

令和元年5月23日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15569

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬と抗癌剤の併用療法の可能性を探る

研究課題名(英文) Evaluation of combined exposure of sevoflurane and anti cancer drugs

研究代表者

平井 昂宏 (Hirai, Takahiro)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：00612798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は吸入麻酔薬の暴露が、がん細胞株の抗がん剤への感受性と高めるのではないかと仮説を立て、これを検証した。細胞はDNA合成期や細胞分裂期に備え、細胞外部からDNAや細胞分裂に必要な成分や栄養素を取り込むが、抗がん剤はこれを利用して類似成分を取り込ませて細胞死に至らせる。研究代表者らはすでに一部のがん細胞株で吸入麻酔薬の暴露後にDNA合成期高めることがを同定していた。この合成期の活性化が抗癌剤の薬剤効果を高めると仮定し、これを検証した。しかし、複数の抗がん剤をセボフルラン暴露後に添加し共培養したが、抗がん剤を添加したのみのコントロールに比べ細胞死数に有意な差は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でセボフルラン暴露後にごん細胞株がDNA合成期を増加させたことを利用し、セボフルランと抗癌剤の併用培養によって抗がん剤の薬剤感受性を高めると考えこれを検証した。しかし、予想したような結果は得られなかった。また一部の抗がん剤は暴露が原因とする細胞死抵抗性を高めたことから、より効果的な添加方法など検討が必要である。期待した成果は得られなかったが、増加するがん患者さんの治療に考慮した麻酔薬の基礎データ提供の足掛かりになると考える。

研究成果の概要(英文)： Some of anticancer drugs which mimic DNA component were taken to cancer cell when the cells were in cell cycle progression. To date we have investigated some of cancer cells were slightly increased cell population accompanied with DNA replication. Whereas our continuous study with this theme, we found that sevoflurane exposed cells that cultured with anti-cancer drug for 24 hours did not show significant reduction compared with anti cancer single treatment control.

研究分野：麻酔

キーワード：セボフルラン がん細胞株

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞研究は慢性骨髄性白血病を中心に研究が進み、静止期にある造血幹細胞を細胞周期に誘導するためのサイトカインを導入する臨床試験が実施されている。一方固形がんについては特有のニッチ形成機序やがん組織への再構築の困難性があるが、がん幹細胞株の樹立が進められていた。このがん幹細胞は抗がん剤や放射線抵抗性を有し、治療後の再発や転移の原因となるのではないかと推測されている。一方、がんの外科手術で用いられる全身麻酔薬吸入麻酔薬はその選択的な阻害薬がないことから生理学的な作用機序について不明な点が多い。一方で吸入麻酔薬による各種動物を用いた組織保護作用も繰り返し報告されている。

このような背景のもと研究代表者らは吸入麻酔薬を暴露した種々のがん細胞株が細胞死抵抗性の一助となる細胞保護効果を発揮し、一時的に細胞周期の DNA 合成期 (S 期) を増加させることを繰り返し確認した。特に乳がん細胞株では DNA 合成期の増加に加え低栄養下でコロニー増殖能を亢進させる特異的な作用を同定した。そこで本研究ではがん幹細胞様の乳がん幹細胞株を用い、DNA 合成期に侵入する細胞を増加と考え、増殖能や細胞周期解析、ATP に着目しその機序解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

白血病に見出されているがん幹細胞や難治性固形がんは、抗がん剤が作用できない細胞周期の静止期に留まり各種抗がん剤からの作用を回避している。この静止期にあるがん細胞は増殖もしないが、抗がん剤など細胞の活性作用を利用した薬剤に反応することもないため、がんの治療抵抗性を高める原因となっている。こうした背景のもと研究代表者らは吸入麻酔薬の暴露後がん細胞株が細胞周期を早めて DNA 合成期に侵入する細胞数を増加することを明らかにした。この知見からがんの治療抵抗性の原因の一つと予測される、抗がん剤のおよばない細胞周期外の静止期にあるがん細胞を、吸入麻酔薬セボフルラン暴露によって細胞周期に再侵入させ、抗がん剤の治療効果を高めることができないかと考えた。そこで研究代表者らはまずヒト培養がん細胞株を用い、吸入麻酔薬と抗がん剤を併用し抗がん効果を改善する新たな治療法を提案することを研究目的とした。

3. 研究の方法

研究代表者らは各種抗がん剤と吸入麻酔薬の併用効果を定量するまず第一歩として、導入と覚醒の速さから広く汎用されている全身吸入麻酔薬のうちイソフルラン、セボフルラン、デスフルランを用いて培養ヒト細胞株の増殖について精査を行った。具体的には臨床濃度以下の空気によって気化した各種吸入麻酔薬を、細胞の生体を維持している 5%二酸化炭素濃度と気温 37 度を維持した細胞培養器内において気化した麻酔薬を暴露した。細胞増殖能は暴露を終えてから 48 時間後にディッシュに接着した細胞をトリプシンによって単細胞化し、PBS とメディウムによって中和したバッファー内でコールターカウンターを用いて流路での細胞数を計測した(Figure 1)。

また抗がん剤の添加に先だつてがん細胞に 1% (vol/vol) 濃度のセボフルランを上記の条件で 4 時間暴露し、その後通常の培養環境に 24 時間静置したのち各種抗がん剤を添加した。添加濃度はパクリタキセル(10-20nM)、フルオロウラシル(5-FU、50-100 μ M)、アドリアマイシン(150-600nM)そしてシスプラチン(50-100 μ M)とし、添加時間は 24 時間とした。抗がん剤添加終了から 48 時間後に細胞を染色し増殖能を解析した。細胞の継時的な増殖は画像取得装置のインキュサイト(sartorius、Michigan USA)を用いた。また細胞周期解析には、DNA 合成期 (S 期) を特異的に標識する 蛍光色素を共益した Brd-U 抗体を用い、フローサイトメーターでその計測を行った。細胞死解析には細胞膜の不安定性を特異的に標識する蛍光色素を結合した Annexin V と細胞膜外の DNA に結合する色素 7-AAD を用いて染色しフローサイトメーターで計測した。試験細胞株はヒト肺癌培養細胞株(2 種)、ヒト大腸がん細胞株(10 種)、ヒト乳腺がん細胞株(3 株)また、正常上皮乳腺細胞株(1 種)を用いた。

4. 研究成果

本研究では抗がん剤が細胞周期の DNA 合成期や分裂期に特異的に作用することに着目し、研究代表者らが見出した吸入麻酔薬暴露によって抗がん剤の薬剤感受性を高めるかどうかを検討した挑戦的課題である。始めに研究代表者らがすでに見出した大腸がん細胞株のほかにさらに細胞周期を早めるがん細胞株の探索を行った。

暴露対象としたがん細胞株はヒトがん細胞株のうち乳がん、肺がん、大腸がん細胞株、また非がん

細胞株の乳腺上皮細胞について、臨床使用濃度以下の1%セボフルランを暴露して、暴露48時間後の増殖能を解析した。その結果、16種類の培養細胞中の、ヒト肺がん細胞株(1種)、ヒト大腸がん細胞株(8種)、ヒト乳がん細胞株(1種)がその増殖能を高めることを明らかにした。これらの増殖能は各細胞株の由来する臓器特異的な増殖の違いは見いだせず、細胞株特異的に増殖することが明らかとなった。

また非がん細胞株はセボフルラン暴露後に細胞数を減少させたことから、これは他の研究例のように非がん細胞株は吸入麻酔薬の暴露によって細胞数を減少することが明らかとなった。特にこの乳腺上皮細胞株とセボフルラン暴露後に細胞数を減少した2種類のがん細胞株については、その後の細胞死解析と、さらに細胞死実行タンパク質の発現を確認している(投稿中)

さらにセボフルラン暴露後に増殖能を高めた10種類の由来臓器の異なる細胞株について、セボフルラン暴露後の細胞周期解析を行った。細胞はDNA合成時にその合成に必須なDNA構成成分のチミジンに類似した(アナログ)合成ヌクレオシドであるBrdUを細胞に取り込ませ、その陽性細胞数を計測する。その結果セボフルラン暴露後の細胞周期解析を行った。その結果DNA合成期を有意に増加した細胞株を2種類見いだした(Figure 2)。

そこでこれらのがん細胞株について以下にあげる複数の抗がん剤はセボフルラン暴露から24時間後にそれぞれ添加した。特にセボフルラン暴露を受けたがん細胞株は暴露終了から24時間以後に細胞周期のDNA合成期に多く侵入していたことから、セボフルランと抗がん剤の同時添加は行わなかった。

試験した抗がん剤はDNA合成期にDNAの塩基対に挿入しDNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼらの反応を阻害し、DNAおよびRNAの生合成を抑制する抗がん剤であるアドリアマイシン(ドキシソルピシン)、細胞分裂時に細胞の極性方向に移動する微小管を安定化し細胞分裂を阻害するパクリタキセル、DNAの塩基対のグアニン、アデニンに結合し、シス体としてDNA合成阻害をする白金製剤であるシスプラチン、さらに体内でリン酸化されチミジンの合成阻害するフルオロウラシル(5-FU)を用いた。これらの4種類の抗がん剤を用いてセボフルランに暴露したがん細胞株に添加しそれぞれの増殖を検討した(Figure 3-7)。

その結果、セボフルランのみ暴露した細胞株では、暴露していない細胞株に比べ僅かだが暴露停止から4日後の増殖能の亢進を維持していた($110\% \pm 0.02$, $N=4$, $P=0.03$)。一方、パクリタキセルを添加した細胞株は20 nMの濃度でセボフルランを暴露せず抗がん剤のみ暴露したコントロールに比べ、予想に反しその増殖能を高めた($115\% \pm 1$ SD, $N=4$, $P=0.004$)。このパクリタキセルの細胞数の増加について、安全な麻酔薬使用のためにも生物学的な検討が必要であると考えられる。さらにアドリアマイシン、フルオロウラシル、シスプラチンとそれぞれ統計的に優位な差は生じなかった。

また、シスプラチンの添加は他の研究例によって増殖能を低下することが報告されているが、本研

Figure 1.

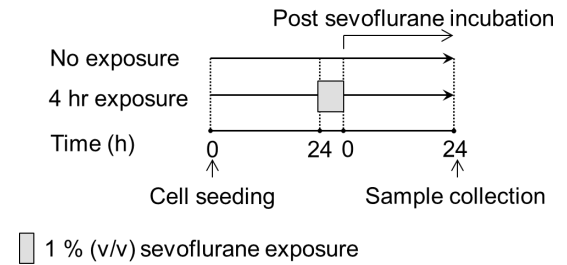


Figure 2.

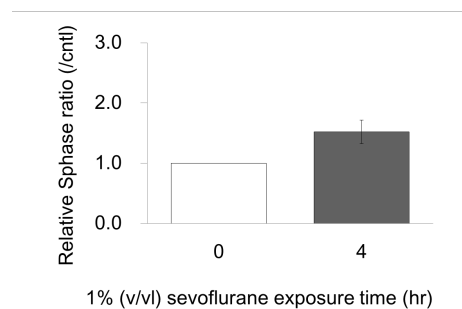
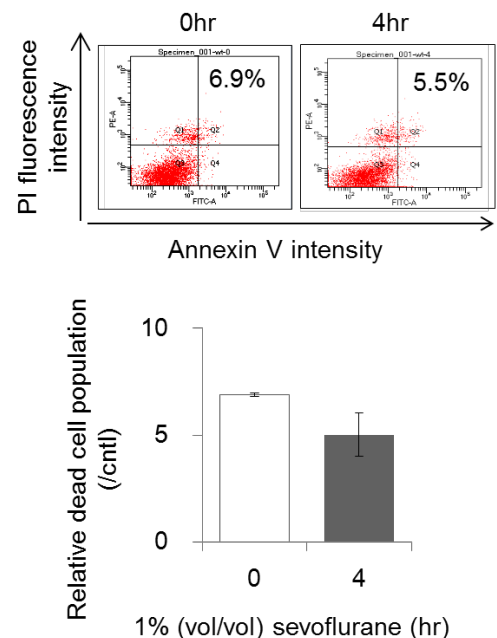


Figure 3.



究で採用した細胞株では増殖能の低下は得られなかった。この考えられる原因として、暴露する吸入麻酔薬の違いと抗がん剤の暴露の条件の違い、さらに異なる細胞株などが考えられる。

本研究は複数のヒトがん細胞株に吸入麻酔薬セボフルランを臨床濃度以下で暴露したところ、細胞株特異的にその増殖を高めることを同定した。特に本研究の特徴は BrdU 染色によるフローサイトメトリーの解析によって、細胞周期の DAN 合成期 (S 期) に侵入する細胞が増えることを利用した点である。これによりがん細胞株の増殖の一因が細胞死抵抗性によって生じているものではなく、麻酔薬暴露後に何らかの機序を経て、がん細胞が活発に分裂することを明らかにした。そこでこの特性を生かして抗がん剤との用を着想するに至った。

本研究で得られた成果は 近年吸入麻酔薬ががんに保護的に働いているという報告に基づき、がんと吸入麻酔薬の生物学的特性の理解が望まれている背景の中、セボフルランと抗がん剤の併用培養を行い、抗がん剤の薬剤感受性を高めると仮説をたてそれを検証した。本研究のような麻酔薬と抗がん剤を併用するような治療の取り組みは現在存在しないが、一部の抗がん剤に対する耐性をわずかに高めたことから、麻酔薬の安全使用のためにもより詳細な研究が必要になると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) 小西裕子 (発表者)、周睿、林智子、平井昂宏、西脇公俊、吸入麻酔薬セボフルラン暴露後にヒトがん培養細胞株が示す増殖能の変化 Sevoflurane exposure partially Human cancer cell line cell growth. 第 59 回日本肺がん学会学術集会(東京)11月29日—12月1日

(2) Takahiro Hirai, Y.K., and Kimitoshi Nishiwaki, 1% Sevoflurane exposure is associated with early and late apoptotic cell death on A549 and MCF-7 cell lines. ASA, San Francisco, California, USA, 2018. October 13-17(ASA; American Society of Anesthesiologists).

(3) 平井昂宏、小西裕子、周睿、西脇公俊、セボフルラン暴露後に生じる大腸がん細胞株の短期的な増殖は ERK1/2 のリン酸化が関与する Sevoflurane exposure increases short-term growth through activation ERK1/2 phosphorylation in colorectal tumor cells. 日本麻酔科学会第 64 回学術集会 (神戸)

(4) 小西裕子、周睿、平井昂宏、西脇公俊、ヒト大腸がん細胞株を用いたセボフルラン暴露と足場非依存性増殖能の検討 Sevoflurane induces anchorage independent growth on colorectal cancer cell lines. 日本麻酔科学会 第 64 回学術集会 (神戸) 6月8日-10日、口頭発表 (優秀演題)

Figure 4.

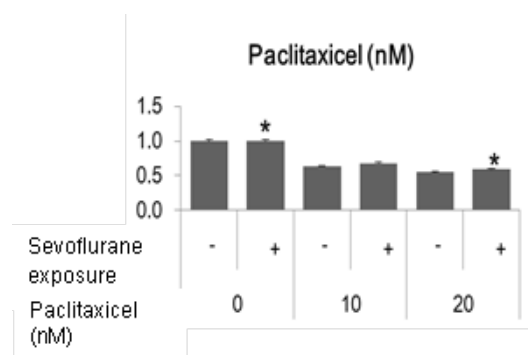


Figure 5.

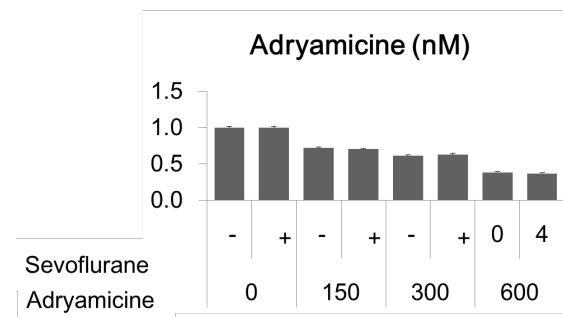


Figure 6.

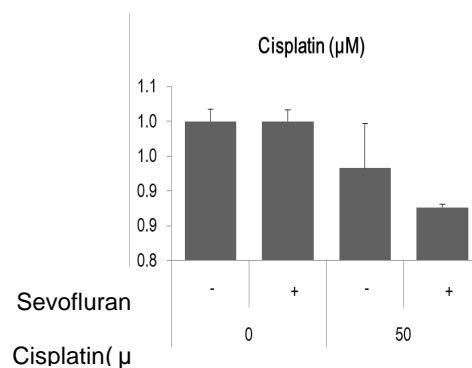
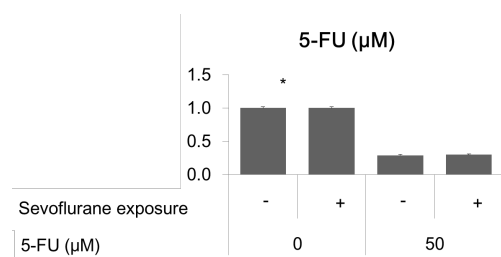


Figure 7.



(5) Yuko Konishi, Takahiro Hirai, Shoko Mizuno and Kimitoshi Nishiwaki., Sevoflurane partly promotes cancer cell growth. 5th Global Conference on Perioperative Care of the Cancer Patient, 2017, Boston, USA, 2017

(6) 小西裕子、石田祐基、水野祥子、平井昂宏、西脇公俊. セボフルランのヒト大腸がん細胞株へ及ぼす影響 2 - HCT116 トランスクリプトーム解析 - 日本麻酔科学会 第 63 回学術集会 (福岡) 2016

(7) 小西裕子、平井昂宏、水野祥子、西脇公俊. セボフルランのヒト大腸がん細胞株へ及ぼす影響 1—HCT116 における S 期細胞増加について— Sevoflurane stimulates s-phase transition on colon cancer cell HCT116. 日本麻酔科学会 第 63 回学術集会 (福岡) 2016

(8) Yuko Konishi Takahiro Hirai, Shoko Mizuno and Kimitoshi Nishiwaki., Sevoflurane stimulates MAPK1/3 phosphorylation after its exposure and caused short cell growth on HCT116, 4th Global Conference on the Perioperative Care of the Cancer Patient, Houston, USA, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/anesthesiology/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：西脇 公俊

ローマ字氏名： Nishiwaki Kimitoshi

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、研究者個人に帰属されます。