

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08839

研究課題名(和文) 局所麻酔薬のDNA脱メチル化機序の解明と麻酔、癌治療、再生医療への有用性の検討

研究課題名(英文) Elucidation of DNA demethylation mechanism of local anesthetic and its usefulness for anesthesia, cancer treatment, regenerative medicine.

研究代表者

鬼塚 信 (Shin, Onizuka)

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：麻酔薬が癌細胞の増殖を抑制することを報告してきたが、その機序は解明されていない。そこで、麻酔薬のDNA脱メチル化を検証した。方法：麻酔薬に暴露した癌細胞からDNAを抽出し、MSP法、DNAドットプロット法、リアルタイムPCR法で解析した。結果：リドカインにより脱メチル化DNAが増加した。リドカインにより癌抑制遺伝子p53のmRNAの発現が増加した。MSP法では、p53が脱メチル化されていた。試験管内実験系で、DNAメチル化を局所麻酔薬は抑制した。結論：局所麻酔薬は、DNAメチル化酵素を阻害し、DNAを脱メチル化する機序により癌抑制遺伝子p53の発現をし、癌細胞増殖抑制しう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

癌患者に対する手術療法が増加しつつある今日、どのような麻酔薬が癌患者にとって有利なのかは不明である。リドカイン等の局所麻酔薬は、癌細胞の増殖を抑制したり、アポトーシスを誘導することがわかってきたがその機序は不明である。本研究で、これらの麻酔薬はDNAを脱メチル化するといった、エピジェネティックな機序により、p53等のがん抑制遺伝子を賦活し、抗癌作用を発揮しうるということが解明された。この意義は、癌手術あるいは術後管理における、これらの麻酔薬の使用が癌の増殖や転移を抑制し、癌患者にとって有益である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that anesthetics suppress the growth of cancer cells, but the mechanism has not been elucidated. Therefore, we verified DNA demethylation of anesthetics. Method: DNA was extracted from cancer cells exposed to anesthetic and analyzed by MSP method, DNA dot blotting, and real-time PCR. Results: Increased DNA demethylated by the local anesthetic lidocaine. Lidocaine increased the expression of mRNA of the tumor suppressor gene p53. In the MSP method, p53 was demethylated. In an in vitro experimental system, local anesthetics suppressed DNA methylation. Conclusion: Local anesthetics such as lidocaine may suppress tumor cell growth by increasing the expression of the tumor suppressor gene p53 by a mechanism that demethylates DNA by directly inhibiting DNA methylase.

研究分野：麻酔蘇生学

キーワード：DNAメチル化 MSP法 メチル化DNA特異抗体 DNAドットプロット法 リアルタイムPCR法 癌抑制遺伝子
リドカイン p53

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リドカインをはじめ麻酔薬が癌細胞の増殖を抑制することを報告してきたが、その機序は解明されていない。研究代表者らは、麻酔薬が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を報告した。

2. 研究の目的

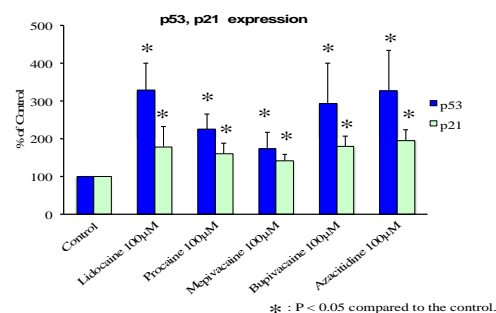
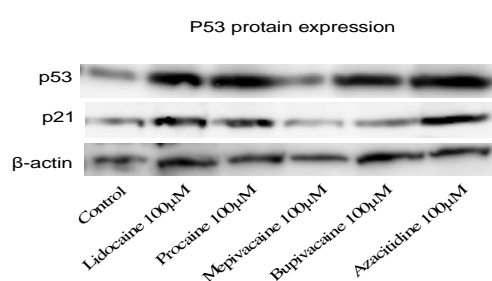
本研究の目的は、麻酔薬の DNA 脱メチル化による癌細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導機序を検証した。

3. 研究の方法

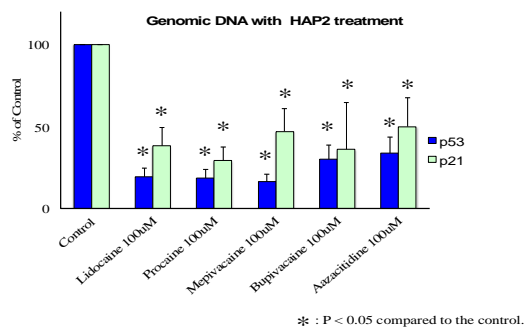
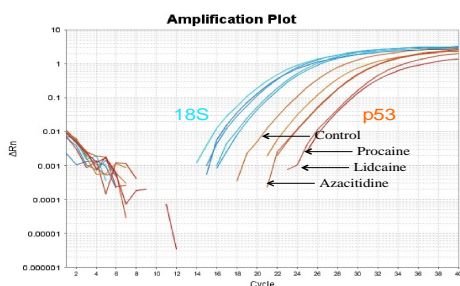
Hela 細胞を検体とした。麻酔薬の DNA メチル化への影響を検証すべく、局所麻酔薬に 48 時間暴露した癌細胞から DNA を抽出し、脱メチル化された DNA を認識し切断するメチル化感受性制限酵素 HAP を用いて酵素反応を行った後、メチル化特異的定量的リアルタイム PCR 法 (MSP 法) で解析した。また、メチル化 DNA 特異的抗体による DNA ドットブロット法を施行した。癌抑制遺伝子の mRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR 法で解析した。統計解析は、unpaired t test を用いた。

4. 研究成果

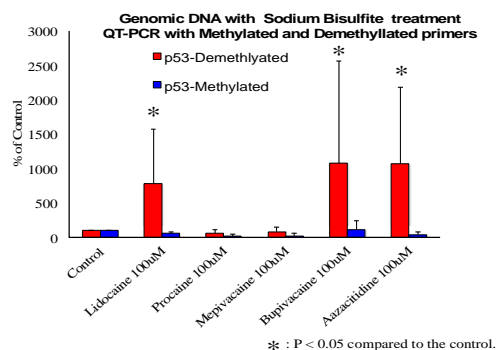
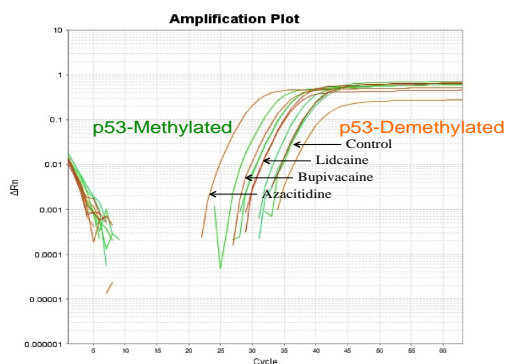
< Western Blotting > 局麻薬は、癌抑制遺伝子 p53、p21 の発現を増加した。(図 1)



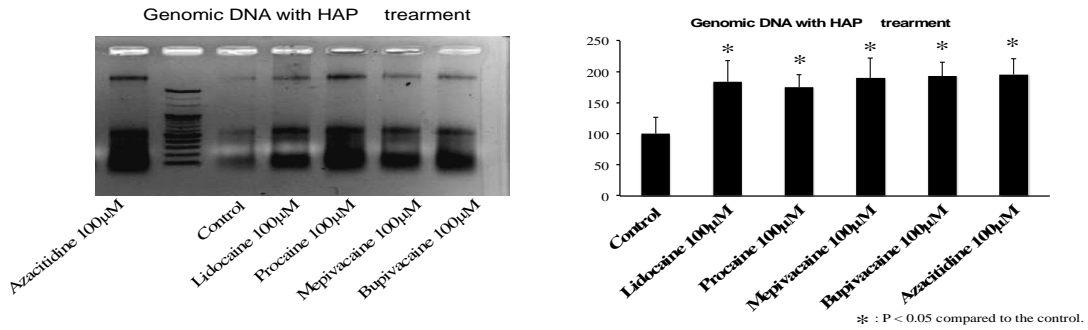
< リアルタイム PCR > 局麻薬は、癌抑制遺伝子の mRNA 発現を増加した。(図 2)



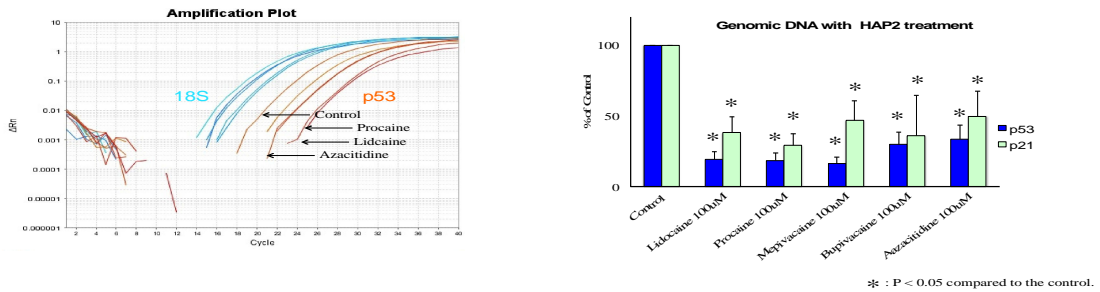
< バイサルファイト処理-RT-PCR 法 > 局麻薬は、p53 の脱メチル化を増加した。(図 3)



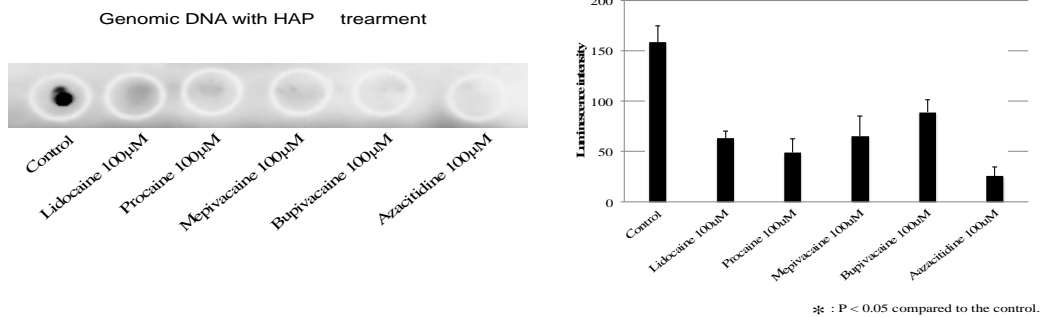
<DNA 電気泳動法> 局麻薬は、DNA メチル化感受性制限酵素 HAPII による切断率を増加した。すなわち、脱メチル化 DNA を増加した。(図 4)



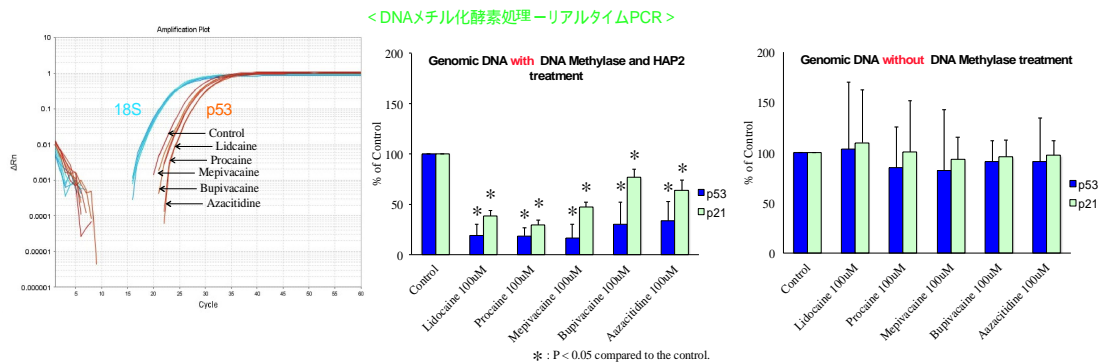
<リアルタイム PCR-MSP 法> 局麻薬は、DNA メチル化感受性制限酵素 HAPII による切断率を増加した。すなわち、局所麻酔薬は、癌抑制遺伝子 p53、p21 の DNA 脱メチル化率を増加した。(図 5)



<メチル化 DNA 特異的抗体-DNA ドットプロット法> 局麻薬は、メチル化 DNA 特異的抗体による抗体反応を抑制した。すなわち、脱メチル化 DNA を増加した (図 6)



<DNA メチル化酵素処理-リアルタイム PCR>
局麻薬は、DNA メチル化酵素の活性を阻害した。(図 7)



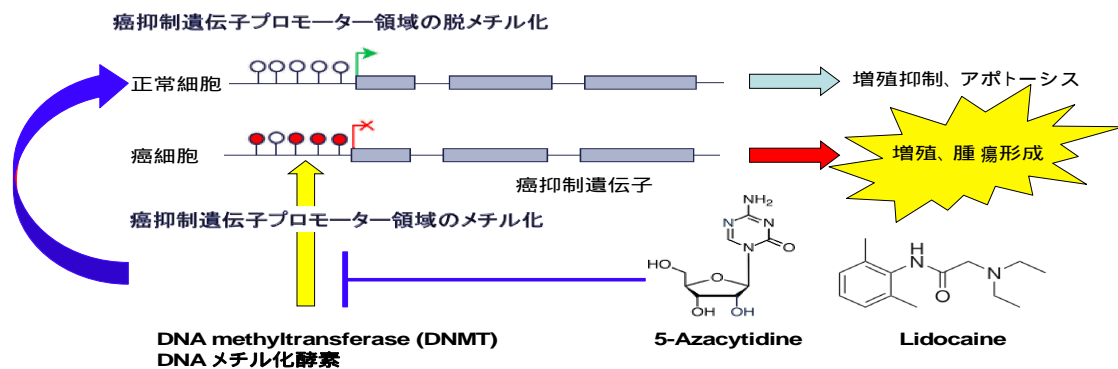
考察：局所麻酔薬により、癌細胞に増殖抑制あるいはアポトーシスを誘導しうる報告は散見されているが、その機序は明確ではない。本実験で、局所麻酔薬は、DNA の脱メチル化というエピジェネティックな作用により、癌抑制遺伝子の発現を増加することで、癌細胞に増殖抑制あるいはアポトーシスを誘導しうる一機序が証明された。Tat らは、リドカインやプロポフォルが癌抑制遺伝子 p53 を増加することで、大腸癌細胞の増殖を抑制すると報告している（1）。また、Jurj らは、リドカインが p53 依存性のアポトーシスを肝細胞癌に誘導することを報告しており、リドカイン投与後では p53 の発現増加が認められている（2）。Bahrudin らは、局所麻酔薬が p53 陽性の癌細胞の増殖を抑制しうることを報告している（3）。Desai らは、リドカインがマウス線維芽細胞を、癌抑制遺伝子 p21 を増加することで増殖抑制しうることを報告している（4）。Lirk らは、リドカインは、時間および量依存性に乳癌細胞の DNA を脱メチル化し得ることを報告している（5）。Villar-Garea らは、局所麻酔薬プロカインが、MCF-7 ヒト乳癌細胞において、DNA を脱メチル化し得ることを報告している（6）。以上に示したように、リドカインをはじめとした局所麻酔薬は、p53 あるいは p21 等の癌抑制遺伝子の発現を増加することで、癌細胞の増殖抑制やアポトーシス誘導をし得ると行った報告が散見される。そこで、本研究では、遺伝子発現に関わる DNA のメチル化というエピジェネティックな作用に注目した。DNA がメチル化されると、発現は抑制され、反対に、DNA が脱メチル化されると、発現は増加するというエピジェネティックな作用によりタンパク発現は調節されていることが証明されている。そこで、麻酔薬にもそのような癌抑制遺伝子の発現増加作用があるのかを検証した。Western Blotting 法を用いたタンパク発現量の解析では、局所麻酔薬はいずれも p53、p21 等の癌抑制遺伝子のタンパク発現を増加した（図 1）。定量的リアルタイム PCR を用いた mRNA 発現量の解析では、局所麻酔薬はいずれも p53、p21 等の癌抑制遺伝子のタンパク発現を増加した（図 2）。さらに、バイサルファイト処理-リアルタイム PCR 法を用いて、癌抑制遺伝子 p53 のメチル化 DNA 量を観察したところ、局所麻酔薬は、癌抑制遺伝子 p53 の脱メチル化を増加した。（図 3）

そこで、局所麻酔薬が、DNA のメチル化に影響するかを検証すべく、メチル化 DNA 感受性制限酵素を用いての酵素反応後、電気泳動した。結果、局所麻酔薬および DNA メチル化酵素阻害剤である Azacitidine は、メチル化 DNA 感受性制限酵素 HAP の酵素作用を増加した。すなわち、メチル化 DNA を減少させたことが示された（図 4）。このことは、リアルタイム PCR-MSP 法を用いての癌抑制遺伝子 p53、p21 のメチル化 DNA の定量においても、局所麻酔薬は、DNA メチル化感受性制限酵素 HAPII による切断率を増加した。すなわち、局所麻酔薬は、癌抑制遺伝子 p53、p21 の DNA 脱メチル化率を増加したことが示された（図 5）。そこで、メチル化 DNA 特異的抗体-DNA ドットプロット法を用いて、局所麻酔薬が、メチル化 DNA を減少しうるかを検証した。結果、局所麻酔薬は、メチル化 DNA 特異的抗体による抗体反応を抑制した。すなわち、メチル化 DNA を減少した（図 6）。以上の結果から、局所麻酔薬は、メチル化 DNA を減少し、脱メチル化を促進しうるということが証明された。

DNA のメチル化、脱メチル化には DNA メチル化酵素活性が影響するので、試験管内で、DNA メチル化酵素とゲノム DNA を反応させる段階で、局所麻酔薬を暴露し、その DNA メチル化に及ぼす影響を検証した。結果、局所麻酔薬は、DNA メチル化酵素の活性を阻害した（図 7）。

以上の結果から、局所麻酔薬は、DNA メチル化酵素を直接的に阻害することで DNA を脱

メチル化する機序により p53、p21 等の癌抑制遺伝子の発現を増加することで癌細胞増殖抑制およびアポトーシスを誘導しうる可能性が示唆された。



国際的な多施設無作為試験で、DNA メチル化酵素阻害剤であるアザシチジンが、骨髄異形成症候群（MSD）患者の全生存率を改善したことが報告されている（7）。アザシチジンなどの DNA メチル化酵素阻害剤は、腫瘍抑制因子の不活化を阻害することで機能していると考察されている。本研究においてもこれと同様の結果が局所麻酔薬において観察された。これらの局所麻酔薬は術中のみならず、術後鎮痛薬として、硬膜外腔における持続投与に使用されている。従って、本研究により証明された局所麻酔薬の DNA メチル化酵素阻害効果を介した DNA の脱メチル化促進作用は、局所麻酔薬の癌の増殖や転移を阻害しうる可能性を裏付けるものである。

結論：リドカインなどの局所麻酔薬は、DNA メチル化酵素を直接的に阻害することで DNA を脱メチル化する機序により癌抑制遺伝子の発現を増加することで癌細胞増殖抑制およびアポトーシスを誘導しうる可能性が示唆された。

参考文献

- (1) Tat T et al. Antiproliferative effects of propofol and lidocaine on the colon adenocarcinoma microenvironment. J BUON. 2019;24:106-115.
- (2) Jurj A et al. J Antiproliferative and Apoptotic Effects of Lidocaine on Human Hepatocarcinoma Cells. A preliminary study. Gastrointestin Liver Dis. 2017;26:45-50.
- (3) Bahrudin U et al. Inhibitory effects of local anesthetics on the proteasome and their biological actions. Sci Rep. 2017;7:5079.
- (4) Desai SP et al. Lidocaine inhibits NIH-3T3 cell multiplication by increasing the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21). Anesth Analg. 2008;107:1592-7.
- (5) Lirk P et al. Lidocaine time- and dose-dependently demethylates deoxyribonucleic acid in breast cancer cell lines in vitro. Br J Anaesth. 2012;109:200-7.
- (6) Ana Villar-Garea et al, Manel Esteller. Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. Cancer Res. 2003;63:4984-9.
- (7) Pierre Fenaux et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. Lancet Oncol. 2009;10:223-32.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鬼塚信、白石成二
2. 発表標題 麻酔薬の癌細胞における免疫チェックポイント分子に及ぼす影響
3. 学会等名 日本麻酔科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鬼塚 信
2. 発表標題 局所麻酔薬の DNA脱メチル化機序
3. 学会等名 日本麻酔科学会第65回学術集会
4. 発表年 2018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
---------	---------