

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11331

研究課題名(和文) 麻酔薬による担癌動物の免疫抑制環境の改変と癌悪性化の分子機構

研究課題名(英文) The immunomodulatory effects of anesthetics in cancer microenvironment leading to cancer malignancy

研究代表者

神谷 真子 (Kamiya, Masako)

朝日大学・経営学部・准教授

研究者番号：80181907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、麻酔薬が癌組織微小環境に与える影響を、口腔扁平上皮癌(OSCC)、間質細胞およびマウス脾細胞の生存率、脾細胞の抗CD3抗体刺激に対するサイトカイン産生能、間質細胞(10T1/2)の免疫抑制能に対する効果から検討した。脾細胞はその他の細胞株と比較して最も低濃度の麻酔薬で生存率が低下し、特に静脈麻酔薬に高い感受性を示した。その免疫応答能は、細胞毒性が現れる濃度よりさらに低濃度域でも抑制された。またミダゾラムは、10T1/2の免疫抑制作用も阻害する点で他の麻酔薬とは異なっていた。一方担癌マウスを用いた動物実験では、静脈麻酔薬が腫瘍の進展に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the effects of the anesthetics on the tumor microenvironment, we evaluated their cytotoxicity against oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells, stromal cells (10T1/2) and mouse spleen cells and the influence on immuno-response of these cells.

The all of anesthetics tested showed cytotoxic effects on spleen cells at much lower concentrations than on the OSCC cells and 10T1/2, which suggests that spleen cells are more sensitive against anesthetics than the other cell lines. The cytokine-production by anti-CD3-stimulated spleen cells was completely inhibited at a lower concentration of intravenous anesthetics, whereas spleen cells maintained a 80-100% viability. In addition, only midazolam inhibited the immunosuppressive action of 10T1/2. On the other hand, in animal experiments with tumor-bearing mice, it was suggested that intravenous anesthetics could inhibit the development of tumor.

研究分野：口腔生化学

キーワード：麻酔薬 抗腫瘍免疫 癌組織内微小環境 口腔扁平上皮癌 免疫抑制

### 1. 研究開始当初の背景

癌患者の術後予後は、癌細胞の形質や病期はもちろんのこと、周術期管理の違いによっても術後の癌転移、再発率が異なる可能性が報告されている。手術のストレスが全身免疫能の低下を招く可能性や、癌組織の切除で癌細胞が血液中にばらまかれてしまう危険性などを考慮すると、周術期管理と患者の良好な予後を結びつける鍵は、患者の周術期における免疫状態であると考えられ、関連する臨床研究が進行中である。しかしその基礎的背景は必ずしも明らかではない。

本研究ではこれら臨床研究と細胞レベルの基礎研究との間をつなぐ「担癌動物モデル」と「試験管内モデル」を構築し、麻酔薬による宿主の免疫抑制状態の改変と癌の悪性化・再発・転移との関連性を検証する。

### 2. 研究の目的

本研究では、周術期に用いる麻酔薬の選択と長期予後を結びつける鍵として患者免疫能の変容に着目し、局所麻酔薬と静脈麻酔薬の影響を解析した。まず、麻酔薬の作用点の一つとして、癌微小環境への影響を検討するため、試験管内共培養系を用いて、癌細胞間質細胞 リンパ球の相互作用に及ぼす麻酔薬の効果について解析した。次いで口腔扁平上皮癌を移植することで免疫抑制状態を呈した動物モデルを用いて麻酔薬投与による宿主抗腫瘍免疫能の改変の実態を検討した。得られた知見を総合することで、麻酔薬による宿主免疫抑制環境の改変と癌再発・転移リスクとの関連性を検証し、リスク回避のための適切な麻酔薬選択のための基礎的資料の提供を試みた。

### 3. 研究の方法

#### 1)細胞株：

口腔扁平上皮癌 (OSCC) として C3H マウス頬粘膜由来扁平上皮癌細胞株 (Sq-1979) と、この細胞株を移植されたマウスの頸部転移リンパ節から樹立したサブクローン (L6-8 および L5-11) を用いた。また、癌関連間質細胞のモデルとして C3H マウス胎児由来線維芽細胞株 (10T1/2) を用いた。

#### 2)脾細胞の刺激培養：

C3H/HeN 系マウスより単離した脾細胞を OSCC や 10T1/2 細胞と混合したのち、抗 CD3 抗体 (1 µg/mL) を用いて脾細胞中の T 細胞を特異的に刺激した。5%CO<sub>2</sub> 存在下で 37 48 時間刺激培養し、上清中のサイトカインの濃度を ELISA 法にて測定した。

#### 3)細胞障害性：

麻酔薬の細胞障害性は PrestoBlue 生細胞試薬を用いて培養 48 時間後の生細胞数を測定し算出した。

#### 4)担癌動物モデル：

C3H/HeN 系マウスに、プロポフォルまたはミダゾラムを図 1 に示す投与計画に従い反復投与した。麻酔薬投与開始から 1 週間後に OSCC (1 × 10<sup>5</sup> 個/匹) を側腹皮下に移植し、腫瘍の進展を経過観察した。OSCC 移植 3 週間後にマウスを安楽死させたのち脾細胞を単離し、刺激培養法にてインターフェロン 産生能を測定した。

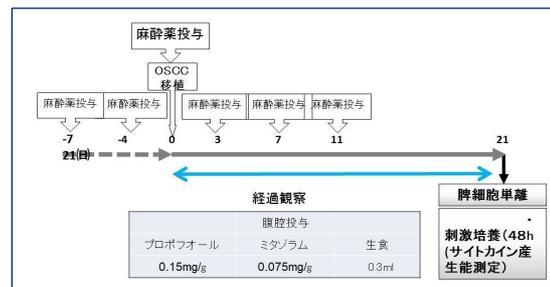


図 1 麻酔薬反復投与下における癌細胞移植実験

### 4. 研究成果

#### 1) 麻酔薬の細胞障害性

局所麻酔薬および静脈麻酔薬に対する OSCC, 10T1/2 およびマウス脾細胞の感受性を検討した (表 1)。

ロピバカインの 50%細胞毒性濃度 (CC50) は、刺激脾細胞 < Sq-1979-1 10T1/2 < L5-11 < L6-8 の順であり、他の局所麻酔薬も同様の傾向を示した。特に転移単由来 L 系 OSCC は、用いたすべての局所麻酔薬に対して強い抵抗性を示した。

プロポフォルに対する CC50 はそれぞれ、刺激脾細胞 < L5-11 Sq-1979-1 < 10T1/2 < L6-8 であり、オーダー的にも、脾細胞が最も感受性が高い点でも局所麻酔薬と類似していた。

ミダゾラムの細胞障害性は他麻酔薬と比較して十分の一以下の低濃度で観察され、かつ L6-8 も本薬剤に対して強い感受性を示す点が特異であった。

表 1 麻酔薬の細胞障害性

	CC50 (mg/ml)				spleen cells
	L5-11	L6-8	Sq-1979-1	10T1/2	
Ropivacaine	1.00	1.66	0.66	0.66	0.12
Lidocaine	0.82	0.95	0.69	0.93	0.47
Mepivacaine	0.52	0.77	0.49	0.54	0.30
Propofol	0.23	1.65	0.27	0.46	0.14
Midazolam	0.024	0.034	0.014	0.058	0.039

## 2) 脾細胞サイトカイン産生能への影響

静脈麻酔薬は、細胞毒性を示さない程度の低濃度領域でも刺激脾細胞のサイトカイン産生能を顕著に阻害した。特にミダゾラムの阻害効果は強力で、インターフェロン(IFN)-産生に対する50%阻害濃度(IC50)は脾細胞に対する細胞障害性の1/4、インターロイキン(IL)-10に対しては、測定範囲ではIC50を算出不能なほど産生を阻害した。

表2 麻酔薬の脾細胞サイトカイン産生能への影響

	IC50 (mg/ml)	
	IFN- $\gamma$	IL-10
Ropivacaine	0.10	0.11
Lidocaine	0.26	0.22
Mepivacaine	0.25	0.42
Propofol	0.046	0.044
Midazolam	0.011	n.d.

n.d. : not determined

## 3) 癌細胞 10T1/2 刺激脾細胞共培養系における麻酔薬の影響

共培養系における10T1/2の添加効果

マウス脾細胞を10T1/2と接触条件下で共培養すると、刺激脾細胞のIFN- $\gamma$ 産生能は低下した。本結果は10T1/2に脾細胞のTリンパ球刺激に対する免疫応答を抑制する作用があることが示唆している(図2)。この10T1/2-脾細胞共培養系にさらにSq-1979-1の馴化培地(CM)を加えると、10T1/2の刺激脾細胞に対する抑制作用が増強された(図2)。このように、本共培養系で癌細胞-間質細胞-免疫担当細胞の相互作用を一部再現できた。

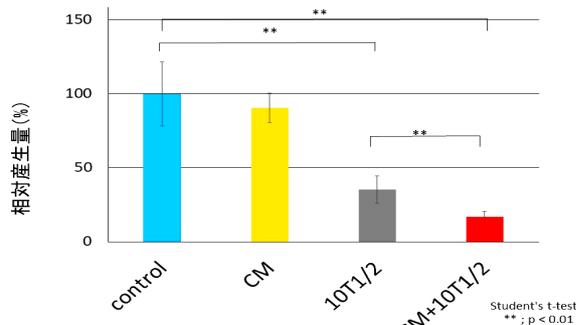


図2 10T1/2との共培養下における脾細胞のIFN- $\gamma$ 産生能に与えるOSCC馴化培地の影響

## 10T1/2の免疫抑制効果に対する影響

本共培養系に麻酔薬を添加すると、用いた三種類の麻酔薬すべてにおいて濃度依存的に刺激脾細胞からのIFN- $\gamma$ 産生量が低下した(図3)。一方、脾細胞と10T1/2を共培養することによるIFN- $\gamma$ 産生抑制は、ミダゾラムを添加群では認められなくなったが、プロポフォールとリドカイン添加群では麻酔薬無添加の場合同様に抑制作用が認められた。

ところが、Sq-1979-1馴化培地(CM)存在下で10T1/2と脾細胞を共培養した場合は、

10T1/2の免疫抑制作用のミダゾラム添加による消失は解消された。

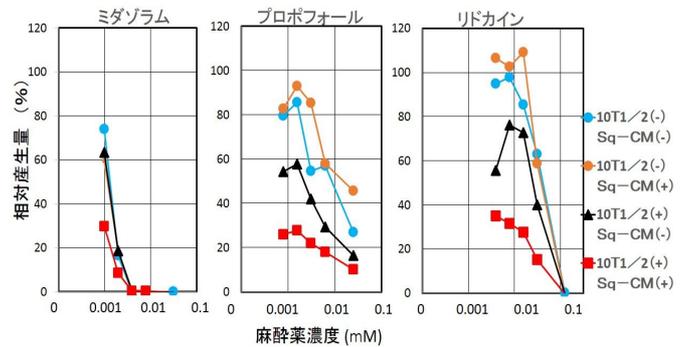


図3 10T1/2の免疫抑制作用に対する麻酔薬の影響

## 4) 担癌マウスに対する静脈麻酔薬の影響

静脈麻酔薬反復投与されたC3H/HeNマウスにリンパ節転移株であるL5-11細胞を移植し腫瘍の進展及び宿主免疫能への影響を観察し以下の結果を得た。

腫瘍の生着および増大速度への影響:

プロポフォール反復投与群のみ腫瘍生着率の低下が認められた(表3)。

表3 静脈麻酔薬の腫瘍生着率への影響

生着率	生着匹数 / 全匹数	%
プロポフォール	5 / 9	56
ミダゾラム	9 / 10	90
生食	10 / 11	91

一方、腫瘍の増大速度に対してはプロポフォール、ミダゾラム投与群ともに低下傾向が認められた(図4)。

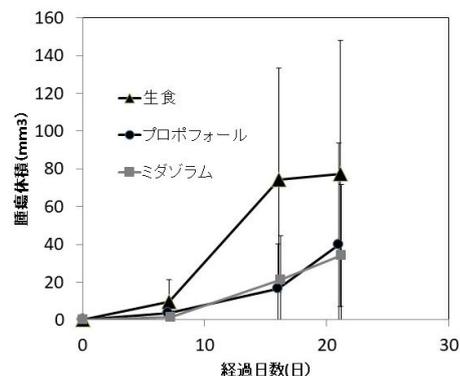


図4 静脈麻酔薬のOSCC組織増大速度への影響

## インターフェロン産生能への影響

静脈麻酔薬を反復投与されたマウスから単離した脾細胞は、生理食塩水投与群に比べてIFN- $\gamma$ 産生能が上昇する傾向が認められたが、担癌状態ではこの傾向は認められず、強い免疫抑制環境下にあることが明らかとなった(図5)。

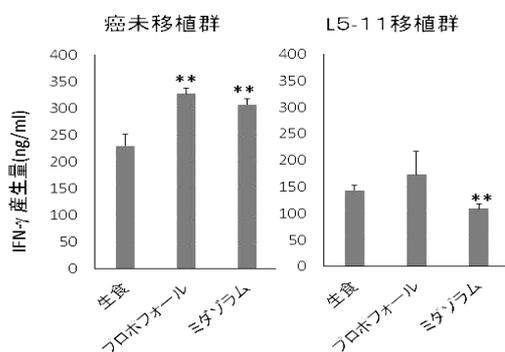


図5 静脈麻酔薬の担癌マウス脾細胞のインターフェロン産生能への影響

以上の結果から、脾細胞は10T1/2やOSCC細胞株に比較して麻酔薬に対する感受性が高く、その免疫応答能は、細胞毒性が現れる濃度よりさらに低濃度域でも抑制されることが示された。特に、ミダゾラムは最も低濃度でこれらの作用を発揮すること、唯一10T1/2の免疫抑制作用を阻害する薬剤である点で、他の麻酔薬とは異なっていた。

一方、担癌マウスを用いた動物実験では、静脈麻酔薬が腫瘍の進展に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。この結果はin vitroで観察された刺激脾細胞の免疫応答に対する麻酔薬の抑制効果とは一見矛盾しているが、in vivoでは癌組織中の間質細胞や骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)の機能修飾を介して麻酔薬が作用している可能性も考えられる。この点については本研究では検証できておらず、新たな課題の提起となった。

## 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 8件)

Kondoh N, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Umemura N, Yamazaki Y, Mitsudo K, Tohnai I: Perspectives of immune suppression in the tumor micro-environment *The Open Dentistry Journal* (査読有) *in press* (2018)

Masuda J, Takayama E, Ichinohe T, Strober W, Mizuno-Kamiya M, Ikawa T, Kitani A, Kawaki H, Fuss IJ, Kawamoto H, Seno A, Vaidyanath A, Umemura N, Mizutani A, Kasai T, Honjo Y, Satoh A, Murakami H, Katsura Y, Kondoh N, Seno M: Immunosuppression effect by adipose tissue-derived mesenchymal stem cells isolated from 2-microglobulin deficient mice *Exp. Ther. Med.* (査読有) *in press*, (2018)

Adachi M, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Inagaki T, Sumi S, Motohahi M, Muramatsu Y, Sumitomo S, Yamazaki Y, Kondoh N: Gene expression analyses

associated with malignant phenotypes of metastatic sub-clones derived from a mouse oral squamous cell carcinoma Sq-1979 cell line *Oncology Letters* (査読有)15(3) 3350-3356 (2018) [doi.org/10.3892/ol.2017.7648](https://doi.org/10.3892/ol.2017.7648)

Inagaki T, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Chihara E, Muramatsu Y, Sumitomo S, Kondoh N: Suppressive effect of mesenchymal stromal cells on interferon- $\gamma$ -producing capability of spleen cells was specifically enhanced through humoral mediator(s) from mouse oral squamous cell carcinoma Sq-1979 cells in vitro *Cancer Translational Medicine* (査読有)4(1), 9-16 (2018) [doi:10.4103/ctm.ctm\\_34\\_17](https://doi.org/10.4103/ctm.ctm_34_17)

Azuma Y, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Inagaki T, Chihara E, Muramatsu Y, Kondoh N: The producing capabilities of interferon- $\gamma$  and interleukin-10 of spleen cells in primary and metastasized oral squamous cell carcinoma cells-implanted mice, *Cancer Translational Medicine* (査読有)3(4), 194-199 (2017) [doi:10.4103/ctm.ctm\\_30\\_17](https://doi.org/10.4103/ctm.ctm_30_17)

Sumi S, Umemura N, Takayama E, Ohkoshi E, Adachi A, Mizuno-Kamiya M, Inagaki T, Kawaki H, Sumitomo S and Kondoh N: Metastasized murine oral squamous cell carcinoma cells induce intratumoral polymorphonuclear myeloid derived suppressor cells, *Oncology reports* (査読有)37(5), 2897-2904 (2017) [doi:10.3892/or.2017.5575](https://doi.org/10.3892/or.2017.5575)

Masuda J, Takayama E, Strober W, Satoh A, Morimoto Y, Honjo Y, Ichinohe T, Tokuno S, Ishizuka T, Nakata T, Mizutani A, Umemura N, Kitani A, Fuss IJ, Shigehiro T, Kawaki H, Mizuno-Kamiya M, Kondoh N, Seno M: Tumor growth limited to subcutaneous site vs tumor growth in pulmonary site exhibit differential effects on systemic immunities *Oncol Rep.* (査読有) 38: 449-455 (2017) [doi:10.3390/ijms19041261](https://doi.org/10.3390/ijms19041261)

Adachi N, Takayama E, Adachi M, Mizuno-Kamiya M, Kawaki H, Takeuchi H, Kubo S, Ishigami H, Kurachi M, Kondoh N: Promotion of nickel (Ni) allergy by anamnestic sensitization with a bacterial component, lipopolysaccharide (LPS), in mice *The Open Dentistry Journal*, (査読有) 10, 531-537 (2016) [doi: 10.2174/1874210601610010531](https://doi.org/10.2174/1874210601610010531)

[学会発表](計 13件)

稲垣慶則, 神谷真子, 梅村直己, 川木晴美, 高

山英次,伊藤宏衣,住友信一郎,櫻井 学,智原栄一,近藤信夫:静脈麻酔薬が口腔扁平上皮癌組織微小環境における免疫制御におよぼす影響 第 59 回歯科基礎医学会学術大会(塩尻) 2017 年 9 月 16~18 日

伊藤宏衣,神谷真子,川木晴美,高山英次,梅村直己,稲垣慶則,村松泰徳,住友伸一郎,近藤信夫:マウス口腔扁平上皮癌細胞株(Sq1979)の IL-1 による間葉系細胞(10T1/2)を介した免疫抑制機構 第 59 回歯科基礎医学会学術大会(塩尻) 2017 年 9 月 16~18 日

稲垣慶則,神谷真子,梅村直己,川木晴美,高山英次,伊藤宏衣,鷺見成紀,櫻井 学,智原栄一,近藤信夫:局所麻酔薬が腫瘍組織の微小環境における免疫応答におよぼす影響 第 37 回日本歯科薬物療法学会・学術大会(名古屋) 2017 年 6 月 18 日

鷺見成紀,高山英次,伊藤宏衣,神谷真子,川木晴美,近藤信夫,住友伸一郎:口腔扁平上皮癌の原発巣と転移巣における骨髓由来免疫抑制 第 61 回日本口腔外科学会(幕張) 2016 年 11 月 25~27 日

稲垣慶則,神谷真子,梅村直己,川木晴美,高山英次,伊藤宏衣,鷺見成紀,櫻井 学,智原栄一,近藤信夫:麻酔薬が癌組織微小環境における免疫制御におよぼす影響 第 58 回歯科基礎医学会学術大会(札幌) 2016 年 8 月 24~26 日

伊藤宏衣,神谷真子,鷺見成紀,川木晴美,高山英次,梅村直己,稲垣慶則,村松泰徳,住友伸一郎,近藤信夫:マウス口腔扁平上皮癌細胞株(Sq1979)の液性因子による間葉系細胞(10T1/2)を介した免疫抑制作用の促進 第 58 回歯科基礎医学会学術大会(札幌) 2016 年 8 月 24~26 日

鷺見成紀,梅村直己,高山英次,伊藤宏衣,神谷真子,川木晴美,近藤信夫,住友伸一郎:口腔扁平上皮癌の原発巣と転移巣における骨髓由来免疫抑制細胞の検討 第 58 回歯科基礎医学会学術大会(札幌) 2016 年 8 月 24~26 日

稲垣俊弘,川木晴美,高山英次,伊藤宏衣,鷺見成紀,足立充隆,住友伸一郎,村松泰徳,近藤信夫:マウス口腔扁平上皮癌と脾細胞の共培養系におけるサイトカイン産生能の検討 第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会(名古屋) 2015 年 10 月 16 日

伊藤宏衣,足立充隆,稲垣俊弘,鷺見成紀,江原雄一,村松泰徳,式守道夫,高山英次,近藤信夫,住友伸一郎:3Hマウス間葉系細胞(10T1/2)を介した口腔扁平上皮癌細胞株(Sq1979)によるCcl2の調節 第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会(名古屋) 2015 年 10 月 16 日

鷺見成紀,神谷真子,川木晴美,高山英次,伊藤宏衣,足立充隆,稲垣俊弘,村松泰徳,住友伸一郎,近藤信夫:マウス口腔扁平上皮癌の悪性形質獲得に伴う脾細胞の抗腫瘍免疫応答の変化 第 57 回歯科基礎医学

会学術大会(新潟) 2015 年 9 月 11~13 日  
伊藤宏衣,足立充隆,神谷真子,川木晴美,高山英次,稲垣俊弘,鷺見成紀,村松泰徳,住友伸一郎,近藤信夫:マウス口腔扁平上皮癌細胞株(Sq1979)の液性因子による間葉系細胞(10T1/2)を介したc-c motif chemokine 2 (Ccl2) 発現の誘導 第 57 回歯科基礎医学会学術大会(新潟) 2015 年 9 月 11~13 日

稲垣俊弘,神谷真子,川木晴美,高山英次,伊藤宏衣,鷺見成紀,足立充隆,住友伸一郎,村松泰徳,近藤信夫:マウス口腔扁平上皮癌の悪性化にともなう脾細胞のサイトカイン産生能の改変機構 第 57 回歯科基礎医学会学術大会(新潟) 2015 年 9 月 11~13 日  
足立充隆,神谷真子,川木晴美,高山英次,稲垣俊弘,伊藤宏衣,鷺見成紀,村松泰徳,住友伸一郎,近藤信夫:マウス口腔扁平上皮癌細胞株(Sq1979)のリンパ節転移巣由来サブクローン(L細胞)によるTh1型免疫反応の促進;その制御因子の同定と機能解析 第 57 回歯科基礎医学会学術大会(新潟) 2015 年 9 月 11~13 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

神谷 真子 (Kamiya Masako)  
朝日大学・経営学部・准教授  
研究者番号: 80181907

### (2) 研究分担者

近藤 信夫 (Kondoh Npbuo)  
朝日大学・歯学部・教授  
研究者番号: 40202072

#### 研究分担者

智原 栄一 (Chihara Eiichi)  
朝日大学・歯学部・教授  
研究者番号: 80244581

#### 研究分担者

山崎 裕 (Yamazaki Yutaka)  
北海道大学・歯学研究科(研究院)・教授  
研究者番号: 90250464

#### 研究分担者

村松 泰徳 (Muramatsu Yasunori)  
朝日大学・歯学部・教授  
研究者番号: 30247556

#### 研究分担者

高山 英次 (Takayama Eiji)  
朝日大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 70533446

#### 研究分担者

川木 晴美 (Kawaki Harumi)  
朝日大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 70513670