

# 麻酔薬（イソフルラン）のがん細胞への影響を否定

本学 廣田学長特命教授、<sup>すみ</sup>角助教らの研究チームが論文を発表

## 【本件のポイント】

- 手術で一般的に使用される吸入麻酔薬を分析
- 腎臓がん由来のがん細胞に対する影響度を否定
- 研究成果の論文が米国科学誌「PLOS ONE」に掲載※

※...2019年4月15日（月）午後4時（米国東部標準時）付

学校法人関西医科大学（大阪府枚方市 理事長・山下敏夫、学長・友田幸一）附属生命医学研究所（所長・木梨達雄）侵襲反応制御部門の廣田喜一学長特命教授、麻酔科学講座角千里助教らの研究チームは、全身麻酔で一般的に広く用いられている揮発性吸入麻酔薬「イソフルラン」が、通常の手術で使われる濃度と使用時間ではヒト腎臓がん由来の細胞株の、包括的ながん細胞としての性質には統計学的に有意な影響を与えないことを示しました。この研究成果は、手術麻酔に用いられる吸入麻酔ががん細胞の性質に直接的には影響を与えないことを、強く示唆しています。しかし一方で研究チームは、吸入麻酔薬ががん免疫や腫瘍環境へ与える影響があるかを、今後注意深く検討する必要があると考えています。

今回の研究は、廣田学長特命教授が研究代表者を務め、大学共同利用機関法人情報・システム研究機構ライフサイエンス統合データベースセンター坊農秀雅特任准教授らと共同で行いました。また、本研究は独立行政法人日本学術振興会 JSPS 科学研究費、関西医科大学 KMU コンソーシアム・学内助成、財団法人加多乃会（本学関係者による組織）、文部科学省私立大学研究ブランディング事業、国立研究開発法人科学技術振興機構バイオサイエンスデータベースセンターの支援を受けて行われました。

なお、研究結果をまとめた論文が英科学誌「PLOS ONE」に、4月15日（月）午後4時付（※日本時間翌16日午前4時）で掲載されました。 ※...各専門用語の詳細は、文末「用語解説」をご参照ください

■ 「PLOS ONE」掲載概要	
掲 載 誌	PLOS ONE DOI:10.1371/journal.pone.0215072
論文タイトル	Cancerous phenotypes associated with hypoxia-inducible factors are not influenced by the volatile anesthetic isoflurane in renal cell carcinoma
筆 者	Chisato Sumi <sup>1</sup> , Yoshiyuki Matsuo <sup>2</sup> , Munenori Kusunoki <sup>1</sup> , Tomohiro Shoji <sup>1</sup> , Takeo Uba <sup>1</sup> , Tepei Iwai <sup>2</sup> , Hidemasa Bono <sup>3</sup> , Kiichi Hirota <sup>2</sup> 1 Department of Anesthesiology, Kansai Medical University, Hirakata, Japan 2 Department of Human Stress Response Science, Institute of Biomedical Science, Kansai Medical University, Hirakata, Japan 3 Database Center for Life Science, Research Organization of Information and Systems, Mishima, Japan

## 【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（岡田）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

## <本研究の概要>

今回、ヒト腎癌由来の細胞（RCC4<sup>\*1</sup>）と von Hippel Lindau（VHL）遺伝子を導入した RCC4-VHL 細胞を用いてこの問題のアプローチを行いました。

まず、表現型への影響（増殖能、細胞運動能、代謝モード、細胞死、網羅的な遺伝子発現）を以下の方法に従って調べました。その結果として、イソフラン処理によって増殖能や細胞運動能、代謝モード、細胞死、網羅的な遺伝子発現を含む、がん細胞としての表現型に対して統計学的に有意な影響は発見されませんでした。一方、転写因子 hypoxia-inducible factor（HIF）は上記の全てのがん細胞の表現型に強い影響を及ぼすことを見いだしました。

### 1.増殖能

in vitro（人工的に構成された環境での検証）系では、生細胞中のミトコンドリアの脱水素酵素活性をベースにした MTT アッセイの変法 WST 法を用いて、増殖能と生存を検討します。

### 2.細胞運動能

細胞運動能検出は、シリコンストッパーを用いてウェル外側にのみ細胞播種を行った後、ストッパーを取り除いて各ウェルの中央にある検出領域を露出させ、その領域への細胞の遊走を顕微鏡で検出することにより行いました。

### 3.代謝モード

がん幹細胞の代謝状況を、米国 Agilent 社の細胞外フラックスアナライザーを用いて、酸素消費速度（oxygen consumption rates, OCR）と細胞外酸性化速度（extracellular acidification rate, ECAR）を測定することにより推定し、麻酔薬処理による影響を検討しました。がん細胞に特徴的なワールブルグ効果（悪性腫瘍の腫瘍細胞内で、酸素のない環境のみならず酸素がある環境でも、酸素がない状況で起こることの多い解糖系に偏ったブドウ糖代謝が観察される現象）に中心的な役割を果たす、hypoxia-inducible factor 1 の活性化状況を検討しました。

### 4.細胞死（アポトーシス）

フローサイトメーターを用いて蛍光標識（特定の条件で発光するように行う加工）した annexin-V<sup>\*3</sup> との結合で初期アポトーシスの検出を行い、同時に propidium iodide を用いて後期アポトーシスまたはネクロトーシスの検出を行います。

Caspase3 活性化<sup>\*4</sup> は酵素活性を化学的に測定するキットと Western blot を用いて行います。アポトーシスに伴う poly（ADP-ribose）polymerase（PARP）分子の切断の有無は Western blot を用いて行いました。

### 5.網羅的な遺伝子発現解析

転写産物の発現を定量化するだけでなく、配列から新規転写産物や新規スプライスジャンクション

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（岡田）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

**PRESS RELEASE**

を網羅的に探索したり、微量転写産物を検知することを目指して、次世代シーケンサーによる RNA-Seq 解析<sup>\*5</sup>を行いました。

## < 本研究の背景・意義 >

麻酔科学は、手術を受ける患者さんの急性期全身管理を目指して発達してきた学問領域です。また、麻酔薬の人体への作用は一過性であり、しかももとに戻すことが可能である、との暗黙の了解も存在しています。つまり、麻酔が患者さんの予後に深刻な影響を与えることはあり得ないという前提のもと、それゆえに、麻酔後の患者さんの長期予後についての深い考察が不十分、と言わざるを得ませんでした。このような状況においては「麻酔」が、がん患者さんの手術後の経過にどんな影響を与えるのか、という問題の解決は、麻酔科学上の大きな課題の一つとなってきました。

近年、どんな麻酔薬（吸入麻酔薬、静脈麻酔薬）か、どんな麻酔法（全身麻酔、区域麻酔）かの選択を含む、麻酔管理法の違いが、がん患者さんの予後へ与える影響について注目が集まるようになってきました。言い換えれば、手術中の麻酔ががんの再発や転移、患者さんのその後に影響を及ぼすかも知れない、という論点ががん治療におけるホットな関心事の一つになりつつある、ということです。これを受けて、かなりの数の疫学研究結果が報告されてきました。また、麻酔薬の影響を探るために樹立細胞株を用いた基礎研究の報告も発表されています。ただ、これらはいまだ限定的な検討にとどまっていること、さらに麻酔薬の一過性の作用と作用後にも持続する遺伝子構造や発現への作用という観点が欠けていることなど、致命的な問題を抱えているため、本質的な解決には至っていません。そこで今回、がん細胞の遺伝子発現を含む表現型（Hallmarks of cancer）を、広く対象とする研究を行うに至りました。

## < 研究チーム >

関西医科大学 麻酔科学講座・附属生命医学研究所 侵襲反応制御部門

助 教：角 千里

大学院生：楠 宗矩

大学院生：正司 智洋

大学院生：右馬 猛生

関西医科大学 附属生命医学研究所 侵襲反応制御部門

学長特命教授：廣田 喜一

講 師：松尾 禎之

研究員：岩井 鉄平

情報・システム研究機構ライフサイエンス統合データベースセンター

特任准教授：坊農 秀雅

### 【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（岡田）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

## 用語解説

### 1. 「RCC4 細胞」

ヒト腎癌由来細胞であり、von Hippel Lindau (VHL) 遺伝子が不活性化しています。この遺伝子の不活性化により、HIF-1 $\alpha$  蛋白質の分解が起こらなくなり、HIF-1 $\alpha$  タンパクが恒常的に発現していることが特徴です。

本研究では VHL 遺伝子が不活性化している RCC4 細胞に empty vector を挿入した RCC4-EV 細胞と、VHL 遺伝子を再導入した RCC4-VHL 細胞を使用しました。

### 2. 「annexin-V」

正常な生存細胞では、膜リン脂質（フォスファチジルセリン、以下「PS」）は細胞膜の細胞質側（内側）に位置しています。しかし、アポトーシスの進行に伴って、PS は細胞膜の内層から外層へ移され、細胞外部環境に露出される様になります。この PS と AnnexinV はカルシウムイオンの共存下で結合します。この声質を利用し、蛍光物質を結合させた AnnexinV を用いると、アポトーシスの過程が進行している細胞を検出することができます。

### 3. 「Caspase3 活性化」

カスパーゼ (Caspase) とは、細胞にアポトーシスを起こさせるシグナル伝達経路を構成する、一群のシステイン残基タンパク質分解酵素です。アポトーシスの誘導の比較的初期に関わるイニシエーター・カスパーゼと、アポトーシスの実行そのものに関わるエフェクター・カスパーゼの、2つのタイプに分類できます。Caspase3 はエフェクター・カスパーゼに属しており、これが活性化されると細胞内の他のタンパク質を分解して、アポトーシスを実際に起こさせる活性を持ちます。この活性を測定すると、細胞内でアポトーシスの過程が進行しているかどうかを見極めることができます。

### 4. 「RNA-Seq 法」

次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現の網羅的な解析法の一つ。転写産物の発現を定量化できるだけでなく、配列から新規転写産物や新規スプライスジャンクションを網羅的に探索することや、微量転写産物を検知できます。

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（岡田）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp