

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462344

研究課題名(和文) 全身麻酔薬が糖尿病環境下にある癌細胞の増殖能に与える影響

研究課題名(英文) Effect of anesthetics on human cancer cell proliferation under diabetic conditions

研究代表者

瓦口 至孝 (Kawaraguchi, Yoshitaka)

奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90433333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病との関連性が指摘されるヒト培養癌細胞(大腸癌、肝細胞癌)を用いて、吸入麻酔薬が癌細胞の特性にどのような影響を与えるか、特に高インスリンおよび高血糖環境における影響について基礎的な検討を行った。1%セボフルラン6時間曝露はATP感受性カリウムチャネルを介して癌細胞の増殖能を亢進すること、さらにグルコース濃度300mg/dL+インスリン濃度0.05mg/Lの環境下において増殖能を亢進することがわかった。また、2%セボフルラン曝露1時間で細胞内の活性酸素種(ROS)濃度が上昇し、一方でグルコース濃度200mg/dlは浸透圧上昇により3時間経過後に細胞内ROS濃度を低下させることも判明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of volatile anesthetics, especially in conditions of high glucose and insulin, on cell proliferation in the human colon or hepatocellular cancer cell lines (HCT116, HT29, and HepG2). First, 1% sevoflurane for 6 h potentially enhanced cell proliferation via KATP channels in colon cancer cells. Second, 1% sevoflurane exposure enhanced cell proliferation in conditions of high glucose (300mg/dL), treated with 0.05 mg/l insulin in HepG2 cells. In addition, we found that 2% sevoflurane for 1 h leads to increased intracellular reactive oxygen species (ROS) concentrations and 200mg/dL of glucose for 3h reduces ROS concentrations potentially via increased osmotic pressure.

研究分野：麻酔科学

キーワード：全身麻酔薬 高血糖 増殖能 活性酸素種 ヒト癌細胞株

1. 研究開始当初の背景

昨今の癌に対する集学的治療の進歩は著しいものの、厚生労働省の発表によると2011年の日本の死因順位別死亡数の第一位は依然悪性新生物である。また人口の高齢化も相まって糖尿病の罹患率が高く、同年の国民健康・栄養調査において糖尿病が強く疑われる人の割合は男性 15.7%、女性 7.6%と報告されている。このような状況の中、最近では癌と糖尿病の関連性が話題となっており、注目すべき疫学研究結果として糖尿病患者では癌の発症率が高いことが報告されている (Wang C, et al. *Int J Cancer* 2012, Ben Q, et al. *Eur J Cancer* 2011, Jiang Y, et al. *Eur J Epidemiol* 2011)。なぜ糖尿病患者で癌の発症率が高いのか詳細は不明であるが、糖尿病における高インスリン血症、高血糖状態や慢性炎症が癌発症に影響すると推察されている。

一方麻酔科学分野の研究では、麻酔薬や麻酔方法の選択が固形癌切除術を受ける患者の予後に影響を与えるかどうかについて、多くの基礎および臨床研究結果が報告されている。私も基礎研究において吸入麻酔薬が抗癌剤感受性を減弱させることを報告した (Kawaraguchi Y, et al. *Anesthesiology* 2011)。臨床研究では後ろ向き研究がいくつか報告されているものの、癌の種類や研究方法の違いもあり、未だ確固たる結論は出ていない。さらに前向き研究も進行中のようであるが、これら臨床研究においては麻酔薬や麻酔方法の選択が患者の予後に余程大きなインパクトを与えない限り、遺伝的および環境的に非常に幅広い患者背景が災いして n 数を大きくしても有意な差として捉えることが難しいと推察される。数ある患者背景因子の中でも、まず癌発症率が高い (=癌感受性が高い) とされている糖尿病患者において、各種麻酔薬が患者予後にどのような影響を与えるかについて検討することが重要と考えるが、この臨床研究を行うには基礎データの蓄積がないのが現状である。

基礎研究においてもいくつか重要な報告は散見される。50年以上も前に発見された Warburg 効果 (悪性腫瘍細胞では嫌気環境のみならず好気環境でも解糖系に偏ったブドウ糖代謝がみられること) を考えると、高血糖環境は癌細胞のエネルギー代謝に有利に働く可能性が考えられる。また麻酔薬で言えば、プロポフォールがブドウ糖の細胞内取り込みを増強する (Lee YA, et al. 2012 *J Am Assoc Lab Anim Sci*)。ことや吸入麻酔薬であるセボフルランが glucose transporter 4 (GLUT4) を介してブドウ糖取り込みを促進して虚血再灌流傷害から細胞を保護する (Lucchinetti E, et al. *Bri J Anaesth* 2011) ことが報告されている。さらに *in vivo* での研究では、ラットにおいてセボフルラン麻酔ではプロポフォール麻酔と比較して高血糖傾向に

ある (Kitamura T, et al. *Anesth Analg* 2009) ことも示唆に富む研究結果である。

以上のことから、高インスリンおよび高血糖環境においては麻酔薬が癌細胞の特性に何らかの影響を与える可能性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

今回の研究では糖尿病との関連性が指摘されている癌種である大腸癌 (HCT116, HT29)、肝細胞癌 (HepG2) のヒト培養癌細胞を用いて

1) 吸入麻酔薬が癌細胞の増殖能や虚血再灌流傷害にどのような影響を与えるか?

2) 高インスリンおよび高血糖環境において、吸入麻酔薬は癌細胞の特性に影響を与えるか? その場合、メカニズムとして癌細胞のエネルギー代謝の変化が関与するか?

について基礎的な検討を行った。

3. 研究の方法

①ヒト大腸癌細胞株 HCT116 および HT29 細胞 (American Type Culture Collection 社から購入) を 10% ウシ胎仔血清および 1% ペニシリン・ストレプトマイシンを添加した McCoy's 5A 培地で培養した。1×10⁴ 個を 96 ウェルプレートにまいたあと一晩 (16-18 時間) CO₂ インキュベーター内に放置した。翌日に培地を新しく入れ替えたあと、吸入麻酔薬であるセボフルラン群ではチャンバー内の二酸化炭素およびセボフルラン濃度をモニタリングしながら 1% または 2% セボフルラン (5% CO₂ + 空気) に 6 時間曝露した。一方コントロール群では CO₂ インキュベーター内で維持した。両群とも 6 時間後に新しい培地に入れ替え、さらに 24 時間経過した時点での増殖能について 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide (MTT) アッセイを用いて 570nm における吸光度 (リファレンス波長 650nm) を測定し評価した。

またセボフルランによる増殖能亢進のメカニズムとして K_{ATP} チャネルの関連性を調べるため、まず K_{ATP} チャネル阻害薬であるグリベンクラミド単独投与が増殖能に与える影響を調べた。溶解のためにジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide: DMSO) を用いてグリベンクラミドを 0, 1, 5, 10, 20, 50ng・ml⁻¹ の濃度に調整した培地に HCT116 細胞を 6 時間曝露させ、新しい培地に入れ替えたあと、さらに 24 時間経過した時点での増殖能について MTT アッセイを用いて評価した。さらに単独では増殖能に影響しない 5ng・ml⁻¹ のグリベンクラミドが 1% セボフルランによる増殖能亢進効果を消失させるかどうかについて調べた。

②ヒト肝臓癌細胞株 HepG2 細胞を 10% ウシ胎仔血清および 1% ペニシリン・ストレプトマイシンを添加した EMEM (Eagle's minimum essential medium) 培地で培養し

た。1×10⁴個を 96 ウェルプレートにまいたあと一晩 CO₂ インキュベーター内に放置した。1%または 2%セボフルラン(5%CO₂+空気)及び 1%または 2%イソフルラン(5%CO₂+空気)に 1 時間もしくは 3 時間曝露した。対象群では CO₂ インキュベーター内で維持した。1 時間及び 3 時間曝露した時点での細胞内活性酸素種(ROS)濃度を励起波長 480nm, 蛍光波長 530nm で測定し対照群と比較した。

次に 2%セボフルラン 3 時間曝露後に過酸化水素 H₂O₂ (500 μM, 6 時間)を用いて再灌流傷害を誘導し、MTT アッセイを用いて細胞の viability を対照群と比較した。また、1 ウェルあたり 100×10⁴ 個になるように調整したあと、セボフルラン群はチャンバー内の二酸化炭素及びセボフルラン濃度をモニタリングしながら 2%セボフルラン(5%CO₂+空気)に 1 時間及び 3 時間曝露し、過酸化水素 H₂O₂ (500 μM, 6 時間)を用いて細胞死を誘導し、caspase 3 活性を測定することでアポトーシスを評価し対照群と比較した。

③HepG2 細胞を 10%ウシ胎仔血清および 1%ペニシリン・ストレプトマイシンを添加した EMEM (Eagle's minimum essential medium) 培地で培養した。1×10⁴ 個を 96 ウェルプレートにまいたあと一晩 CO₂ インキュベーター内に放置した。翌日に臨床的なグルコース濃度に調整した培地に新しく入れ替えたあと (コントロール群では浸透圧を揃えるためにマニトールと使用した)、セボフルラン群はチャンバー内の二酸化炭素およびセボフルラン濃度をモニタリングしながら 1%または 2%セボフルラン (5%CO₂+空気) に 6 時間曝露した (実際に培地に溶解しているセボフルラン濃度をガスクロマトグラフィー法で測定すると 1%セボフルランで 1.6 μg/mL, 2%では 18.8 μg/mL であった)。その後 48 時間経過した時点で MTT アッセイを行った。同様に 1%または 2%セボフルラン 6 時間曝露を HepG2 細胞に行う際に、通常のグルコース濃度 (100mg/dL) と高血糖環境として 300mg/dL のそれぞれにおいて、様々なインスリン濃度(0.0005、0.05、及び 5 mg/L)のなるように添加して 48 時間経過した時点で MTT アッセイを行った。

④2 型糖尿病患者の実臨床において内因性インスリン濃度の上昇はあまり見られないことから、高血糖単独、特に臨床的に時折遭遇する血糖値であるグルコース濃度 200mg/dl に注目した。HepG2 細胞において、グルコース濃度 200mg/dl 及びグルコース濃度 100mg/dl+マニトール 100mg/dl とともに 3 時間曝露後にコントロール (グルコース 100mg/dl) と比較し ROS 濃度の変化を調べた。次に ROS 低下のメカニズムを探るため、スーパーオキシドディスムターゼ活性上昇の有無をそれぞれ曝露 1 時間後及び 3 時間後に測定した。

4. 研究成果

①セボフルランがヒト大腸癌細胞株 (HCT116, HT29) の増殖能に与える影響について、1%セボフルラン 6 時間曝露後 24 時間経過した時点での増殖能は亢進していたが、2%セボフルランでは有意差がなかった (図 1-2)。また HCT116 細胞において ATP 感受性カリウムチャンネル (K_{ATP}) 阻害薬グリベンクラミド添加により増殖能亢進効果が消失した (図 3)。このことより、1%セボフルラン 6 時間曝露は K_{ATP} チャンネルを介して大腸癌細胞の増殖能を亢進することが示唆された。

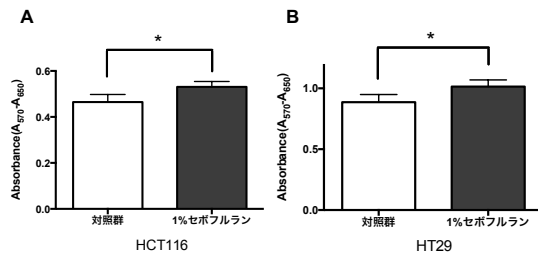


図 1. 1%セボフルラン 6 時間曝露がヒト大腸癌細胞の増殖能に与える影響 (A) HCT116 (B) HT29、平均値±標準偏差 (n=6) *; P<0.05 v.s. 対照群

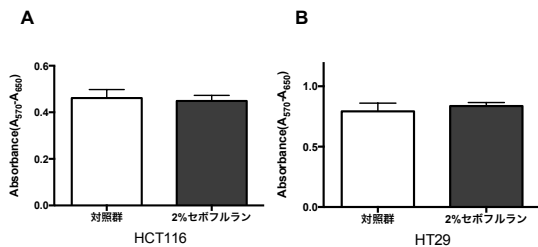


図 2. 2%セボフルラン 6 時間曝露がヒト大腸がん細胞の増殖能に与える影響 (A) HCT116 (B) HT29、平均値±標準偏差 (n=6)

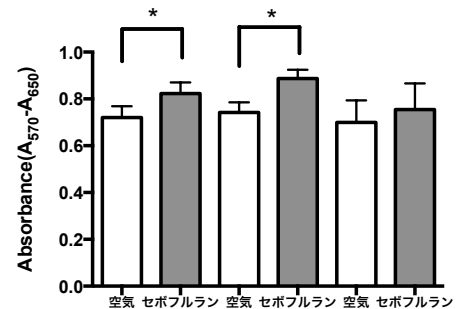


図 3. 1%セボフルランによる細胞増殖能亢進に対するグリベンクラミドの効果 平均値±標準偏差 (n=6) *; P<0.05 v.s. 対照群

②図 4 に示すように 2%セボフルラン曝露 1 時間経過した時点で細胞内 ROS 濃度は対照群と比較して有意に上昇していたが、3 時間の時点ではその効果は消失していた。1%セボフルラン曝露と 1%または 2%イソフルラン曝露 1

時間または3時間では差はなかった。

過酸化水素による再灌流傷害に対して2%セボフルラン3時間曝露は細胞保護効果を示さず、むしろ2%セボフルラン単独で caspase 3 活性を上昇させた (図 5)。

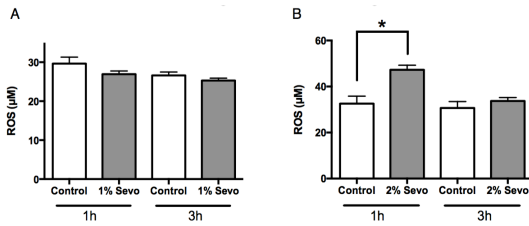


図 4. HepG2 細胞での ROS 産生におけるセボフルラン(A;1% B;2%)の影響

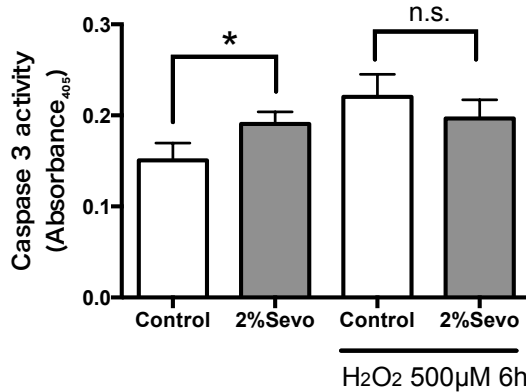


図 5. 過酸化水素によるアポトーシスに対する2%セボフルランの影響

③図 6 に示すように臨床的なグルコース濃度では HepG2 の増殖能に影響を与えなかった (A)。グルコース濃度 100mg/dL 及び 300mg/dL とともに各濃度のインスリンは増殖能に影響しなかった (B-C)。一方で1%及び2%セボフルランの6時間曝露は、高血糖環境単独では増殖能に影響しなかったが、セボフルラン 1% 6時間曝露はグルコース濃度 300mg/dL+インスリン濃度 0.05mg/L の環境下においてのみ増殖能を亢進した (図 7)。

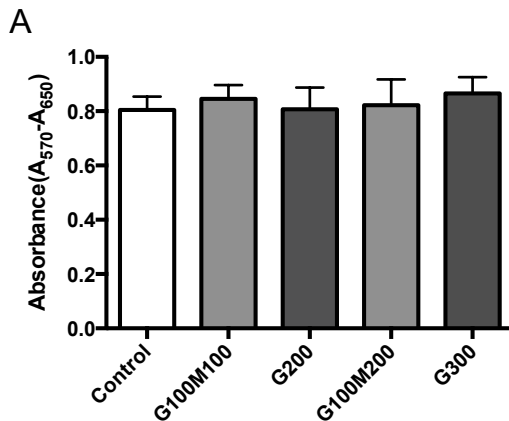


図 6. HepG2 における各グルコース及びインスリン濃度における増殖能の変化

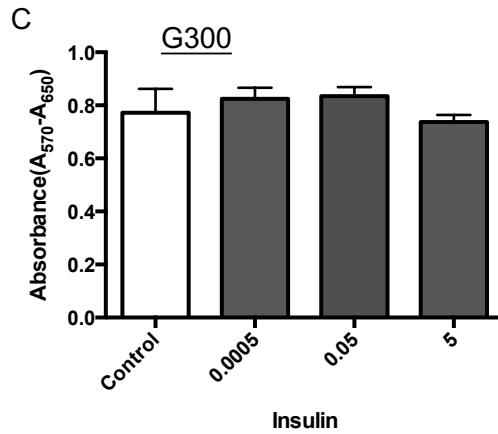
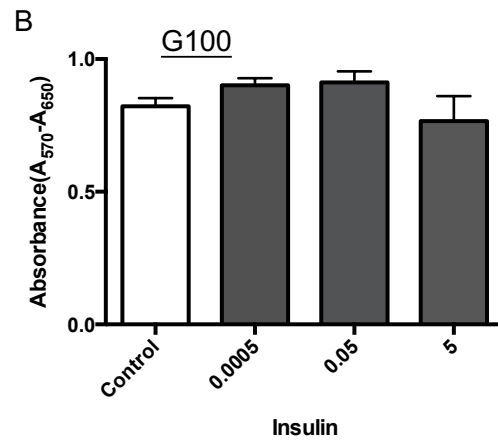


図 6 の続き B(G100) ; グルコース濃度 100mg/dL、C(G300) ; 300mg/dL

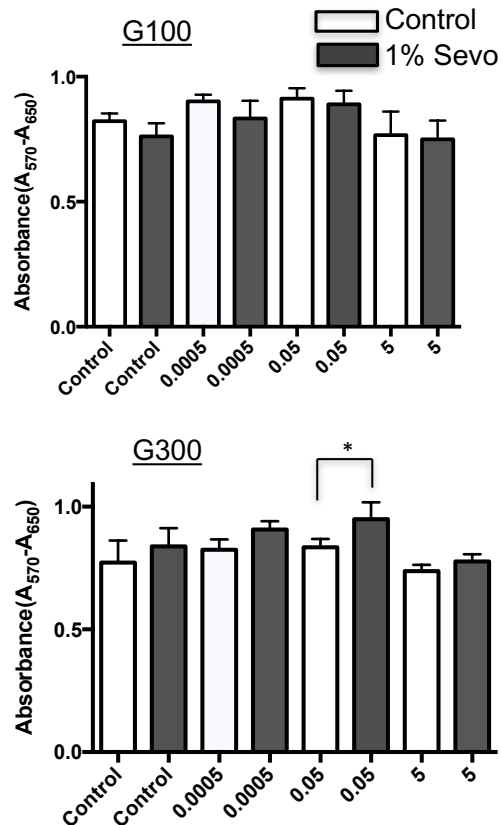


図 7. 各インスリン及びグルコース濃度における1%セボフルランが増殖能に与える影響

④HepG2 細胞において、グルコース濃度 200mg/dl 及びグルコース濃度 100mg/dl+マニトール 100mg/dl とともに 3 時間曝露後にコントロール(グルコース 100mg/dl)と比較し細胞内 ROS 濃度が低下することがわかった。しかし、スーパーオキシドディスムターゼ活性は曝露 1 時間及び 3 時間後ともにコントロールと比較して上昇は見られなかった。この結果から ROS 濃度の低下のメカニズムは不明であるが、グルコース濃度よりも浸透圧の差が影響していることが推察された。

(2)研究分担者
なし

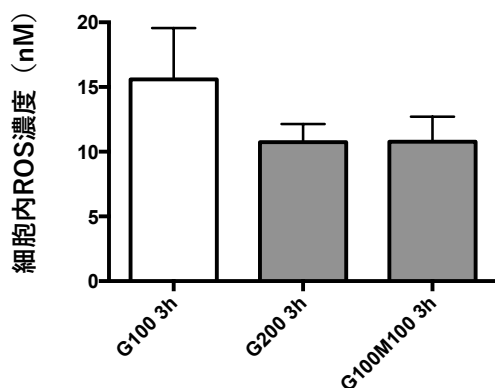


図 8. グルコース 200mg/dL が細胞内 ROS 濃度に与える影響

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

・杉本浩士、瓦口至孝、野村泰充、西和田 忠、植村景子、古家 仁、川口昌彦
1%セボフルラン 6 時間曝露はヒト大腸がん細胞株において増殖能を亢進する
麻酔 2015 Apr;64(4):357-61

・Nishiwada T, Kawaraguchi Y, Uemura K, Sugimoto H, Kawaguchi M.
Effect of sevoflurane on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells under conditions of high glucose and insulin.
J Anesth. 2015 Oct;29(5):805-8

[学会発表] (計 1 件)

・杉田 匠、瓦口至孝、西和田忠、植村景子、川口昌彦
セボフルランがヒト肝癌由来細胞株 HepG2 の過酸化水素誘導性細胞死に与える影響
日本麻酔科学会第 63 回学術集会 2016 年 5 月 26 日 博多

6. 研究組織

(1)研究代表者

瓦口至孝 (KAWARAGUCHI, Yoshitaka)
奈良県立医科大学麻酔科学 非常勤講師
研究者番号: 90433333