

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2023
課題番号：19K18291
研究課題名（和文）セボフルランと原がん遺伝子KRASの関わり

研究課題名（英文）Sevoflurane stimulated KRAS signalings

研究代表者

小西 裕子 (Konishi, Yuko)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：60771970

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：吸入麻酔薬や静脈麻酔薬によってもたらされる心筋や神経保護は以前より報告され、申請者はヒト培養細胞株や免疫不全マウスを用い、がん細胞への麻酔薬の直接の影響解析に取り組んできた。特に本研究では吸入麻酔薬セボフルランを用いて原がん遺伝子KRAS変異に着目し、がん細胞への麻酔薬の影響を明らかにすることを目的とした。また本研究では細胞周期の増加とこれらの遺伝子変異の影響に着目し、細胞周期解析やリン酸化解析を実施した。その結果、細胞周期への直接的な影響を見いだすことはできなかったが、細胞増殖に必須の経路の活性化を同定したことから、この上流域を今後は探索していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

担癌患者の安全な麻酔管理を達成するために必須の基礎的な理解を進めるため、本研究では消化器がん細胞株の麻酔薬暴露後の増殖影響を明らかにすることを目的とした。特に本研究では手術時間の長い消化器がんを取り上げ、特定の遺伝子変異と吸入麻酔薬による増殖変化について精査し、一部のタンパク質の活性化を見いだした。将来的にはがんの外科的処置の炎症を抑え、免疫を障害しない周術期管理を目指した基盤を整備し、より安全な麻酔薬の選択方法の提案や周術期管理を補完するものである。

研究成果の概要（英文）：In recent years, anesthesiologists and their groups have actively reported both basic and cohort studies to clarify whether the chance of recurrence and metastasis occurs during the peri-operative period under anesthesia. Our groups have studied the influence of sevoflurane, a volatile anesthetic, on cell survival through cell cycle arrest or induction of cell proliferation. In this study, I aimed to explore the cause of this proliferative stimulation post-sevoflurane exposure using one of the most oncogenic genes, the KRAS mutation. The results of this study proved that sevoflurane certainly induced both ERK/MEK and PI3K/AKT signaling pathways, but this was not directly related to the KRAS mutations.

研究分野：麻酔学

キーワード：セボフルラン 原がん遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

周術期に長時間使用する様々な麻酔薬が、がんの外科手術後の再発・浸潤に関わりをもつかどうかという懸念から、吸入麻酔薬や静脈麻酔薬は、これまでに各種がん細胞株の増殖に影響を与える懸念が残ることから、各国の前向きランダム化研究やコホート研究、そして動物や細胞株を用いた基礎研究が実施されてきた。しかし発表されてきた結果は多様であり、麻酔薬後に生じる細胞保護作用は、がん細胞だけではなく、神経や心臓など正常細胞にも見出されている。2017年イギリスの Wigmore, TJ らは各種がん外科手術に使用する麻酔薬を吸入麻酔薬と静脈麻酔薬に分け、術後の5年生存率を比較したところ、大腸がんや膀胱がんでは有意差は得られなかったが、乳がん手術では静脈麻酔薬が有意に生存率を高めたことを報告した(1)。一方、2019年韓国の Yoo, S らは乳がん手術のうち根治乳房切除術に限定し、上記2つの麻酔方法に有意差がないことを5年及び10年の生存率を用いて報告した(2)。このように同じ乳がんに対する術中の麻酔薬の影響についても手術時間の差、再発や浸潤の有無、外科手術の侵襲度の違いがあることもあり結論は一致していない。しかし体細胞変異を生じているがん細胞に対して、周術期に長時間用いる麻酔薬の影響に取り組んできた例はない。

こうした背景のもと我々の研究グループでは、麻酔の導入や覚醒の早さから汎用されている実験に使用した麻酔薬は麻酔の導入と覚醒が短いことから汎用されているセボフルラン(1%)やデスフルラン(5%)や近年吸入麻酔薬と並行して使用されている静脈麻酔薬プロポフォルなどに着目し、ヒトがん細胞株へ暴露実験を実施し増殖能を生化学的また分子生物学的に精査してきた。特にセボフルランを同一の暴露条件を用いて増殖解析を行うと、複数のヒトがん細胞株と正常細胞株はそれぞれ異なる増殖影響を示すことを見いだした。特にこの違いは由来臓器に関わらずがん細胞株ごとに異なったことから、本研究では代表的な原がん遺伝子変異である *RAS* 遺伝子に着目し、その変異の違いと麻酔薬暴露後の増殖能の違いについて研究を進めた(3,4)。

2. 研究の目的

Ras 変異は代表的な原がん遺伝子であるばかりでなく、難治性の消化器がんの個別化医療の一環として *Ras* 遺伝子検査 (*KRas* および *NRas* の変異の有無を調べるゲノムプロファイリング検査)を行い、適用する抗がん剤を選択するなど、遺伝子検査が一般的に実施されている。しかしこれまでに麻酔とがん増殖について、素地となるがんの原因遺伝子に取り組んだ研究は十分ではない。そこで本研究では原がん遺伝子となった変異 *Ras* 遺伝子の種別に応じた麻酔薬後の増殖能の解析に取り組み、その活性化の機序についての理解を進めることを目的とした。とくに *Ras* 遺伝子は *KRas*、*NRas*、*HRas* のアイソフォームが存在する。正常細胞においても *RAS*-GTP 結合により活性型となった *RAS* タンパク質は、その下流経路を刺激して細胞の増殖能を高めることがわかっている。しかし正常細胞では *RAS* 活性化を制御する阻害シグナルも遊動的に活性化し、*RAS*-GDP 型の不活化へ戻すフィードバック機構によって活性化を鎮める働きがある。ところが *Ras* 遺伝子のコドン 12、13、61 などに変異を生じた原がん遺伝子 *Ras* は *RAS*-GTP 結合が優位な状態となり、活性を恒常的に生じ、初期がんを発生することが明らかになっている(5)。特に麻酔薬分野においてこれらは *PI3K* シグナルと *MAPK* シグナルを活性化するのだが、同時にこのシグナルは麻酔薬暴露によっても大きく変化することが既に知られている。特にその原因には細胞内カルシニューリンによっても影響を受けると報告されている。そこで本研究はまず *Ras* 遺伝子変異のある複数の消化器がん細胞株を用い、1%セボフルランを4時間暴露しその後の増殖変化から、これらの経路の活性化などを明らかにする。

3. 研究の方法

実験に使用した麻酔薬は麻酔の導入と覚醒の短さ、安定した麻酔管理を可能にすることから広くがんの切除術にも適用されている、全身麻酔薬セボフルラン(1%、4時間暴露)やデスフルラン(5%、4時間暴露)を採用した。これらの麻酔薬を暴露するために汎用されている細胞培養器の中で庫内の二酸化炭素と麻酔薬濃度を随時モニターし、*RAS* 遺伝子変異を有するヒト培養がん細胞株の増殖解析を実施した。さらにこの増殖について遺伝子の動きを確かめるために、ヒト結腸がん細胞株にセボフルランを暴露しその RNA から cDNA を合成し次世代シーケンサー HiSeq による配列の読み取りを行った。そして *Ras* 遺伝子の発現と関連する遺伝子のトランスクリプトーム解析を行い増殖にかかわる遺伝子の働きを調べた。また *Ras* 遺伝子変異の違いと

の暴露後の増殖について関連を調べるため、*Ras* 遺伝子の下流経路である MEK/ERK および PI3K/AKT 経路について、細胞ライセートからそのリン酸化を調べた。そしてこの消化器がん細胞株のセボフルラン暴露後に生じる増殖能の亢進をヌードマウスに移植した異種移植モデルによって再現できるかどうかを検討した。動物実験は本施設の倫理委員会の認証を受けたプロトコールに沿って実施した。また得られた腫瘍はパラフィン固定後に免疫組織染色を行った。

4. 研究成果

始めにこれまでの増殖解析のうち臨床使用濃度に近い1%濃度を用いてセボフルランを暴露し増殖を示した細胞株（結腸癌、大腸がん、乳がん、非小細胞肺がんのヒト培養細胞株）は、曝露終了から 2-4 日かけてその増殖が高まることを培養器に設置した画像から同定した(Incucyte Zoom)。さらにその中で *Ras* 遺伝子に変異を有する細胞株に着目し解析を進めた（Coulter Counter）。

その結果図1のように *Ras* 遺伝子に変異を有する細胞株を中心に増殖を亢進することを明らかにした。（図1は相対的な細胞増加率を示し、暴露をしていない細胞株の数をそれぞれ1とした。）また増殖を示した細胞株は MEK 阻害剤と AKT 阻害剤のうち、MEK 阻害剤などに高い感受性を示し細胞増殖を低下させた。また *in vitro* での試験にはセボフルラン曝露後に増殖した細胞株を用いて各細胞株をセボフルランに暴露し、免疫不全マウスへの皮下へ異種移植を行った。その結果、*Ras* 遺伝子変異を有する細胞株はマウス皮下において、血管新生を促しその移植片を増大した。そこでこの皮下腫瘍から組織切片を作成し、細胞分裂の活発さを比較するため細胞増殖マーカーである抗 Ki67 抗体によって染色した。その結果 *Ras* 遺伝子変異を有する組織では、移植片の周囲に盛んに細胞分裂することを同定した。

一方、これらの細胞株について細胞レベルで細胞周期の S 期が増殖するかどうかを確かめるため、BrdU を細胞に取り込ませて染色を行いフローサイトメトリーによって細胞周期を解析した。しかし結果は予測と異なり、*Ras* 遺伝子の変異の違いと野生型には細胞周期には明らかな差は生じなかった。一方、*Ras* 遺伝子 G13D ヘテロ変異をもつ細胞株では S1 期の増加を見いだした(3)。そこで MEK/ERK および PI3K/AKT 経路と 1%セボフルラン暴露への影響を明らかにするため、*Ras* 下流経路にあたる MEK/ERK 経路に着目した。これらの経路は相補的に関わり増殖を促進するが、特に PI3K/AKT 経路は *Ras* 遺伝子変異を有するがん細胞株の活性化に寄与していることが分かっていることから、細胞ライセートからウェスタンブロッティングを行いそれぞれの経路のリン酸化活性化について検討を行った。その結果、セボフルラン暴露により両経路共に、曝露終了から 30 分、150 分と活性化がスパイク的に刺激されることが明らかになった。またこの結果から PI3K/AKT 経路と比較すると、セボフルラン曝露によって活性化するのは MEK/ERK 経路であることが示唆された（図2, 3）。以上の結果は細胞増殖能が AKT 阻害剤によって大きく減少したと矛盾しない結果を得られた。

本研究の結果から、*Kras* 遺伝子変異を有するヒトがん細胞株は僅かにセボフルランの暴露によって増殖能を高め、PI3K/AKT 経路ではなく MEK/ERK 経路をより活性化させて、細胞死抵抗性や増殖能を高めていると予測する。しかし BrdU による細胞周期解析では明らかな違いを生じなかったことから、細胞死抵抗性などの亢進が生じている可能性もある。以上の結果から周術期に長時間用いる麻酔薬と *Kras* 変異を有する消化器がん細胞株の増殖影響を検討したところ、当初の仮説とは異なりその変異型が直接の増殖能に影響するかどうかは本研究では明らかにならなかったが、今後の課題はトランスクリプトームで明らかにした特定経路上流域の変化を見いだすことである。

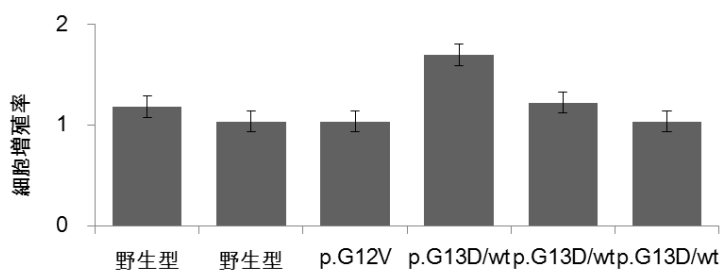


図1 遺伝子*Kras*変異とセボフルラン(1%,4h)暴露後の増殖率

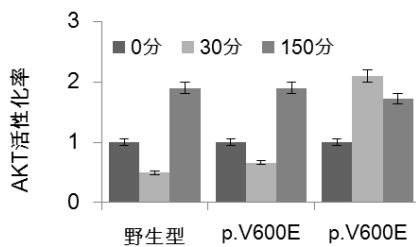


図2 *BraA*遺伝子変異型とAKT活性

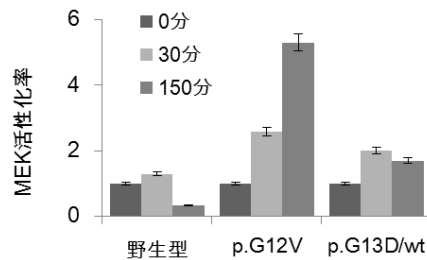


図3 *Kras*遺伝子変異型とMEK活性

<引用文献>

1. Niitsu H, Hinoi T, Kawaguchi Y, Sentani K, Yuge R, Kitadai Y, et al. KRAS mutation leads to decreased expression of regulator of calcineurin 2, resulting in tumor proliferation in colorectal cancer. *Oncogenesis*. 2016;5(8):e253-e.
2. Wigmore TJ, Mohammed K, Jhanji S. Long-term Survival for Patients Undergoing Volatile versus IV Anesthesia for Cancer Surgery: A Retrospective Analysis. *Anesthesiology*. Jan 2016;124(1):69-79.
3. Takahiro Hirai YK, Shoko Mizuno, Zhou Rui, Yao Sun & Kimitoshi Nishiwaki. Differential effects of sevoflurane on the growth and apoptosis of human cancer cell lines. *Journal of anesthesia*. 2020;34(1):47-57.
4. Rui Zhou YK, Ailing Zhang, Kimitoshi Nishiwaki. Propofol elicits apoptosis and attenuates cell growth in esophageal cancer cell lines. *Nagoya Journal of Medical Science*. 2023;85(3):579-91.
5. Huang L, Guo Z, Wang F, Fu L. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1):386.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Zho Rui, Yuko Konishi, Ailing Zhang, Kimitoshi Nishiwaki	4. 巻 85
2. 論文標題 Propofol elicits apoptosis and attenuates cell growth in esophageal cancer cell lines (in press)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nagoya Journal of Medical Science	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） 10.18999/nagjms.85.3.579	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 Takahiro Hirai, Yuko Konishi, Shoko Mizuno, Zhou Rui, Yao Sun, Kimitoshi Nishiwaki	4. 巻 34
2. 論文標題 Differential effects of sevoflurane on the growth and apoptosis of human cancer cell lines	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 45-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00540-019-02701-w	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuko Konishi
2. 発表標題 Low-Dose Sevoflurane Induces Human Cancer Cell Line Proliferation Along with Erk and Akt Phosphorylation in Vitro and in Vivo
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第66回学術集会（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuko Konishi, Zhou Rui, Takahiro Hirai, Tomoko Hayashi, Kanako Ozeki, Nozomi Nakamura, Akiko Akane, Kimitoshi Nishiwaki
2. 発表標題 Low Dose Sevoflurane Induced Colon Cancer Cell Growth Accompanied with Erk and Akt Phosphorylation in Vitro
3. 学会等名 ANESTHESIOLOGY annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小西裕之、小西裕子、他58名	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 605
3. 書名 ゲノム編集の最新技術と医薬品・遺伝子治療・農業・水畜産物・有用物質生産への活用	

〔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
---------	---------