

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670685

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬によるエピゲノム変化が癌細胞に及ぼす影響の解析

研究課題名(英文) Epigenetic influence via sevoflurane exposure to colon tumor cell

研究代表者

石田 祐基 (ISHIDA, Yuki)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：10718315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室ではこれまでに細胞数計測による増殖解析を行ったところ、1%セボフルランに暴露されたヒト結腸癌細胞株がその増殖能を高めることを確認している。そこでこの増殖の原因を探るために、Illumina HiSeqによる全トランスクリプトーム網羅解析を実施した。その結果セボフルランに暴露されたHCT116は無刺激コントロールと比較して、電位依存性陽イオンチャネル遺伝子群の発現を変化することを同定した。これらのことからHCT116は臨床濃度以下の1%セボフルランによりトランスクリプトーム発現を大きく変化させ、その増殖効果に寄与していると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previously we found that sevoflurane inhaled colon tumor cells showed active proliferation compared to none exposure cells. To know the cause of the proliferation, we hypothesized that sevoflurane inhaled HCT116 may change its transcriptomes and epigenetic alterations on DNA. In this study HCT116 were inhaled by 1% sevoflurane for four, eight, twelve hours or none exposure and these mRNAs were read via Next generation sequencing (NGS) Illumina HiSeq. From this sequencing analysis we found that apparently Calcium and Sodium ion channel gene expressions were increased/decreased significantly. Also epigenome related DNA methylation genes were highly expressed in a time dependent manner. We concluded that HCT116 is significantly altered its transcriptome with clinically relevant 1% sevoflurane exposure.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：セボフルラン トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

(1) エピジェネティック異常と発癌

発癌に重要な遺伝子変化には突然変異とエピジェネティック異常がある。DNA のメチル化異常及びヒストンアセチル化異常は、腫瘍抑制遺伝子のサイレンシングを引き起こし、癌の増悪性を促すことが知られている。このような DNA エピジェネティック異常は、癌周囲の正常組織に蓄積し、手術後の癌の多発に深く関与していることが知られ、現在エピジェネティック治療は癌治療の標的となっている。

そこで本研究ではエピジェネティック異常のうち、癌再発の予兆といわれる、DNA 低メチル化異常に着目した。麻酔薬が与える DNA エピジェネティックへの影響について分子生物学的・細胞生物学的解析を行うことは、申請者の知る限り現在までなく、高齢化を迎え増え続ける癌患者に対する麻酔科医の急務と考えた。

(2) 麻酔薬と癌細胞の研究

一方、癌の手術や慢性疼痛に麻酔薬が使用されるなか、麻酔薬の影響による癌の再発・浸潤の懸念から、多くのコホート研究が行われてきた。しかし各医療機関によるプロトコルの違いや癌の原発巣の違いにより、癌再発について相反する結果が報告されている。また吸入麻酔薬(イソフルラン)の刺激実験では、ヒト腎臓癌細胞株の低酸素誘導因子の高発現が報告されている。一方一部のヒト乳腺癌細胞株や肺癌細胞株で増殖減衰や致死となる報告も多く、統一した実験系による比較が望まれる。また動物実験を用いた免疫低下に関する研究では、各種の吸入麻酔薬により T リンパ球を含む白血球や、NK 細胞の活性抑制が報告されており、吸入麻酔薬の癌再発・浸潤能へ懸念が高まっている。

2. 研究の目的

これまでに我々は汎用されている吸入麻酔薬セボフルランを用い、ヒト癌細胞株の増殖解析を行ってきた。その結果ある種の癌細胞株はセボフルラン暴露を受けると一時的にその増殖を高め、別の癌細胞は増殖を減じることを同定した。

そこで本研究では臨床濃度以下のセボフルランを結腸腺癌細胞株 HCT116 に暴露し、その全トランスクリプトーム解析を実施し、セボフルランによって変化する mRNA の発現変化と HCT116 増殖活性化との関連について発現パスウェイの解析や遺伝子発現のサイレンシングや過剰発現の有無を中心に明らかにすることを目的とした。

また次世代シーケンズ解析の利点としてこれまでに各国から報告されている他の研究例やシーケンズパターンを、本研究で得られたトランスクリプトーム解析の結果

と照合することが可能であり、これにより不明な点も多いセボフルラン暴露の遺伝子発現の機序を推定することが可能となる。

3. 研究の方法

(1) セボフルラン暴露後の増殖解析

麻酔薬の暴露により研究目的としているメチル化異常の有無を確かめるために、本研究では始めに、ヒト結腸腺癌細胞株 HCT116 に 1%セボフルランを暴露し増殖の影響について検討を行った。増殖解析には Coulter counter による細胞数計測と血球計算版計測を用いた。

(2) Cell preparation

セボフルラン暴露により細胞数を増加させたヒト結腸腺癌細胞株 HCT116 を暴露前日に細胞培養器内に (37 度、5%二酸化炭素濃度) 5% FBS を含む培地で事前培養し、翌日に臨床濃度以下である 1% セボフルランを 0.1 - 0.2 L/min の空気と共に培養器に流入させ暴露した。暴露時間は 4、8、12 時間または暴露なしとした。この時培養器内のセボフルラン濃度と二酸化炭素濃度は、麻酔ガスモニター (Ohmeda 5250 RGM) により随時モニターしその調整を行った。

(3) RNA preparation

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 Inc) 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。

(4) Data analysis

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 (Qiagen) 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 以上かつ、 \log_2 (セボフルラン暴露あり/暴露なし) の値が 2 倍変化量となる 1 以上を示す遺伝子を解析対象に定めて 2 群間比較を行った。

4. 研究成果

(1) 麻酔薬暴露方法

細胞培養器に気化したセボフルランを流

入し暴露実験を行った。培養器は通常培養条件の 37 度、5%二酸化炭素に保ち、ここに分速 0.1-0.2L の空気と共にセボフルランを流入させた。しかし培養器内の二酸化炭素センサーが麻酔薬の影響を受け、5%二酸化炭素が保たれず、培養液の pH に大きな変化が生じることが判明した。そこでこの問題を克服するために、麻酔薬の影響を受けにくい赤外線を利用した二酸化炭素検知センサーをもつ麻酔ガスモニター (Ohmeda 5250 RGM) を併用し、二酸化炭素濃度の調整を随時行い、培養液の変化を抑えることに成功した。

(2) MTT アッセイ

セボフルラン暴露後の増殖解析に MTT アッセイを実施した。MTT は分子式 $C_{18}H_{16}BrN_5S$ で示されるテトラゾリウム塩の化合物からなり、ミトコンドリアの呼吸鎖活性である脱水素酵素によりホルマゼンと NADH の酸化物 NAD^+ に変化する。そこでセボフルラン暴露後の細胞数計測に、この MTT を用いて呼吸鎖活性からセボフルラン暴露による細胞毒性・増殖率の計測を試みた。

検量線解析の結果、セボフルラン暴露を受けた細胞は受けなかった細胞に比べ吸光度を有意に低下させた。セボフルランを暴露された細胞による検量線は、そうでないコントロールに比べ傾きが小さくなった。(トリPLICATE に実施し、 $N=3$) このことから本研究による実験方法ではセボフルラン暴露はミトコンドリアの呼吸鎖活性に作用するため、MTT 比色法による結果を適切に得られないことが推察された。

(3) 細胞カウント法

セボフルラン暴露による細胞増殖解析には比色法による測定に代わり、増殖には Coulter Counter (BeckmanCoulter) を用いてカウントを行った。細胞は測定前日に 70% コンフルエントになるように 3.5 mm ディッシュに播種し、24 時間後から上述の方法で 1%セボフルランを暴露した。細胞数のカウントは暴露直後から 5 日間連続して計測した。この実験を独立した日に 5 回繰り返した。その結果 HCT116 は 1%セボフルランの暴露により有意に暴露 8 時間の細胞数をそうでないコントロールに比べ約 20%細胞数を増加することが明らかになった。

(4) 細胞死解析

セボフルラン暴露により培養癌細胞が増殖する場合があります、その原因は細胞死抵抗性の違いによることが報告されている。そこで本研究の HCT116 も細胞死抵抗性を示すかどうかを解析するために、細胞膜の安定性を検知する anekisinnV と 7AAD による細胞死解析を Flow Cytometry を用いて実施した。その結果、HCT116 の暴露翌日の細胞死数は暴露をしなかったコントロールに比べ変化は見られなかった。このことから HCT116 の細胞増

加現象は細胞死抵抗性ではないことが明らかとなった。

(5) Mapping の結果

セボフルラン暴露による細胞の増加の原因を探るため、全トランスクリプトーム解析を実施した。HiSeq によるシーケンスの結果、セボフルラン暴露時間が異なる各サンプルから、平均 4,700 万リード長の配列が十分に高い精度で読みとられた。これらの得られたシーケンスは FASTQ データとして当施設の CLC Genomic Workbench を用いて、既知のヒト遺伝子配列を参照し 464 万リードに分類し、さらに参照用トランスクリプトーム配列を用いて、57,776 遺伝子にマッピングした。これらの遺伝子のうち、Kal's Z-test により 5% 以上有意差のある 55,001 遺伝子変動 (95%) について、既報の報告を基にパスウェイについて発現解析を行った。

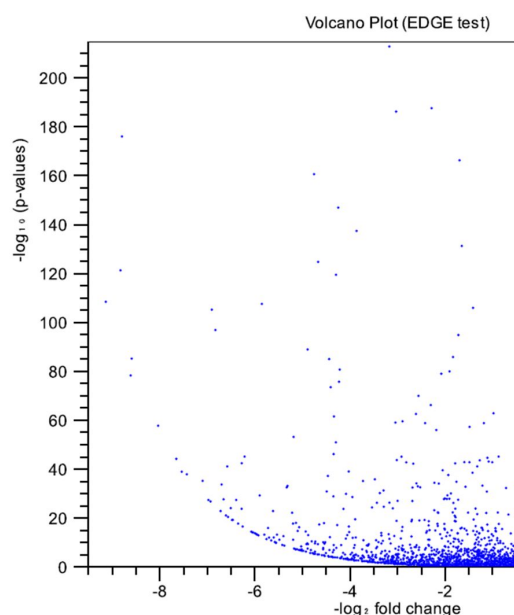


Figure. 1.

1% のセボフルランを 4 時間暴露した HCT116 のトランスクリプトーム Volcano Plot。X 軸は各遺伝子の \log_2 Fold Change (4 時間暴露/無刺激)、Y 軸は Kal's Z-test より得た P 値、各ドットが 1 遺伝子をそれぞれ示す。左上に分布する遺伝子群はセボフルラン暴露を受けた結果発現量が顕著に低いことを示す。セボフルラン暴露時間 (8、12 時間暴露の図はなし) にそれぞれ盛んな遺伝子発現の変化がみられた。

(6) 電位依存性イオンチャンネル遺伝子群

カルシウムやナトリウムなどの電位依存性イオンチャンネルは細胞のイオン透過を担い、細胞膜電位に依存し開閉する。麻酔薬セボフルランはこうしたチャンネルの活動電位を変化させることが神経細胞や心筋において報告されており、本研究の HCT116 でもカルシウムイオン、ナトリウムイオンチャンネル

に関連する遺伝子の急激な増加や減少という発現変化が見られた。しかし具体的な陽イオンチャンネルの開閉に關与する遺伝子の流れは複雑で不明な点も多く、遺伝子発現変化とセボフルラン暴露後の増影響についての検討は今後の課題となった。

以上より本研究で実施した HCT116 の 1% セボフルラン暴露とその網羅的トランスクリプトーム解析を実施した。その結果これまでに心筋細胞やと神経細胞などで報告のある、電子依存的陽イオンチャンネルの遺伝子発現の活性化または不活性化について、本研究でも同様の結果を得ることができた。

さらにセボフルラン暴露により HCT116 はエピゲノム修飾に關わる遺伝子を暴露時間依存的に低発現することを同定できた。

今後の課題として転写発現だけによらず、リン酸化やユビキチン化などによるタンパク質発現の制御もあることから、セボフルラン暴露によって変化する転写制御タンパク質について、より一層の研究が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Shiina S, Ohno M, Ohka F, Kuramitsu S, Yamamichi A, Kato A, Motomura K, Tanahashi K, Yamamoto T, Watanabe R, Ito I, Senga T, Hamaguchi M, Wakabayashi T, Kaneko MK, Kato Y, Chandramohan V, Bigner DD, Natsume A. CAR T cells targeting podoplanin reduce orthotopic glioblastomas in mouse brains.(2015) Cancer Immunol Res. 査読有り、2016 Jan 28. pii: canimm.0060.2015.
doi: 10.1158/2326-6066

Maeda M, Hasegawa H, Sugiyama M, Hyodo T, Ito S, Chen D, Asano E, Masuda A, Hasegawa Y, Hamaguchi M, Senga T. Arginine methylation of ubiquitin-associated protein 2-like is required for the accurate distribution of chromosomes. (2016) FASEB J. 査読有り、Jan;30(1):312-23.
doi: 10.1096/fj.14-268987

Mansour MA, Hyodo T, Akter KA, Kokuryo T, Uehara K, Nagino M, Senga T. SATB1 and SATB2 play opposing roles in c-Myc expression and progression of colorectal cancer. (2016) Oncotarget. 査読有り、Jan 26;7(4):4993-5006.
doi: 10.18632/oncotarget.6651.

Obayashi T, Funasaka K, Ohno E, Miyahara R, Hirooka Y, Hamaguchi M, Goto H, Senga T. Treatment with near-infrared radiation promotes apoptosis in pancreatic cancer cells.

(2015) Oncol Lett. 査読有り、Sep; 10(3): 1836-1840.
doi: 10.3892/ol.2015.3399

Akter KA, Mansour MA, Hyodo T, Ito S, Hamaguchi M, Senga T. FAM98A is a novel substrate of PRMT1 required for tumor cell migration, invasion, and colony formation. (2015) Tumour Biol. 査読有り、Oct 27.
doi: 10.1007/s13277-015-4310-5.

Ayesha AK, Hyodo T, Asano E, Sato N, Mansour MA, Ito S, Hamaguchi M, Senga T. UBE2S is associated with malignant characteristics of breast cancer cells. (2015) Tumour Biol. 査読有り、2015 Aug 6.
doi: 10.1007/s13277-015-3863-7

Porazinski S, Wang H, Asaoka Y, Behrndt M, Miyamoto T, Morita H, Hata S, Sasaki T, Krens SF, Osada Y, Asaka S, Momoi A, Linton S, Miesfeld JB, Link BA, Senga T, Castillo-Morales A, Urrutia AO, Shimizu N, Nagase H, Matsuura S, Bagby S, Kondoh H, Nishina H, Heisenberg CP, Furutani-Seiki M. YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape.(2015)Nature. 査読有り、May 14;521(7551):217-21.
doi:10.1038/nature14215

Mansour MA, Hyodo T, Ito S, Kurita K, Kokuryo T, Uehara K, Nagino M, Takahashi M, Hamaguchi M, Senga T. SATB2 suppresses the progression of colorectal cancer cells via inactivation of MEK5/ERK5 signaling. (2015) FEBS J. 査読有り、Apr;282(8):1394-405.
doi: 10.1111/febs.13227

ホームページ等

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

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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

石田 祐基 (ISHIDA, YUKI)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：10718315

(2) 研究分担者

千賀 威 (SENGA, TAKESHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：804194