

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17850

研究課題名(和文) 麻酔薬の標的細胞小器官としてのミトコンドリアと細胞内エネルギー代謝関連の探究

研究課題名(英文) mitochondria as target cell organelles of anesthetics and exploration of intracellular oxygen energy metabolism

研究代表者

岡本 明久 (OKAMOTO, Akihisa)

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50509479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：静脈麻酔薬、局所麻酔薬が細胞の代謝を変容して、細胞死やそれに続発する全身性の代謝障害を引き起こす可能性が指摘されてきた。この問題へのアプローチとして樹立細胞株を用いてミトコンドリアに依存する酸素依存的な代謝経路への影響を解明する計画を策定した。局所麻酔薬リドカインや静脈麻酔薬プロポフォールは臨床使用濃度でミトコンドリア依存的な酸素消費を抑制して嫌氣的な代謝を促進することが解った。また酸素消費の抑制は、細胞死を惹起する事が判明した。ミトコンドリア電子伝達系は細胞障害においてプロポフォール・リドカインの標的となる事を示す実験的なエビデンスは得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

局所麻酔薬の神経障害、プロポフォール注入症候群の病態の分子機序の解明は麻酔科学が取り組むべき重要な課題である。いまだに病態の分子機構の詳細や発症予測因子・治療法の同定には至っていない。この問題に細胞機能に必須な役割を果たすミトコンドリアの酸素代謝の観点からのアプローチを試みた。この研究をさらに発展させることで安全な周術期管理を行う手掛かりが得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that intravenous and local anesthetics may alter cellular metabolism, leading to cell death and subsequent systemic metabolic disturbances. The local anesthetic lidocaine and the intravenous anesthetic propofol have been shown to suppress mitochondria-dependent oxygen consumption and promote anaerobic metabolism at clinically relevant concentrations. Suppression of oxygen consumption was found to induce cell death. Experimental evidence suggests that the mitochondrial electron transport system is a target of propofol and lidocaine in cellular injury.

研究分野：麻酔科学

キーワード：リドカイン プロポフォール ミトコンドリア 酸素 アポトーシス ネクローシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

報告者はこれまでリドカインを含む局所麻酔薬や静脈麻酔薬プロポフォールが活性酸素種(ROS)を産生して細胞死を惹起することを報告してきた。ROSを抗酸化剤で除去することでリドカインやプロポフォールによる細胞毒性を軽減することにも成功している。報告者らの研究の独自点は、様々なタイプのミトコンドリア遺伝子の変異体を細胞質移植法を用いて細胞に導入した。transmitochondrial cybrids 細胞(Cybrids 細胞)を用いてプロポフォールが細胞の有酸素・無酸素代謝のモード変換に与える影響と細胞の生死に与える影響を培養細胞を用いて明らかにした事であり、これによりリドカインやプロポフォールの細胞毒性がミトコンドリアの電子伝達系に対する作用に依存する事を示してきた。

一方、従来から局所麻酔薬・プロポフォールによる細胞毒性の発現においてミトコンドリアが標的となっていることを強く示唆する研究成果は報告されてきた。

プロポフォール注入症候群(Propofol Infusion Syndrome, PRIS)の病態生理学から推察されるように細胞の代謝異常や細胞死がPRIS発症の細胞学的基盤にあると考えられており、この方向性からの研究が進められてきたにもかかわらず、いまだに病態の分子機構の詳細や発症予測因子・治療法の同定には至っていない。病態の進展にミトコンドリア機能異常を指摘する報告も散見するが、標的システム・分子の同定には至っておらず発症のトリガー因子の同定もされていない。従来ミトコンドリアを標的と想定した研究はなされているが、その多くは単離したミトコンドリアを用いて高濃度のプロポフォールを用いた検討であり、臨床使用濃度と同等のレベルで生細胞機能との関連を持った研究は報告者らの報告がその嚆矢であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分子生物学的な手法を用いてミトコンドリア内のリドカインやプロポフォールの標的分子を明らかにして酸素代謝・エネルギー代謝を司るミトコンドリア機能への影響を細胞内のATP動態の可視化と共に明らかにする事であった。

この目的の達成のため、細胞外フラックスアナライザーを用いた細胞のエネルギー状態の動的な変動と共焦点レーザー走査型顕微鏡を援用した生細胞内のATP濃度をリアルタイムに可視化できる蛍光プローブ ATeam、siRNAを用いた遺伝子発現制御法を駆使して研究を遂行する事を当初の計画として掲げた。

先行研究で報告者らが行った網羅的遺伝子発現検索 RNA-Seqの結果に基づいてリドカイン・プロポフォールの標的遺伝子を絞り込むという手法、細胞外フラックスアナライザーを用いて電子伝達系の各複合体依存の酸素消費量をミトコンドリアの単離を行わずアッセイ可能な手技も援用する方法を援用して以下の具体的な目的を達成する計画を策定した。

- (1) リドカイン・プロポフォールが細胞の酸素代謝へ及ぼす影響の検討
- (2) リドカイン・プロポフォールが細胞のエネルギー代謝へ及ぼす影響の検討
- (3) リドカイン・プロポフォールの標的となるミトコンドリア電子伝達系複合体、蛋白質の同定と発現調節による酸素代謝・エネルギー代謝への影響の検討

3. 研究の方法

以下の測定システムを用いて研究を進めていく計画であった。

(1) 細胞外フラックスアナライザー(XFp Agilent Technologies社製 研究機関に配備済み)を用いた細胞酸素消費量測定(oxygen consumption rate, OCR)、細胞外酸性化速度測定(extracellular acidification rate, ECAR)(乳酸産生の代理マーカー)系

(2) 細胞内ATP量の測定系

(2)- : 細胞内分画別のATP量の生化学的測定

(2)- : 融合蛋白質 ATeamを用いた細胞内分画別のリアルタイムATP濃度の測定

(3) ミトコンドリア蛋白質の発現調節系

目的別に具体的な問題解決の方略を策定した。

(1) リドカイン・プロポフォールが酸素代謝へ及ぼす影響の検討: 細胞酸素消費量(OCR)、細胞外の酸性化能(嫌氣的代謝の代理マーカー)(ECAR)の測定

ミトコンドリア機能とプロポフォール毒性との関連を探るため、ミトコンドリアDNAに変異を導入した細胞を作製し実験に供する。親株P29細胞のミトコンドリアDNAを欠損させ(0細胞)、報告者らが確立している手法を用いてCybrids細胞を作出する。

リドカイン・プロポフォルの用量と作用時間は重要な検討要素であるが報告者らの先行研究により 1 mM(リドカイン), 50 μ M(プロポフォル) 6 h を基軸として検討する。

細胞酸素消費量(OCR), 細胞外の乳酸・ピルビン酸を測定は細胞外フラックスアナライザー XFp(Agilent Technologies 社)を用いて測定する。細胞数が 105 個から再現よく細胞酸素消費量(OCR)、ECAR が測定できる。

(2) リドカイン・プロポフォルが細胞のエネルギー代謝(ATP 産生)へ及ぼす影響の検討：融合蛋白質 ATeam を用いたリアルタイム ATP 濃度アッセイ

細胞内 ATP 濃度とその分布の検討はこの研究の必須な要素である。細胞内の ATP の分布状態の変化によって説明できる可能性がありこの検証を行う。0 細胞や Cybrids 細胞はミトコンドリアでの ATP 産生が著しく低下しているなのでこのアッセイのコントロールとして利用可能である。

(3) リドカイン・プロポフォルの標的となるミトコンドリア電子伝達系複合体、蛋白質の同定と発現調節による酸素代謝・エネルギー代謝への影響の検討

報告者らの先行研究によりリドカイン・プロポフォルがミトコンドリア機能、特に電子伝達系を抑制することが明らかになっている。本検討でその標的分子または標的複合体の同定を試みる。ミトコンドリア蛋白質はミトコンドリア DNA 由来のものと核 DNA 由来のものに分類される。核 DNA 由来の電子伝達系の各複合体の構成遺伝子を選択して siRNA(RNA 干渉法)を用いた発現抑制を行う。

4. 研究成果

研究成果を研究目的別に記述する。

(1) リドカイン・プロポフォルが酸素代謝へ及ぼす影響の検討：細胞酸素消費量(OCR)、細胞外の酸性化能(嫌氣的代謝の代理マーカ) (ECAR)の測定

神経芽腫由来 SH-SY5Y 細胞を用いた。

リドカイン・プロポフォルの用量と作用時間は重要な検討要素であるが報告者らの先行研究により 1 mM(リドカイン), 50 μ M(プロポフォル) 6 h を基軸として検討した。

細胞酸素消費量(oxygen consumption rate, OCR), 細胞外酸性化速度測定(extracellular acidification rate, ECAR)(乳酸産生の代理マーカー) を細胞外フラックスアナライザー XFp(Agilent Technologies 社)を用いて測定した。

その結果、リドカイン、プロポフォルは OCR を抑制し、一方で ECAR を促進することがあきらかになった。

リドカイン 1mM 6 h 処理は、OCR を約 40%減少させ、ECAR を約 120%上昇させた。一方、プロポフォル 50 μ M 6 h 処理により OCR は 50%減少し ECAR は 150%上昇した。

この抑制には用量依存性が存在するもののリドカイン 10 mM、プロポフォル 100 μ M は細胞障害を非常に短い間に引き起こすことが判明した。

これらの OCR の抑制は、ミトコンドリア DNA を欠損させた細胞(0 細胞)では観察されないことから、ミトコンドリアでの酸素消費量の抑制によることが強く推定された。

次に、ミトコンドリアの電子伝達系の各複合体での酸素消費量を測定する実験系を細胞外フラックスアナライザーを用いて構築した。その結果、プロポフォルは複合体 I, II, III に依存する酸素消費量を抑制するが複合体 IV に依存する酸素消費量を抑制はしなかった。

さらに 1 mM(リドカイン), 50 μ M(プロポフォル) 6 h 条件でアポトーシス主体の細胞死が惹起されることを見いだした。細胞死はリドカイン 10 mM, プロポフォル 100 μ M 条件下ではネクローシス主体の細胞死が惹起される事が判明した。

(2) リドカイン・プロポフォルが細胞のエネルギー代謝(ATP 産生)へ及ぼす影響の検討：融合蛋白質 ATeam を用いたリアルタイム ATP 濃度アッセイ

SH-SY5Y 細胞においてプロポフォル 50 μ M 6 h 処理により細胞の ATP 量に統計学的な優位差は検出されなかった。一方、プロポフォル 50 μ M はミトコンドリアでの酸素消費量を抑制するという事実が存在する。リドカイン 1mM 6h 処理

この矛盾を解決するために、細胞内の ATP 濃度の分布を検証する実験系を立ち上げようと試みたのであるが、諸事情により成功しなかった。

(3) リドカイン・プロポフォルの標的となるミトコンドリア電子伝達系複合体、蛋白質の同定と発現調節による酸素代謝・エネルギー代謝への影響の検討

報告者らの先行研究によりリドカイン・プロポフォルがミトコンドリア機能、特に電子伝達系

を抑制することが明らかになっている。

この問題へのアプローチとして、次世代シーケンサを利用した網羅的な遺伝子発現変動を RNA-Seq 法を用いて解析をした。

現在、次世代シーケンサを用いた配列の取得は完了して、現在進行形で解析を行っている。予想に反してミトコンドリアの構成蛋白質の mRNA の発現はリドカイン・プロポフォールによっては大きくは変動しないことを示唆するデータを得ている。

他方、siRNA library を用いた発現抑制は極初期の予備実験に留まった。

これらの実験により以下の結論が導かれた。

樹立細胞株を用いてミトコンドリアに依存する酸素依存的な代謝経路への影響を解明する計画を策定した。局所麻酔薬リドカインや静脈麻酔薬プロポフォールは臨床使用濃度でミトコンドリア依存的な酸素消費を抑制して嫌氣的な代謝を促進することが解った。また酸素消費の抑制は、細胞死を惹起する事が判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------