

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09349

研究課題名（和文）吸入麻酔薬後のケモカインCXCL12-CXCR4発現不均衡と血管新生

研究課題名（英文）Volatile anesthesia induced angiogenesis with chemokine transcription

研究代表者

平井 昂宏（Hirai, Takahiro）

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：00612798

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）：周術期に用いる吸入麻酔薬のがん細胞への影響を調べるために麻酔後に増加したケモカインに着目し検討を進めた。申請者らは吸入麻酔薬セボフルラン暴露によって免疫不全マウスの皮下に移植した腫瘍が血管新生を促進し増大したことを見いだしていた。そこでこの作用機序に細胞から発生したケモカインが関わりと仮説しこれを検証した。申請者らはこのタンパク質リン酸化パネル試験やトランスクリプトームにより麻酔薬後のケモカインやカルシウムシグナリングの活性化を確認した。しかし、がん細胞のボイデンチャンバーによる走化性やメチル化特異的PCR法による、ケモカインリガンドのプロモーター領域にメチル化修飾変化は見いだせなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はすでにかんの外科学的切除術に用いられる全身麻酔薬セボフルランが、ヒト培養細胞がんのケモカインや免疫応答を活性化することを見いだした。しかしこれらの変化は、動物モデルにおける血管新生に直接影響を与えたかどうかは明らかにできなかった。また培養細胞を用いた実験においては、セボフルラン曝露によってケモカイン受容体が非常に高活性することから、ケモカインを誘導し遊走する能力や、ケモカインのプロモーター領域のメチル化修飾が生じているかどうかを検討したが、セボフルラン曝露による変化は生じなかった。本研究により周術期に用いられているセボフルランの作用機序について検討を進めた。

研究成果の概要（英文）：Since volatile anesthesia is widely used for surgical tumor resection, the influence of preoperative anesthesia on tumor metastasis should be carefully examined. We have found that sevoflurane induces angiogenesis in tumors within immune-deficient xenograft models in mice. The cause of the induction of distant blood vessels could be attributed to chemokine or immune responses expressed by sevoflurane-exposed injected cancer cells. In this study, we found that chemokines and related immune signals were confirmed to be expressed in sevoflurane-exposed intestinal human cancer cells. However, in the in vitro model, neither methylation at the chemokine promoter area nor chemotaxis was detected using Western blotting and Boyden chamber assays, respectively.

研究分野：anesthesiology

キーワード：セボフルラン ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

吸入麻酔薬と癌の再発・浸潤への懸念

近年の高齢化に伴い急増しているがん治療であるが、その最も効果的な治療の一つである外科的がん切除術は十分な周術期管理を実施することにより、多様な年齢や背景をもつがん患者さんへ広く安全に適用することができている。しかしその一方で、こうした手術中の外科的侵襲や炎症作用などによってその自己免疫能力の低下が生じ、がんの再発や小さな転移を促がしてしまう可能性も以前より指摘されている。さらにこうした周術期に長時間使用する鎮静や筋弛緩、意識消失を目的とした吸入麻酔薬や静脈麻酔薬などの全身麻酔薬が、がん細胞に直接作用して増殖を促す懸念も生じていた(1992年 Salo, M., 2016年 Wigmore, T.J et al., 2014年 D.J. Buggy et al.)。興味深いことにこれまでも、このような麻酔薬の副次的な作用として心筋や神経への細胞死からの保護作用が生じ、術中の虚血性細胞死を防ぐ効果を生ずるなど麻酔薬のまだ十分に理解をされていない効果があることもまた報告されていた。こうした背景のもと、麻酔学分野では試験管や動物実験でのがんと麻酔薬の及ぼす影響について研究されているが、がん細胞の細胞死抵抗性や遊走能の亢進、または細胞死の増加、免疫応答の活性化など扱う細胞株や実験条件の違いなどから多様な報告があり、その議論はまだ結論を得ていない。一方でその解決のために世界各国では大規模コホート研究を実施し、使用する麻酔薬選択と適用するがんの種類に着目し、手術後の回復時間や予後の回復などから麻酔薬の影響の有無を検証している。

2. 研究の目的

このような背景のもと申請者らはこれまでの実験で1%セボフルラン暴露後の大腸がん細胞株がCXCL12-CXCR4経路と血管新生VEGFの転写を活性化し、ヌードマウス皮下の血管新生を促したことを同定しました。しかし4%セボフルランは増殖や皮下腫瘍の増大を認めなかったことから適切なセボフルラン濃度が腫瘍の増大や血管新生を抑える可能性があり、その作用機序を明らかにするために正確な基礎データを積み上げていくことが安全な麻酔薬使用のための重要な課題であると考えました。

申請者らはセボフルラン暴露後に生じた、ケモカインCXCR4(Alpha-chemokine receptor specific for stromal-derived factor-1, CD184)の遺伝子発現増について着目しました。CXCR4はSDF-1(stromal cell derived factor-1)と協同して、肺発生、血管新生、腫瘍増加や生存増強に関わることが報告されており、近年では肺発生時の重要な神経発達に関与することが分かっています。細胞内のカルシウムやHIF-1やNF- κ Bによって制御されているそうですが、本実験の条件ではHIF-1やNF- κ Bの発現変化は見いだせなかったことから、セボフルラン暴露後に14倍に発現したCXCR4高発現はカルシウム活性によって励起されたと考え検証します。またケモカインCXCL12は複数のがん細胞でメチル化異常による自己分泌制御(オートクリン)破綻が報告されていることから、暴露後のCXCL12の低発現の理由が遺伝子修飾の一つメチル化異常によるかどうかの検証を行います。以上のことからセボフルラン暴露を受けたヒト大腸がん細胞株は低メチル化などのCXCL12-CXCR4経路の発現不均衡を生じ、VEGFを活性化して移植後の血管新生と腫瘍の増大につながったと考えこれを検証します。

3. 研究の方法

試験したヒト培養細胞株は免疫不全マウスの皮下に移植され増大した細胞株を採用した。適用した麻酔薬は覚醒の速さから広く用いられている全身吸入麻酔薬セボフルランを用い、臨床使用されている濃度に近い1%(空気により気化)を4時間暴露した。申請者らはこれまでの成果からセボフルラン曝露がマウス皮下の腫瘍細胞の血管新生を盛んに生じたことに着目した。特にセボフルラン曝露後の腫瘍ではCXCL-12遺伝子の発現が著しく低下していたことから、その原因を明らかにするためプロモーター領域のメチル化について以下のように検証した。セボフルランを暴露したヒト培養細胞株を用いてメチル化特異的PCR法によりメチル化の増減を比較して、CXCL-12の発現低下の可能性の一つを検証した。またマウスの異種移植モデルではセボフルラン曝露後の移植腫瘍は、新たに血管を呼び込み増大したことから、これらの組織切片や組織から遺伝子を抽出してcDNAを合成し、血管新生因子についての関連する遺伝子発現解析を行った。また細胞や組織のライセートから発現しているタンパク質を組織免疫染色やウェスタンブロット法を用いて解析を行った。また麻酔薬暴露にはカルモジュリンの発生によって、ケモカインの活性化を生じることが予測されたのでリン酸化パネル検査を実施した。本研究で実施した動物実験は使用施設の倫理委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

転移や浸潤を達成するために、がん細胞は周囲の微小環境を変貌させて血管新生を促すなど、がん細胞の新たな一面が明らかになっている。本研究ではこれまでにセボフルラン1%を暴露したヒト培養がん細胞株らが、免疫不全マウスの皮下で血管新生を盛んに活性化したことを確

認している。そこで始めにこれらの腫瘍から血管新生因子に関わる遺伝子発現が活性化しているかどうかをトランスクリプトーム解析で同定した。その結果、血管新生の活性化と共に、カルシウムシグナルの活性化やケモカインの異常低下を見いだした。そこでまずセボフルランを暴露した培養細胞株にセボフルランを暴露し、血管新生に関わる遺伝子発現の時系列変化を調べた。その結果予測と異なり、培養細胞のみでは暴露 8 時間以後にはそれら遺伝子の発現活性化は見られなかった。マウスの皮下に移植した際は、マウスの血管に働きかける異なる経路の活性化が必要になると示唆された。そこで組織切片を用いて VEGF(抗体) や CXCR4 の蛍光組織染色を実施した。VEGF は移植腫瘍周囲で発現が見られたが、CXCR4 については抗体の特異性に問題があり判定はできなかった。このことから組織ではヒト由来の VEGF タンパク質が移植腫瘍の周囲から発生していることが同定できた。さらに申請者らは培養細胞株を用い、セボフルラン曝露後に活性化するカルシニューリンシグナルの活性化について取り組んだ。具体的にはセボフルランを暴露したヒト培養細胞株のライセートを暴露直後と 6 時間経過後に採取し、複数のカスケードが搭載されたリン酸化パネルを用いて免疫染色結果からそれを評価した(図 1)。その結果、予測した通りカルモジュリンやその上流域にあるカルシウムシグナリングの活性化は、セボフルラン曝露終了から 6 時間後にはカルシウムシグナリングや PKC の一部が活性化することを同定した。ここでがん細胞の後天的な変化を反映した遺伝子の異常修飾を蓄積しに着目した。本研究ではすでに一部のケモカイン発現がセボフルラン曝露後に異常抑制されていることを同定していた。そこでその原因にそのケモカイン CXCL-12 のプロモーター領域に修飾異常が生じてセボフルラン後は活性化を低下させたと仮定し、メチル化特異的 PCR を実施した。その結果予測と異なり、セボフルランの暴露によってプロモーター領域にはメチル化の有意な変化は見いだせなかった。

この結果を支持する実験データとして、セボフルラン曝露をした細胞株を用いてポイデンチャンパー法による走化性試験を実施した。しかしこちらも曝露の有無の違いによる走化性の有意な差を見いだせなかった。

以上のことからセボフルラン曝露により血管新生能を高めたがん細胞の作用機序について、カルシウム経路や PKC 経路が活性化することを明らかにした。しかしマウス血管新生を促す機構は CxCL-12 のプロモーター領域のメチル化には関連が見いだせなかったことから、さらに検討が必要である。

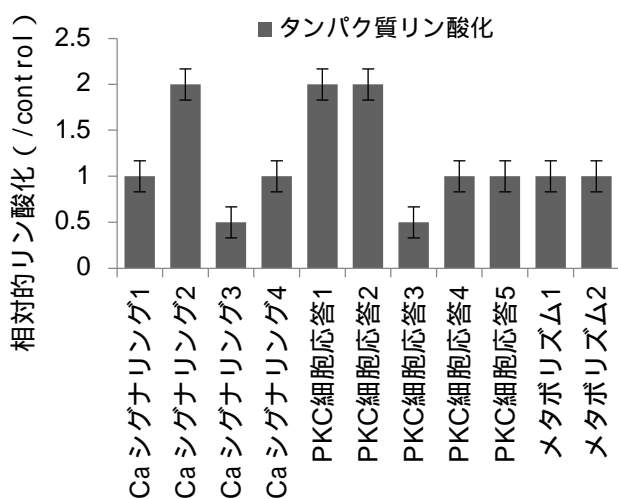


図1 タンパク質リン酸化パネル試験結果

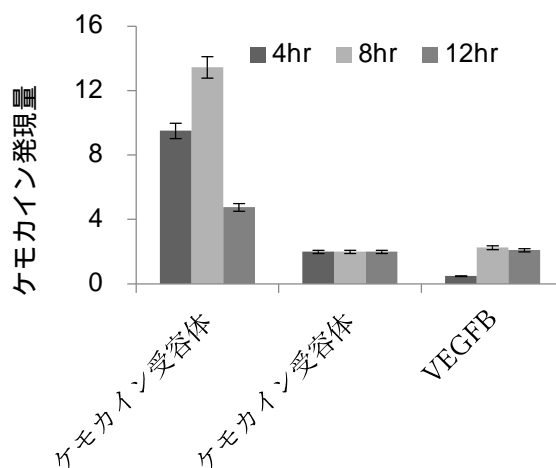


図2 セボフルラン曝露によるケモカイン活性

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） なし	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 47-57
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, Takahiro Hirai and Kimitoshi Nishiwaki
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）
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 (Yuko Konishi) (60771970)	名古屋大学・医学系研究科・特任講師 (13901)	

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
---------	---------