

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2023

課題番号：17K17239

研究課題名（和文）局所麻酔薬による線維芽細胞での神経成長因子発現増加が創傷治癒過程に及ぼす影響

研究課題名（英文）Effects of local anesthetics on the wound healing process by increasing nerve growth factor expression in fibroblasts

研究代表者

松村 朋香 (Matsumura, Tomoka)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：40527066

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト培養線維芽細胞に様々な濃度のリドカインを投与し、投与後の神経成長因子（nerve growth factor: NGF）発現量の変化、細胞増殖能の変化、細胞形態変化および細胞遊走能について経時的に観察した。高濃度リドカインを投与した群では、投与後の線維芽細胞の形態変化が見られ、細胞増殖抑制が認められた。瘢痕形成に関わる筋線維芽細胞へリドカイン投与すると用量依存的に細胞増殖が抑制され、高濃度投与によりアポトーシス誘導を認めた。周術期疼痛管理と並行しつつ良好な創傷治癒をコントロールするためにリドカインが有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

局所麻酔薬は過去の研究により細胞増殖抑制やアポトーシスの誘導などが報告されているが、実際の臨床で局所麻酔薬投与による創傷治癒の遅延などはほとんど見られない。線維化による術後創傷瘢痕やケロイドは難治性とされている。線維芽細胞および筋線維芽細胞のアポトーシスを誘導する抗癌剤は治療の候補であるが、副作用が強く、実用化には至っていない。本研究は、最も一般的な局所麻酔薬であるリドカインを、皮膚線維症の治療におけるドラッグリポジショニングとして、他の臓器の線維症治療にも使用できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Cultured human fibroblasts were treated with various concentrations of lidocaine, and changes in nerve growth factor (NGF) expression, cell proliferative ability, cell morphology, and cell migration ability were observed over time after administration. In the group treated with high concentrations of lidocaine, changes in fibroblast morphology were observed after administration, and inhibition of cell proliferation was observed. Lidocaine administration to myofibroblasts involved in scar formation inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner, and apoptosis induction was observed at high concentrations. The results suggest that lidocaine may be useful in controlling good wound healing in parallel with perioperative pain management.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：歯科麻酔学 局所麻酔薬 線維芽細胞 創傷治癒

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リドカインはNa<sup>+</sup>チャネル阻害により神経伝達を妨げることから局所麻酔薬として臨床で頻用され、神経因性疼痛などの難治性の痛みに対しては、イオントフォーシスなどを用いて経皮的投与も行われている。リドカインをはじめとする局所麻酔薬は、細胞毒性があることが過去の研究により示されている。しかし、臨床での使用で壊死などの組織傷害の報告はほとんどない。

これにはリドカインが細胞に対して毒性を持つ一方で、それを補完する何らかのメカニズムがあるのではないかと考えた。過去の研究で、リドカインがヒト培養線維芽細胞(TIG-114)に及ぼす影響を調べ、リドカインを投与するとNGFの発現が増加することを示した。NGFは神経軸索の伸長及び神経伝達物質の合成促進作用、神経細胞の維持作用、細胞損傷時の修復作用を持つ。リドカイン投与が非神経組織、特に組織を構成する細胞のなかで大部分を占める線維芽細胞に何らかの作用をしていることで創傷治癒過程に影響を及ぼしているのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

下記 ~ に示すように、組織に投与されたリドカインが線維芽細胞にどのような影響を与えるか、特に創傷治癒過程においてリドカインがどのような働きを示すかを調べた。

リドカインが細胞増殖に及ぼす影響

線維芽細胞に作用したリドカインが神経成長因子(NGF)の発現に与える影響

筋線維芽細胞に与えるリドカインの影響

### 3. 研究の方法

#### a. 細胞培養

ヒト皮膚線維芽細胞 (Normal human dermal fibroblasts : NHDF, Promo Cell GmbH, Germany) をCO<sub>2</sub> インキュベーター内で37 °C、5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。過去の実験ではヒト皮膚不死化細胞株(TIG-114)を用いていたが、より正常な生体の状態に近づけるため、NHDFに変更した。

#### b. リドカイン投与

NHDFにリドカイン(1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.01 and 0.001 mg/ml)を投与した。

#### c. 線維芽細胞増殖の定量

細胞増殖測定には cell counting kit-8 (CCK-8) (#96992, Sigma)を使用した。96 well プレートにNHDFを10<sup>3</sup> cell / wellで撒き、翌日にリドカインを投与した。リドカイン投与から3日後にマイクロプレートリーダーを使用して吸光度を測定した。リドカインおよびTGF- $\beta$ 1を投与しない群をコントロールとした。

#### d. 定量的PCR

培養細胞をRNA Mini Kit (Qiagen)を使用してRNA抽出した。抽出したRNAからcDNAを作成し、定量的PCRを行った。定量的PCRは、Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて、LightCycler System (Roche Applied Science, Penzberg, Germany)にて増幅反応を行った。NGFのプライマー配列は(Forward: 5' -ggcagtgtcaaggggaatgcgaagtt - 3', Reverse: 5' -ccaaggagcagctttctatcctgg- 3')、内部標準として使用したGAPDHのプライマー配列は(Forward: 5' -tcctgagctgaacgggaag - 3', Reverse: 5' -ggaggagtgggtgtcgctgt - 3')であった。

#### e. ELISA

NHDFにリドカインを投与し、3日後の細胞からタンパクを抽出し、ELISAキット(Human beta Nerve Growth Factor ELISA Kit)を用いてNGFタンパク量を測定した。

#### f. NHDFから筋線維芽細胞への形質転換

NHDFにTGF- $\beta$ 1 10 ng/mlを投与し、抗 $\alpha$ -SMA抗体で細胞を染色した。蛍光顕微鏡を用いて染色後の細胞を観察した。

#### g. アポトーシス同定

Apoptotic/ Necrotic/ Healthy Cells Detection Kit (#ab176749, abcam)を用いて細胞を染色し、蛍光顕微鏡で細胞を観察した。

h. cAMC, PKC 阻害薬

cAMP 活性阻害のために HA 1004 を使用し、PKC 活性阻害のために GO 6976, Staurosporine を使用した。

i. ウェスタンブロット

一次抗体に抗カスパーゼ 3 抗体を用いた。内部標準として アクチンを使用した。

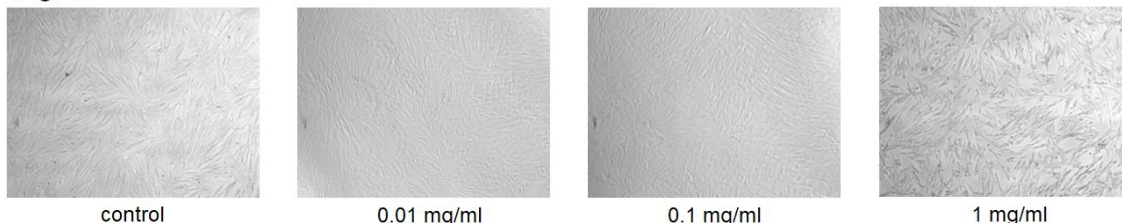
4. 研究成果

リドカインが細胞増殖に及ぼす影響

a. リドカイン投与後の細胞形態の観察

NHDF にリドカインを投与したところ、1, 0.5, 0.25 mg/ml で細胞の縮小、細胞形態の変化がみられた。(Fig. 1)

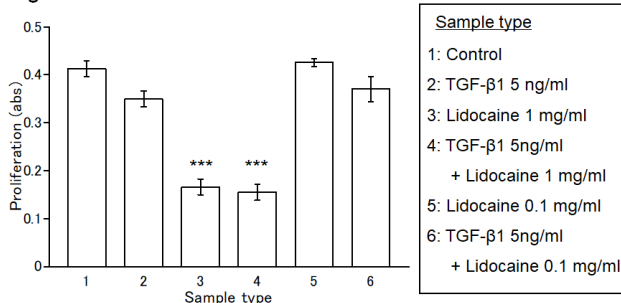
Fig. 1



b. リドカイン投与の NHDF 細胞増殖への影響

1 mg/ml リドカインを投与したリドカインはコントロール群と比較して有意に細胞増殖の抑制がみられた。(Fig. 2)

Fig. 2



Lidocaine suppressed cellular proliferation of NHDF and MF (n=4). (\*\*\*) p < 0.001 compared to control, Dunnett's test)

線維芽細胞に作用したリドカインが神経成長因子(NGF)の発現に与える影響

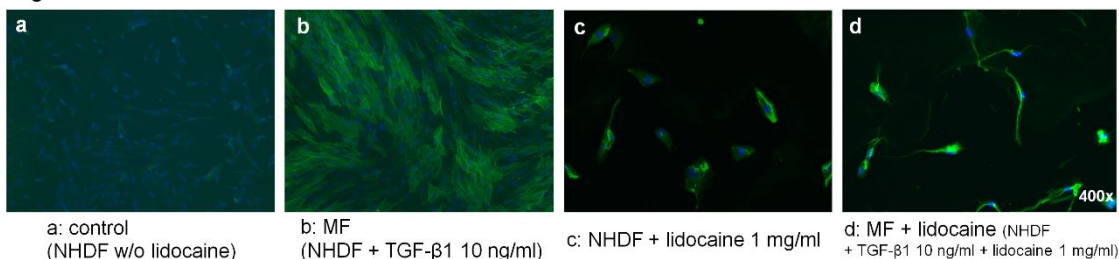
NHDF にリドカインを投与し、3 時間後の NGF の発現を ELISA および定量的 PCR により定量した。コントロール群と比較して、リドカイン投与群における NGF 量に有意差は認められなかった。

筋線維芽細胞に与えるリドカインの影響

TGF-β1 投与により NHDF が筋線維芽細胞(MF)に形質転換されたかを確認するために、筋線維芽細胞のマーカーである α-SMA で免疫染色を行った(緑: α-SMA, 青: DAPI)。TGF-β1 投与後には細胞内に α-SMA の増加がみられ、MF への形質転換が認められた(Fig 3 b)

1mg/ml リドカイン投与により、NHDF と同様に MF においても細胞形態の萎縮が見られた(Fig 3 c,d)

Fig. 3

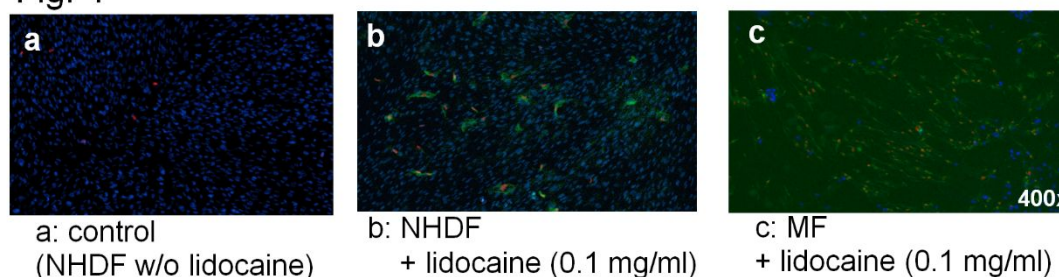


また、MFにおけるリドカインの細胞増殖への影響を調べたところ、MFにおいても細胞増殖の有意な抑制が示された(Fig 2)。

リドカインは歯肉線維芽細胞において、アポトーシスを誘導することが示されている。今回のNHDFの細胞形態の萎縮がアポトーシスによるものかを調べるため、リドカイン投与から3日後のNHDFおよびMFに対して、the Apoptotic/ Necrotic/ Healthy Cells Detection Kit (#ab176749, abcam)で細胞を染色した(緑(Annexin):アポトーシス、青(Hoechst): Healthy cell、赤(Ethidium): Necrosis)。

その結果、NHDFおよびMFにおいてアポトーシスの誘導が確認できた(Fig4)。

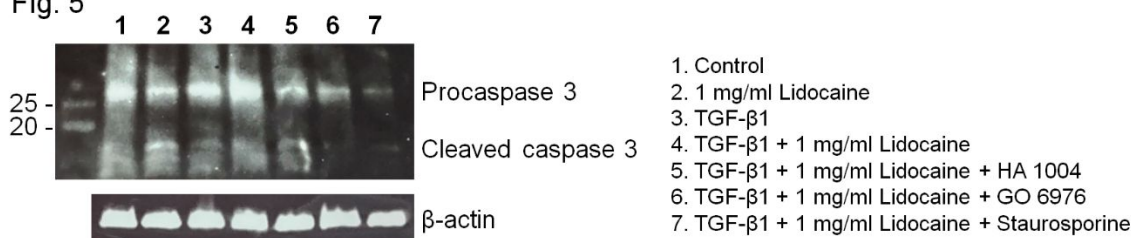
Fig. 4



先行研究の結果では、歯肉線維芽細胞のアポトーシス誘導にはcAMPおよびPKCを介した経路が関わっていると示されている。本研究におけるNHDFおよびMFにおけるアポトーシスがどの経路によるものかを調べるため、cAMP活性阻害薬(HA 1004)、PKC活性阻害薬(GO 6976, Staurosporine)を投与し、アポトーシス反応の重要な調節因子の一つであるカスパーゼ3の発現をウエスタンブロットにより調べた。

先行研究に基づく仮説ではカスパーゼ3活性の指標となるcleaved caspase3がリドカイン投与して細胞死が起きていた群に比べて、cAMP阻害薬を投与するとcleaved caspase3の量が減少し、PKC阻害薬を投与した群ではcleaved caspase3の量が増加することとなるが、今回のウエスタンブロットの結果では阻害薬投与群のバンドは非常に不明瞭であった(Fig. 5)。

Fig. 5



以上の結果から、リドカインは線維芽細胞のアポトーシスを誘導し、筋線維芽細胞にも細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導する。ヒト皮膚線維芽細胞株を用いた過去に行った実験では、低濃度リドカインは線維芽細胞におけるNGF発現を増加させた。本研究ではprimary cellに変更し実験したところ、NGF発現の有意な増加は認められなかった。これらの結果から、リドカイン投与濃度や細胞の性質によりリドカインの与える影響は異なることが示唆された。今回の実験で線維芽細胞と同様にリドカインにより細胞増殖抑制やアポトーシス誘導が認められた筋線維芽細胞は創傷治癒に重要な役割を果たし、筋線維芽細胞の異常な増殖や活性が瘢痕形成につながる。ドラッグリポジショニングとして、リドカインの使用が線維化形成阻害および線維化治療に有用となる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikeda Nanako, Matsumura Tomoka, Kono Haruna, Baba Yukiko, Hanaoka Miho, Fukayama Haruhisa	4. 巻 67
2. 論文標題 Combined Use of a Gum Elastic Bougie and Video Laryngoscopy for Intubating a Patient With an Unexpected Laryngeal Papilloma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anesthesia Progress	6. 最初と最後の頁 230 ~ 232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2344/anpr-67-03-01	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumura Tomoka, Mitani Shigeki, Fukayama Haruhisa	4. 巻 57
2. 論文標題 Sugammadex-induced anaphylaxis involving sudden onset of severe abdominal pain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Anesthesia	6. 最初と最後の頁 119 ~ 120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jclinane.2019.04.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumura Tomoka, Suzuki Chihiro, Kubota Kazumasa, Minakuchi Shunsuke, Fukayama Haruhisa	4. 巻 65
2. 論文標題 Difficult Nasal Intubation Using Airway Scope? for a Child With Large Tumor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anesthesia Progress	6. 最初と最後の頁 251 ~ 254
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2344/anpr-65-04-08	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 阿部 彩由美, 脇田 亮, 阿部 桂子, 松村 朋香, 深山 治久	4. 巻 4
2. 論文標題 甲状腺癌の既往の患者に対し予期せぬ挿管困難が生じた1例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本歯科麻酔学会雑誌	6. 最初と最後の頁 65-67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Takaya, Utsumi Nozomi, Baba Yukiko, Matsumura Tomoka, Wakita Ryo, Maeda Shigeru	4. 巻 13
2. 論文標題 Considerations for Satisfactory Sedation during Dental Implant Surgery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 461 ~ 461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm13030461	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Yu, Matsumura Tomoka, Abe Yushi, Kutsumizu Chihiro, Maeda Shigeru	4. 巻 69
2. 論文標題 Coronary Spasm During Postoperative Sedation With Dexmedetomidine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anesthesia Progress	6. 最初と最後の頁 20 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2344/anpr-69-01-02	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumura Tomoka, Hosokawa Susumu, Hanaoka Miho, Abe Yushi, Iwamoto Tsutomu, Maeda Shigeru	4. 巻 73
2. 論文標題 Transient ventricular bigeminy during emergence from general anesthesia in a pediatric patient with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Electrocardiology	6. 最初と最後の頁 38 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jelectrocard.2022.05.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Ken, Matsumura Tomoka, Abe Yushi, Nakajima Atsushi, Funayama Takuya, Sumphaongern Thunshuda, Wakita Ryo, Maeda Shigeru	4. 巻 69
2. 論文標題 Perioperative Management of a Patient With Tongue Cancer Who Developed Pneumomediastinum Following Tracheostomy Performed to Secure the Airway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anesthesia Progress	6. 最初と最後の頁 37 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2344/anpr-69-03-02	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tomoka Matsumura, Shigeru Maeda
2. 発表標題 Lidocaine suppresses cell proliferation and induces apoptosis of myofibroblasts
3. 学会等名 Neuroscience 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 裕, 松村 朋香, 脇田 亮
2. 発表標題 補助人工心臓埋入患者の歯科治療時における全身管理経験
3. 学会等名 第48 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 賢, 松村 朋香, 中島 淳, 安部 勇志, 船山 拓也, 脇田 亮, 深山 治久.
2. 発表標題 静脈内鎮静法下に行った気管切開後に発生した縦隔気腫の1 例.
3. 学会等名 第48 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 花岡 美穂, 松村 朋香, 阿部 彩由美, 船山 拓也, 安部 勇志, 深山 治久
2. 発表標題 注意欠如・多動性障害(ADHD)小児の口腔外科再建手術後にデクスメトミジンによる鎮静を行った一症例
3. 学会等名 日本歯科麻酔学会 学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉 真子 , 船山 拓也 , 阿保 綱孝 , 松村 朋香 , 脇田 亮 , 深山 治久
2. 発表標題 全身麻酔後に複数回おきた頻脈性不整脈に対するValsalva法により高度徐脈が生じた1例
3. 学会等名 日本歯科麻酔学会 学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野晴奈 松村朋香 馬場有希子 深山治久
2. 発表標題 気管挿管時に喉頭腫瘤が発見された一症例
3. 学会等名 第35回 関東臨床歯科麻酔懇話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoka MATSUMURA, Shigeki MITANI, Haruhisa FUKAYAMA
2. 発表標題 Sugammadex induced anaphylactic shock noticed when intense urge to urinate
3. 学会等名 IFDAS 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoka Matsumura, Sayaka Asano, Shigeru Maeda
2. 発表標題 The effect of lidocaine on cell proliferation of myofibroblasts
3. 学会等名 14th The Federation of Asian Dental Anesthesiology Societies (FADAS) (国際学会)
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 安部勇志、松村朋香、前田 茂
2. 発表標題 口腔外科再建術における遊離皮弁予後に関わる周術期因子についての後方視的検討
3. 学会等名 第49 回日本歯科麻酔学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------