

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10527

研究課題名(和文) 癌細胞のアポトーシス誘導性から評価した癌患者に最適な麻酔薬の探索

研究課題名(英文) Search of optimal anesthetic in cancer patients was evaluated from apoptosis induced cancer cells

研究代表者

鬼塚 信 (Onizuka, Shin)

九州保健福祉大学・保健科学部・教授

研究者番号：20264393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：プロポフォールの抗癌作用機序を検証した。Hela細胞を検体とした。アポトーシス、ミトコンドリア電位、ミトコンドリアpHを検証した。結果：プロポフォールは、癌細胞の増殖を濃度依存性に抑制した。プロポフォールは、ミトコンドリア電位を脱分極し、ミトコンドリアpH勾配を消失させた。そして、ミトコンドリア経路のアポトーシスを誘導した。これらの結果は、プロトノフォアCCCPと一致した。

結語：プロポフォールは、プロトノフォアとして作用し、ミトコンドリアの水素イオン濃度勾配を消失することで、ミトコンドリア電位を消失、癌細胞にミトコンドリア経路のアポトーシスを誘導することが証明された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the mechanisms of anti-cancer effects induced by propofol. Methods:Hela cells were used for this experiment. Apoptosis was observed by DNA fragmentation, caspase activity, and western blot. Mitochondrial membrane potential, cytosolic pH, and mitochondrial pH were observed by fluorescent probes. Results:Propofol reduced the viability of Hela cells by dose and time dependently manner. Propofol induced apoptosis through the mitochondrial pathway. Propofol induced mitochondrial depolarization. Propofol induced both mitochondrial and intracellular alkalization. Propofol lost the pH gradient between the intra- and extra- membrane as same as protonophore CCCP.

Conclusion:Propofol acts as protonophore, and this chemical property induce apoptosis in cancer cell lines through the mitochondrial pathway by disappearance of the pH gradient.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：麻酔薬 抗癌作用 プロポフォール ミトコンドリア アポトーシス pH勾配 プロトノフォア

1. 研究開始当初の背景

多くの癌患者が全身麻酔下に手術を受けている昨今、どの麻酔薬が癌患者において有益であるかは、解明されていない。プロポフォールは、今日、麻酔導入、TIVA等の静脈麻酔薬、鎮静剤など多岐にわたり使用されている。最近、プロポフォールには抗癌作用を有するとの報告が散見されるようになり、プロポフォールの持つ抗癌作用が注目されつつある。例えば、Guoらは、プロポフォールは、カルシウム結合蛋白の一種 S100A4 を低下することで量依存性に癌細胞にアポトーシスを誘導し、癌の増殖、転移を防ぐと報告している(1)。Songらも、プロポフォールは、ヒト乳癌細胞 SK-BR-3 において、ERK 経路によるアポトーシスを誘導することを報告した(2)。Ecimovicらは、ヒト乳癌細胞 MDA-MB-231 において、アポトーシス関連蛋白の一種 NET1 を抑制しアポトーシスを誘導することを報告した(3)。Desmondらは、プロポフォールによる全身麻酔が他の吸入麻酔薬や麻薬による全身麻酔よりも免疫抑制作用が少なく、癌患者にメリットがあるとしている(4)。Wuらはプロポフォールは、癌細胞にミトコンドリアマトリックスメタロプロテアーゼ、MMP-2 MMP-9 の mRNA およびそれらのタンパク発現を抑制することでアポトーシスを誘導すると報告している(5)。以上のようにプロポフォールは癌細胞にアポトーシスを誘導するといった報告が散見されるが、その機序は明確ではない。ミトコンドリアは、呼吸、エネルギーである ATP 産生、アポトーシス誘導等多くの機能を有し、これらの機能は密接に関係している。例えば、呼吸と ATP 産生は、プロトンすなわち水素イオンにより行われる。電子伝達系とも称される呼吸鎖は、プロトン濃

度勾配を作り、そのプロトンが F₀-ATP アーゼを水力発電所のタービンのごとく回転させることで ATP を作り出す。ここで、注目すべきは、プロトン濃度とは、pH のことであるということである。もし、プロポフォールにより、ミトコンドリアにおけるプロトン濃度勾配を破綻させたら、ミトコンドリア電位は消失し、これがアポトーシスのトリガーとなりうるのではないか。しかし、プロポフォールのミトコンドリア pH、ミトコンドリア電位等への影響は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、プロポフォールのミトコンドリアへの影響を pH およびミトコンドリア電位を中心に検証することである。

3. 研究の方法

Hela 細胞(ヒト子宮頸癌細胞)を検体とした。

形態学

形態学的変化は、倒立顕微鏡観察下、(IX-70, Olympus, Tokyo, Japan) CCD カメラ(DS-2500, Sato, Kawasaki, Japan)にて画像を取得した。

細胞生存率

細胞生存率は、カルセイン AM アッセイにて検証した。カルセイン AM により、生細胞は、強い緑食蛍光を示すが、死細胞は蛍光しない。細胞生存率は、72 時間経時的に観察した。

アポトーシスの検出

DNA フラグメンテーション

アポトーシスの検証は、DNA フラグメンテーションにより評価した。プロポフォール暴露 48 時間後、DNAzol (Molecular

Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA) を用いて、DNA を抽出し、2%アガロースゲル電気泳動法により、検体 DNA を電気泳動した後、0.5 µg/ml エチジウムブロマイドで染色し、UV トランスイルミネーター上で 312nm にて画像を取得し、画像解析ソフトウェア(CS Analyzer ver. 3.0, ATTO, Tokyo, Japan)を用いて解析した。

カスパーゼ活性

カスパーゼ活性は、合成基質法によるカスパーゼ活性アッセイキット (APOPCYTO™ Caspase Colorimetric Assay Kit, MBL, Tokyo, Japan)を用いて検証した。

ウェスタンブロット法

検体をサンプルバッファー (0.125M Tris-HCl (pH 6.8), 0.4% SDS, 20% Glycerol, 1% 2-mercaptoethanol, and 1% bromophenol blue)で溶解した後、95 10 分間、煮沸した。蛋白含有量を紫外線蛍光分光光度計(UV-1700, Shimadzu, Tokyo, Japan)で調整後、10% SDS-PAGE ゲルで電気泳動し、PVDF 膜に転写した。チトクローム C、カスパーゼ9、カスパーゼ3 を一次抗体として、抗原抗体反応を行い、HRP によるケミルミネッセンス法による画像を取得し、画像解析ソフトウェア (CS Analyzer ver. 3.0, ATTO, Tokyo, Japan) を用いて解析した。

ミトコンドリア電位

ミトコンドリア電位は、レシオメトリック蛍光プローブ(JC-1) (Molecular Probes, OR, USA)を用いて測定した。蛍光顕微鏡 (Ti-u, Nikon Tokyo, Japan), EM-CCD カメラ (Imagem, Hamamatsu Photonics, Tokyo, Japan) および 蛍光イメージング装置

(AQA-COSMOS, Hamamatsu Photonics, Tokyo, Japan)で測定した。励起波長 480-nm ダイクロックミラー : 505-nm 蛍光波長 535-nm および 590-nm 。2つの蛍光比を計算し検証した。

ミトコンドリア pH

ミトコンドリア pH は、レシオメトリック蛍光プローブ carboxy SNARF-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)を用いて測定した。蛍光顕微鏡 (Ti-u, Nikon Tokyo, Japan), EM-CCD カメラ (Imagem, Hamamatsu Photonics, Tokyo, Japan) および 蛍光イメージングシステム (AQA-COSMOS, Hamamatsu Photonics, Tokyo, Japan)で測定した。励起波長 480-nm ダイクロックミラー : 505-nm 蛍光波長 590-nm および 640-nm 。2つの蛍光比を計算し検証した。

細胞膜間 pH

細胞膜間 pH は、蛍光プローブ 5-Hexadecanoylamino fluorescein (HAF) (H110, Molecular Probes, OR, USA)を用いて測定した。蛍光顕微鏡 (Ti-u, Nikon Tokyo, Japan), EM-CCD カメラ (Imagem, Hamamatsu Photonics, Tokyo, Japan) および 蛍光イメージングシステム (AQA-COSMOS, Hamamatsu Photonics, Tokyo, Japan)で測定した。励起波長 436-nm および 470-nm ダイクロックミラー : 505-nm 蛍光波長 535-nm。2つの励起波長に対する蛍光比を計算し検証した。

統計

結果は平均 ± 標準偏差で示した。ANOVA 施行後 Scheffe' test で有意差検定した。P < 0.05 を有意差有りとした。

4. 研究成果

研究成果形態学

プロポフォールは、量依存性に、Hela 細胞の生存率を低下した。

プロポフォール、1%イントラリピッド単独および両方を暴露72時間後の低倍率(40x)における顕微鏡写真においては、Hela 細胞のコロニーの大きさと数に注目した。プロポフォール(10 μ M)および1%イントラリピッド添加プロポフォール(10 μ M)暴露群においては、ともにコロニーの大きさ、コロニー数共に量依存性に減少したが、1%イントラリピッドのみ暴露した群では、無添加群(コントロール群)との差は観られなかった。

プロポフォール、1%イントラリピッド単独および両方を暴露72時間においては、個々のHela 細胞の形態学的変化に注目した。プロポフォール(10 μ M)および1%イントラリピッド添加プロポフォール(10 μ M)暴露群においては、ともに細胞膜周辺に多くの塩晶あるいは、細胞膜外に塩晶(ブラ)を観察したが、1%イントラリピッドのみ暴露した群および無添加群(コントロール群)はともに観察されなかった。

細胞生存率

図2に各濃度におけるプロポフォール暴露後72時間後のカルセイン-AMによる蛍光イメージングを示す。プロポフォールの量依存性に、Hela 細胞の生存率は減少した。しかし、1%イントラリピッドのみ暴露した場合は、生存率に影響しなかった。

DNA フラグメンテーション

プロポフォールはHela細胞にDNAフラグメンテーションを誘導した。

カスパーゼ活性

プロポフォールは、ミトコンドリア経路アポトーシスのトリガーエンザイムであるカスパーゼ

9、およびエフェクターエンザイムであるカスパーゼ3それぞれを活性化した。

ウェスタンブロット

プロポフォールは、チトクローム C、活性化型カスパーゼ9、活性化型カスパーゼ3それぞれを増加した。

ミトコンドリア膜電位

JC-1による蛍光イメージングにおいて、プロポフォールはミトコンドリア膜電位を量依存性に脱分極した。プロトノフォアで脱共役剤であるCarbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP) (200 μ M)も著明にミトコンドリア膜電位を量依存性に脱分極した。

ミトコンドリア pH

プロポフォールおよびCCCPはミトコンドリアpH勾配を消失させた。通常、電子伝達系によりミトコンドリアにおいては、膜間腔よりも内膜の方が、pHはよりアルカリ性を示す。コントロールにおけるpHは、膜間腔が 7.10 ± 0.33 、マトリックスが 8.41 ± 0.35 であった。プロポフォール(10 μ M)投与で、マトリックスのpHは酸性に傾き、一方、膜間腔のpHは、アルカリ化した。プロポフォール投与の結果、膜間腔が 7.92 ± 0.29 、マトリックスが 8.10 ± 0.42 となり、膜間腔とマトリックス間のpH勾配は減少した。

細胞膜間 pH

プロポフォールおよびCCCPは細胞膜間pH勾配を消失させた。もし、プロポフォールがCCCP同様、プロトノフォアとして作用するならば、ミトコンドリアpHの濃度勾配を消失させるとともに、細胞膜間pH勾配を消失させることが考えられる。これを証明すべく、pH感受性蛍光プローブ:HAFを用いた。

HAFは脂質二重膜の両疎水基にアンカーするので、細胞膜を挟んで両側のpHを測定可能である。今回は、細胞の断面のpHを測定すべく、total

internal reflection fluorescence (TIRF)を用いた。結果、コントロールにおいては、細胞内外のpH勾配が細胞外が 7.59 ± 0.09 、細胞内が、 6.75 ± 0.17 であったが、プロポフォール(10 μM)暴露後は、細胞外が 7.27 ± 0.15 、細胞内が、 7.18 ± 0.20 となり、細胞膜内外のpH勾配を消失させた。この結果は、プロトノフォア CCCP と類似した。

考察

本研究は、プロポフォールが CCCP 同様プロトノフォアとして作用することを証明した。このプロポフォールによるプロトノフォア効果は、ミトコンドリアにおける pH 勾配を消失し、ミトコンドリア膜電位の消失をもたらした。何故ならば、ミトコンドリア膜電位は pH 勾配によって形成されている為である。さらに、このプロポフォールによるミトコンドリア電位の消失は、チトクローム C の放出、カスパーゼ9、カスパーゼ3といったミトコンドリア経路のアポトーシスカスケードを活性化し、Hela 細胞にアポトーシスを誘導した。プロトノフォアとは、イオノフォアの一つで、水素イオンのトランスポーターである。水素イオンは陽イオンであり、通常は脂質二重膜を通過し得ないが、プロトノフォアは、濃度勾配に従い水素イオンを通過させることで、脂質二重膜間の水素イオン勾配を消失させる性質を有する。

プロトノフォアは、一般に親水基と芳香族の化合物であり、これにより脂質二重膜を通過し、水素イオンを分配しうる。プロトノフォアはミトコンドリアにおける電子伝達系の脱共役剤として作用し、ミトコンドリア膜間腔およびマトリックス間のプロトン勾配を消失させる。本研究では、2つの蛍光プローブを用いて、ミトコンドリアおよび細胞膜間のpH勾配を観察した。プロポフォールは、プロトノフォア同様、ミトコンドリアおよび細胞膜間のpH勾配を消失した。

これらの結果は、プロポフォールがプロトノフォアとしての性質を有することを示している。

今後は、本研究結果を踏まえ、プロポフォール、CCCP を含めプロトノフォアなどの脱共役剤、或はロテノン等の電子伝達系阻害剤など、ミトコンドリア標的薬のミトコンドリアを介した抗癌作用を研究、検証したい。

<引用文献>

Guo XG, Wang S, Xu YB, Zhuang J. Propofol suppresses invasion, angiogenesis and survival of EC-1 cells in vitro by regulation of S100A4 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015; 19: 4858-65

Song J, Shen Y, Zhang J, Lian Q. Mini profile of potential anticancer properties of propofol. *PLoS One.* 2014; 9: e114440 doi: 10.1371

Ecimovic P, Murray D, Doran P, Buggy DJ. Propofol and bupivacaine in breast cancer cell function in vitro - role of the NET1 gene. *Anticancer Res.* 2014; 34: 1321-31

Desmond F, McCormack J, Mulligan N, Stokes M, Buggy DJ. Effect of anaesthetic technique on immune cell infiltration in breast cancer: a follow-up pilot analysis of a prospective, randomised, investigator-masked study. *Anticancer Res.* 2015; 35: 1311-9

Wu KC, Yang ST, Hsia TC, Yang JS, Chiou SM, Lu CC, Wu RS, Chung JG. Suppression of cell invasion and migration by propofol are involved in down-regulating matrix metalloproteinase-2 and p38 MAPK signaling in A549 human lung adenocarcinoma epithelial cells. *Anticancer Res.* 2012; 32: 4833-42.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

第 65 回日本麻酔科学会 2018 年 横浜市
局所麻酔薬の DNA 脱メチル化機序

鬼塚 信、白石 成二

第 64 回日本麻酔科学会 2017 年 神戸市
プロボフォールの抗癌作用機序

鬼塚 信、白石 成二

第 62 回日本麻酔科学会 2015 年 神戸市
麻酔薬および抗癌剤のミトコンドリア遺
伝子(mitochondrial F0-ATPase)発現への
影響

鬼塚 信、白石 成二

6. 研究組織

(1)研究代表者

鬼塚 信 (ONIZUKA, Shin)
九州保健福祉大学・保健科学部・教授
研究者番号：20264393

(2)連携研究者

白石 成二 (SHIRAIISHI, Seiji)
国立国際医療研究センター・研究所・室長
研究者番号：90216177