

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 12 月 29 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15568

研究課題名(和文) 麻酔は術後がん再発転移に影響するか? : 末梢血腫瘍DNAとバイオマーカーによる検討

研究課題名(英文) Impact of anesthesia on cancer recurrence and metastasis: analysis of circulating tumor DNA

研究代表者

川真田 樹人(KAWAMATA, Mikito)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：90315523

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)：麻酔・周術期管理が、術後のがん再発・転移に及ぼす大きな影響を検討するため、悪性黒色腫と肺悪性腫瘍患者を対象に、周術期における末梢血中に出現するBRAF遺伝子変異などのがん細胞DNA(circulating tumor DNA: ctDNA)の検出と、麻酔方法やサイトカインを計測した。BRAF遺伝子変異を持たない悪性黒色腫患者で、周術期に新たにBRAF遺伝子変異ctDNAが検出された例はなかった。対象を肺悪性腫瘍患者にも拡大しても、周術期に新たな変異するctDNAは検出できなかった。麻酔関連薬のctDNAへの影響を検討するには、末期がん患者における緩和ケアなどでの検討が必要と思われた。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the effect of anesthesia and perioperative management on the recurrence and metastasis of postoperative cancer, we measured the circulating cancer cell DNA (ctDNA) such as BRAF was measured in the peripheral blood in the peripheral blood during the perioperative period in patients with malignant melanoma and pulmonary carcinoma, in relation to anesthetic techniques and cytokines in the blood. There was no patients with malignant melanoma in whom a new BRAF gene mutation was detected during the perioperative period. No new mutant ctDNA could be detected at the perioperative period, even if patients with pulmonary carcinoma were enrolled in this study. In order to investigate the effect of anesthesia on ctDNA, it seems necessary to consider management of palliative care etc in patients with end-stage cancer.

研究分野：麻酔蘇生学

キーワード：末梢血腫瘍DNA 周術期 がん転移 麻酔法

### 1. 研究開始当初の背景

周術期は手術後の残存がん細胞の再発に最も影響を与える期間であると考えられる。手術後循環血液中にがん細胞を認めると有意に再発が多いことが報告されている。また、周術期はがん細胞の増殖を抑制する免疫機能の低下が起こることが知られている。手術ストレス、麻酔薬、他様々な周術期因子によって抗原提示の変化、免疫抑制物質の分泌、免疫抑制経路の活性化が起こり、残存・転移腫瘍細胞の成長を促進する可能性がある。こうしたメカニズムには、免疫抑制、がん遺伝子の転写促進、がん血管新生、カドヘリン接着機能低下によるがん細胞の原発巣からの離脱、転移臓器血管内皮セレクチンとの接着促進、が考えられる。

最近、高感度 digital PCR により、がん組織から血中に逸脱した circulating tumor DNA (ctDNA) を検査することで、原発巣のがん細胞数や、遺伝子変異・悪性度を評価することが可能となった。この方法を用いれば周術期の血中のがん細胞の量的変化を詳細に評価することができる。本研究の目的は ctDNA の周術期の経時的な変化を調べることで、周術期管理ががんの転移・再発に与える影響を明らかにすることである。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、周術期の ctDNA とサイトカイン・心房性利尿ペプチドなどのバイオマーカーを計測し、麻酔・周術期管理が、術後のがん再発・転移に及ぼす影響を検討することである。がん細胞の遺伝子変異はこれまでにさまざまな報告がある。皮膚がんのなかでも悪性度が高いといわれる悪性黒色腫においては BRAFV600E、BRAFV600K、NRAS、c-KIT などの遺伝子変異が知られている。近年 BRAF 変異をもつ悪性黒色腫に対する分子標的薬が日本でも保険適応となり、その治療効果が期待されている。これらの遺伝子変異をもつ悪性黒色腫の治療をうける患者の治療効果判定や転移の有無を早期発見するための指標として ctDNA の測定が有用であるとの報告が近年いくつか見られている。

今回我々は、周術期(特に腫瘍摘出前後)に ctDNA の増加を認め、そういった症例で術後がんの再発・転移を認めれば、周術期の ctDNA 測定は術後がんの再発・転移を予測するのに有用な検査方法になりえ、周術期管理によるがん転移・再発に与える影響の解明や、長期予後を改善する周術期管理法の開発につながると仮説した。そこで、悪性黒色腫に対して全身麻酔下に原発巣切除術を施行される患者を対象に、周術期の ctDNA の変動を調査し、周術期の腫瘍量の変化を定量的に評価することを試みた。

### 3. 研究の方法

本研究について信州大学遺伝子解析倫理委員会承認を得た(試験番号 546)。

2016年5月から信州大学医学部附属病院で全身麻酔下に悪性黒色腫の原発巣摘出術を受けた患者を対象とした。

全身麻酔はプロポフォール 1-2mg・kg<sup>-1</sup>、ロクロニウム 0.6-1.0mg・kg<sup>-1</sup> で導入した。麻酔維持は担当麻酔科医の判断によりセボフルラン 1~1.5%、またはデスフルラン 3-5%、またはプロポフォール標的濃度調節持続静注 2-3µg・ml<sup>-1</sup> 及びレミフェンタニル 0.1-0.3µg・kg<sup>-1</sup>・h<sup>-1</sup> で行った。フェンタニルを手術侵襲に応じて適宜投与した。足底に原発巣を認めた 2 例において 0.25%レボピバカイン 20ml を用いた単回の坐骨神経ブロックを併用した。全身麻酔導入後に橈骨動脈に動脈カテーテルを挿入した。麻酔導入時、腫瘍摘出時、手術終了時の計 3 回動脈カテーテルからの採血を行った。採血後は速やかに血漿分離を行った後、-80℃ で検体を保存し、後日、DNA の抽出及び ddPCR 法による circulating tumor DNA(ctDNA) 測定を行なった。

### 4. 研究成果

本研究への登録症例数は 23 症例である。患者背景として、麻酔方法は全身麻酔が 21 症例、全身麻酔と坐骨神経ブロックを併用した症例が 2 症例であった。全身麻酔の維持薬としては吸入麻酔薬であるセボフルランを使用した症例が 17 症例、同じく吸入麻酔薬のデスフルランを使用した症例が 4 症例、静脈麻酔薬のディプリバンを使用した症例が 2 症例であった。手術時に摘出した原発巣の標本の遺伝子変異を検索し、4 症例で BRAFV600E 変異を認めた。原発巣の遺伝子変異を認めた 4 例の保存血漿で血漿 DNA(cell free DNA : cfDNA) の抽出と digital droplet PCR(ddPCR) 法を用いた circulating tumor DNA(ctDNA) の検索を行った。cfDNA の麻酔導入時、腫瘍摘出時、手術終了時の変化

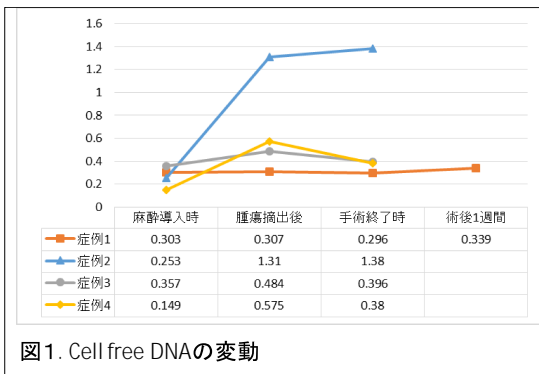


図1. Cell free DNAの変動

を図1に示す。4 症例のいずれのポイントにおいても ctDNA は検出されなかった。

今回の研究で周術期に ctDNA を検出した症例はなかった。ctDNA が検出されない理由としては、本研究で対象としているような悪性黒色腫の原発巣に対して摘出術の適応となる症例では多臓器転移をきたしていることは稀で、腫瘍量が少なく血中に存在する ctDNA が現在の ddPCR 法で検出できるレベル以下である可能性が考えられる。ctDNA の検出感度は ddPCR 法の出現により著明にあがっているが、それでも現在の技術では血中総 DNA における ctDNA のアレル頻度 0.01%までが限界とされる。ctDNA のアレル頻度は進行がんにおいても 0.1~数%程度

と言われ、今回の研究対象患者ではアレレル頻度がより低かった可能性が考えられる。

症例 において麻酔導入時と比較して腫瘍摘出後、手術終了時の cfDNA が高値を示しているが、ctDNA は検出されなかった。血液中には正常細胞由来の DNA と ctDNA が含まれている。正常細胞由来の DNA は主に白血球などに由来する。ctDNA のアレレル頻度は進行がんにおいても 0.1~数%程度であり、cfDNA の急激な増加に ctDNA が関与しているとは考えにくい。血液検体採取後は、時間が経過するに従い血中有核細胞由来の DNA 量が増加するとされる。本研究では採血から血漿分離までの時間を、最大でも2時間を超えないように、極力短くするように努めたが、それぞれの検体において採取から血漿分離までの時間を記録してはいたため、採血から血漿分離までの時間が影響を及ぼした可能性は否定できない。

本研究から、ctDNA が手術により検出されたり、手術により増加することは示されなかった。そのため、麻酔方法による ctDNA 量の変化も検討は不可能であった。しかし ctDNA ががん細胞の定量化の指標として、今後、その感度などが向上して、いずれ ctDNA を指標に周術期管理を検討できる時期が来るであろう。本研究は貴重な予備データを示したと思われる。

## 5. 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10件)

Ishida T, Tanaka S, Sekiguchi T, Sugiyama D, Kawamata M: Spinal nociceptive transmission by mechanical stimulation of bone marrow. *Molecular Pain*. 2016; 12: 1-15. (Doi:10.1177/1744806916628773).(査読有)

Fuseya S, Yamamoto K, Minemura H, Yamaori S, Kawamata T, Kawamata M: Systemic QX-314 Reduces Bone Cancer Pain through Selective Inhibition of Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily 1-expressing Primary Afferents in Mice. *Anesthesiology*. 2016; 125: 204-218. (査読有)

Kozuka Y, Kawamata M, Furue H, Ishida T, Tanaka S, Namiki A, Yamakage M: Changes in synaptic transmission of substantia gelatinosa neurons after spinal cord hemisection revealed by analysis using in vivo patch-clamp recording. *Molecular Pain*. 2016; 12: 1-14. (Doi:10.1177/1744806916665827.) (査読有)

Tanaka Y, Kawaguchi M, Noguchi Y, Yoshitani K, Kawamata M, Masui K, Nakayama T, Yamada Y: Systematic review of motor evoked potentials monitoring during thoracic and thoracoabdominal aortic aneurysm open repair surgery: a diagnostic meta-analysis. *J Anesth*.

2016; 30: 1037-1050. (査読有)

Yoshiyama Y, Sugiyama Y, Ide S, Fuseya S, Murakami T, Kawamata M: Efficacy of Temporary Transvenous Pacing to Prevent Atropine-resistant Bradycardia during Surgery for a Tumor in the Brainstem Region: A Case Report. *Shinshu Medical Journal*. 2016; 64: 153-157.(査読有)

Sugiyama Y, Shimizu S, Urasawa M, Tanaka S, Kawamata M: Severe re-expansion pulmonary edema induced by one-lung ventilation. *Respir Care* 2015; 60: e134-40. (査読有)

Ishida T, Sakamoto A, Tanaka H, Ide S, Ishida K, Tanaka S, Mori T, Kawamata M: Transverse abdominis plane block with 0.25% levobupivacaine: a prospective, randomized, double-blinded clinical study. *J Anesth* 2015; 29:557-61. (査読有)

Kawai Y, Ajima K, Kaidoh M, Sakaguchi M, Tanaka S, Kawamata M, Kimura H, Ohhashi T: In vivo support for the new concept of pulmonary blood flow-mediated CO<sub>2</sub> gas excretion in the lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015; 308: L1224-36. (査読有)

Ishida T, Kiuchi C, Sekiguchi T, Kawamata M: McGrath MAC video laryngoscope for insertion of a transesophageal echocardiography probe: a randomized controlled trial. *Eur J Anaesth* 2015;33: 263-8. (査読有)

Baral B, Ide S, Uzawa M, Kiyosawa K, Sasaki H, Kawamata M: Conscious sedation and awake fiberoptic intubation in a patient with difficult mask ventilation-a case report. *Open J Anesth* 2015; 5: 206-210. (査読有)

(学会発表)(計3件)

Mikito Kawamata, Esther Pogatzki-Zahn, Audun Stubhaug: Acute Post-Operative Pain: Mechanisms, Treatment, and Prevention of Chronification. Refresher Course. 第16回国際疼痛学会(IASP)(横浜)2016.9.26-30

川真田 樹人: 非麻薬性鎮痛薬. 日本ペインクリニック学会第49大会(大阪)2015.7.23-25

川真田 樹人: 明日からできる臨床研究の上手な進め方: 今後の日本での臨床研究の方向性. 日本臨床麻酔学会第3回大会(横浜)2015.10.21-23

(図書)(計7件)

川真田 樹人: 痛みの生理学. 麻酔科学レビュー 最新主要文献集 2016. 澄川 耕二, 岩崎 寛. 東京, 総合医学社, 2016, pp.211-214.

田中 聡, 布施谷 仁志, 川真田 樹人: 脳・脊髄腫瘍の麻酔管理. 神経麻酔. 内野 博之, 川口 昌彦. 東京, 克誠堂出版, 2016, pp.208-212.

布施谷 仁志, 石田 高志, 川真田 樹人: 覚醒下手術の麻酔管理. 神経麻酔. 内野 博之, 川口 昌彦. 東京, 克誠堂出版, 2016, pp.254-259.

石田 高志, 川真田 樹人: 脊髄くも膜下麻酔・硬膜外麻酔後の神経障害. 麻酔科医のための周術期危機管理と合併症への対応. 横山正尚. 東京, 中山書店, 2016, pp.238-245.

峰村 仁志, 川真田 樹人: 局所麻酔. エビデンスで読み解く小児麻酔. 川名 信, 蔵谷 紀文. 東京, 克誠堂出版, 2016, pp.195-199.

川真田樹人: 脊髄くも膜下麻酔・硬膜外麻酔. 麻酔科学文献レビュー2015-2016 総括・文献紹介. 森崎浩. 東京, 秀潤社, 2015, pp. 42-62.

川真田樹人, 峰村 仁志: 痛みの伝導機構と区域麻酔. 麻酔科医のための区域麻酔スタンダード. 横山正尚. 東京, 中山書店, 2015, pp.15-21.

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者 川真田 樹人

(KAWAMATA, Mikito)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号: 90315523

(2)研究分担者 石田 高志

(ISHIDA, Takashi)

信州大学・医学部附属病院・助教(特定雇用)

研究者番号: 60531952