

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791620

研究課題名(和文)オピオイドが癌細胞の抗がん剤感受性を低下させるか？

研究課題名(英文)Effects of opioid on anticancer agent sensitivity in cancer cells

研究代表者

瓦口 至孝(Kawaraguchi, Yoshitaka)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90433333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト大腸癌細胞株HCT116及びHT29細胞において、オピオイドが増殖能に与える影響について調べた。フェンタニル、レミフェンタニル、トラマドールでは増殖能に変化は見られなかったが、モルヒネを6時間曝露した場合、HCT116細胞の増殖能は有意に亢進した。さらに、モルヒネとフェンタニル先行曝露は5-フルオロウラシル48時間曝露による増殖能抑制作用に影響しないことが分かった。一方、HT29細胞では50ng/ml24時間曝露において増殖能が有意に抑制された。モルヒネは $\mu$ オピオイド受容体以外の経路で細胞増殖能に影響を与える可能性があるものの、5-フルオロウラシルの抗がん作用には影響しないことが分かった。

研究成果の概要(英文)：According to previous studies, it is likely that opioids directly regulate the growth of cancer cells by modulating cell proliferation and/or apoptosis. We examined the effects of several opioids on proliferative activity in human colon cancer cell lines (HCT116 and HT29). It is demonstrated that exposure of morphine to HCT116 cells for 6 h resulted in enhanced proliferation. To the contrary, morphine exposure to HT29 cells for 24 h inhibited cell proliferation. The  $\mu$  opioid agonists, fentanyl and remifentanyl did not alter the proliferative activity. Therefore, it is suggested that morphine may affect cell proliferation through a certain pathway other than  $\mu$  opioid receptor. In addition, we investigated whether morphine and fentanyl alter the sensitivity to 5-fluorouracil. The pretreatment with morphine and fentanyl did not alter sensitivity to 5-fluorouracil in HCT116 cells. This is the first study to investigate the effects of opioids on subsequent chemotherapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 麻酔・蘇生学

キーワード：癌 オピオイド 抗がん剤感受性

1. 研究開始当初の背景

日本における死因順位別死亡数(厚生労働省、2009年)の第一位は悪性新生物、すなわち癌と報告されており、昨今の手術療法や化学療法、放射線治療などの集学的治療の進歩は著しい。近年、麻酔科学領域における癌関連のトピックスとして、全身麻酔下の固形癌摘出手術の際に硬膜外麻酔(局所麻酔)を併用してオピオイド使用量を減らすことが癌の再発や転移を減少させる可能性を示唆するヒトでの retrospective study がいくつか発表されている。このことから周術期や緩和医療における疼痛管理に必須であるオピオイドの使用が、逆に癌患者の予後を悪くしている可能性が考えられ、基礎および臨床研究の両面から検討することが急務と考えられる。

基礎研究においては、モルヒネの投与が natural killer 細胞活性やサイトカインの発現などを抑制することで間接的に癌細胞の生存を助ける可能性が示唆され、臨床投与量のモルヒネがマウスにおいて癌細胞の血管新生や発育を促進することも報告されている。一方、ラットを用いた研究で、モルヒネ投与により癌の発育や転移が減少するという報告もあり、現在のところはっきりとした結論に至っていない。

Caveolae は細胞膜上に存在するコレステロールに富む microdomain であり、caveolin という構造タンパク質の存在が重要とされている。Caveolin は scaffolding domain を持ち、様々なシグナル伝達に関連する蛋白質を系統化することでシグナル伝達に重要な役割を果たしており、心臓や脳においては揮発性麻酔薬が caveolin 依存的に虚血再灌流傷害に対して細胞保護効果を発揮することが報告されている。

オピオイドに関しても心臓の虚血再灌流傷害に対する細胞保護作用が caveolin 依存的であることが報告されており、特に caveolin 発現量が多い癌細胞においてオピオイド投与が癌細胞の生存に有利に働く可能性が考えられる。そこで今回、各種オピオイドが caveolin 発現量の異なる癌細胞において抗がん剤感受性にどのような影響を与えるかについて検討した。

2. 研究の目的

今回の研究では以下の3点を明らかにすることを目的とした。

- (1) 臨床で使用されるオピオイド(モルヒネ、フェンタニル、レミフェンタニル、トラマドール)を臨床使用濃度でヒト癌培養細胞に暴露した場合、細胞増殖能に影響を与えるか?
- (2) 臨床使用濃度でのオピオイド暴露単独では癌細胞の増殖能に影響がない場合、抗

がん剤(5-フルオロウラシル)による増殖抑制作用に影響するか?

- (3) 上記2点について caveolin 発現量の異なる細胞株間で差があるか?

3. 研究の方法

ヒト大腸癌細胞株 HCT116 (caveolin 高発現株) 及び HT29 (caveolin 低発現株) 細胞を 96 ウェルプレートに  $1 \times 10^4$  個ずつまいて一晩インキュベーター内に放置した。翌日にモルヒネ (0-50ng/ml)、フェンタニル (0-20ng/ml)、トラマドール (0-500ng/ml)、レミフェンタニル (0-100ng/ml) を6時間または24時間曝露した。曝露終了後は新しい培地に入れ替え、24時間経過した時点での細胞増殖能について MTT アッセイを用いて評価した。増殖能を抑制している場合は、FACS を用いてどの細胞周期でブロックされているかについて調べた。

次にモルヒネ及びフェンタニルが抗癌剤による増殖能抑制効果に与える影響を調べるため、モルヒネ (0-50ng/ml) 及びフェンタニル (0-20ng/ml) に24時間曝露した HCT116 及び HT29 細胞に、5-フルオロウラシル (5-FU, 5ng/ml) 曝露を48時間行い、MTT アッセイを用いて評価した。

統計学的検討には one-way ANOVA および Post hoc test として Dunnett 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意とした。

4. 研究成果

(1) モルヒネ曝露が細胞増殖能に与える影響

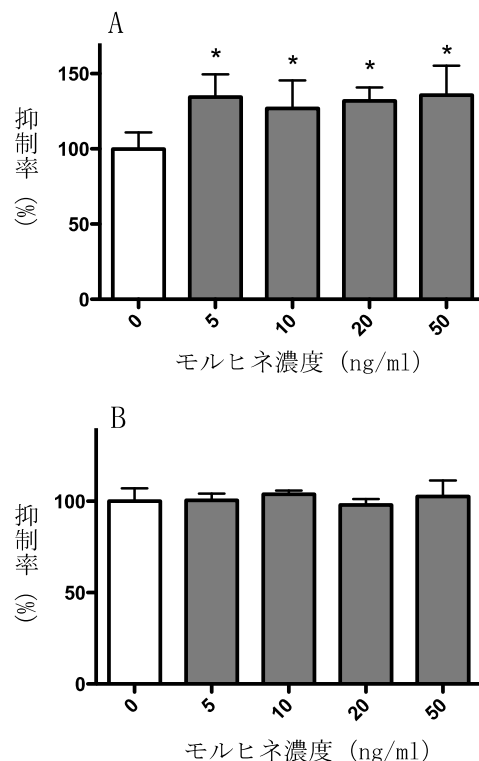
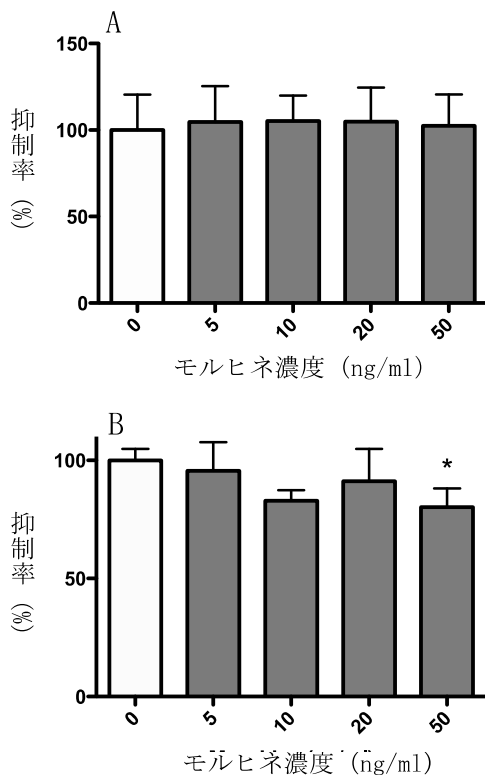


図1. モルヒネ曝露 (A: 6時間、B: 24時間) が HCT116 細胞の増殖能に与える影響

上図に示すようにモルヒネ 6 時間曝露は HCT116 細胞の増殖能を亢進した。

図 2. モルヒネ曝露 (A: 6 時間、B: 24 時間) が HT29 細胞の増殖能に与える影響

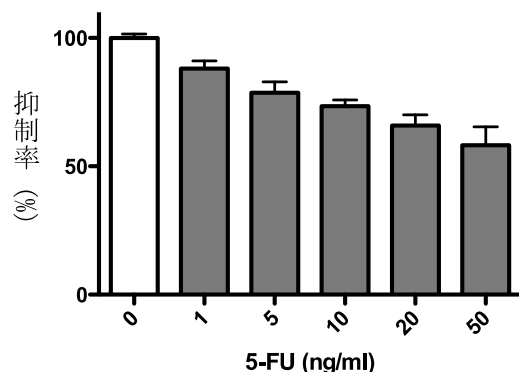


上記に示すようにモルヒネ (50ng/ml) 24 時間曝露は HT29 細胞において増殖能を抑制した。FACS による解析では、特定の細胞周期の増加は見られなかった。

(2) フェンタニル、レミフェンタニル、トラマドール曝露は HCT116 細胞及び HT29 細胞において、細胞増殖能に影響せず、 $\mu$ オピオイドアゴニスト刺激では増殖能が亢進しないこと、モルヒネの作用も  $\mu$ オピオイドレセプター以外の関与が示唆された。

(3) 抗癌剤 (5-FU) の細胞増殖抑制作用に対するモルヒネとフェンタニルの影響

下図のように HCT116 細胞において 5-FU による細胞増殖作用を確認し、以降の実験に 5ng/ml を採用した。



一方、HT29 細胞では濃度依存的な増殖抑制作用が見られなかったため、以降の実験は HCT116 細胞のみで行った。

(4) モルヒネ及びフェンタニル 24 時間曝露が 5-FU の増殖抑制効果に対する影響

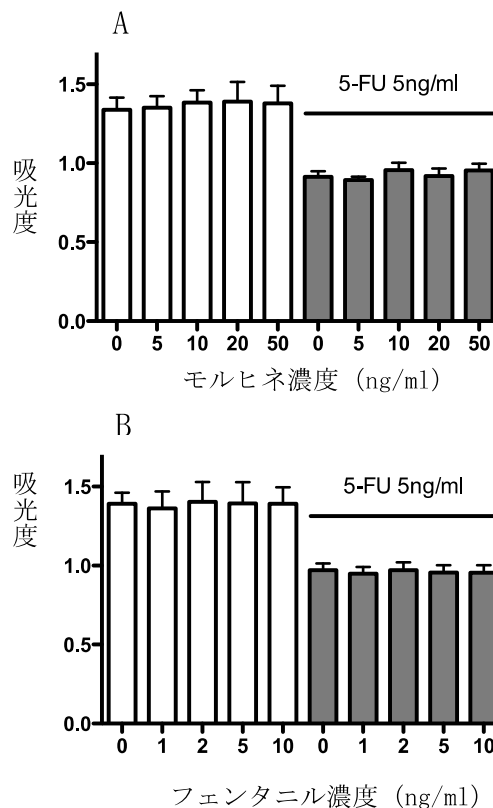


図 3. HCT116 細胞におけるモルヒネ (A) 及びフェンタニル (B) が 5-FU の効果に与える影響

モルヒネ及びフェンタニルはいずれの濃度においても 5-FU の効果に影響はしなかった。

以上の結果より、細胞株の種類 (caveolin の発現量の違い) によってモルヒネは増殖能を亢進または抑制するが、他のピュアな  $\mu$ オピオイドアゴニストが増殖能に影響しなかったことから、モルヒネは  $\mu$ オピオイドレセプター以外の経路で増殖関連シグナルが細胞内に伝達されていることが示唆された。

また、モルヒネは抗癌剤 (5-FU) への作用に影響しなかったことから、癌疼痛や手術後の鎮痛に使用されるオピオイドが抗癌剤による化学療法に影響しない可能性も初めて示唆された。

今後は更なる詳細なメカニズムの検討と、免疫細胞が関連する動物を用いた in vivo の研究が必要となる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nomura Y, Kawaraguchi Y, Sugimoto H, Furuya H, Kawaguchi M. Effects of morphine and fentanyl on 5-fluorouracil sensitivity in human colon cancer HCT116 cells. Journal of Anesthesia. 査読有り、28(2), 2014, 298-301  
DOI: 10.1007/s00540-013-1717-2.

〔学会発表〕(計 1 件)

野村泰充、瓦口至孝、杉本浩士、古家 仁、川口昌彦 ヒト大腸癌培養細胞の増殖能に対するオピオイドの影響  
日本麻酔科学会第 60 回学術集会 2013 年 5 月 14 日 札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瓦口至孝 (KAWARAGUCHI, Yoshitaka)  
奈良県立医科大学麻酔科学 講師  
研究者番号: 90433333

### (2) 研究分担者

なし