

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：11101
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2019～2021
 課題番号：19K09367
 研究課題名(和文) 癌切除を受ける患者の予後を改善するための全身麻酔薬の探求—理想的な鎮痛薬は？—
 研究課題名(英文) The quest for the appropriate anesthetic agents for patients undergoing cancer surgery-What is the best analgesic agent?
 研究代表者
 丹羽 英智 (NIWA, HIDETOMO)
 弘前大学・医学研究科・准教授
 研究者番号：20374845
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Natural killer (以下NK) 細胞は、生体に備わっている抗癌免疫細胞の一つである。癌切除手術後のNK細胞活性(NKCC)を維持することが、術後の転移、再発を減らし、患者の予後を改善する可能性がある。レミフェンタニルは、その強力な鎮痛作用により、外科的侵襲ストレスを最小限に抑えることから術後のNKCCを維持する可能性があるが、同薬がNK細胞活性にどのような影響を与えるのかは不明であり、本研究の目的は、これを明らかにすることであった。今回、我々は、KHYG1ヒトNK細胞株を用いた実験系を確立し、レミフェンタニルも他のオピオイド同様、濃度依存性にNKCCを抑制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

レミフェンタニルは、癌手術における標準的な鎮痛薬であり、日本の外科手術において最も使用頻度が高い麻薬鎮痛薬であるが、その抗癌免疫であるNatural killer cell活性(NKCC)への影響についての研究データは、基礎研究レベルから不足している。今回、我々はヒトNK細胞株を用いた基礎研究モデルを確立し、レミフェンタニルがNKCCを用量依存性に抑制することを明らかにした。生来のヒトNK細胞は、培養が難しく、多くの実験を行えないことが問題だったが、今回、培養が容易なヒトNK細胞株を使用してこの問題を解決した。このことは、今後、さらに詳細な基礎実験を行う上での利点となる。

研究成果の概要(英文)：As an integral part of innate immunity, natural killer (NK) cells kill cancer cells. Thus, the NK cell cytotoxicity (NKCC) suppressed by surgical stress during cancer surgery may be associated with poor outcomes. Remifentanyl could attenuate the NKCC suppression after cancer surgery due to its strong anti-nociceptive action. However, the effect of remifentanyl on the NKCC is unknown. The aim of this study was to investigate such effect of remifentanyl. We established the in vitro experiment model using human cell lines (the cell line K562 as target cells and the NK cell line KHYG1 as effector cells). The NK cells were treated with 3-60 nM remifentanyl (the remifentanyl groups) or without remifentanyl (the control) for 24 h. The post-treatment NKCC was measured with a lactate dehydrogenase assay and compared among the treatment groups. The dose dependent reduction of NKCC was found in the remifentanyl groups.

研究分野：臨床麻酔

キーワード：natural killer cell 抗癌免疫 レミフェンタニル オピオイド 癌手術

1. 研究開始当初の背景

Natural killer (以下 NK) 細胞は、生体に備わっている抗癌免疫細胞の一つであり、癌切除手術後の NK 細胞障害活性 (以下 NKCC) を維持することが、術後の転移、再発を減らし、患者の予後を改善することが期待されている。一方、NKCC は外科的侵襲によるストレス、投与される麻酔薬、輸血の他、体温など様々な因子により術後数週間にわたり低下し、これが、癌の再発、転移につながる。そこで、我々は、癌手術に使用するための「NKCC を低下させない麻酔薬」を探求してきた。全身麻酔は、鎮静薬、鎮痛薬、筋弛緩薬、そして、麻酔補助薬を組み合わせることで成立する。麻酔補助薬として使用されるケタミンは、これまで NKCC を低下させると考えられてきたが、我々は、ケタミンが NKCC を低下させないことを証明した (J Oncol. 2022)。一方、近年、全身麻酔の鎮痛薬として、麻薬鎮痛薬 (以下オピオイド) であるレミフェンタニルが使用される。同鎮痛薬は、その強力な鎮痛作用により、外科的侵襲による生体のストレス反応を最小限に抑えることから術後の NKCC を維持することに有利に働く可能性がある一方、他のオピオイドと同様に NKCC を抑制する可能性もあるが、同薬の NKCC に与える影響については、基礎研究レベルのデータから不足している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「癌切除を受ける患者におけるレミフェンタニルの NKCC への影響を明らかにし、同薬が、癌切除術のための理想的な鎮痛薬かどうかを検討すること」であった。

3. 研究の方法

レミフェンタニルの NKCC に与える影響については、基礎研究レベルのデータから不足していることから、まずは、培養細胞を用いて、麻酔薬が NKCC に与える影響を検討するための実験系を確立することから研究を始めた。

ヒト NK 細胞株を用いた実験系の確立

我々が調べた限りでは、NK 細胞株を用いて、麻酔薬の同細胞株活性への影響を調べた研究は報告されていないことから、まずは、このような基礎実験系を確立するための予備実験を行った。

(1) KAI3 ヒト NK 細胞株を用いた実験系

JCRB 細胞バンク (大阪) のリストを参照し、ヒト NK 細胞株 (KAI3、IFO50518) を用いて、NKCC を調べた。KAI3 をエフェクター細胞としてレミフェンタニルを添加しない条件で、K562 細胞 (ヒト慢性骨髄性白血病細胞株) をターゲット細胞とした $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ による ^{51}Cr 放出試験を行った (臨床検査機関 (SRL, Inc. Tokyo) に依頼)。エフェクター : ターゲット細胞数比 = 10:1、20:1、40:1 で検討した。

(2) KHYG1 ヒト NK 細胞株を用いた実験系

エフェクター : ターゲット細胞数比の検討

ヒト NK 細胞株 (KHYG1、JCRB0156) を用いて、NKCC を調べた。KHYG1 をエフェクター細胞としてレミフェンタニルを添加しない条件で、K562 細胞をターゲット細胞とし

エフェクター：ターゲット細胞数比 = 5:1、10:1、20:1 の条件下で NKCC を測定した。NKCC の測定には、LDH 放出細胞傷害アッセイ (Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH)、cat.# 4744934, Sigma Aldrich) を用いた。

プレドニン (Positive control) の設定

免疫抑制薬であるステロイドを NKCC 抑制作用の Positive control として使用することにした。プレドニン濃度 0, 1, 3, 10, 30 μ M を KHYG1 細胞株に添加したのちエフェクター：ターゲット細胞数比 = 5:1、10:1、20:1 で NKCC を測定した。

ケタミン実験

上記の通り、我々は無作為比較臨床試験を行い、ケタミンは NKCC を変化させないことを証明した。この事実を培養細胞実験系においても証明するために、ヒト NK 細胞株 KHYG1 にケタミン (0, 3, 10 μ M) を 24, 72 時間暴露した後、NKCC を LDH 放出細胞傷害アッセイで測定した。エフェクター：ターゲット細胞数比は、の実験より 10:1、20:1 で行った。

フェンタニル、モルヒネ実験

次に同様の実験系で、レミフェンタニルと同じオピオイドであるフェンタニル、モルヒネの NKCC への影響を検討した。これら二剤のオピオイドは、先行研究で NKCC を低下させることが証明されている。このことから、この実験では、得られた結果が先行研究の結果と一致するかどうか、を検討した。2 剤の暴露濃度は、The Minto model から算出されたレミフェンタニルの臨床使用濃度と同力価に設定した。

レミフェンタニル実験

上述の実験の結果から、本実験系により麻酔薬の NKCC への影響を検討することが可能と判断した。KHYG1 にレミフェンタニル (0, 3, 10, 30, 60, 100 nM) を暴露した後、それぞれの NKCC を測定した。エフェクター：ターゲット細胞数比は 10:1 とした。

4. 研究成果

(1) KAI3 ヒト NK 細胞株を用いた実験系

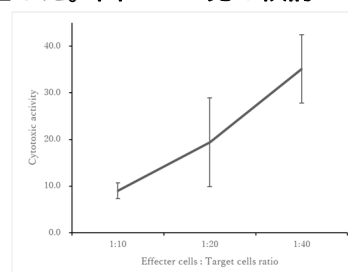
K562 細胞 (ヒト慢性骨髄性白血病細胞株) をターゲット細胞として $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ による ^{51}Cr 放出試験を行い、ヒト NK 細胞株 KAI3 の NKCC を測定した。しかしながら、様々な E:T 比を試したが、この実験系では、NKCC を測定することが出来なかった。

(2) KHYG1 ヒト NK 細胞株を用いた実験系

そこで、我々は細胞株を変更することにした。西日本農業研究センターの齋藤武先生の手法を参考にして KHYG1 ヒト NK 細胞株を用いた実験系を確立した。図 1:E:T 比の検討

エフェクター：ターゲット細胞数比の検討 図 1

図 1: K562 細胞をターゲット細胞として Effector : Target 細胞数比 = 5:1、10:1、20:1 の条件下で LDH 放出細胞傷害アッセイを行い、NKCC を測定した結果、エフェクター細胞数



の増加に伴い、NKCC も増加した。この結果から、今後の実験では、エフェクター：ターゲット細胞数比は 10:1 または 20:1 で行うことにした。

プレドニン (Positive control) の設定

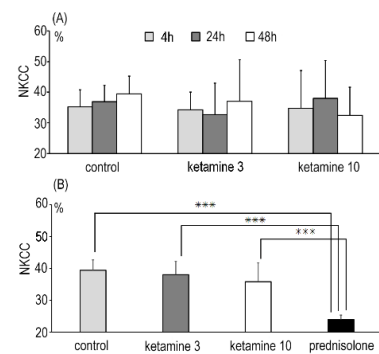
プレドニン濃度 0, 1, 3, 10, 30 μ M を KHYG1 細胞株に添加したのち、LDH アッセイを行った結果、プレドニン 10 μ M で有意な NKCC 抑制が得られた。

ケタミン実験 図2

図 2: KHYG1 にケタミン (0, 3, 10 μ M) を 24, 72 時間暴露した後、NKCC を LDH 放出細胞傷害アッセイで測定した結果、ケタミン暴露群の NKCC は、コントロールに比べて変化しないことが証明された。

(Kubota M, Niwa H, et al. J Oncol. 2022. eCollection 2022)

図 2.ケタミンと NKCC



フェンタニル、モルヒネ実験 図 3.4

図 3.4: フェンタニル、モルヒネの 2 剤により、濃度依存性に NKCC が抑制されることが示された。

図 3.モルヒネと NKCC

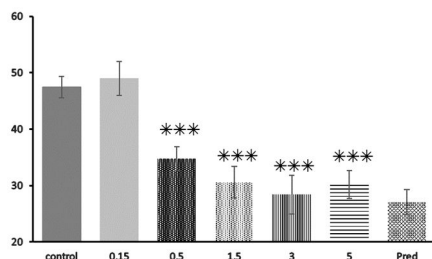
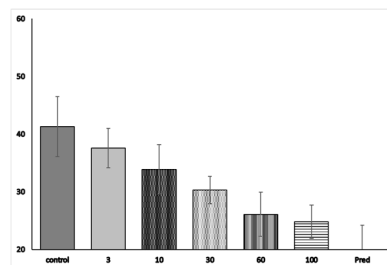


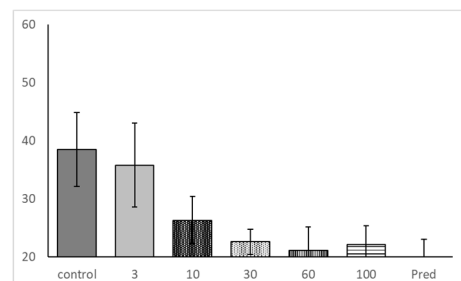
図 4.フェンタニルと NKCC



レミフェンタニル実験 図 5

図 5: 上記 2 剤のオピオイドと同様、レミフェンタニルも濃度依存性に NKCC を抑制することが示された。

図 5.レミフェンタニルと NKCC



今回、我々はレミフェンタニルが、NKCC を用量依存性に抑制することをヒト NK 細胞株の実験系で証明した。この結果から、癌手術においては、レミフェンタニルも、他のオピオイド同様、最小限の使用に抑えた方が良いことが示唆された。今後、これらの研究結果を臨床研究で確かめる必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kawaguchi Jun, Ota Daichi, Niwa Hidetomo, Sugo Yuki, Kushikata Tetsuya, Hirota Kazuyoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Immunomodulation by ketamine as an adjunct to total intravenous anesthesia in patients undergoing minimally invasive radical prostatectomy: A randomized pilot trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 203 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2020.2060	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 Sugo Yuki, Kubota Mirei, Niwa Hidetomo, Hirota Kazuyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Moderate rate of implementation of spinal anesthesia for cesarean section: does it improve neonatal well-being? A case control study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 245 ~ 252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80666-7	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 Kubota Mirei, Niwa Hidetomo, Seya Kazuhiko, Kawaguchi Jun, Kushikata Tetsuya, Hirota Kazuyoshi	4. 巻 2022
2. 論文標題 Ketamine Does Not Change Natural Killer Cell Cytotoxicity in Patients Undergoing Cancer Surgery: Basic Experiment and Clinical Trial	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2022/8946269	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 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎佑真、丹羽英智、廣田和美
2. 発表標題 レミフェンタニルは、natural killer 細胞活性を抑制するか？基礎実験の結果から
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第68回学術集会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------