

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20042

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬はエピゲノム異常を引き起こすか？

研究課題名(英文) Sevoflurane attenuates epigenome related genes expression.

研究代表者

水野 祥子 (MIZUNO, Shoko)

名古屋大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：60635580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年吸入麻酔薬の暴露によりいくつかのがん培養細胞株の増殖亢進が報告されている。本研究では臨床に用いられている濃度以下の吸入麻酔薬を暴露したヒトがん細胞株が、暴露後に増殖を高め浸潤に必要な足場非依存性増殖能を亢進することを明らかにした。さらに暴露直後のトランスクリプトーム網羅解析からDNA修飾の一つであるエピゲノムの異常に関わるいくつかの遺伝子に発現変動が生じることを同定した。以上から本研究ではセボフルラン暴露を受けた一部のヒトがん細胞株の増殖が高まることを *in vivo* と *in vitro* で明らかにしその原因のひとつとしてDNA修飾異常が考えられることを示した。

研究成果の概要(英文)：Recently some studies report that inhalational anesthesia induces cell proliferation. However due to the existence of conflict reports, farther studies have been required. In this study to reveal the impact of inhalational anesthesia on human cancer cell lines, I examined the proliferation, anchorage independent growth, mouse xenograft model and gene transcriptome analysis. From these assays two of human cancer cell lines were enhanced distinct proliferation and anchorage independent growth cessation sevoflurane exposure. But xenograft tumor was able to be established only from human colon cancer cell line. And its transcriptome indicated that several genes that related to gene invertible methylation were highly expressed than non-exposure control. Above all my study confirmed that some cancer cell lines were extending its proliferation ability *in vivo* and *in vitro*, with some possibility of DNA methylation.

研究分野：麻酔・蘇生医学

キーワード：セボフルラン がん細胞

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 術後期のがん再発懸念

外科的侵襲によってがんの転移が促進する可能性があることは従来より指摘されている。その原因として術後の細胞性免疫の低下や、炎症性サイトカインなどの急増によるがん細胞の特性変化が挙げられている。このような原因以外にも、麻酔薬が直接がん細胞に作用し、転移・浸潤能を増すという報告がされている。たとえばヒトがん細胞株では MAPK や AKT 経路など増殖関連タンパク質の活性化が報告され、さらに C.A.Deagan らは sevoflurane 刺激後の患者血清から乳がん細胞株の増殖効果を明らかにした。また臨床使用時の麻酔薬は他の薬剤よりも高濃度で使用され、その影響は術後数日間続くことが報告されており、がんへの影響を解析することは非常に重要である。(Benzonana L et al. *Anesthesiology*, 2013, Liang H et al. *J. Anesth*, 2015)

## 2. 研究の目的

### (1) 麻酔薬とがん細胞の研究

こうした背景のもと研究代表者らは一部のヒトがん細胞株が sevoflurane 刺激によって増殖することを予備実験で得たことから、この増殖の原因を吸入麻酔薬が与える遺伝子の異常修飾が原因の一つかどうかを検証するため、まず臨床で広く用いられているセボフルラン吸入麻酔薬の暴露と増殖亢進について複数の各種臓器由来のヒトがん細胞株を用いて、二次元培養増殖能、足場非依存性増殖能さらにマウスを用いた異種移植実験を検証し、さらに一部の細胞株について次世代シーケンサーを用いた転写遺伝子の網羅解析を行い、セボフルラン暴露後に活性化するまた発現が異常抑制される遺伝子に着目し遺伝子の修飾異常の有無について検討を行うことを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 麻酔薬暴露方法

1%セボフルランは空気と共に分速 0.2 L の速さで細胞培養器 (37 度、5% 二酸化炭素を維持) に流入し、培養器内に静置した様々な臓器由来のヒトがん培養細胞株を暴露した。培養器内のセボフルラン濃度は麻酔ガスモニター (Ohmeda 5250 RGM) を用いて随時観察し調整を行った。

### (2) セボフルラン暴露後の増殖解析

麻酔薬の暴露から 48 時間後にディッシュ上の細胞をトリプシンで単細胞化し PBS でケ諾後に Coulter counter (Beckman Coulter) による細胞数計測を行った。

### (3) 足場非依存性増殖能の解析

足場非依存性増殖能解析は 0.4% 濃度の軟寒天培地内に細胞を播種し、2 週間培養後のコロニー数を計測し評価した。スフェロイドアッセイは低接着培養プレートを用いコロニーを培養し、そのサイズを画像解析により計測し増殖速度を解析した。

### (4) トランスクリプトーム回収

細胞はセボフルランの暴露終了 2 時間後に Total mRNA を回収した。回収には DNase I (Invitrogen) 処理および、RNasey Mini Kit (Qiagen) を用いた。回収した mRNA の回収率とその精度は超微量分光光度計 Nano Drop (Thermo Fisher Scientific) とゲル泳動により確認をした。その後の cDNA 合成とライブラリ調整は、研究計画書の通り Illumina HiSeq (ペアエンド、4000 万リード長) による受託解析 (北海道システムサイエンス) を利用した。

### (5) トランスクリプトームデータ解析

受託解析により得られた FASTQ 形式のシーケンスのマッピング、アノテーション、およびデータ統計解析は当施設の共通機器である CLC Genomics Workbench (フィルジェン) ソフトを用いた。統計解析にはマッピングされた RPKM 値 (Reads Per Killobases per

Million) を基に、mRNA 発現解析で用いられているシーケンス配列位置とその長さ依存的に重みづけをした Kal's Z-test を用い P 値を得た。解析にはその発現変動の P 値が 0.05 未満かつ、セボフルランを暴露したサンプルが無暴露サンプルと比較し遺伝子発現量に 4 倍以上の変化を示す遺伝子を解析対象に定めて 2 群間比較を行った。

#### (6) マウス異種移植モデル

研究代表者の所属機関の動物委員会の承認を得て以下の通り実施した。セボフルランを暴露したヒトがん細胞株をトリプシンで単細胞化し、PBS との細胞懸濁液を作成し、これを免疫不全モデルマウス (B 細胞・T 細胞機能欠如マウス; C.B-17/lcr-scid/scidJcl) の両側背部皮下に移植し、定着した腫瘍のサイズと体重を 4 日毎に計測し、腫瘍の推定重量を算出した。

#### 4. 研究成果

本研究は臨床使用濃度以下のセボフルランがヒトがん細胞の増殖能を高め、その作用機序の一つとして遺伝子の修飾異常をもたらすかどうかを検討するため、その基盤となる麻酔薬暴露と各種臓器由来のがん増殖能の有無を明らかにする実験を行った。

##### (1) 2次元培養の増殖能

4 種類のヒトがん細胞株をセボフルラン暴露 (0 - 8 h) した後、48 時間後に細胞数をコールターカウンターにより計測した。(図 1)。その結果予測に反してセボフルラン暴露後の増殖能は各種細胞株によって異なり、

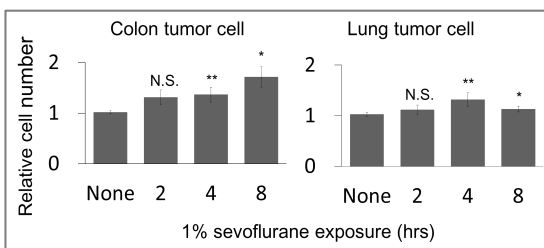


図 1 . ヒトがん細胞株 3 種とセボフルラン暴露後の増殖能

大腸がん細胞株では増殖能の亢進に濃度依存性がみられたが、肺がん細胞株では暴露 4 時間で最大の増殖能を示したが、8 時間暴露では増殖能が 4 時間より高まることはなく、なんらかの増殖抑制が働いたことを同定した。

##### (2) 足場非依存性増殖能

足場非依存性増殖能は正常細胞にはなく、がんの増殖能のひとつである。血液細胞を除き正常細胞は細胞外基質 (足場) のない環境下では増殖できないが、腫瘍細胞はこうした足場のない不安定な環境に合わせて形質転換を行い転移や浸潤能を獲得する。そこでセボフルラン暴露により、がんの悪性化に關与する足場非依存性増殖能が増すかどうかを確かめるために次の実験を行った (図 2)。暴露 (0 - 12 時間) した細胞を軟寒天培地に再播種し、2 週間培養し生じた単細胞由来のコロニーの数を計測した。その結果 4 時間暴露した大腸がん培養細胞株は暴露をしないコントロールに比べてコロニー数を増やすことはなかった。しかし 4 時間より多く暴露した細胞では有意にコロニー数を増やした。また肺がん細胞株においても暴露 8 時間においてコロニー数を増加させた。同様に多細胞由来の細胞階の大きさを比較したスフェロイドの実験でも同様の結果が得られた。

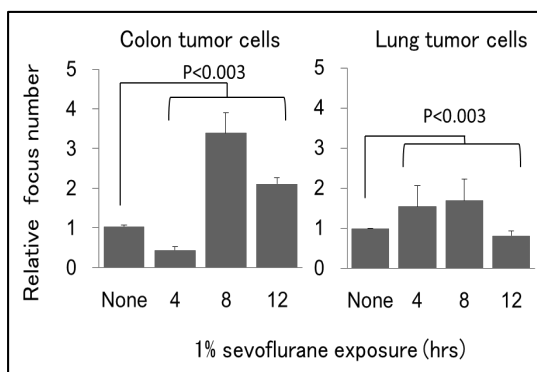


図 2 . セボフルラン暴露後に足場非依存性増殖能を高めたヒト大腸がん細胞株

##### (3) マウスを用いた異種移植モデル

ここまでセボフルラン暴露をした 2 種

類の大腸がん培養細胞株と肺がん細胞株は増殖能が増加することをディッシュ培養と軟寒天培地、スフェロイドアッセイにて同定した。そこでこの増殖能の亢進が動物モデルにおいても再現されるかどうかを明らかにするため免疫不全マウスを用いた異種移植モデルを作成した。その結果セボフルランを4時間暴露した大腸がん培養細胞株は、免疫不全マウスの皮下の腫瘍重量をコントロールと比べ2.1倍 ( $p < 0.004$ ,  $N = 19$ ) に優位に増加した。一方多次元培養で増殖を高めた肺がん細胞は、マウスの皮下腫瘍を増大することにはなかった。考えられる理由として用いた肺がん細胞株は暴露をしていない細胞のマウス皮下での定着率が非常に低かったため十分な検体数が得られなかったことから、実験手技に問題があったと同時に異種移植実験に適した細胞種の選択が必要と考える。

#### (4) 暴露直後の遺伝子発現解析

セボフルラン暴露によって大腸がん培養細胞株の増殖能が動物モデルでも再現することが明らかになった。そこでこの増殖能の亢進に関わる機序を解明するため全トランスクリプトーム解析を実施した。その結果既知のヒト遺伝子配列を参照し464万リードに分類し、57,776遺伝子をマッピングした。これらの遺伝子のうち有意差のある55,001遺伝子変動(95%)に着目し、既報の報告を基に36のパスウェイについて発現解析を行った。その結果セボフルランを暴露した大腸がん細胞株は遺伝子の可逆的メチル化酵素に関わる遺伝子が暴露直後から2.3-2.4倍に発現量を増加することが明らかとなった。また8時間暴露したサンプルでは前立腺がんや腎臓がんなどで発現が確認されている可逆的な脱メチル化酵素遺伝子も2.3倍に増加していることが同定された。以上のことからセボフルラン暴露直後の遺伝子発現では、可逆的脱メチル化遺伝子とその関連遺伝子が高発現していることが同定した。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) Yuko Konishi, Takahiro Hirai, Shoko Mizuno and Kimitoshi Nishiwaki., Sevoflurane partly promotes cancer cell growth. 5th Global Conference on Perioperative Care of the Cancer Patient, 2017

(2) 小西裕子、石田祐基、水野祥子、平井昂宏、西脇公俊. セボフルランのヒト大腸がん細胞株へ及ぼす影響 2 - HCT116 トランスクリプトーム解析 - Sevoflurane stimulates s-phase transition on colon cancer cell HCT116. 2016

(3) 小西裕子、平井昂宏、水野祥子、西脇公俊. セボフルランのヒト大腸がん細胞株へ及ぼす影響 1 HCT116におけるS期細胞増加について Sevoflurane stimulates s-phase transition on colon cancer cell HCT116. 2016.

(4) Yuko Konishi Takahiro Hirai, Shoko Mizuno and Kimitoshi Nishiwaki., Sevoflurane stimulates MAPK1/3 phosphorylation after its exposure and caused short cell growth on HCT116, 4th Global Conference on the Perioperative Care of the Cancer Patient, 2016

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/anesthesiology/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水野 祥子 (MIZUNO, Shoko)

名古屋大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：60635580