

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10932

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬は可逆的なヒストン脱メチル化に関与しているか

研究課題名(英文) Sevoflurane affect one of DNA modification?

研究代表者

小西 裕子 (Yuko, Konishi)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：60771970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： これまでに我々は複数のがん細胞株を用い吸入麻酔薬の暴露により、細胞死を生じるがん細胞株と増殖を高める細胞株が存在することを報告した。そこで本研究では汎用している吸入麻酔薬セボフルランに着目し、暴露後にヒト結腸がん細胞が増殖する機序について取り組んだ。その結果、大腸のポリープ形成に関わるとされる糖分泌タンパク質の有無の違いが、細胞分裂因子タンパク質やWnt/ β -catenin経路を不活化し、セボフルラン暴露後にコロニー形成能や増殖能を減少することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

吸入麻酔薬が低酸素などの状況で心筋や神経の保護作用があることが古くから知られているが、一方で癌の再発への影響を精査した実験はまだ十分ではない。本研究ではセボフルラン暴露によって加速した細胞増殖能を、ある遺伝子の欠失クローンを樹立して厳密に比較し基礎データを蓄積することができた。これにより担癌患者へのより適切な麻酔薬の選択に資する基礎データの蓄積を可能にした。将来的には原発癌腫やその遺伝的特性に対応した周術期の麻酔薬を選択することができると考える。

研究成果の概要(英文)： From the growing in vitro evidences suggests that sevoflurane potentially plays a role in the progression of tumors. In this study we revealed that sevoflurane potentially induced one of colorectal cancer cell line through MAPK and Wnt/ β -catenin canonical pathway activation. Whereas two of our established Wnt knock out clones undo this proliferation and reduced the number of colonies after 2 weeks in regular culture. These suggested that Wnt genes that comprise a family of secreted lipid-modified signaling glycoprotein were one of key regulator after sevoflurane induced cell growth. To further explore we hypothesized that a potential of methylation would occur onto Wnt suppressor genes upon sevoflurane exposure, supporting the our found lower expressed those of suppressor genes. In the contrast our study could not revealed that sevoflurane potentially methylated DNA and lead to reduce the expression such as JMJD Wnt suppressor gene.

研究分野：麻酔学

キーワード：セボフルラン 結腸がん細胞株

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

周術期に長時間使用する様々な麻酔薬が、がんの外科手術後の再発・浸潤に関わりをもつかどうかという懸念から、各国で後ろ向きコホート研究が実施された。2017年イギリスの Wigmore, TJ らは各種がん外科手術に使用する麻酔薬を吸入麻酔薬と静脈麻酔薬に分け、術後の5年生存率を比較したところ、大腸がんや膀胱がんでは有意差は得られなかったが、乳がん手術では静脈麻酔薬が有意に生存率を高めたことを報告した。一方、2019年韓国の Yoo, S らは乳がん手術のうち根治乳房切除術に限定し、上記2つの麻酔方法に有意差がないことを5年及び10年の生存率を用いて報告した。このように同じ乳がんに対する術中の麻酔薬の影響についても手術時間の差、再発や浸潤の有無、外科手術の侵襲度の違いがあることもあり結論は一致していない。また細胞株や動物を用いた基礎研究においても同様に一致した結論は得られていない。予測される問題点として、対象としたサンプル数が十分ではなく、麻酔薬へ暴露する条件が各施設で異なっていることなどが考えられる (Benzonana L et al., Anesthesiology, 2013, Lian H et al., J Anesth, 2015)。

2. 研究の目的

これまでに研究代表者らは汎用されている吸入麻酔薬セボフルランに着目し、ヒトがん細胞株へ暴露し増殖能を生化学的また分子生物学的に精査した。特にセボフルランを同一の暴露条件下で複数のヒトがん細胞株と正常細胞株に暴露することにより、細胞株ごとに異なると予測した増殖能の比較を可能にした。その結果、一部のヒトがん細胞株ではセボフルランの暴露後に増殖を減少し一方で、増殖能亢進を示した細胞株もみられた。これらの増殖影響の違いは、由来するがんの臓器とは関わりなく、細胞株特異的に生じていることを見出した。そこで本研究ではこの試験細胞に含まれたヒト結腸がん培養細胞株に着目し、セボフルラン暴露後に転写を高めた遺伝子発現や、タンパク質などの生化学的な変化を明らかにすることを目的とした。またエピゲノム修飾異常は発がんの原因の一つになり、炎症や老化による細胞周期制御遺伝子の異常低発現をはじめ、大腸がん細胞では増殖を制御する遺伝子を異常低下させ、その結果 Wnt や C-myc などのがん遺伝子を活性化し増殖を促すことが近年知られていることから、セボフルラン暴露によりこのエピゲノム修飾異常の有無にも取り組んだ (Yamashita S et al. Cancer Sci 2006)。

3. 研究の方法

本研究は以下の手順で実験を行った。複数のヒトがん細胞株を用いた増殖解析はセボフルラン暴露から0~72時間後にそれぞれの細胞数をコールタカカウンターによって計測し増殖能を評価した。足場非依存性増殖能は軟寒天培地に2週間培養後に染色し、顕微鏡画像によってコロニーの数を数えて評価を行った。細胞数を増加した原因として細胞分裂の活性化に着目し、DNA合成期に侵入した細胞数を次のように計測した。セボフルラン暴露した細胞にFITCを添加したBrdUによる取り込ませ染色を行いフローサイトメトリーによって計測をした。一方セボフルラン暴露後に生じた細胞死の評価を行うため、細胞死の指標タンパク質の一つである細胞膜の脆弱性を示すAnnexin Vと細胞外のDNAを染色する7-AADにてそれぞれ染色しフローサイトメトリーで計測した。さらにこの増殖について遺伝子の動きを確かめるために、目的のヒト結腸がん細胞株にセボフルランを暴露しcDNA合成を経て、シーケンサーHiSeqによる配列の読み取りを行った。さらに得られた配列をCLC Genomics Workbenchを用いて網羅解析を実施した。また標的のエピゲノム修飾異常に関連するタンパク質の細胞内変化を明らかにするため、セボフルラン暴露後の細胞破砕液を時系列に回収し、タンパク質の活性化や細胞質内の発現量についてウェスタンブロットング法を用いて定量を行った。またこの結腸がん細胞株のセボフルラン暴露後に生じる増殖能の亢進をヌードマウスに移植した異種移植モデルによって再現できるかどうかを検討した。動物実験は本施設の認証を受けたプロトコルに沿って実施した。また得られた腫瘍はパラフィン固定後に免疫組織染色を行った。また一部のWNT遺伝子をCRISPR/Cas9システムによりノックアウトしたクローンをセボフルランに暴露しメチル化特異的PCR法を用いた解析を行った。以上全ての試験したヒト培養細胞株は5%の二酸化炭素を満たした37度の恒温培養器内に静置し、気化した0-4%のセボフルランを0-16時間暴露した。エピゲノム修飾異常を生じているかどうかを明らかにするためセボフルランが暴露後に発現を低下していた候補遺伝子のそれぞれについてメチル化特異的PCRを実施した。

4. 研究成果

始めに由来の異なる8種類のヒトがん細胞株と2種類の正常細胞株を用いて同一条件下で増殖能を細胞数の変化によって検討した。その結果2種類の正常細胞株、1種類の肺がん細胞株、2種類の乳がん細胞株らは4-8時間までに暴露無しコントロールに比べてその細胞数を減らした(結果の一部、図1)。これらの増殖影響の違いと由来臓器には関連がみられなかったことから、セボフルラン暴露後の増殖影響は細胞株特異的に生じていることを明らかにした。

次に暴露後に細胞死を生じたかどうかを調べるために細胞死の指標タンパク質2種類(Aneixin V-FITC, 7-AAD)を用いてそれぞれ染色した結果、セボフルラン暴露後に増殖を減少したグループでは、染色陽性細胞が有意に増加したことから、セボフルランによって細胞死が引き起こされていると同定した。一方、セボフルラン暴露を受けた一部の肺がん細胞株、乳がん細胞株、大腸がん細胞株は細胞数を増やし、細胞死指標タンパク質の陽性細胞数は暴露無しコントロールと有意差は得られなかった。これによりセボフルラン暴露後に細胞数を増やしたヒトがん細胞株群は、暴露無しコントロール群と同様に細胞死を増加しなかったことが明らかとなった。

またこのヒト結腸細胞株がセボフルラン暴露後に増殖に転じた機序を明らかにするため、BrdU染色陽性細胞数をフローサイトメトリーにて計測した。その結果この結腸がん細胞株は暴露無しコントロールに比べ有意にDNA合成期に侵入する細胞数を増加した(図2)。このことからこの結腸がん細胞株はセボフルランによって、細胞死を抑えて増加したのではなく、暴露後に細胞周期を速めることにより細胞数を増加したことが判明した。

また動物を用いた実験において、セボフルラン暴露後の結腸がん細胞株はヌードマウスの皮下でもその増殖能を維持したことが、暴露無しコントロールとの比較により同定した。さらにこの腫瘍組織の免疫染色によって細胞分裂を示す指標タンパク質の免疫陽性細胞が増加したことも実験により明らかになった。その結果セボフルラン暴露を受けたヒト結腸がん細胞株はマウスの皮下においても増殖能を維持したことを明らかにした(図3)。

図1. セボフルラン暴露の時間と由来の異なるヒトがん細胞株の細胞数比較

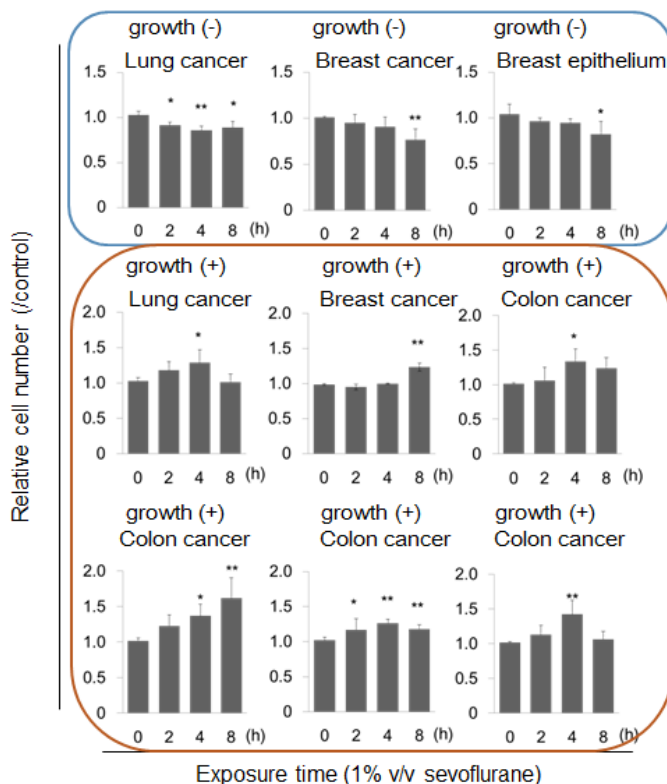


図2. セボフルラン暴露4時間に増加するDNA合成期の細胞数

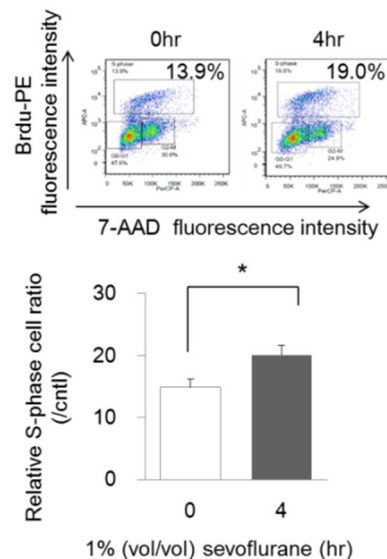


図3. セボフルラン暴露後のヒト結腸がん細胞株を移植したヌードマウス。図下は生育日数と皮下の腫瘍の大きさを比較したグラフ

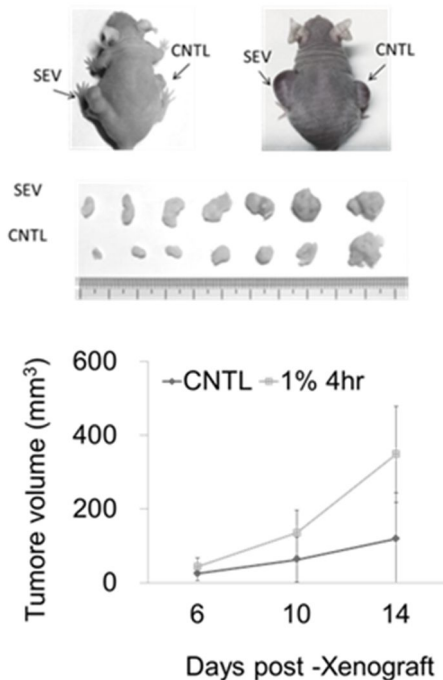


図4. セボフルラン暴露と分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼの遺伝子発現量

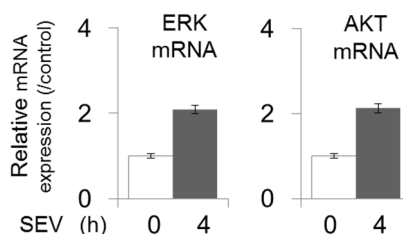
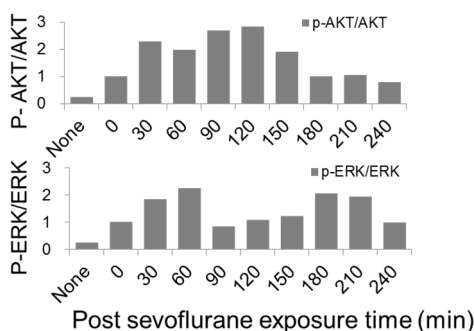


図5. セボフルラン暴露を中断後の分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼのリン酸化



さらにセボフルラン暴露後に増殖する機構を支えている遺伝子の働きを調べるため、異なる暴露時間における mRNA 網羅解析を行った。その結果、細胞周期チェックポイント遺伝子でもあり重要ながん抑制遺伝子 *p53* や、エピゲノム修飾に関連する一部の遺伝子が異常低発現をしていることを見出した。

そこでこれらの mRNA がタンパク質までに翻訳されているかどうかを確認するためウェスタンブロットングを行った。その結果メチル化修飾に関わる JMJD タンパク質の定量が技術的に困難であったため検出が難しく十分な結果が得られなかった。異なるエピトープの抗体を試験する、またはエライザなどを別の実験を試すなどの課題が残された。

またその JMJD タンパク質らの下流で制御を受ける *c-Myc* 遺伝子について解析したところ、*p53* と同調してその発現量を低下していたが、転写タンパク質量は刺激無コントロールと十分な差を生じなかった。これによりクロマチン修飾による制御を受けている可能性が低いと予測し、予定をしていたクロマチン修飾異常の網羅解析を実施せず、回避的にクロマチン修飾特異的抗体を用いたウェスタンブロットングや細胞免疫染色について試験を行った。しかしサンプル濃度やターゲットタンパク質の活性の低さを検出するためには抗体反応が十分ではなく、他の複数の抗体を試すなど実験手技に技術的な課題を残すことになった。

一方、タンパク質 TP53 はセボフルラン暴露後において細胞質内でのタンパク質量は暴露時間全体を通して低下したことからセボフルラン暴露によってがん抑制遺伝子 *p53* の転写は抑えられることが判明した。

また細胞数の増加や DNA 合成期の増加に直接関わる分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (AKT, ERK, MEK) の活性化タンパク質量を解析したところ、両者ともセボフルラン暴露3時間から有意にその活性を高めることを同定した。このことからセボフルランを4時間暴露した結腸がん細胞株は、暴露時間を通してがん抑制遺伝子 *p53* の発現を抑える一方、MAP キナーゼである ERK や AKT を活性化して細胞死抵抗性を示し、早期の増殖を進めることが推察された (図4, 5)。

上記のようにメチル化修飾異常の同定が困難であったためノックアウトクローンをを用いた検討を行った。まずセボフルラン暴露後に活性を異常低下した制御遺伝子であり、がん化に関わ

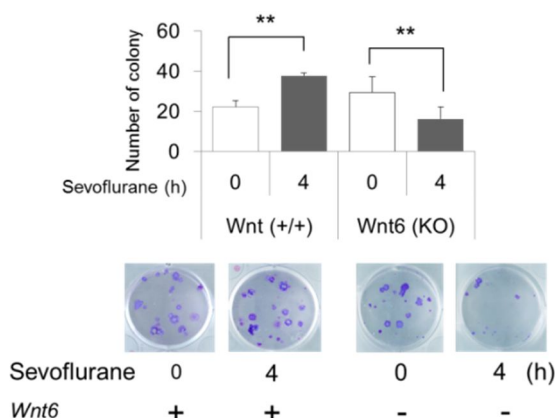
り活性を高めた *WNT* 遺伝子の一つに着目した。さらにこの遺伝子の有無の違いを厳格に比較するためにこの *WNT* 遺伝子のノックアウトクローンを CRISPR/Cas9 システムを用いて樹立した。*WNT* 遺伝子は胃や小腸などの表皮で分泌され、Frizzled ファミリーの細胞表面受容体に結合し、Dishevelled ファミリータンパク質を介し、転写因子 β -カテニンシグナルを活性化することが知られている。特にこの *WNT*/ β -カテニン経路はエピゲノム修飾のうち、特にメチル化修飾に影響を一部に受け、胃や小腸などの消化器上皮の未分化能を維持することが知られている。

そこでセボフルラン暴露後に発現した *Wnt* 遺伝子のノックアウトクローンを樹立し、麻酔薬暴露による活性化の違いを検討した。ノックアウトクローンはセボフルラン暴露後の足場の不安定な増殖能を有意に減少し、単層培養の増殖能に有意にコロニー増殖能を減少した(図6)。さらにこの増殖能の低減はマウスの異種移植によっても再現できたことから、セボフルラン暴露を受けたこの結腸がん細胞株は糖分泌タンパク質の一種 *WNT* を介して、浸潤能に関わる足場の安定しない状況での増殖能を高めることを示した。

またこの *WNT* ノックアウトクローンをを用いたメチル化特異的 PCR 法による予備的な解析を行った。この予備実験の結果ではヒト結腸癌の *WNT* ノックアウトクローンはメチル化をしていない実験コントロールに比べ、プロモータ領域のメチル化の違いに有意な差はみられなかった。しかし試験回数も十分ではなく、実験技術や時間の制御もあり課題が残された。

以上により本研究の遂行により、仮説としたセボフルラン暴露によって癌抑制遺伝子 *p53* 遺伝子の可逆的なエピゲノム異常を検出することはできなかった。しかしセボフルラン暴露により MAPK を活性化して細胞死を低減し、細胞分裂を早め単層培養での増殖能を亢進することを明らかにした。これらのことから本研究で用いたヒト結腸癌培養細胞株のセボフルランからの増殖影響の機序の理解を一部進めることができた。

図6. *WNT* 遺伝子ノックアウトクローンコロニー形成能の比較



< 引用文献 >

- Wigmore TJ., et al. Anesthesiology. 2016;124(1):69-79.
- Yoo S, Le., et al. Anesthesiology. 2019;130(1):31-40.
- Benzonana, L. L., et al. Anesthesiology 119, no. 3 (2013): 593-605.
- Liang, H., et al. J Anesth 29, no. 6 (2015): 821-30.
- Yamashita, S., et al. Cancer Sci 97, no. 1 (2006): 64-71.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takahiro Hirai, Yuko Konishi, Kimitoshi Nishiwaki
2. 発表標題 1% Sevoflurane exposure is associated with early and late apoptotic cell death on A549 and MCF-7 cell lines
3. 学会等名 American Society of Anesthesiologists (ASA) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小西裕子、周睿、林智子、平井昂宏、西脇公俊
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小西裕子、周睿、平井昂宏、西脇公俊
2. 発表標題 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（優秀演題）
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第64回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小西裕子、周睿、平井昂宏、西脇公俊
2. 発表標題 セボフルラン暴露後に生じる大腸癌細胞株の短期的な増殖はERK1/2のリン酸化が関与する
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第64回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuko Konishi, Takahiro Hirai, Sachiko Mizuno, Kimitoshi Nishiwaki
2. 発表標題 Sevoflurane partly promotes cancer cell growth.
3. 学会等名 5th Global Conference on Perioperative Care of the Cancer Patient
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takahiro Hirai, Yuko Konishi, Kimitoshi Nishiwaki
2. 発表標題 Sevoflurane stimulates MAPK1/3 phosphorylation after its exposure and caused short cell growth on HCT116.
3. 学会等名 ASA; American Society of Anesthesiologists
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuko Konishi, Takahiro Hirai and Kimitoshi Nishiwaki
2. 発表標題 Sevoflurane stimulates MAPK1/3 phosphorylation after its exposure and caused short cell growth on HCT116
3. 学会等名 The 4th Global Conference on the Perioperative Care of the Cancer Patient (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 平井 昂宏、小西裕子、西脇公俊
2. 発表標題 各種ヒトがん細胞に与えるセボフルラン暴露影響の予備的研究
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第63回学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 小西裕子、平井昂宏、水野祥子、西脇公俊
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第63回学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 小西裕子、水野祥子、平井昂宏、西脇公俊
2. 発表標題 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 -
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第63回学術集会
4. 発表年 2016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
研究協力者	西脇 公俊 (Nishiwaki Kimitoshi) (10189326)	名古屋大学・大学院医学系研究科・教授 (13901)	