

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16751

研究課題名(和文) 麻酔関連薬剤の長時間曝露が口腔癌細胞の生存に影響を与えるか？

研究課題名(英文) The effects of prolonged exposure to anesthetics on oral cancer cells.

研究代表者

西和田 忠(Nishiwada, Tadashi)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20649165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌細胞に対するオピオイドの影響についてヒト口腔癌細胞株HSC-3を用いて研究した。モルヒネ48時間曝露でviabilityを低下、細胞を傷害させることを明らかにした。10日間曝露でも容量依存性にコロニー形成を減少させた。アポトーシスと細胞周期を調査し、高濃度でのみ有意なアポトーシスの増加と細胞周期の停止を認め臨床濃度では認めなかった。次にNF- $\kappa$ BとVEGFについて研究し、臨床濃度でもNF- $\kappa$ B陽性細胞・VEGF産生を減少させることを明らかにした。これらから、モルヒネがVEGF産生とNF- $\kappa$ B発現を抑制することによってHSC-3の増殖を阻害させ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

麻酔薬の癌細胞増殖への影響は、癌の手術療法において麻酔薬の選択に関わる大きな課題である。特に頭頸部癌の手術では術後創部安静のために麻酔薬の長期投与が必要である。過去のオピオイドの癌細胞に対する影響を調査した基礎研究では、オピオイドが癌細胞に対して促進的に働くとする報告と抑制的に働くとする報告が混在しており、その原因も解明されていない。本研究によるモルヒネの一貫したHSC-3に対する抑制作用と、臨床濃度におけるNF- $\kappa$ B及びVEGF抑制を介した機序の解明は、基礎研究ではあるが、臨床での全身麻酔、術後鎮静鎮痛方法の選択にひとつのエビデンスをもたらすことになり、臨床的意義は大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of opioids on oral cancer cells using the human oral cancer cell line HSC-3. It was revealed that exposure to morphine for 48 hours reduces viability and damages cells. Exposure for 10 days reduced the colonization in a dose-dependent manner. Then, apoptosis and cell cycle were investigated, significant increase in apoptosis and cell cycle arrest were observed at only high concentration. Next, we studied the effects of morphine on NF- $\kappa$ B and VEGF, it was revealed that NF- $\kappa$ B positive cells and VEGF production were reduced even at clinical concentrations. These results revealed that morphine inhibits the proliferation of HSC-3 by suppressing VEGF production and NF- $\kappa$ B expression.

研究分野：麻酔

キーワード：モルヒネ 口腔癌 細胞増殖 血管内皮増殖因子 Nuclear factor kappa B

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

固形癌摘出手術の際に使用される全身麻酔薬の種類やオピオイド使用の有無が術後の癌再発や転移といった患者アウトカムに影響する可能性が報告されている。

頭頸部癌に対する手術では、病変部位の切除とリンパ節郭清に加えて血管吻合を伴う遊離皮弁を用いた再建術が必要となる。術後は血管吻合部の安静のために72時間程度の不動化が必要で、静脈麻酔薬とオピオイドの持続投与を要する。このような頭頸部外科手術の術後管理における各薬剤の長時間曝露が、全身麻酔中に限定された通常の外科手術の場合よりも、手術操作等によって体内に播種される残存癌細胞に大きな作用を及ぼす可能性が危惧される。

この問題に対する過去の臨床研究報告はなく、さらに口腔癌診療ガイドラインによると口腔癌が全癌の約1%、頭頸部癌全体で約2.5%と頻度が低いため、臨床研究を行うことは非常に困難と考えられる。一方、静脈麻酔薬に関する基礎研究においては、プロポフォールが食道扁平上皮癌細胞の増殖、浸潤、血管新生を抑制 (Xu YB, et al. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2013) するという報告やミダゾラムが口腔癌細胞を傷害 (Ohno S, et al. Anticancer Res 2012) するという報告がある。また癌種は異なるが、デクスメトミジンは癌細胞の生存に促進的に働くという報告 (Xia M, et al. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2016) がある。オピオイドについては癌細胞の生存に促進的に働くという報告 (Lazarczyk M, et al. Peptides 2010, Fujioka N, et al. Anesth Analg 2011) と抑制的に働くという報告 (Hatsukari I, et al. Anticancer Res 2007, Zhang XL, et al. Int J Clin Exp Pathol 2015) が存在するが、逆の結果が出る原因や機序は解明されておらず結論が出ていない。また、これらの研究は各種薬剤の臨床使用濃度を大きく上回る条件で行われており、より実臨床に即した薬剤濃度や曝露時間を考慮した研究結果が望まれる。

### 2. 研究の目的

(1) 口腔癌細胞への麻酔関連薬剤の臨床濃度による長時間曝露が、癌細胞の viability・細胞傷害・増殖能・アポトーシス等にどのような影響を与えるかを検討することによって、全身麻酔や術後鎮静鎮痛に用いる薬剤の選択に寄与する。

(2) オピオイドが口腔癌細胞に与える影響についてその機序を考察し、結論の出していない癌細胞に対するオピオイドの影響について一定のエビデンスを与える。

### 3. 研究の方法

(1) まず、ヒト口腔癌細胞株 HSC-3 を用いて、口腔癌の術後鎮痛・鎮静に長時間用いられるオピオイドとプロポフォールによる影響及びそれらの併用による影響について検討した。オピオイドとしてモルヒネとフェンタニル、鎮静薬として臨床で最も用いられるプロポフォールを用いた。実験プロトコールとしては、それらを 48 時間もしくは 72 時間 HSC-3 に曝露し、MTT assay を用いて viability を測定するとともに LDH assay を用いて細胞傷害性を測定した。また、BrdU ELISA を用いて細胞増殖を測定した。それぞれそれら単独と併用について調査した。

(2) 口腔癌に対しては近年では特に放射線療法の発展が目覚ましいが、放射線療法においてもその鎮痛のためにオピオイドが使用されることから、HSC-3 の放射線感受性にオピオイドが影響するかについて検討した。実験プロトコールとしては、モルヒネもしくはフェンタニルを HSC-3 に曝露後、4Gy の X 線を照射し、コロニー形成法を用いて 10 日後の細胞増殖を計測した。

(3) (1) (2) の結果、モルヒネ単独曝露が臨床濃度でも HSC-3 に影響する可能性が考えられたため、モルヒネに焦点を絞って、モルヒネの HSC-3 に対する影響についてその機序も含めて検討した。実験プロトコールとしては、臨床濃度から高濃度までのモルヒネを HSC-3 に曝露し、48 時間後に MTT assay で viability を、LDH assay で細胞傷害性を調査した。フローサイトメトリーを用いて細胞周期に与える影響を調査するとともにアポトーシスを調査した。またより長期間の曝露による影響を調査するためにコロニー形成法を用いて 10 日後の細胞増殖を測定した。さらにその機序を検討するために、フローサイトメトリーを用いて NF- $\kappa$ B 発現細胞を調査するとともに ELISA を用いて vascular endothelial growth factor (VEGF) 産生について調査した。

### 4. 研究成果

(1) 用いた各薬剤の濃度は、併用することも考慮し、比較的低い臨床濃度とした。モルヒネは 500nM で有意に viability を低下させたが、プロポフォールは臨床濃度である 12.5  $\mu$ M において有意な影響を与えなかった。しかし両薬剤を併用することによって、より viability を低下させた (図 1)。またフェンタニルは 50nM で有意に viability を低下させ、プロポフォールとの併用でより有意に viability を低下させた (図 2)。しかし細胞傷害性を調査した LDH assay では全ての薬剤で有意差を認めず、また細胞増殖を調査した BrdU ELISA でも有意な増殖の低下を認めなかった (図 3、図 4)。

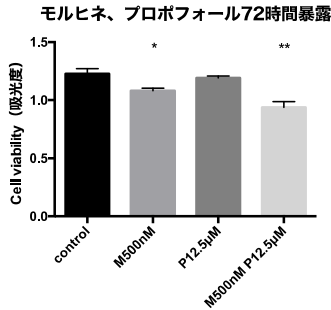


図1 モルヒネ・プロポフォール・それらの併用がHSC-3のviabilityに与える影響  
\* P < 0.05 vs. control, \*\* P < 0.05 vs. M500nM, P12.5µM

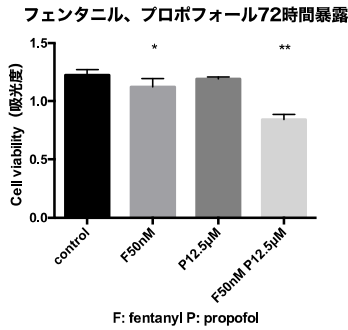


図2 フェンタニル・プロポフォール・それらの併用がHSC-3のviabilityに与える影響  
\* P < 0.05 vs. control, \*\* P < 0.05 vs. F50nM, P12.5µM

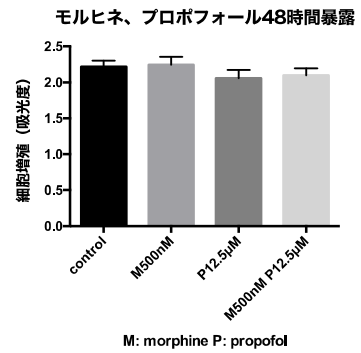


図3 モルヒネ・プロポフォール・それらの併用がHSC-3の細胞増殖に与える影響

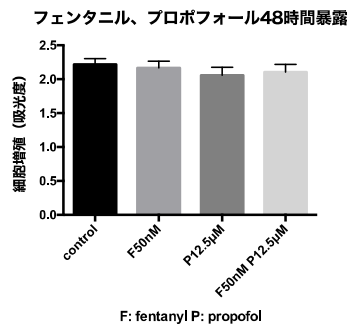


図4 フェンタニル・プロポフォール・それらの併用がHSC-3の細胞増殖に与える影響

(2) 用いた濃度はオピオイドに対する耐性を考慮した臨床濃度とした。モルヒネのみで10日間100 µM 暴露で有意にコロニー形成が抑制されたが、X線に対する感受性には影響を与えなかった(図5、6)。フェンタニルについても同様の研究を行なったが、フェンタニルはコロニー形成、X線感受性ともに影響を与えなかった(図7、8)。

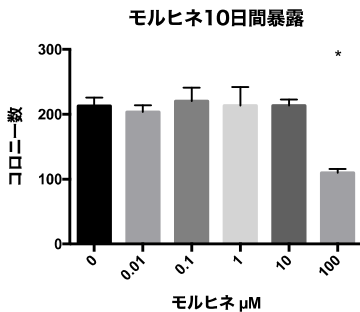


図5 モルヒネ10日間暴露がコロニー形成に与える影響  
\* P < 0.05 vs. 0

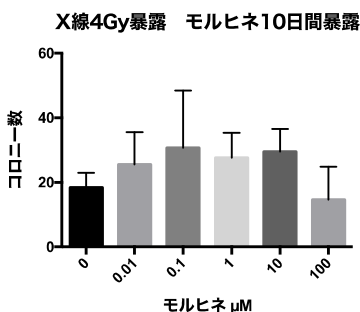


図6 X線4Gy後のコロニー形成にモルヒネ暴露が与える影響

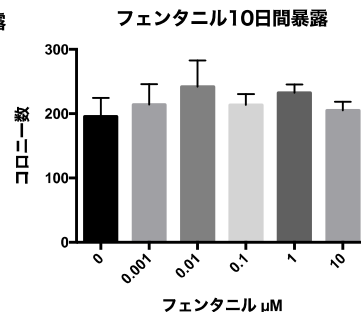


図7 フェンタニル10日間暴露がコロニー形成に与える影響

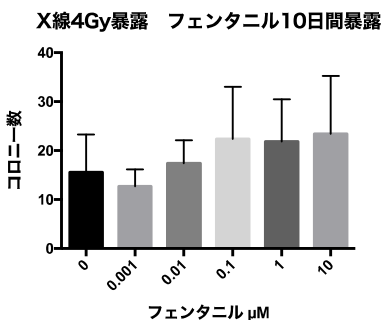


図8 X線4Gy後のコロニー形成にフェンタニル暴露が与える影響

(3) 用いたモルヒネ濃度は(1)(2)の結果を踏まえて、かつ高濃度のモルヒネによる作用を確認するために臨床濃度から高濃度に当たる1000 µMまでとした。コロニー形成法は10日間、それ以外は48時間暴露した。MTT assayで濃度依存性にviabilityが低下し、LDH assayで濃度依存性に細胞傷害性が増強した(図9、10)。コロニー形成法においても濃度依存性にコロニー形成数が減少した(図11)。細胞周期を調査した結果、1000 µMで有意にG0/G1期からS期に移行する細胞数が減少した(図12)。アポトーシスについて検討した結果、1000 µMでのみ有意にアポトーシスの増加を認めた(図13)。これらの機序を調査するために、NF-β発現細胞及びVEGF産生を測定したところ、いずれも濃度依存性の低下を認めた(図14、15)。

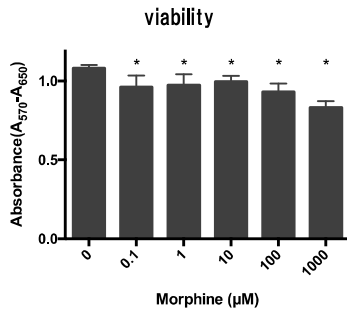


図9 モルヒネ48時間暴露がHSC-3のviabilityに与える影響  
\* P < 0.05 vs. 0

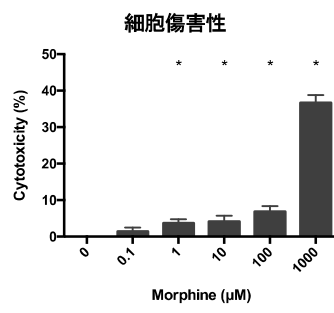


図10 モルヒネ48時間暴露がHSC-3の細胞傷害性  
に与える影響  
\* P < 0.05 vs. 0

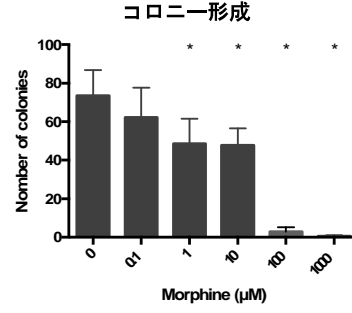


図11 モルヒネ10日間暴露がHSC-3のコロニー  
形成に与える影響  
\* P < 0.05 vs. 0

	Cell cycle phase		
	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
control	54.9±1.4	30.6±0.8	12.1±0.8
morphine 10 μM	55.7±1.1	30.7±1.0	11.3±0.4
morphine 100 μM	56.9±0.5	30.1±0.4	10.7±0.5*
morphine 1000 μM	81.4±2.4*	8.3±0.9*	6.7±1.0*

図12 モルヒネ48時間暴露がHSC-3の細胞周期に与える影響  
\* P < 0.05 vs. control (0 μM)

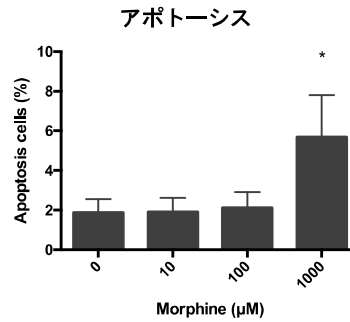


図13 モルヒネ48時間暴露がHSC-3のアポトーシス  
に与える影響  
\* P < 0.05 vs. 0

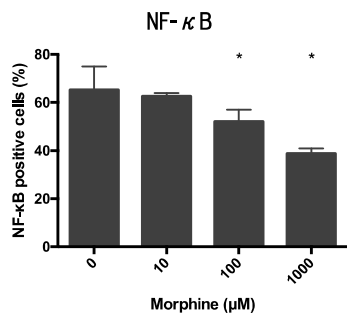


図14 モルヒネ48時間暴露がHSC-3のNF-κB発現  
に与える影響  
\* P < 0.05 vs. 0

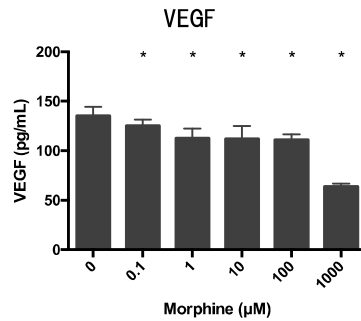


図15 モルヒネ48時間暴露がHSC-3のVEGF産生  
に与える影響  
\* P < 0.05 vs. 0

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishiwada T, Kawaraguchi Y, Uemura K, Kawaguchi M.	4. 巻 33
2. 論文標題 Morphine inhibits cell viability and growth via suppression of vascular endothelial growth factor in human oral cancer HSC-3 cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of anesthesia	6. 最初と最後の頁 408-415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00540-019-02645-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 西和田 忠、瓦口 至孝、川口 昌彦	4. 巻 44
2. 論文標題 オピオイドとがん	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床麻酔	6. 最初と最後の頁 51-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----