

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861232

研究課題名(和文)オピオイドが腫瘍増殖および生命予後に与える影響の解析

研究課題名(英文)Analysis of opioid effects against tumor proliferation and life prognosis

研究代表者

大槻 明広(Otsuki, Akihiro)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00379637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000 円

研究成果の概要(和文)：がん細胞をオピオイド鎮痛薬であるモルヒネおよびフェンタニルで処理したとき、高濃度モルヒネおよびフェンタニルは腫瘍細胞への増殖を抑制する。しかし、中～高濃度モルヒネで増殖促進作用を示す場合もあった。細胞分裂に対する影響、細胞死への影響、細胞接着への影響などが複合して腫瘍細胞の生存率に関与しているためと考えられた。また、オピオイド投与後のオピオイド受容体の発現量の変化が、モルヒネとフェンタニルで異なることが細胞増殖に与える影響の差に関連しているかもしれない。

研究成果の概要(英文)：When tumor cells are treated with the opioid analgesics morphine and fentanyl, high concentrations morphine and fentanyl inhibit tumor proliferation. However, in some cases medium to high concentration morphine showed proliferation promoting action. This results are thought that the effect on cell division, the effect on cell death, the influence on cell adhesion, etc. are combined and contributed to the survival rate of tumor cells. It may also be related to the difference in the effect on cell proliferation that the change in the expression level of opioid receptor after opioid administration is different between morphine and fentanyl.

研究分野：麻酔学

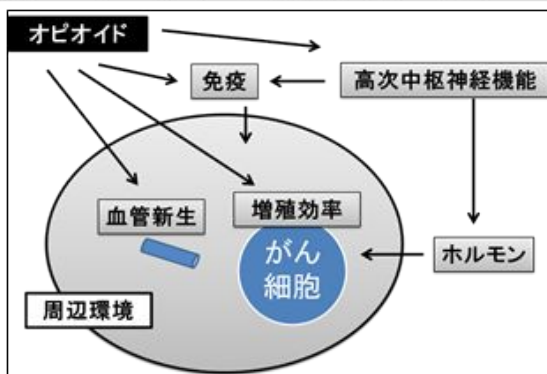
キーワード：オピオイド オピオイド受容体 がん細胞 A549 モルヒネ

1. 研究開始当初の背景

周術期全身麻酔管理において鎮痛は近年ますます重要視されている。硬膜外麻酔や各種末梢神経ブロックが手術侵襲に伴うストレス反応を抑止し、呼吸器合併症を減少させる等の報告がなされており、術後の死亡率を減少させる可能性が示唆されている。しかしながら依然として、術中術後鎮痛においてオピオイドは欠くことのできない薬剤である。オピオイドの作用は鎮痛だけでなく、鎮静、消化管への作用、催吐作用、多幸感、薬物依存など多くの作用を有しているが、緩和医療の視点からは、一般的に担癌患者へのオピオイドの使用が、予後に影響することはないとされる。一方で、近年、培養がん細胞へのオピオイド投与が、がん細胞の増殖率に影響を及ぼしたり、手術麻酔に使用したオピオイドが、がん再発率を上昇させるという報告がなされている。このことから、麻酔法の選択が患者予後を左右するという考え方が注目されている。

これまでにオピオイド処理によるがん増殖効率、細胞死、遊走性などに影響を与えることが報告されているが、その結果は、報告によってさまざまであり、この違いがどのような機序によるかは、十分検討されていない。報告によって結果に差が出る原因として、オピオイドが、がん細胞の増殖や再発に対してどのような影響を与えるかは、増殖効率、血管新生、免疫、ホルモンへの作用など、総合的な結果(図1)として考える必要があること、また、がんの種類によって、オピオイドに対する感受性に差異があることが考えられる。たとえば、オピオイド受容体の発現量が、各種がんによって違いがあればオピオイドに対する感受性は各種がん細胞によって変化することが予想される。

図1. オピオイドのがん細胞に対する影響



2. 研究の目的

オピオイドの使用でがん細胞の増殖効率が変わるかどうか、変化するならどのような原因であるかを解明することを目的とした。具体的には、子宮がん、卵巣がん、大腸がん、扁平上皮がんに対してオピオイド処理を行い、増殖が促進される細胞とそうでない細胞を

確定し、濃度依存性の有無を検討し、また、オピオイド受容体の発現量が、その応答と関連しているかどうかを検討した。

3. 研究の方法

(1) オピオイドの培養がん細胞に対する影響 細胞培養

A549、HeLa、U2OS、MCF7、HCT116、ヒト扁平上皮がん(SCC)培養がん細胞をDulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)培養液(ウシ胎仔血清10%)で培養した。培養は、37℃、95%空気、5%CO₂で行った。

生細胞数の計測

6ウェル培養皿に、接触阻害となる細胞数の1/10で培養を開始した。翌日、オピオイドを含む培養液に変更して、3日間培養したのちに、トリプシンで培養皿から剥がして、細胞懸濁液として、細胞数を計測した。オピオイドの濃度は、モルヒネ0.1、1、10、100、1000mM、およびフェンタニル0.001、0.01、0.1、1、10mMとした。

コロニーフォーメーションアッセイ

A549細胞を、6cm径細胞培養皿で1×10⁴個ずつ培養を開始した。同時にモルヒネ0.1、1、10、100、1000mM、およびフェンタニル0.001、0.01、0.1、1、10mMによる処理を開始し、10日後にメタノールとクリスタルバイオレットで処理して、固定と染色をしたのち、そのコロニー数を計測して比較した。

MTTアッセイ

A549細胞およびMCF7細胞を96ウェル細胞培養皿に500個/ウェルの濃度で培養を開始し、翌日より培養液にモルヒネ0.01、0.1、1、10、100、1000mM、およびフェンタニル0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10mMとなるようにオピオイドを添加したのち、3日後にMTTラベル試薬を投与。4時間後に溶解試薬を投与して、翌日、マルチプレートリーダーで570nm波長を用いて色素量を測定した。

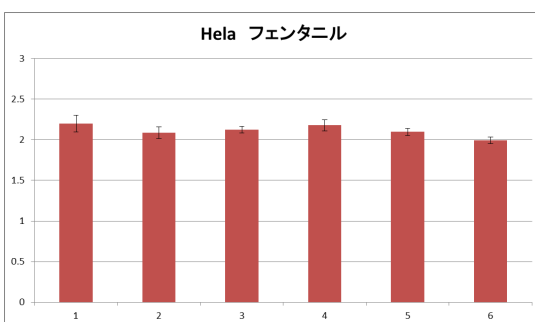
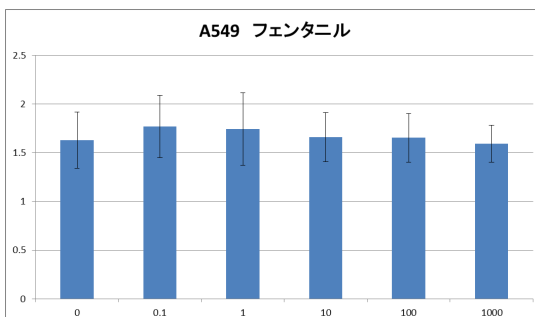
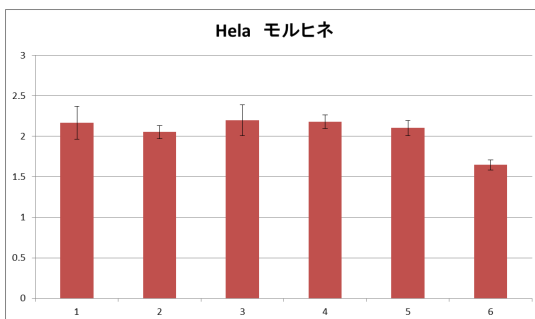
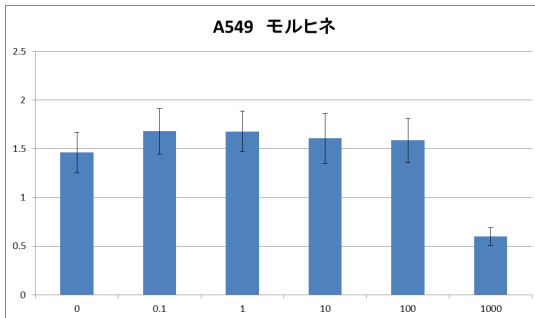
(2) オピオイド受容体の発現量の比較

A549、HeLa、MCF7、SCC、U2OS、HCT116細胞からmRNAを抽出し、μ、κ、δオピオイド受容体の発現量をReal Time PCR法で比較した。内部対照はGAPDHを使用した。

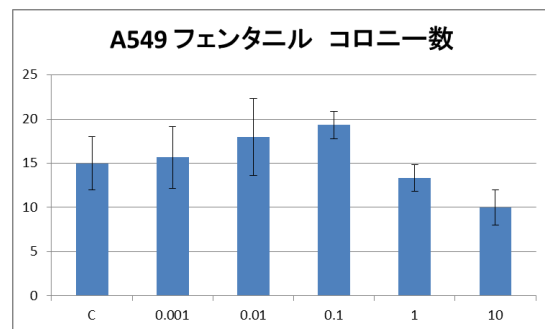
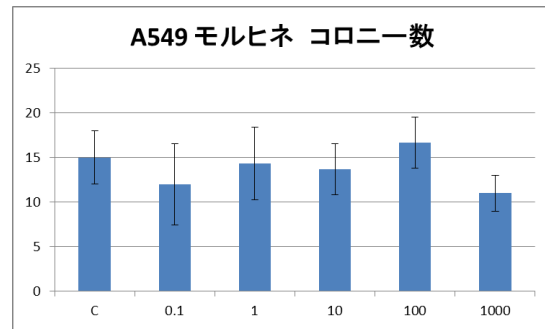
A549細胞にモルヒネ100、1000nMおよびフェンタニル1、10nMを投与して、24時間後にmRNAを抽出した。それぞれの濃度とオピオイド処理していないときの、μ、κ、δオピオイド受容体の発現量をReal Time PCR法で比較した。内部対照はGAPDHを使用した。

4. 研究成果

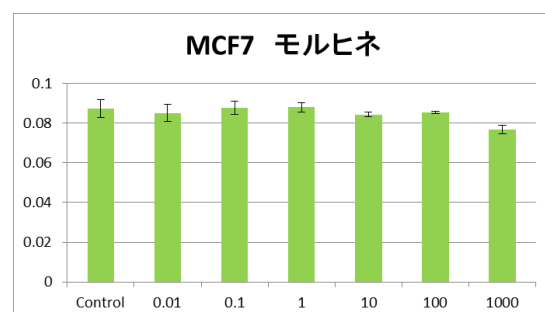
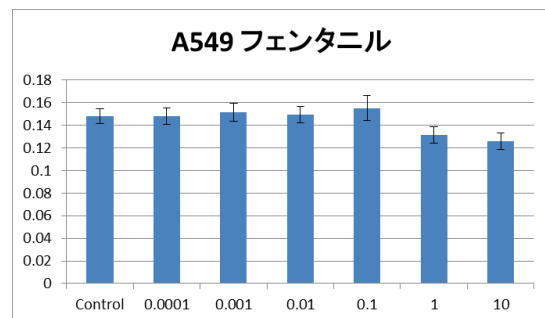
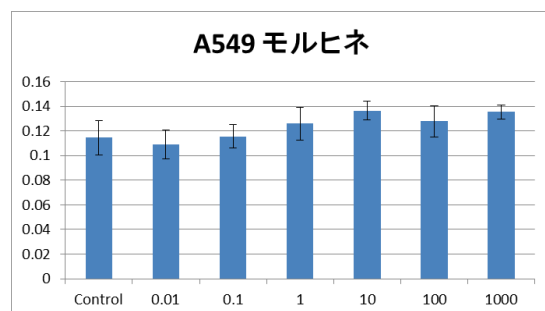
(1)モルヒネおよびフェンタニルで3日間処理後の細胞数の変化を、A549、Hela、MCF7、HCT116、U2OS、ヒト由来扁平上皮がん培養細胞（SCC）で比較した。モルヒネ1000mMで処理した場合のみ、有意に生存率が低下した。フェンタニルとモルヒネに対する反応の傾向は同じであったが、Hela細胞は、ほかの細胞と比較して、モルヒネによる細胞増殖抑制効果がすくなかった。

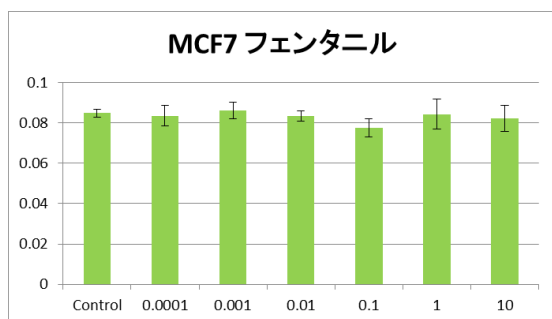


(2)A549 細胞をオピオイドで処理しコロニーフォーメーションアッセイを行ったところ、高濃度モルヒネだけでなく、高濃度フェンタニルでも同様に生細胞数が減少する傾向がみられた。

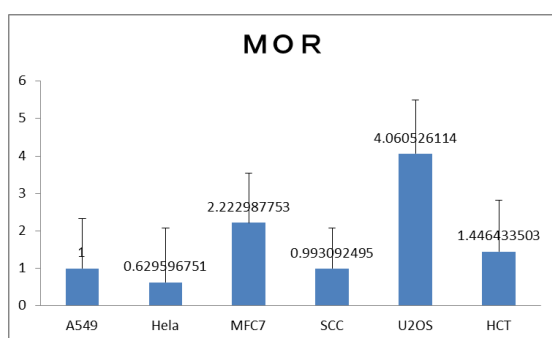


(3)A549 および MCF7 の細胞生存率を MTT アッセイで比較したところ、A549 では高濃度フェンタニルで生存率の低下が、中～高濃度モルヒネでは増加がみられ、MCF7 では、高濃度モルヒネのみで細胞生存率の低下がみられた。

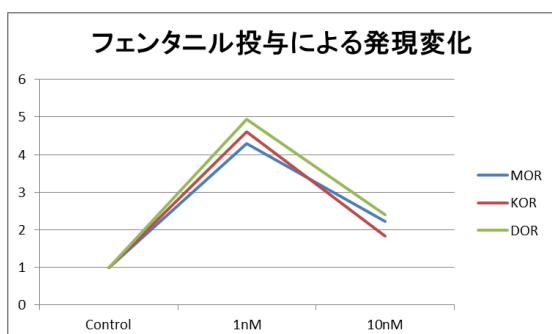
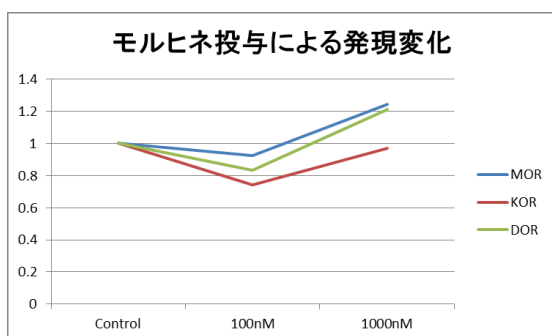




(4) A549、Hela、MFC7、HCT116、U2OS、SCC でのモルヒネ受容体の発現量を RT-PCR で比較したところ、 μ オピオイド受容体 mRNA の発現量は U2OS と MFC7 で高かった。 κ 受容体と δ 受容体の mRNA 発現量も同様の傾向を示した。



(5) 1nM のフェンタニル投与により A549 での mRNA は 5 倍程度に上昇したが、100nM のモルヒネ投与では変化を示さなかった。



以上の結果から、高濃度モルヒネおよびフェンタニルは腫瘍細胞への増殖を抑制することが示唆された。しかし、MTT では、モルヒネ中～高濃度処理で増殖促進作用を示す場合があることから、細胞分裂に対する影響、

細胞死への影響、細胞接着への影響などが複合して腫瘍細胞の生存率に関与していると考えられた。オピオイド受容体の発現量とオピオイドに対する感受性は関連がないような結果であったが、オピオイド投与後のオピオイド受容体の発現量の変化が、モルヒネとフェンタニルで異なり、このことがオピオイドの種類によって細胞増殖に与える影響がことなると、関連している可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

大槻 明広、【術後疼痛管理：急性期から亜急性期の術後鎮痛を考える】術後亜急性痛発症防止の臨床的対策、査読無、Vol.36、No.12、2015、pp.1631-1640

〔学会発表〕(計 1 件)

大槻 明広、急性から亜急性期にかけての術後鎮痛、日本ペインクリニック学会第 48 回大会、2014 年 7 月 25 日、京王ホテルプラザ (東京都新宿区)

〔図書〕(計 1 件)

大槻 明広 他、克誠堂出版、術前評価と予測因子からみた周術期合併症対策、135-145、2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大槻 明広 (OTSUKI Akihiro)
鳥取大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00379637