

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08874

研究課題名(和文) グリオーマ幹細胞を用いたがん組織表現型と遺伝子発現への麻酔薬の影響の検討

研究課題名(英文) Investigation of the effects of anesthetics on cancer tissue phenotype and gene expression using glioma stem cells

研究代表者

岩井 鉄平 (Iwai, Teppei)

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：90440966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：グリオーマ由来のがん幹細胞をex vivo (試験管内スフェロイド培養)、in vitro (試験管内単細胞培養)条件下で麻酔薬処理を施し細胞生物学的、分子生物学的にグリオーマ由来のがん幹細胞の表現型への影響(増殖能、代謝モード、細胞死)、グリオーマ由来のがん幹細胞の遺伝子系への影響(遺伝子発現)を検討した。がん幹細胞様細胞MD13細胞、Me83細胞は臨床使用濃度2%の揮発性吸入麻酔薬セボフルレンへの6時間の暴露により、増殖能・細胞死への影響なしにsphere形成能を抑制が抑制されることを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

固形腫瘍としての癌は単なる単細胞の集合体ではなく、単細胞樹立細胞株を用いた麻酔薬の影響についての従来の研究は多くのバイアス故に臨床的な実態とはかけ離れている。患者の予後への影響を見るためには、がん組織特有の表現型を解析対象とすべきである。麻酔薬のがんに対する影響の検討は樹立細胞株を用いた単細胞培養細胞について主に行われてきたがグリオーマ幹細胞を用いた検討は報告がない。この点で本研究はユニークな視点からのエビデンスを提供する事になる。この治験はがん治療の帰趨に関わる重要な要素であり社会的な意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Glioma-derived cancer stem cells were treated with anesthetics under ex vivo (in vitro spheroid culture) and in vitro (in vitro monoculture) conditions to examine the effects of anesthetics on the phenotype of glioma-derived cancer stem cells (proliferative capacity, metabolic mode, and cell death) and the effects of anesthetics on the genetic system of glioma-derived cancer stem cells (gene expression). 6-hour exposure of MD13 and Me83 cancer stem cell-like cells to sevoflurane, a volatile inhalant anesthetic at 2% clinical concentration, suppresses sphere formation without affecting proliferation or cell death.

研究分野：麻酔科学

キーワード：麻酔薬 神経膠腫 がん幹細胞 三次元スフェア培養 RNA-Seq法

1. 研究開始当初の背景

麻酔科学は主に手術を受ける患者の急性期全身管理を指向して発達してきた学問領域である。麻酔薬の生体への作用は一過性であり、しかも可逆的であるとの暗黙の了解も存在してきた。その意味で、麻酔後の患者の長期予後についての考察が不十分であった。このような状況で「麻酔」が、がん患者の手術予後にいかなる影響を与えるかという問題の解決は麻酔科学上の大きな課題の一つとなってきた。固形腫瘍としての癌は単なる単細胞の集合体ではなく、単細胞樹立細胞株を用いた麻酔薬の影響についての従来の研究は多くのバイアス故に臨床的な実態とはかけ離れている。患者の予後への影響を見るためには、がん組織特有の表現型を解析対象とすべきである。

報告者らは、がん組織に特徴的な性質つまり持続的な増殖能、増殖抑制の回避、転移・浸潤能、ゲノムの不安定性、代謝転換、腫瘍促進炎症、血管新生の誘導などの要素(hallmarks of cancer)に対する麻酔薬の影響を検討項目として設定する。一方、「がん幹細胞」または Tumor Initiating cell という概念が提唱されている。麻酔が、がん患者の予後に影響を与えると仮定してその分子機構の解明には長期予後に影響を与える再発への影響を検討する必要があるがん幹細胞への影響を検討する事は必須の課題である。またがん特徴的な代謝様式である解糖系優位なモード (Warburg 効果) をもたらす転写因子 HIF-1 の活性化が麻酔薬で大きく影響を受けると報告者らのこれまでの研究結果も存在する。

報告者らはグリオーマから樹立しているがん幹細胞を用いてこの問題へのアプローチでの研究を着想した。

麻酔薬のがんに対する影響の検討は樹立細胞株を用いた単細胞培養細胞について主に行われてきたがグリオーマ幹細胞を用いた検討は報告がない。

また本研究では従来の研究に欠けていた視点からの検討を行う。つまり麻酔薬のがんの長期予後に影響するとして、今回グリオーマ幹細胞(glioma stem-like cell, GSC)を用いて短期間の麻酔薬作用が再発などを含む長期的な表現型にいかなる分子機序で転換されるのかという問いを設定した。

この点で本研究はユニークな視点からのエビデンスを提供する事になると考えられた。

2. 研究の目的

がん細胞の挙動への麻酔薬の影響については、樹立細胞株を用いた基礎研究の報告もされている。しかし従来の樹立細胞株を用いた検討は細胞株の樹立に伴う過程でがん組織がもつ性質が変化しているという点また in vitro における表現型に力点を置きすぎて in vivo でのがんのがん組織としての振る舞いの検討への視点が欠損しているという致命的な問題点を抱えていてこのトピックスの本質的な解決には至っていなかった。

作業仮説として麻酔薬のがんの長期予後に影響するとして、今回グリオーマ幹細胞(glioma stem-like cell, GSC)を用いて短期間の麻酔薬作用が再発などを含む長期的な表現型にいかなる分子機序で転換されるのかという問いを設定した。悪性度の高いグリオーマを対象として、三次元スフェア(細胞塊)培養と脳移植モデルを用いてがん組織への麻酔薬の影響を検討する実験系を構築しさらに長期予後の観点から再発と関連深いがん幹細胞性の影響を合わせて検討して麻酔薬のがんに与える影響を理解することを目的とした。報告者らが樹立したグリオーマ由来のがん幹細胞を解析の対象とすることで従来の単なる樹立細胞株を用いた検討の欠点のいくつかを克服できると期待され周術期使用薬剤ががん幹細胞に直接的(細胞へ直接)または間接的(脳という環境下で間接的に)にいかなる影響を及ぼすかある程度最終的な結論が与えられると期待された。

報告者で樹立したグリオーマ由来のがん幹細胞を in vivo (Xenograft モデル), ex vivo (試験管内スフェロイド培養), in vitro (試験管内単細胞培養)条件下で麻酔薬処理を施し細胞生物学的、分子生物学的に以下の項目を研究期間3年で検討した。

(1)グリオーマ由来のがん幹細胞の表現型への影響(増殖能、代謝モード、細胞膜分子発現、細胞死、細胞内シグナル伝達、抗がん剤への感受性、組織学的検討)

(2)グリオーマ由来のがん幹細胞の遺伝子系への影響(遺伝子発現, エピジェネティックの制御など)

3. 研究の方法

(1) 実験系

グリオーマ由来のがん幹細胞の調製

グリオーマ由来のがん幹細胞は手術切除標本から樹立され継代を行っている high-grade glioma

patient-derived neurospheres (MD13 and Me83)を利用した。

in vitro・ex vivo 実験系

in vitro 実験系とは、酵素処理をがん幹細胞に施し単細胞化したものを培養に供して行う実験系であり、ex vivo 実験系とはがん幹細胞をスフェロイドのまま培養して行う実験系である。

(2) 周術期使用薬剤について

揮発性吸入麻酔薬としてイソフルラン・セボフルランを用いた。

(3) がん組織の表現型への影響

増殖能

in vitro 系では生細胞中のミトコンドリアの脱水素酵素活性をベースにした MTT アッセイの変法 WST 法(テトラゾリウム塩のホルマザン色素への変換)を用いて増殖能と生存を検討する。ex vivo での増殖は、顕微鏡で長軸と短軸を測定した指数によるものと WST 法を用いる。

幹細胞性(stemness)

In vitro Sphere Formation Assay または In vivo tumor initiating assay で評価する。CD133 などのマーカーの発現も検討する。

細胞死(アポトーシス)

フローサイトメーターを用いて蛍光標識した annexin-V との結合で初期アポトーシスの検出を行い、同時に propidium iodide を用いて後期アポトーシスまたはネクロトーシスの検出を行う。Caspase3 活性化は酵素活性を化学的に測定するキットと Western blot を用いて行う。アポトーシスに伴う poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 分子の切断の有無は Western blot を用いて行う。

代謝モード

がん幹細胞の代謝状況を酸素消費速度(OCR)と細胞外酸性化速度(ECAR)を細胞外フラックスアナライザーで測定することにより推定して麻酔薬処理による影響を検討する。

加えてがん細胞に特徴的なワールブルグ効果(悪性腫瘍の腫瘍細胞内で、嫌気環境のみならず好気環境でも、解糖系に偏ったブドウ糖代謝が観察される現象)に中心的な役割を果たす hypoxia-inducible factor 1(HIF-1)の活性化状況を検討する。HIF-1 の活性が麻酔薬で大きく影響を受けることはこれまでの研究で明らかになっている。

(4) 遺伝子発現への影響

遺伝子型の決定

ICOSLG, CD44, PROM1, OLIG などの遺伝子について mRNA 発現の変化を reverse transcription(RT)-PCR により検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞死への影響

がん幹細胞様細胞 MD13 細胞、Me83 細胞をセボフルレン(sev)2%条件下で 4 days 培養を継続して caspase 3/7 の活性化を観察したところ、セボフルレン未処理群との間で活性に有意差が見られなかった。

WST 法を用いて増殖能を検討した。MD13 細胞、Me83 細胞両株ともに Control 群と比較して sev 2% 5 days 群は増殖が抑制されていた。

(2) sphere 形成能

control 群(cont 群)、sev2% 4 時間曝露群(sev2%-4h 群)、sev2% 6 日間曝露群(sev2%-6d 群)の 3 群に分けて MD13 細胞、Me83 を用いて検討した。単一細胞を 96 well plates に限界希釈して上記 3 群に分けて培養し播種から 6 日後に直径 50 μm 以上の sphere を形成した well 数の割合を求め、対数近似のグラフを用いて sphere の形成に必要な単一細胞数(x)を算出し評価した。

cont 群と比較して MD13 では sev2%-4h 群は 88%、sev2%-6d 群は 30%、Me83 では sev2%-4h 群 86%、sev2%-6d 群 26%に低下した。

(3) sphere 増殖能

control 群(cont 群)、sev2% 4 時間曝露群(sev2%-4h 群)、sev2%6 日間曝露群(sev2%-6d 群)の 3 群に分けて MD13 and Me83 細胞を用いて検討した。増殖能は形成した sphere の面積を測定して評価した。sphere 面積は MD13 では sev2%-4h 群は 123%、sev2%-6d 群は 117%、Me83 sev2%-4h 群は 88%となり cont 群と比較して差は無かった(n=10)。

Me83 sev2%-6d 群は 70%となり cont 群と比較して増殖能を抑制する傾向にあった(n=10)。

(4) 遺伝子発現

control 群(cont 群)、sev2% 4 時間曝露群(sev2%-4h 群)、sev2%6 日間曝露群(sev2%-6d 群)の 3 群に分けて sphere 塊の状態での RNA を抽出し、cDNA を作製し、ICOSLG, CD44, PROM1, OLIG2, 18S rRNA

の primer を使用して半定量的 RT-PCR を施行した。
sev 2%-6d 群で MD13 細胞においては ICOSLG, CD44 の遺伝子発現は増加した。sev 2%-6d 曝露後、Me83 細胞では ICOSLG は変化なく CD44 の遺伝子発現は増加した。PROM1, OLIG2 の遺伝子発現はベースラインで少なく変動は観察されなかった。

(5)HIF-1 活性化への影響

Sev 2% 6 日間の曝露では HIF-1 活性の有意な変動は観察されなかった。

以上の検討によりがん幹細胞様細胞 MD13 細胞、Me83 細胞は臨床使用濃度 2%の揮発性吸入麻酔薬 セボフルレンへの 6 時間の曝露により、増殖能・細胞死への影響なしに sphere 形成能が抑制されること、これらの変化と並行して ICOSLG, CD44 の遺伝子発現が増加することが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hirota K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Basic Biology of Hypoxic Responses Mediated by the Transcription Factor HIFs and its Implication for Medicine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 E32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines8020032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Bono H, Hirota K	4. 巻 8
2. 論文標題 Meta-Analysis of Hypoxic Transcriptomes from Public Databases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 E10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines8010010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirota K	4. 巻 133
2. 論文標題 An intimate crosstalk between iron homeostasis and oxygen metabolism regulated by the hypoxia-inducible factors (HIFs)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radic Biol Med	6. 最初と最後の頁 118-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 広田 喜一	4. 巻 585
2. 論文標題 酸素生物学の建設 生体の酸素利用の方程式	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 現代化学	6. 最初と最後の頁 29-32
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 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 Sumi Chisato, Matsuo Yoshiyuki, Kusunoki Munenori, Shoji Tomohiro, Uba Takeo, Iwai Teppei, Bono Hidemasa, Hirota Kiichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Cancerous phenotypes associated with hypoxia-inducible factors are not influenced by the volatile anesthetic isoflurane in renal cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0215072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sumi Chisato, Okamoto Akihisa, Tanaka Hiromasa, Kusunoki Munenori, Shoji Tomohiro, Uba Takeo, Adachi Takehiko, Iwai Teppei, Nishi Kenichiro, Harada Hiroshi, Bono Hidemasa, Matsuo Yoshiyuki, Hirota Kiichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Suppression of mitochondrial oxygen metabolism mediated by the transcription factor HIF-1 alleviates propofol-induced cell toxicity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-27220-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwata Ryoichi, Lee Joo Hyoung, Hayashi Mikio, Dianzani Umberto, Ofune Kohei, Maruyama Masato, Oe Souichi, Ito Tomoki, Hashiba Tetsuo, Yoshimura Kunikazu, Nonaka Masahiro, Nakano Yosuke, Norian Lyse, Nakano Ichiro, Asai Akio	4. 巻 22
2. 論文標題 ICOSLG-mediated regulatory T cell expansion and IL-10 production promote progression of glioblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 333-344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/neuonc/noz204	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 広田 喜一
2. 発表標題 低酸素-低酸素誘導性因子(HIF)-炎症
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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 分担者	広田 喜一 (HIROTA Kiichi) (00283606)	関西医科大学・医学部・教授 (34417)	
研究 分担者	岩田 亮一 (IWATA Ryoichi) (60580446)	関西医科大学・医学部・非常勤講師 (34417)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------