

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11048

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬はWntを介して一部の癌細胞を悪性化するか

研究課題名(英文) sevoflurane may affect cancer cell proliferation through Wnt signaling

研究代表者

林 智子 (Hayashi, Tomoko)

名古屋大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：10718414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：吸入麻酔薬は虚血再灌流と同様に心筋や腎臓の保護作用を生じることが以前より知られている。これに対し、癌の外科手術に使用する麻酔薬ががん細胞に同様の保護作用をしているという懸念がある。報告者らはすでに複数のがん細胞株を用い吸入麻酔薬セボフルランの増殖への影響は使用する細胞株によって異なることを報告している。本研究ではその中で増殖を亢進した結腸癌細胞株を用い、その増殖作用をWnt/ β -catenin経路にあると考えそのノックアウトクローンを樹立し検討した。その結果、セボフルラン暴露は一部のWnt遺伝子依存的に足場非依存性やコロニー増殖能などを高め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

本研究では大腸がんの初期に関わるとされるWnt/ β -catenin経路がセボフルラン暴露により活性化し、一部のヒト培養細胞株で長期的な増殖能を高めることを確認した。しかし本研究は実験室での培養細胞株を主に使用した研究であるため、より生体に近い環境での詳細な検討が必須である。本研究により、将来的に各癌腫に応じた麻酔薬の選択に資する厳密な基礎研究の一部を達成することができた。

研究成果の概要(英文)： Volatile anesthetics have been reported protect myocardial tissue against reperfusion injury on myocardial ischaemia and kidney disturbance. Surgical treated cancer cells potentially influenced similar protection in the perioperative period. We recently showed one of a volatile anesthesia sevoflurane induced the growth on some of cancer cell lines as context independent manner. In this studied we revealed that sevoflurane induced Wnt/ β -catenin canonical pathway accompanied with MAPK activation by established Wnt knock out clones derived from human colorectal cancer cell line. These clones also revealed that one of Wnts gene is necessary for anchorage independent growth and colonization growth post its exposure of clinical relevant dosed sevoflurane. Above all we clarified that sevoflurane onwards the Wnt/ β -catenin pathway and maintain its growth to one of human colon cancer cell line.

研究分野：麻酔学

キーワード：ヒトがん細胞株 セボフルラン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに吸入麻酔薬暴露により発現すると報告されている *COX-2* は、その動物モデルにおいて虚血再灌流時の心筋保護に働くことが知られている (Alcindor et al., *Anesthesiology* 2004)。一方で大腸癌における *COX-2* 発現は、*Wnt*/ β -カテニン経路と協同し、癌の浸潤を誘発する原因の一つになることが報告されている。特に糖分泌タンパク質である *Wnt* は結腸・大腸癌の表皮で多く分泌され、細胞表面にある受容体と結合し、細胞質内の転写因子 β -カテニンの分解構造体の働きを阻害する。その結果、安定化した転写因子 β -カテニンは核内へ移行し、原がん遺伝子 *c-Myc* などを転写することが知られている。こうした *Wnt*/ β -カテニン経路の活性化は消化器がんの悪性化に寄与することが推察されている (Echizen et al., *Cancer Sci.* 2016)。

2. 研究の目的

このような背景のもと報告者らはセボフルラン暴露を受けた一部のヒトがん細胞株群が、平面ディッシュの単層培養において細胞分裂を盛んに生じて増殖能高め、遊走能や創傷治癒能を高めることを報告した (発表論文 1)。特に本研究ではヒト結腸がん細胞株が臨床で用いられている低濃度 (1 - 2%濃度) のセボフルラン暴露によって *COX-2* 遺伝子と一部の *Wnt* 遺伝子の発現量が高まることを見出した。さらにこのセボフルラン暴露によってヒト結腸がん細胞株は足場の安定しない環境での増殖能を獲得したことに着目し、麻酔薬暴露後に生じたヒト結腸がん細胞株に生じた形質転換について、糖分泌タンパク質の一つ *Wnt* 遺伝子が重要な働きをしていると仮説しこれを検証する。

3. 研究の方法

Wnt 遺伝子の有無がヒトがんの悪性化に関与するかどうかを明らかにするために、ヒト結腸がん細胞株に着目し、一部の *Wnt* 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムを利用してノックアウトクローンを樹立した。得られたクローンは PCR とシーケンス、ウェスタンブロッティングによってノックアウトが達成されたかどうかを評価した。

樹立したクローンをを用いて *Wnt* 欠失型細胞と野生型細胞の表現型の違いを比較するため、浸潤や転移に関わる形質転換能を比較する。具体的にはセボフルラン暴露の有無のある野生型株とクローンをを用いて、創傷治癒アッセイや軟寒天培地による培養により評価した。足場非依存性増殖能は軟寒天培地上に単細胞化したそれぞれの細胞を播種し 2 週間培養後に染色し、顕微鏡画像によってコロニー数を数え評価を行った。またコロニーの大きさを継時的に計測するために、市販のスフェロイド作成用プレートを用いて細胞塊コロニーを培養し、タイムラプス観察カメラを搭載した IncuCyte ZOOM (既設機器) を用いて定量した。

野生型株とクローンのセボフルラン暴露後の増殖変化がマウスの皮下でも再現できるかどうかを明らかにするため、セボフルランを暴露した野生型株とノックアウトクローンをそれぞれ免疫不全マウスの皮下へ移植し、その腫瘍の大きさや重さから増殖能を評価した。本研究の動物実験は本施設の認証を受けたプロトコ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組織免疫染色を行った。

セボフルラン暴露後にその発現を変化させた野生型株とノックアウトクローンの遺伝子発現をリアルタイム PCR とそれぞれのタンパク質をウェスタンブロッティングによって評価する。特に EGF 受容体や血管新生受容体の遺伝子やタンパク質の活性化を定量し、腫瘍の増殖能や形質転換能との関わりを精査する。

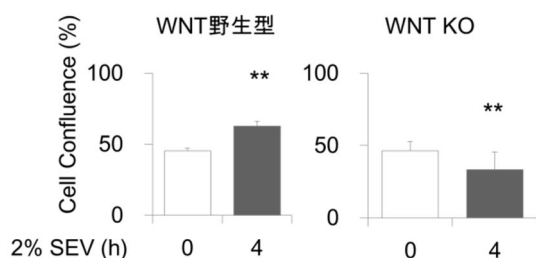
4. 研究成果

始めにセボフルラン暴露後に発現した遺伝子について網羅解析と PCR によって解析したところ、暴露 4-12 時間中に高発現をした *COX-2*、原がん遺伝子 *c-Myc* と一部の *Wnt* 遺伝子を見出した。そこでこの遺伝子の有無の違いを厳格に比較するためにこの *Wnt* 遺伝子のノックアウトクローンを CRISPR/Cas9 システムを用いてクローンを樹立した。得られたクローンは PCR とシーケンスにて *Wnt* 遺伝子の一部を欠失したことを確認した。

この *Wnt* 遺伝子の有無がセボフルラン暴露後の増殖能にどのように影響するかを明らかにするため、*Wnt* 遺伝子ノックアウトクローンとその親株である野生型細胞株を用いて、*in vitro* の平面増殖能を調べた。しかしセボフルラン暴露後から 5 日までの細胞数に、暴露無コントロールと *Wnt* 遺伝子ノックアウトクローンの間に、短期的な増殖能に統計的な有意差はみられなかった。そこで再発にも関わるとされる、単細胞化した細胞が細胞塊となる長期的な増殖能を評価するために、コロニー形成能を評価した。その結果、単細胞化したサンプルから出現したコロニー出現数は、セボフルランを暴露した野生型株では増加したが、セボフルラン暴露を受けた *Wnt* 遺伝子ノックアウトクローンでは有意にコロニー数を減少した (図 1)。しかし *COX-2* 発現は *Wnt* 遺伝子の有無に関わらず発現を高めていたことから、セボフルラン暴露後の WNT 発現との関連性は低いことが示唆され今後の課題として残された。これらのことからセボフル

ラン暴露後に特異的に高発現した一部の *Wnt* 遺伝子はヒト結腸がん細胞株において、暴露後に発現を高めた糖分泌タンパク質 WNT を介して暴露直後の増殖ではなく、長期的な増殖に影響を与えることが明らかとなった。

図1 .セボフルラン暴露後の14日目の細胞被覆率。セボフルラン暴露後の結腸がん細胞株の増殖はWNT 依存的に被覆率を抑えた。

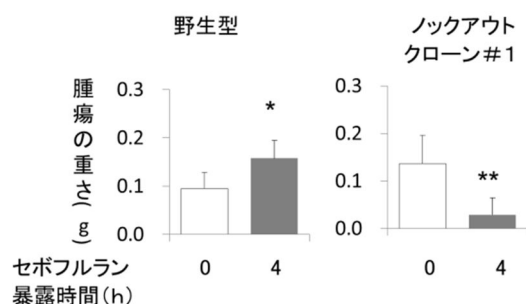


一方、浸潤に必須とされる足場の安定しない環境における増殖能（足場非依存性増殖能）についてこの遺伝子との関わりを調べるために、足場非依存性増殖能とスフェロイド形成能実験を行った。その結果、セボフルラン暴露を受けないサンプルは足場非依存性増殖能やスフェロイド形成能に有意な差は生じなかった。しかし *Wnt* 遺伝子ノックアウトクローンは有意に足場非依存性増殖能を減衰させ、また継時的な観察の結果スフェロイド形成能も減衰していることを同定した。

これらのことから、セボフルラン暴露を受けた結腸がん細胞株は *Wnt* 遺伝子を活性化して、長期的な増殖能や足場の不安定な環境での増殖能を高めることが明らかとなった。しかし単層培養における短期（2-4日）の増殖能や創傷治癒能には *Wnt* 遺伝子は重要な働きをしていないと示唆された。

さらに *in vivo* の *Wnt* 遺伝子の働きを確認するため、*Wnt* 遺伝子の有無のある細胞を免疫不全マウスの皮下に異種移植しその腫瘍を用いて評価を行った。その結果、移植開始から WNT ノックアウトクローン由来の腫瘍は、野生型由来の腫瘍に比べ、セボフルラン暴露によってさらに増殖能を減じたことが明らかとなった（図2）。またこの腫瘍の組織を免疫染色したところ細胞分裂のマーカーと血管新生タンパク質は、暴露をしていない腫瘍組織に比べ陽性細胞率を低く抑えていた。

図2 .マウスの皮下に移植した腫瘍を示した図。セボフルラン暴露の有無のある野生型と *Wnt* 遺伝子ノックアウトクローンの腫瘍サイズ。セボフルラン暴露を受けた *Wnt* ノックアウトクローン腫瘍は増殖能を抑えた。



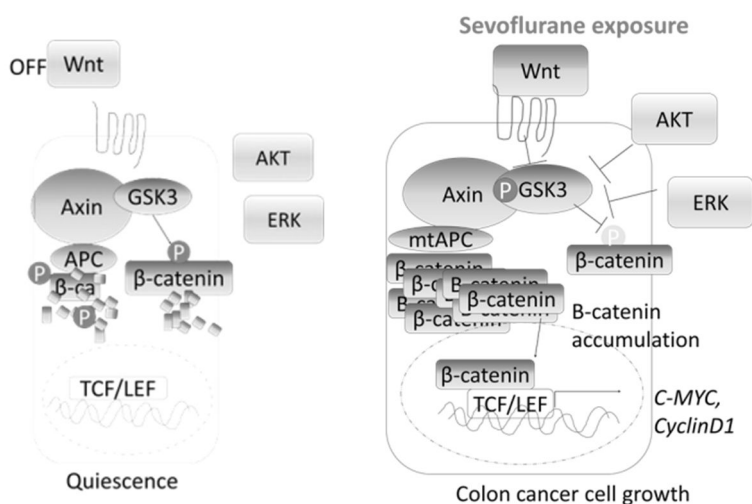
これらのことから一部の *Wnt* 遺伝子依存的にセボフルラン暴露後に活性化する腫瘍の増殖能の亢進は、マウスの皮下においても再現することができた。

さらにこの *Wnt*/ β -catenin 経路に着目した。*Wnt* 遺伝子は胃や小腸などの表皮で分泌され細胞表面受容体に結合し、転写因子 β -カテニン分解複合体を不活化して蓄積し、核に移動して転写活性を高めることが知られている。またこの経路は MAPK の活性化にも関わることが指摘されていることから、 β -catenin とその分裂複合体の一つ GSK3、ERK、AKT タンパク質の発現量などを調べた。

その結果、セボフルラン暴露後の WNT タンパク質は暴露終了から 2-3 時間後にその発現を高めるのに伴い、 β -カテニンも細胞内に蓄積されることをウェスタンブロッティングによって同定した。この時 ERK と AKT タンパク質は暴露終了直後から相補的にリン酸化される様子を明らかにした。しかし *Wnt* 遺伝子ノックアウトクローンは AKT の顕著な活性化があり、 β -カテニンの蓄積も所持っているが、このノックアウトクローンをセボフルランに暴露した場合、AKT 及び ERK の活性化は見られず、また β -カテニンが蓄積される様子も観察できなかった。

以上のことから *Wnt* 遺伝子ノックアウトクローンは *Wnt*/ β -カテニン経路以外を活性化して、 β -カテニンを補うが、セボフルラン暴露を受けると *Wnt* 遺伝子の欠失により β -カテニンの蓄積ができず MAPK の活性化もなく増殖能を高められないことが同定された。本研究で観察された *Wnt* 遺伝子ノックアウトクローンをを用いた結果から、セボフルラン暴露によって生じると推察される細胞内シグナルの模式図を示した (図 3)。

図 3 . セボフルラン暴露と *Wnt*/ β -catenin 経路の模式図。セボフルラン暴露後に AKT と ERK の活性化が発生し GSK3 のリン酸化を阻害し、また一部の *Wnt* 遺伝子が亢進して GSK3 のリン酸化を阻害する。その結果 β -カテニンの分解を妨げられ、細胞質内に β -catenin の蓄積が生じ、原がん遺伝子 *c-Myc* などの遺伝子の転写が生じることを示した模式図



本研究ではセボフルラン暴露後に増殖を高めたヒト結腸がん細胞株を用い、*Wnt* 遺伝子ノックアウトクローンを樹立した。特にセボフルラン暴露によって高発現した一部の *Wnt* 遺伝子が暴露後の増殖能亢進に関わっていると仮定し、このノックアウトクローンをを用いてその詳細を解析した。その結果、セボフルラン暴露によりこの結腸がん細胞株は一部の糖分泌タンパク質 *Wnt* 遺伝子を介して転写因子 β -カテニンの分解複合体を阻害し、細胞質内に β -カテニンを蓄積し、原がん遺伝子 *C-Myc* の発現を高め、長期的な増殖能や足場非依存性増殖能、コロニー形成能を高めることを明らかにした。

< 引用文献 >

Tanaka K, Ludwig Lynda M, B.S., Krolikowski John G, B.A., et al. Isoflurane Produces Delayed Preconditioning against Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury: Role of Cyclooxygenase-2. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2004;100(3):525-531.

Echizen K, Hirose O, Maeda Y, Oshima M. Inflammation in gastric cancer: Interplay of the COX-2/prostaglandin E2 and Toll-like receptor/MyD88 pathways. *Cancer Sci*. 2016;107(4):391-397.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 小西裕子、林智子、平井昂宏、西脇公俊
2. 発表標題 吸入麻酔薬セボフルラン暴露後にヒトがん培養細胞株が示す増殖能の変化
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Hirai YK, and Kimitoshi Nishiwaki
2. 発表標題 1% Sevoflurane exposure is associated with early and late apoptotic cell death on A549 and MCF-7 cell lines
3. 学会等名 American Society of Anesthesiologists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小西裕子、周睿、平井昂宏、西脇公俊
2. 発表標題 ヒト大腸がん細胞株を用いたセボフルラン暴露と足場非依存性増殖能の検討（優秀演題）
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第64回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平井昂宏、小西裕子、周睿、西脇公俊
2. 発表標題 セボフルラン暴露後に生じる大腸癌細胞株の短期的な増殖はERK1/2のリン酸化が関与する
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第64回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuko Konishi, Takahiro Hirai, Sachiko Mizuno and Kimitoshi Nishiwaki
2. 発表標題 Sevoflurane partly promotes cancer cell growth
3. 学会等名 5th Global Conference on Perioperative Care of the Cancer Patient (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takahiro Hirai, Yuko Konishi and Kimitoshi Nishiwaki
2. 発表標題 Sevoflurane stimulates MAPK1/3 phosphorylation after its exposure and caused short cell growth on HCT116
3. 学会等名 ASA; American Society of Anesthesiologists (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究 分担者	小西 裕子 (Konishi Yuko) (60771970)	名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教 (13901)	
連携 研究者	西脇 公俊 (Nishiwaki Kimitoshi) (10189326)	名古屋大学・大学院医学系研究科・教授 (13901)	