G21976	MFF	-4.91	5.76	2.96E-06	0.01291
13	G04756	PEMT	-7.02	4.80	3.62E-06	0.01458
14	G04112	AATK	-6.65	4.87	4.00E-06	0.01496
15	G16844	DENND5A	4.05	5.91	4.47E-06	0.01560
16	G21218	HRAS	-5.04	5.53	0.00001	0.02439
17	G00391	KIF1C	4.51	6.13	0.00001	0.02439
18	G20129	YPEL4	6.97	4.76	0.00001	0.04288
19	G03028	CACNB1	-6.89	4.70	0.00002	0.04662
20	G06448	Pick1	-4.77	4.83	0.00002	0.05562
21	G09060	PAX8	6.15	4.61	0.00002	0.05562
22	G06855	GDF1	6.94	4.74	0.00004	0.09552
23	G23406	CCDC92	6.06	5.00	0.00004	0.09552
24	G10127	ARHGAP1	-7.15	4.91	0.00005	0.09931
25	G11191	SDF4	6.90	4.70	0.00005	0.11027
26	G20246	LOC102688560	-8.24	5.86	0.00006	0.12809
27	G13149	AGPAT1	8.24	5.85	0.00007	0.12809
28	G15860	PCSK7	6.79	4.62	0.00007	0.12809
29	G23340	GALNT9	6.78	4.61	0.00008	0.14054
30	G00111	CAMK1G	-3.50	5.98	0.00008	0.14054
31	G22668	TM9SF4	7.11	4.88	0.00008	0.14054
32	G23747	Sap30	-6.63	4.50	0.00009	0.14187

表 1. (続き)

	遺伝子ID	遺伝子シンボル	logFC	logCPM	P値	FDR
33	G07791	EGR1	4.84	4.98	0.00009	0.14402
34	G04590	Rfc2	3.78	5.44	0.00010	0.14711
35	G09671	SMAP2	-6.72	4.57	0.00010	0.15222
36	G10566	GMPPA	-6.85	4.67	0.00010	0.15265
37	G10810	ARG2	5.72	4.44	0.00013	0.18322
38	G03200	TDP2	6.61	4.48	0.00014	0.18322
39	G10257	TM9SF2	-4.31	6.08	0.00014	0.18322
40	G12832	PUF60	-7.85	5.51	0.00014	0.18322
41	G11948	ANXA6	-7.83	5.48	0.00016	0.20160
42	G18451	Maea	5.86	4.49	0.00019	0.24120
43	G05049	PTPRN2	7.74	5.40	0.00020	0.24271
44	G21786	SAFB2	6.57	4.45	0.00021	0.24842
45	G15764	Rpl22l1	-3.64	4.93	0.00022	0.24979
46	G20799	EPS15	-6.51	4.40	0.00022	0.24979
47	G21179	Mob2	-7.58	5.27	0.00022	0.24979
48	G04905	DTNA	6.66	4.51	0.00023	0.24979
49	G13847	UBAC1	3.90	5.00	0.00024	0.25477
50	G13130	LOC100594395	-2.24	9.95	0.00024	0.25509
51	G12510	RASSF2	6.64	4.50	0.00026	0.26930
52	G13998	STX6	-7.51	5.22	0.00027	0.27221
53	G12785	ALDOC	7.63	5.31	0.00033	0.32524
54	G12578	LOC100467656	7.42	5.13	0.00035	0.33740
55	G16989	TDRKH	5.88	4.44	0.00035	0.33740
56	G16065	ALG12	-6.38	4.31	0.00036	0.33934
57	G18339	EWSR1	7.32	5.05	0.00039	0.36041
58	G20799	EPS15	6.33	4.27	0.00040	0.36238
59	G07791	EGR1	-6.30	4.25	0.00041	0.36238
60	G21218	HRAS	4.10	5.34	0.00042	0.36238
61	G11731	MSRB2	-4.06	4.73	0.00043	0.36238
62	G03279	HMOX1	-2.05	7.16	0.00043	0.36238
63	G15840	TTR	-1.69	4.54	0.00044	0.36238
64	G03171	LOC101558357	6.32	4.26	0.00044	0.36238
65	G10396	SYBU	5.90	4.58	0.00045	0.36268
66	G02178	OXR1	6.40	4.32	0.00046	0.36822

表 1. (続き)

	遺伝子ID	遺伝子シンボル	logFC	logCPM	P値	FDR
67	G23101	SNX29	-4.96	4.57	0.00048	0.37797
68	G22406	PFKFB3	-4.02	4.68	0.00050	0.38418
69	G13074	FLOT1	-7.69	5.37	0.00051	0.38487
70	G14650	SPIN1	7.21	4.96	0.00053	0.39519
71	G15981	AKT2	3.66	5.35	0.00056	0.41028
72	G05627	KCNIP4	-7.16	4.92	0.00059	0.42824
73	G07873	TAX1BP1	-7.18	4.93	0.00062	0.44611
74	G12654	FMOD	-1.95	7.82	0.00063	0.44611
75	G11003	ARHGAP44	6.22	4.19	0.00065	0.45071
76	G17547	MFS11	-6.27	4.23	0.00066	0.45443
77	G12327	MTIF3	-6.20	4.18	0.00070	0.46714
78	G02262	ADCY1	3.84	6.09	0.00071	0.46714
79	G24487	GABBR1	-7.04	4.82	0.00072	0.46714
80	G08266	IQSEC1	6.81	4.91	0.00072	0.46714
81	G11104	CNOT2	-6.17	4.16	0.00072	0.46714
82	G12713	GALNT10	-6.28	4.24	0.00080	0.50463
83	G04986	ZNF655	6.35	4.29	0.00081	0.50463
84	G24010	JAKMIP3	-3.70	4.73	0.00081	0.50463
85	G10843	MAP3K9	3.96	4.52	0.00083	0.50463
86	G16978	POGZ	6.37	4.30	0.00083	0.50463
87	G06605	CCBL1	-6.20	4.18	0.00085	0.50463
88	G15862	Bace1	-4.38	5.37	0.00086	0.50463
89	G00499	ADK	-6.41	4.34	0.00086	0.50463
90	G06285	SIPA1L2	-6.19	4.18	0.00089	0.51254
91	G19348	ULK3	6.42	4.34	0.00089	0.51254
92	G04455	NCKIPSD	-5.72	5.30	0.00090	0.51310
93	G12781	SUPT6H	6.12	4.12	0.00092	0.51516
94	G25255	BAG3	-2.09	7.47	0.00092	0.51516
95	G22110	HSPA12A	6.99	4.77	0.00094	0.51576
96	G08699	MGAT5	3.73	5.06	0.00096	0.51840
97	G03752	HTR7	-6.88	4.75	0.00097	0.51840
98	G07612	WASH1	6.46	4.36	0.00097	0.51840
99	G15284	SLC25A28	-4.00	4.84	0.00098	0.51876
100	G23544	GAPVD1	-5.57	4.27	0.00101	0.52934



表 2. IPA ソフトウェアによって算出された, 手術群と覚醒群の比較において Fisher の正確確率検定による  $P$  値が 0.01 未満である上位 14 のシグナル伝達経路

シグナル伝達経路の名称	$P$ 値 (-log)	構成する分子(遺伝子)名
ゴナドトロピン放出ホルモン	3.17	MAP3K9, CACNB1, EGR1, ADCY1, HRAS
Gタンパク共役受容体	2.99	AKT2, HTR7, ADCY1, HRAS, GABBR1, TDP2
Gaiタンパク	2.81	ADCY1, HRAS, GABBR1, RALGDS
Gβγタンパク	2.76	AKT2, CACNB1, ADCY1, HRAS
活性化T細胞核内因子	2.65	AKT2, CACNB1, ADCY1, CAMK1G, HRAS
2 <sup>nd</sup> メッセンジャーcAMP	2.65	HTR7, ADCY1, CAMK1G, GABBR1, TDP2
オピオイド	2.45	AKT2, CACNB1, ADCY1, CAMK1G, HRAS
急性期反応	2.27	HMOX1, TTR, AKT2, HRAS
エストロゲン感受性乳癌	2.26	AKT2, HRAS, HSD17B12
CD184抗原	2.26	AKT2, EGR1, ADCY1, HRAS
ニューレグリン	2.15	AKT2, PICK1, HRAS
GABA受容体	2.13	CACNB1, ADCY1, GABBR1
B細胞受容体	2.1	MAP3K9, AKT2, EGR1, HRAS
サイクリンキナーゼ5	2.04	EGR1, ADCY1, HRAS

表 3. 表 2 で示した各シグナルを構成する分子 (遺伝子) の詳細

シンボル	遺伝子名	順位
MAP3K9	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 9	85
CACNB1	Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Beta 1	19
EGR1	Early Growth Response 1	33/59
ADCY1	Adenylate Cyclase 1	78
HRAS	HRas Proto-Oncogene, GTPase	16
AKT2	AKT Serine/Threonine Kinase 2	71
HTR7	5-Hydroxytryptamine Receptor 7	97
GABBR1	Gamma-Aminobutyric Acid Type B Receptor Subunit 1	79
TDP2	Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 2	38
RALGDS	Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator	2
CAMK1G	Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase IG	30
HMOX1	Heme Oxygenase 1	62
TTR	Transthyretin	63
HSD17B12	Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 12	9
PICK1	Protein Interacting With PRKCA 1	20