

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16477

研究課題名(和文) 乳癌細胞のエストロゲン受容体転写活性に及ぼす全身麻酔薬の影響

研究課題名(英文) Effect of general anesthetics on transcriptional activity of estrogen receptor in breast cancer cells

研究代表者

宮井 善三 (Miyai, Yoshimitsu)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10785463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌は、現在顕著な増加傾向にあり、乳癌手術において麻酔方法を含めた、再発を予防するための周術期マネジメントの確立は、臨床上的重要な課題である。申請者は、乳癌、とくにエストロゲン受容体(ER: estrogen receptor)陽性乳癌細胞において、核内受容体であるERの転写活性がその増殖、進展に、不可欠であることに注目し複数の麻酔薬のERへの作用を詳細に検討した。結果、代表的全身麻酔薬であるプロポフォルにおいて乳癌細胞株におけるERの核内発現量の僅かな低下を認めたが、転写活性においては大きな変化は認めず、我々の検討した範囲では、麻酔薬による大きな影響は確認出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回研究した範囲においては、全身麻酔薬特にプロポフォルによる乳癌の増殖抑制効果は認められなかった。実際最近追試が行われた乳癌に対する全身麻酔薬のインパクトについても、より大規模な研究では否定的な結果が報告されており、我々の結果のそれらの報告と矛盾しないものなのかもしれない。結果としては否定的ではあったが、前立腺癌細胞に対しては過去明らかな抑制効果を認め報告しており、各癌腫によって麻酔薬の作用は変化があるものなのかもしれない。この点については今後の課題であろう。

研究成果の概要(英文)：Breast cancer has been increased rapidly, and how to prevent the recurrence of breast cancer after surgical resection is important. These days multiple clinical trials suggest that the method of anesthetics could have an impact on the recurrence rate of breast cancer and its prognosis, although the basic mechanism of that phenomenon is not fully clarified. We investigated the effect of anesthetics on estrogen receptor modalities in breast cancer cells, for estrogen-estrogen receptor (ER) axis has a major driving force of breast cancer, and found that propofol, one of the representative general anesthetics, had a small effect on ER expression in nucleus of breast cancer cells, but the change is not great enough to suppress ER transcriptional activities.

研究分野：麻酔科学

キーワード：乳癌 エストロゲン受容体 全身麻酔薬

## 1. 研究開始当初の背景

麻酔薬と癌の予後との関連について検討した臨床研究が近年増加している。癌の再発に要する時間と比較すれば、麻酔薬に暴露されている時間ははるかに短いため、麻酔薬が予後に影響する可能性は一見低いように考えられるが、多数の臨床研究により、麻酔薬のみではなく、体温、疼痛、炎症、心理的ストレスなどといった種々の周術期の因子が癌の予後に影響しうることが明らかとなってきた。その背景として周術期には、外科手技による癌細胞の播種、外科手術後の修復のために放出される各種成長因子の増加、抗腫瘍免疫の低下、腫瘍由来の抗血管新生因子の消失といった因子が発生するため、癌が増殖、進展しやすい状況にあると考えられている。

乳癌は近年顕著な増加傾向にあり、日本人女性の部位別癌罹患率の第一位となっている。乳癌の特徴として、肉眼的には完全に切除しえたと考えられる症例においても、時間を置いて再発してくることが少なからずあり、術後の再発の有無は、患者の予後に決定的な影響を及ぼす。従って、乳癌の術後再発を低下させるような、周術期臨床マネージメントが重要である。特に、麻酔薬と乳癌との関連については、近年大規模なコホート研究において、プロポフォール主体の麻酔が、吸入麻酔薬主体の麻酔に比べて、無再発生存率が有意に長いとの報告があり、麻酔が乳癌患者の予後に影響する可能性が高いと考えられる。

一方、臨床研究に比較して、麻酔薬がどのように乳癌細胞に作用するかという基礎的研究は、*in vitro* で、プロポフォールが乳癌細胞の増殖や浸潤を抑制しうることや、セボフルランが逆に乳癌細胞の増殖を促進することが結果として示されているものの、それがどのようなメカニズムによるものなのかはほとんど不明である。

乳癌には、エストロゲン受容体(ER: estrogen receptor)を発現してエストロゲン依存性に発生、進展するER陽性乳癌と、エストロゲンに依存しないER陰性乳癌があり、両者は生物学的に異なった病気と考えられている。とくにER陽性乳癌は近年著明な増加傾向にあり、全乳癌の大多数を占めるようになってきている。これらER陽性乳癌においては、エストロゲンはERと結合することにより核内へと移行し、これら複合体は転写因子として機能し、乳癌細胞の増殖に必要な多数の遺伝子を誘導する。これがER陽性乳癌における基本的な増殖メカニズムであるが、手術時の月経周期により乳癌の予後が影響されるとの報告や、手術直前に合成プロゲステロンを投与してエストロゲンの作用を相対的に低下させると術後転移が低下したとの報告があり、周術期においても乳癌の増殖、進展にエストロゲン-ER系が重要であることが確認されている。

申請者は、本研究において、エストロゲン-ER系に麻酔薬が及ぼす影響に注目し、各種麻酔薬が、ER陽性乳癌細胞において、まずERの転写活性にどのような影響を与えるかを比較し、さらにERの核移行や、リン酸化などの修飾、ユビキチン-プロテオソーム系による分解などを詳細に検討することにより、そのメカニズムまでを明らかにしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、全身麻酔薬がエストロゲン-ERの転写活性系に及ぼす影響とそのメカニズムを明らかにし、その結果を複数の麻酔薬間で比較することにより、乳癌術後再発予防のためにどのような麻酔方法が適当か、ということをも提案する基礎データを提供することであった。

乳癌においては、麻酔薬・麻酔方法と予後との関連について、多数の臨床研究が行われていることとは対照的に、麻酔薬と乳癌細胞の増殖・進展に関する基礎的研究は驚くほど少なく、またER陽性と陰性乳癌では、生物学的な振る舞いが全く異なるにもかかわらず、それらに特化した研究はほとんどない。

特に、臨床研究において、プロポフォール主体の全身麻酔が、吸入麻酔薬主体の麻酔に比較して、乳癌術後再発を抑制するとの結果が報告されており、全身麻酔薬の乳癌細胞に対する作用にほんらかの差が存在することが示唆され、そのメカニズムを明らかにすることで、より理論的に、どのようなタイプの乳癌にどのような麻酔方法、麻酔薬が適当であるのか具体的に提案できると期待された。

また、癌の発生、進展は、種々の生物学的因子が複雑に関連しているものと考えられるが、ER陽性乳癌の場合は、エストロゲン-ER系の重要性が明らかであり、基礎データの臨床への応用性が高いと考えられた。

### 3. 研究の方法

ER 陽性ヒト乳癌細胞株 (MCF-7 細胞) を使用して、以下の点について検討した。

A: ER の核移行が麻酔薬によりどのような影響をうけるか、イムノプロット法、免疫組織染色法を用いて検討する。

MCF-7 細胞に E2 を投与したのち、同時に代表的全身麻酔薬である propofol (50  $\mu$ M) と isoflurane (1%) をそれぞれ 4 時間同時投与した。終了後、MCF-7 細胞の核タンパクを抽出し、エストロゲン受容体交代を用いてイムのプロット法を行なった。その結果、E2 投与群においては、エストロゲン受容体タンパクの発現が有意に上昇し、一方 propofol 群、isoflurane 群においては低下が認められた。これは、仮説として提唱した、全身麻酔薬がエストロゲン受容体の核移行を抑制することにより、その転写活性をと抑制することを示唆したものと考えられた。

B: 続いてエストロゲン-ER 系の転写活性が、麻酔薬によってどのような影響を受けるかをリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。

MCF-7 細胞に、エストロゲン (エストラジオール: E2) を添加したうえで、エストロゲン-ER 系の標的遺伝子 (COX7RP, CathepsinD) の活性化をリアルタイム RT-PCR にて相対的に定量化して評価した。

E2 (2 時間) を添加したところ、MCF-7 細胞における COX7RP mRNA の誘導は、対照群と比較して、1.3 倍程度 (E2: 50nM) と僅かであるが増加していた。

E2 (4 時間) を添加したところ、MCF-7 細胞における COX7RP mRNA の誘導は、対照群と比較して、1.4 (E2: 10nM) から 1.6 倍程度 (E2: 50nM) であり、E2: 100nM ではほとんど増加せず、E2 による濃度依存的な遺伝子誘導は確認できなかった。

E2 (8 時間) を添加したところ、MCF-7 細胞における COX7RP mRNA の誘導は、対照群と比較して 0.6 程度 (E2: 50nM) であり、E2 による濃度依存的な遺伝子誘導は確認できなかった。

そこで E2 による誘導が確認できた 2 時間投与の条件下で代表的全身麻酔薬である propofol を同時投与し、その作用を検討した。

Propofol (10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M) を同時投与したところ、COX7RP mRNA の誘導は 0.8 から 0.9 程度に減少したが、positive control である E2 投与群においては、今回は COX7RP mRNA の増加を認めず、この実験系で認めた propofol の効果は、エストロゲン-ER 系への特異的な作用であるのか、単なる MCF-7 細胞への毒性であるのかは判然としなかった。

Cathepsin D についても同様の実験を行なった。E2 (4 時間) を添加したところ、MCF-7 細胞における Cathepsin D mRNA の誘導は、対照群と比較して、1.0 (E2: 10nM) から 0.96 倍程度 (E2: 50nM) であり、E2: 100nM では 1.10 程度ほとんど増加せず、E2 による濃度依存的な遺伝子誘導は確認できなかった。

以上の結果から MCF-7 を用いて当初予定していた実験系において、リアルタイム PCR 法によって、その転写活性を確認することは残念ながら困難と判断した。

このため、さらに以下の様な実験を予定していたが、それらの施行には至っていない。

C. ER の修飾 (それぞれ特有のアミノ酸に対するリン酸化、アセチル化、メチル化によって ER の核移行、転写活性に影響があることが報告されている) に及ぼす麻酔薬の影響をイムノプロット法によって検討する。

D. ER の分解過程について、麻酔薬の影響を検討する。ER の分解はユビキチン-プロテオソーム (UPS) 系によると考えられているため、薬剤的に UPS 系を阻害するなどの実験系を用いて、ER の発現量および分解のプロセスに麻酔薬が作用しているかをどうか明らかにする。

E. 核外の ER シグナル に及ぼす麻酔薬の影響を検討する。ER のうち、細胞膜上にとどまるものがあり、エストロゲンにより活性化されたのち、細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) 系、PI3K/AKT シグナル系に作用して、乳癌細胞の増殖に寄与すると報告されている。この細胞膜上の ER は、GABA 受容体やグルタミン酸受容体といった麻酔薬の標的部位ともなりうる受容体とも相互作用することが報告されているため、この核外 ER シグナルが麻酔薬によって影響される可能性があると考えられる。具体的には細胞膜上 ER の発現量や ERK や AKT の活性化をイムノプロットで検討し、この系における麻酔薬の作用を明らかにする予定である。

#### 4. 研究成果

以上の研究結果から、イムノプロットの研究から、エストロゲン受容体タンパクの核移行に全身麻酔薬 (propofol, isoflurane) が作用する可能性が示唆されたものの、リアルタイム PCR の結果からは、その影響を確認することはできなかった。

近年の臨床研究では、当初発表された数例の報告 (静脈麻酔薬 = propofol を主体とした全身麻酔が吸入麻酔薬を中心とした全身麻酔に比べて乳癌切除術の予後を改善する) の結果が否定される、すなわち、全身麻酔の方法は予後を左右しないとする結果が、より多数の症例数を集積した研究によって示されており、まだ大規模前向き研究の結果は示されていないものの、当初考えられていた様な、静脈麻酔を中心とすることで乳癌患者の予後を改善するという機運はなくなりつつある印象を受けている。

我々の研究結果はある意味上記の様な臨床的事実を裏付けるものかもしれないと考えている。

#### 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)

今回の研究結果とは直接関連しないが、副次的に得られた結果で以下の様な論文を発表した。

Hirotsu A, Iwata Y, Tatsumi K, Miyai Y, Matsuyama T, Tanaka T.

Maternal exposure to volatile anesthetics induces IL-6 in fetal brains and affects neuronal development.

European Journal of Pharmacology 2019 Nov 15;863:172682

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirotsu A, Iwata Y, Tatsumi K, Miyai Y, Matsuyama T, Tanaka T	4. 巻 15
2. 論文標題 Maternal exposure to volatile anesthetics induces IL-6 in fetal brains and affects neuronal development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 863:172682
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----