

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15684

研究課題名(和文) 局所麻酔薬による単球由来マイクロパーティクル発生における分子薬理学的機構の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of action of local anesthetics in the shedding of microparticles from human monocytic cells

研究代表者

西岡 慧 (Nishioka, Akira)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・麻酔科レジデント

研究者番号：60755544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト単球系細胞(THP-1)を局所麻酔薬ブピバカインに曝露するとNADPHオキシダーゼ(NOX)活性が増加し、細胞内スーパーオキシド産生量が増加した。アポトーシス細胞と凝固活性小胞(PV)はTHP-1のブピバカインへの曝露により増加したが、superoxide dismutase (SOD)はこれらの増加を強力に抑制した。SODは分子量が大きいことから細胞外で作用すると考えられるため、SODはNOXが細胞外に放出するスーパーオキシドを消去し、アポトーシスとPV発生を抑制すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Exposure of human monocytic cells THP-1 to a local anesthetic bupivacaine increased the activity of NADPH oxidase and the production of superoxide in these cells. Bupivacaine provoked the apoptosis of THP-1 cells as well as the shedding of procoagulant vesicles from these cells. Superoxide dismutase (SOD) potently blocked these changes in THP-1 cells exposed to bupivacaine. Because of the molecular weight of SOD, it is unlikely that SOD works intracellularly. Taken these together, it is suggested that superoxide released extracellularly from NADPH oxidase provokes the shedding of procoagulant vesicles from THP-1 cells.

研究分野：麻酔科学

キーワード：単球 マイクロパーティクル 局所麻酔薬 procoagulant vesicle bupivacaine superoxide dismutase NADPH oxidase superoxide

## 1. 研究開始当初の背景

硬膜外麻酔や脊髄クモ膜下麻酔など脊髄幹神経ブロック(neuraxial block)を使用した麻酔法は、全身麻酔と比較してより良い鎮痛を提供できる上、静脈血栓塞栓症の発生を低下させるなど、生命予後すら改善する可能性が指摘されている<sup>1)</sup>。しかしながら静脈血栓塞栓症の予防に対して、より質の高い学術的根拠のあるXa阻害薬が使用されることが多く、日常の臨床においてneuraxial blockの選択を躊躇するような事態に遭遇することはしばしば経験される。

相対的に、末梢神経ブロックの臨床的有益性は増大しているように考えられる。しかしながら、局所麻酔の末梢組織への有害反応は、脊髄くも膜下や硬膜外腔に投与した場合の神経毒性とはまったく異なっている<sup>2)</sup>。一例として、ブピバカインは脊髄クモ膜下腔に投与された場合、他の局所麻酔薬より神経毒性が少ないことが知られている一方、末梢組織へ投与された場合、横紋筋壊死や間質組織の癒着など有害反応を起こしやすいことが知られている<sup>3)</sup>。

## 2. 研究の目的

局所麻酔薬を末梢組織に投与した場合に発生する組織障害や細胞毒性について、先行研究では主に横紋筋組織の障害についての検討が進んでいる<sup>3)</sup>。一方、その周囲の癒着が発生する分子機構の解析はほとんどなされていない。本研究では、単球がさまざまな細胞障害刺激に応じて発生するマイクロパーティクルやその他の小胞に注目し、それらに凝固を亢進させる作用があることを実験的に証明したうえで、局所麻酔薬が凝固活性小胞の発生を増加することや、そのことに関連する分子薬理学的機構を解明する。

## 3. 研究の方法

### THP-1

ヒト単球系細胞セルライン THP-1 は DS Pharma Biomedical (Suita, Osaka) から入手した。培養液(RPMI-1640 containing 2-mM L-alanyl-glutamine and 25-mM HEPES) に抗菌薬(100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) と 10%ウシ胎仔血清を混合し 25-cm<sup>2</sup> 培養用フラスコ内で 1 - 9 × 10<sup>5</sup> cells/ml の細胞密度で浮遊培養を継続した。

### 標準実験操作

THP-1 を三回遠心洗浄(200 g, 2分)した後、細胞密度が 2 × 10<sup>6</sup> cells/ml となるように培養液に再浮遊させた。核染色が必要な場合は Hoechst 33342 (終濃度 5 µg/ml) を加えた。

細胞浮遊液(50 µl) を 96 穴培養プレートの

各ウェルに加え 30 分間加温した後(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)、各種試薬を混合した培養液(50 µl) を追加し、決められた時間まで加温を継続した。

塩類緩衝液(BSS) 100 µl に以下の試薬を必要に応じて混合し[hydroethidine (1 µM), bupivacaine (1 mg/ml), ヒト新鮮凍結血漿(FFP, 0.5 vol%), FITC 標識 fibrinogen (0.5 vol%), FITC 標識 Annexin V (1 vol%), heparin (10 unit/ml)], 各ウェルに加え、一定時間加温した後、フローサイトメトリー測定用のポリスチレンチューブに移した。

### フローサイトメトリー

各種試薬とともに加温した細胞浮遊液(5 × 10<sup>5</sup> cells/ml, 50 µl) に、蛍光ならびに粒子径を標準化するためのビーズ(CountBright absolute counting beads) を一定量加えたのち、培養液を用いて終量が 500 µl となるように希釈した。各ウェル由来の 1 × 10<sup>4</sup> 個の粒子を FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ) で測定し、BD FACS DIVA software で一次解析を行った。二次解析を行う場合は Kaluza flow cytometry analysis software (ver. 1.2, Beckman Coulter, Brea, CA) を使用した。

この研究では試料中の THP-1 ならびに CountBright の粒子密度は既知であるため、各々の粒子密度はこれらとの比較により示された。フローサイトメトリー測定法の詳細についてはすでに報告した<sup>4)</sup>。

### 凝固活性粒子(procoagulant vesicles PV)の測定

FITC 標識フィブリノーゲンを FFP と混合し細胞浮遊液に加えると、フィブリノーゲンは正常 THP-1 細胞とはほとんど結合せず、早期アポトーシスの指標である Annexin V が結合した粒子と FSC/SSC プロット上で同じ画分に示される粒子と結合した。これらの粒子はアポトーシス細胞の他、FSC 上で細胞よりさらに小さな粒子であり、ヘパリンの混合によりこれらの粒子へのフィブリノーゲン結合は抑制された。これらのことから PV は FSC 上で細胞より小さな粒子であり、FITC 標識フィブリノーゲンが結合した粒子とヘパリンをさらに加えた際に計測される粒子との差分と定義した<sup>4)</sup>。

### Fluorescence detection from cells in 96-well multiplate

96 穴培養用プレート内の細胞浮遊液に propidium iodide あるいは hydroethidine (それぞれ終濃度 1 µg/ml あるいは 1 µM) を加え、さらにブピバカインを加えて 37 °C で加

温した。薬物負荷の一定時間後，蛍光プレートリーダー (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を使用して各ウェルの蛍光を測定した。

#### NADPH oxidase 活性

NADPH oxidase 活性は細胞膜画分の NADPH 依存性のスーパーオキシド産生と定義し，分光光度計を使用して cytochrome c 還元法で測定した。

細胞浮遊液を 2-ml microtube に加え 37 °C で各種刺激を加えたのち，液体窒素に投入した。室温で解凍後，3000 g，5 分で遠心し，得られたペレットを 200  $\mu$ l のタンパク分解酵素阻害薬カクテル (Roche EDTA-free Complete dissolved in 150-mM sucrose and buffer-A (50-mM sodium phosphate and 1-mM EGTA (pH 7.0))) に再浮遊させた。細胞に超音波破碎を加え (15 秒 2 回，10 - 50 W)，800 g，5 分で遠心し，上清に残った細胞膜画分のタンパク量を Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) を利用して測定した。NADPH oxidase 活性は分光光度計のホルダーに設置したキュベットの 550 nm における吸光度を 5 分間計測することにより求めた。細胞膜画分を含む反応溶液 (400  $\mu$ l) の最終組成を以下に示す：20- $\mu$ g protein of cell membrane fraction, 100- $\mu$ M oxidized form of cytochrome c, 2-mM NaN<sub>3</sub>, 10- $\mu$ M FAD, 10- $\mu$ M GTP S, and 0.1-mM NADPH dissolved in buffer-A.

#### 逆転写リアルタイム PCR

THP-1 細胞から Total RNA を抽出した後，2  $\mu$ l から cDNA を作成した。この産生物 1  $\mu$ l を鋳型として利用しリアルタイム PCR を施行した。PCR 反応試薬の混合比率などの詳細についてはすでに報告した<sup>4)</sup>。レポーター蛍光物質の検出閾値サイクル (Ct) をハウスキーピング遺伝子である GAPDH の Ct と比較することで相対的 mRNA 発現量を評価した。

#### 統計解析

フローサイトメトリーで検出された蛍光強度は平均値  $\pm$  標準偏差で示している。多重比較は分散分析を行った後，Dunnett の個別比較を施行した。細胞や粒子などの発生比率変化はカイ二乗検定で評価し，介入によるリスク比は Der Simonian-Laird 法で評価した。危険率 5% を有意差ありとした。

#### 4. 研究成果

プピバカインが惹起する THP-1 細胞浮遊液のフローサイトメトリー上の組成変化に対する各種試薬の影響

細胞内におけるスーパーオキシド発生量の指標となる hydroethidine の蛍光強度は正常ならびにアポトーシス状態の THP-1 細胞の双方において時間依存性に増加した。プピバカイン (1 mg/ml) はアポトーシスならびに正常 THP-1 細胞内の hydroethidine 蛍光強度の増加を加速した<sup>4)</sup>。アポトーシス細胞の発生比率はプピバカインに 20 分あるいは 30 分曝露した細胞浮遊液で曝露なしと比較し有意に多かった。独立して施行された 6 回の試験から 30 分間のプピバカイン曝露はアポトーシスの発生を 1.71 倍 (1.44 - 2.03 [95% CI], n = 6, P < 0.0001) 増加した。

Superoxide dismutase (SOD, 1500 unit/ml) はプピバカイン曝露によるアポトーシス細胞発生率を 67% (47% - 94% [95% CI], n = 5, P = 0.0216) に抑制した。SOD はアポトーシス細胞の hydroethidine 蛍光強度を減少させたが正常細胞においてこの SOD の効果は認められなかった<sup>4)</sup>。LY294002 (100  $\mu$ M) はプピバカイン曝露によるアポトーシス細胞発生率を 61% (44% - 86% [95% CI], n = 4, P = 0.0041) に抑制した<sup>4)</sup>。SOD とは異なり，LY294002 は hydroethidine 蛍光強度を正常細胞とアポトーシス細胞の双方で減少させた。

プピバカインに 30 分間曝露された細胞浮遊液における PV 発生量は曝露されなかった場合と比較し 1.38 倍 (1.12 - 1.72 [95% CI], n = 6, P = 0.0032) に増加した。SOD と LY294002 はプピバカインによる PV 発生増加をそれぞれ 61% (0.42 - 0.90 [95% CI], n = 5, P = 0.0126) あるいは 54% (0.33 - 0.89 [95% CI], n = 4, P = 0.0163) に抑制した。

細胞浮遊液中に発生している様々な粒子表面の組織因子 (tissue factor TF) 発現について検討したところ，アポトーシス細胞や小胞は正常細胞と比較して TF を有意に多く発現していた。TF の遺伝子発現レベルについても検討したところ，THP-1 細胞は TF の mRNA を構成的に発現していることが確認された。この TF 遺伝子発現は 30 分間のプピバカイン曝露による影響を受けなかった。

#### 細胞膜画分の NADPH oxidase 活性

NADPH oxidase 活性はプピバカインへの 30 分間あるいは 1 時間の曝露により増加した。一方，2 時間の曝露を行うと曝露前と同程度に低下した<sup>4)</sup>。各ウェル内のネクロトーシス細胞数の指標となる propidium iodide 蛍光はプピバカイン曝露後 1 時間では増加しなかったが，2 時間で有意に増加した<sup>4)</sup>。

SOD はプピバカイン曝露 6 時間後のスーパーオキシド産生量を強く抑制したが，LY294002 は部分的に抑制した<sup>4)</sup>。

#### 結論

ヒト単球系細胞 THP-1 を局所麻酔薬ブピバカインに曝露すると NADPH オキシダーゼ活性が増加し、細胞内スーパーオキシド産生量が増加した。アポトーシス細胞と PV は THP-1 のブピバカインへの曝露により増加したが、SOD はこれらの増加を強力に抑制した。SOD は分子量が大きいことから、細胞外で作用すると考えられるため、SOD は NADPH オキシダーゼが細胞外に放出するスーパーオキシドを消去し、アポトーシスと PV 発生を抑制すると考えられた。

NADPH オキシダーゼを構成するユニットの細胞膜への動員を抑制する LY294002 がブピバカインによる NADPH オキシダーゼ活性増加を抑制し、アポトーシスならびに PV 発生を抑制したことも NADPH オキシダーゼ由来のスーパーオキシドが PV 発生に関与することを示唆した。

本研究により、細胞外に放出される NADPH オキシダーゼ由来のスーパーオキシドがヒト単球系細胞のアポトーシスや PV 発生に関与することが示唆され、細胞外 SOD がこれらの発生を抑制することが示唆された。本研究で示されたブピバカインが惹起し、ヒト単球系細胞が関与する凝固活性亢進が、局所麻酔薬投与による組織癒着にどの程度関与するかどうかについてはさらなる研究が必要である。

#### < 引用文献 >

1. Azma T, Tuluc F, Ito T, Aoyama-Mani C, Kawahito S, Kinoshita H. Mechanisms of action of anesthetics for the modulation of perioperative thrombosis: evidence for immune mechanisms from basic and clinical studies. *Curr Pharm Des* 2014;20:5779 – 93. PMID: 24502580.
2. 東俊晴, 菊地博達. 局所麻酔薬の細胞毒性に関して(質疑応答). *臨床麻酔* 2009;33:1797 – 9.
3. Kohane DS, Lipp M, Kinney RC, Anthony DC, Louis DN, Lotan N, Langer R. Biocompatibility of lipid-protein-sugar particles containing bupivacaine in the epineurium. *J Biomed Mater Res* 2002; 59: 450 – 9. PMID:11774302.
4. Azma T, Ogawa S, Nishioka A, Kinoshita H, Kawahito S, Nagasaka H, Matsumoto N. Involvement of superoxide generated by NADPH oxidase in the shedding of procoagulant vesicles from human monocytic cells exposed to bupivacaine. *J Thromb Thrombolysis*. 2017; 44: 341 – 354. PMID:28819812

#### 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4件)

Azma T, Ogawa S, Nishioka A, Kinoshita H, Kawahito S, Nagasaka H, Matsumoto N. Involvement of superoxide generated by NADPH oxidase in the shedding of procoagulant vesicles from human monocytic cells exposed to bupivacaine. *J Thromb Thrombolysis*. 2017; 44: 341 – 354.

Kinoshita H, Watanabe K, Azma T, Feng GG, Akahori T, Hayashi H, Sato M, Fujiwara Y, Wakatsuki A. Human serum albumin and oxidative stress in preeclamptic women and the mechanism of albumin for stress reduction. *Heliyon*. 2017;3:e00369.

Azma T, Nishioka A. Are techniques for general anesthesia less invasive than procedures for cataract surgery? *Eye (Lond)*. 2017;31:1744 – 745.

東 俊晴. 「特集：疼痛治療におけるパルス高周波法 up to date：臨床応用からメカニズム研究まで」パルス高周波法の基礎メカニズム：抗サイトカイン作用から遺伝子エビジェネティクスまで。ペインクリニック 2018;39;707 – 720.

[学会発表](計12件)

東 俊晴, 小川 さおり, 西岡 慧, 竹内菊子, 長坂 浩, 松本 延幸. セリンプロテアーゼ阻害薬と比較したニューロキニン1受容体阻害薬によるトリプシン惹起血管内膜透過性亢進に対する抑制効果. 日本麻酔科学会第63回学術集会, 福岡, 2016年

西岡 慧, 竹内菊子, 伊藤大真, 東 俊晴. 電気痙攣療法における麻酔時間と痙攣持続時間, 誘発成功率に対する鎮静薬の影響. 日本麻酔科学会第63回学術集会. 福岡, 2016年

竹内菊子, 西岡 慧, 東 俊晴. 眼科手術を計画された経口抗凝固薬内服患者の術前評価に関する遡及的解析. 日本麻酔科学会第63回学術集会. 福岡, 2016年

東 俊晴, 西岡 慧, 伊藤大真, 松本 延幸. ヒト単球系細胞の proopiomelanocortin (POMC) 遺伝子発現に対するパルス高周波の時間依存性効果. 日本ペインクリニック学会第50回大会, 横浜, 2016年

東 俊晴, 西岡 慧, 長坂 浩, 松本 延幸. ヒト単球内皮細胞の凝固活性小胞放出と単層膜透過性に対するリポ多糖とニューロキニン1受容体阻害薬の影響. 日本心臓血管麻酔学会第21回学術大会, 横浜, 2016年

西岡 慧, 東 俊晴 . 電気痙攣療法期間中の肺動脈血栓栓症の危険因子に関する後方視的検討 . 日本麻酔科学会第 64 回学術集会, 神戸, 2017 年

東 俊晴, 西岡 慧, 星島 宏, 西澤 秀哉, 長坂 浩, 松本 延幸 . ヒト単球系細胞の低温保存が組織因子陽性凝固活性小胞の発生に及ぼす影響の検討 . 日本麻酔科学会第 64 回学術集会, 神戸, 2017 年

西岡 慧, 坂元 枝里子, 東 俊晴 . 未診断軽症血友病患者に対する周術期止血戦略に関する一考察 . 日本心臓血管麻酔学会第 22 回学術大会, 下野, 2017 年

東 俊晴 . わたくし (機関紙編集委員) は麻酔科専修医にこんな研究指導をしています . 日本心臓血管麻酔学会第 22 回学術大会, 下野 (栃木), 2017 年

東 俊晴 . パルス療法はなぜ効果を示すのか (シンポジウム 7: 疼痛治療におけるパルス療法の有用性) . 日本ペインクリニック学会第 51 回大会, 岐阜, 2017 年

Azma T, Nishioka A, Ito T, Nagasaka H, Matsumoto N. Comparative effects of continuous radio frequency current at 50°C and pulsed RF on cytotoxicity, microvesicle shedding, and mRNA expression for POMC in human monocytic cells. The 35th Annual Congress for the European Society of Regional Anaesthesia & Pain Therapy, September 7 – 10, 2016, Maastricht, Nederland.

Azma T, Nishioka A, Ito T, Nagasaka H, Matsumoto N. A case series of radio-frequency ablation of lumbar sympathetic trunks as a minimally invasive adjunctive intervention for patients with chronic visceral pain associated with colonic dysmotility. The 16th World Congress on Pain, September 26 – 30, 2016, Yokohama, Japan.

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

西岡 慧 (NISHIOKA, Akira)  
国立国際医療研究センター国府台病院・レジデント  
研究者番号 : 60755544

### (2) 連携研究者

東 俊晴 (AZMA, Toshiharu) 国立国際医療研究センター国府台病院・手術関連診療部門長  
研究者番号 : 60284197