

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：16101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23792350
 研究課題名（和文） 鉄イオン遊離に関する還元物質の解明と酸化ストレスに対する局所麻酔薬の影響
 研究課題名（英文） The reductive mobilization of iron and the effects of local anesthetics on oxidative stress
 研究代表者
 高石 和美（TAKAISHI KAZUMI）
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
 研究者番号：20325286

研究成果の概要（和文）：NADPH-p450 reductase からの電子供与が、鉄貯蔵タンパクのフェリチンから鉄を還元遊離させた。培養細胞において局所麻酔薬のリドカインとプロカインは、鉄イオンの還元物質の一つである一酸化窒素合成酵素活性を阻害した。

研究成果の概要（英文）：Nucleotide-dependent flavoenzyme (NADPH-p450 reductase) mobilized reductively iron from ferritin. In cultured bovine aortic endothelial cells, lidocaine and procaine, local anesthetics, inhibited the activity of nitric oxide synthase which is one of reducing agents of iron.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学
 科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学
 キーワード：歯科麻酔学

1. 研究開始当初の背景

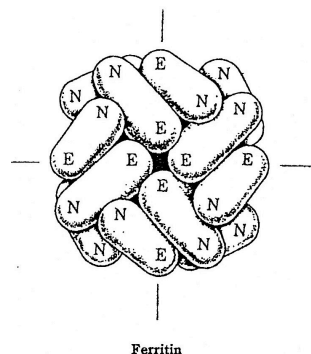
鉄イオンは、生命維持に不可欠で各臓器に必須の金属イオンである。ヒトでは体内に約 3g 存在して 1 日に 1～2mg を体外から吸収しほぼ同量を排出している。体内に取り込まれた鉄は貯蔵鉄と遊離鉄に分類される。そのうち貯蔵鉄は生体内の鉄の 2/3 以上を占め、フェリチンあるいはヘモジデリンとして主に肝臓に存在する。鉄はヘム合成の重要な素材であり、フェリチンから遊離する鉄イオンがヘム合成に関与する。

フェリチンは、24 個のペプチドから成るタンパク質でその中心部に鉄が酸化の状態で貯蔵されている。フェリチンから鉄イオンが遊離するには、鉄が還元されて二価鉄になる必要がある (Crichton RR, et al, Eur J Biochem,

164 (3), 485-506, 1987)。しかし、フェリチンから鉄イオンが遊離する際の機序については不明な点が多い。

過去

の報告によると、鉄を還元する物質として、FMN, FAD, dihydrolipoate, xanthine oxidase, O₂⁻などが報告されている。著者らは様々な手法を用いて一酸化窒素 (Nitric Oxide: NO) を測定してきたが、NO も鉄イ



オンの還元物質の一つである。これら還元剤の細胞内濃度と鉄イオンの生体内での移動率を考慮すると、他に強力な還元物質が存在すると考えられ、広く生体内に存在する NADPH-cytochrome P-450 reductase が還元物質の一つであると考えた。NADPH-cytochrome P-450 reductase による電子供与がフェリチン鉄の還元に寄与しているのではないかという仮説をたてて研究を行った。

2. 研究の目的

NADPH-cytochrome P-450 reductase からの電子供与がフェリチン鉄の還元に寄与しているという仮説を立証し、局所麻酔薬の酸化ストレスに対する影響を検討するために以下の研究を行った。

- (1) NADPH 存在下、フェリチンに NADPH-cytochrome P-450 reductase を作用させ鉄イオンが遊離するか否かを検討した。
- (2) O_2^- の関与について検討するため SOD を添加し、遊離鉄イオンを定量した。
- (3) 他の報告によると、buffer の pH 低下に伴い鉄イオン遊離は増加することが予想されるため (Funk F, et al, Eur J Biochem, 152(1), 167-72, 1985), 同様の実験系で pH を変化させて、フェリチンからの鉄イオン遊離に対する影響を検討した。
- (4) Cyt C からの電子供与による鉄イオンの遊離を検討した。
- (5) Ferricyanide からの電子供与による鉄イオンの遊離を検討した。
- (6) NO 合成酵素 (NO Synthase: NOS) の鉄イオン遊離に関する影響を検討した。
- (7) 培養細胞を用いて局所麻酔薬が NOS 活性に与える影響を検討した。

3. 研究の方法

- (1) 20mM phosphate buffer (3ml, pH 7.4) 中にフェリチン ($2 \mu M$), Batho-phenanthroline ($20 \mu M$), NADPH-cytochrome P-450 reductase ($10 \mu g$) を添加した。Batho-phenanthroline は、二価鉄に結合して赤橙色キレートを形成することから鉄の定量試薬として用いられている (D. Blair, et al, Talanta, 7, 163, 1961)。NADPH ($100 \mu M$) を添加し攪拌後、分光光度計 (日立 U-3900) により 535nm で吸光度を real time で測定した。10 分間の吸光度の変化量を求め、下式により遊離した鉄イオンの濃度を求めた。

$$\epsilon_{535} = 22.1 \times 10^{-3} M/cm$$

- (2) 1 の実験系に SOD ($10 \mu M$) を添加し遊離鉄イオンを定量した。
- (3) 20mM phosphate buffer (3ml, pH 6.4) を使用し、同様の実験を行った。
- (4) 同様の実験系において、Cytochrome C ($6.7 \mu M$) または Ferricyanide ($2mM$) を添加して遊離鉄イオン量を比較した。
- (5) 同様の実験系において NOS を作用させ遊離鉄イオンを定量した。
- (6) 仔牛大動脈血管内皮細胞を培養し、NOS 活性に対するリドカイン ($1 nM-1mM$) とプロカイン ($1 nM-1mM$) の影響を検討する。NOS 活性の指標として、NO/ O_2^- assay (Kelm et al., 1997) を用いて NO 産生量を測定した。

4. 研究成果

20mM phosphate buffer (3ml, pH 7.4) 中にフェリチン ($2 \mu M$), Batho-phenanthroline ($20 \mu M$), NADPH-cytochrome P-450 reductase ($10 \mu g$), NADPH ($100 \mu M$) を添加し、分光光度計により 535nm で吸光度を測定した (図 1)。

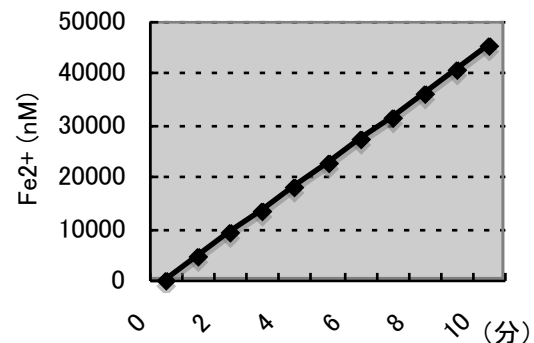


図1

10 分間の吸光度の変化量を求め、 $\epsilon_{535} = 22.1 \times 10^{-3} M/cm$ により遊離した鉄イオンの濃度を求めた。その結果、 $2.71 mM$ の Fe^{2+} が遊離した。[Fe[CN] $_6$] を含む鎖塩であるフェリシアンイドを添加すると、 Fe^{2+} 遊離は増加した ($8.58 mM$)。cytochrome-C を添加すると、 Fe^{2+} 遊離はより増加した ($34.29 mM$) (図 2)。同様の実験系に SOD ($10 \mu M$) を添加すると、影響がみられなかった ($2.55 mM$)。20mM phosphate buffer (3ml, pH 6.4) を使用し同様の実験を行った。pH 7.4 と比較して、 Fe^{2+} の遊離が増加した ($3.23 mM$)。

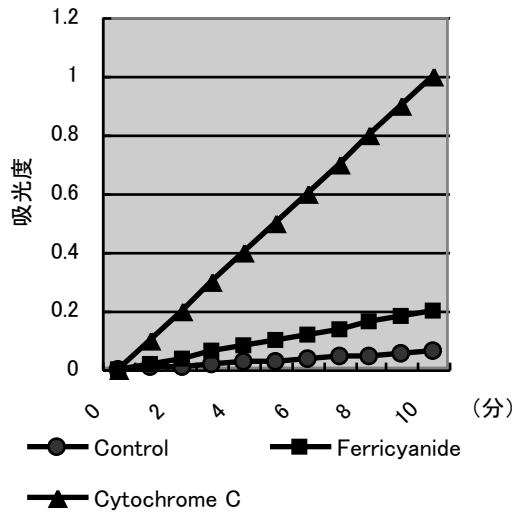


図2

NADPH-cytochrome P-450 reductase による鉄イオンの還元について考えられる反応経路を下記に示す (図3)。

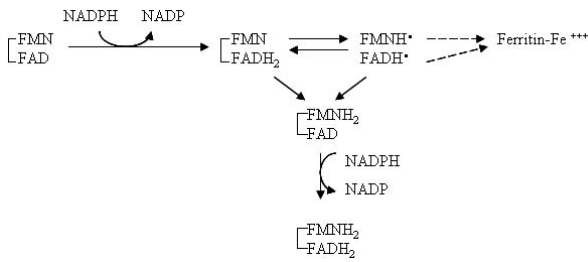


図3

同様の系で誘導型一酸化窒素合成酵素 (NOS2) がフェリチンからの鉄イオン遊離に対して与える影響について検討した。その結果, NOS2 存在下で鉄イオン遊離が増加した (図4)。

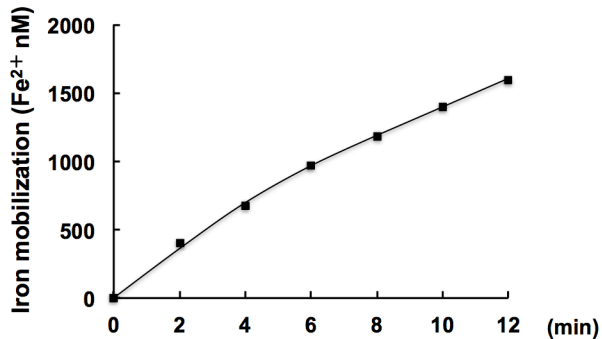


図4

これは, NOS の基質である L-アルギニンを加えることにより影響を受けなかった。

さらに, これらによる鉄イオン遊離は SOD を添加することで影響を与えなかった。

また, 培養血管内皮細胞を使用し, 産生された NO を測定した。ブラディキニンとアセチルコリンによって内皮型一酸化窒素合成酵素 (NOS3) を刺激した細胞において, 局所麻酔薬のプロカインとリドカインは NO 産生を抑制した (図5)。

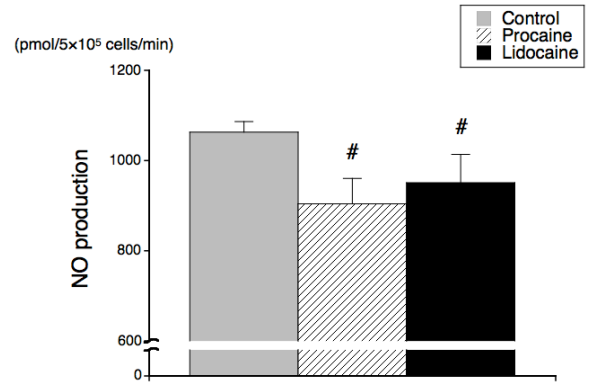


図5

リポポリサッカライドと IL-1 β で NOS2 を刺激した細胞において, プロカインとリドカインは NO 産生を抑制した (図6)。

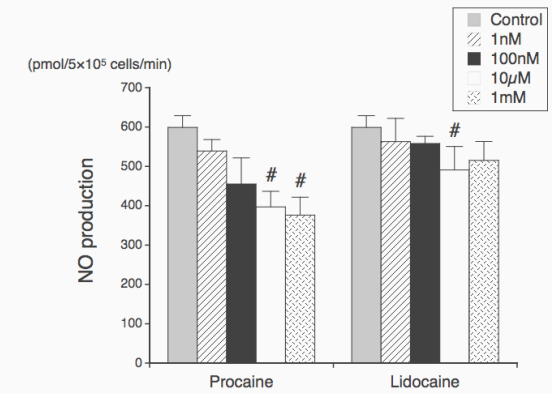


図6

以上から, 鉄貯蔵蛋白からの鉄イオン遊離には, NADPH-cytochrome P-450 reductase および NOS2 が還元物質として関与することが明らかとなった。培養細胞において, NOS3 および NOS3 により産生される NO は, 局所麻酔薬に抑制され, 酸化ストレスに対する局所麻酔薬の関与が示唆された。

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)

(1) Takaishi K, Kitahata H, Kawahito S; Local anesthetics inhibit nitric oxide production and L-arginine uptake in cultured bovine aortic endothelial cells. *European Journal of Pharmacology* 704, 2013, 58-63. 査読有
DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.02.014

(2) Soga T, Kawahito S, Oi R, Kakuta N, Katayama T, Wakamatsu N, Takaishi K, Yamaguchi K, Izaki H, Kanayama H, Kitahata H, Oshita S; Recent less-invasive circulatory monitoring during renal transplantation. *The Journal of Medical Investigation* 60(1, 2), 2013, 159-163. 査読有

(3) Kawahito S, Kawano T, Kitahata H, Oto J, Takahashi A, Takaishi K, Harada N, Nakagawa T, Kinoshita H, Azuma T, Nakaya Y, Oshita S; Molecular mechanisms of the inhibitory effects of clonidine on vascular adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Anesthesia Analgesia* 113(6): 1374-1380, 2011. 査読有
2011.12.1

(4) Kawano H, Hamaguchi E, Kawahito S, Tsutsumi YM, Tanaka K, Kitahata H, Oshita S; Anaesthesia for a patient with paraneoplastic limbic encephalitis with ovarian teratoma: relationship to anti-N-methyl-D-aspartate receptor antibodies. *Anaesthesia* 66(6): 515-518, 2011. 査読有
2011.6.1.

[学会発表] (計 2 件)

(1) Mita N, Kawahito S, Takaishi K, Kitahata H, Oshita S; Impact of the newly developed, next-generation artificial endocrine pancreas. *American Society of Anesthesiologists, Annual Meeting 2012, October 16, 2012, Walter E. Washington Convention Center (the United States of America).*

(2) Takaishi K, Kawahito S, Nakamura D, Tatsuishi T, Eguchi S, Kitahata H; The effects of intravenous anesthetics on the release of vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Euroanaesthesia 2012, June 1-4 2012, Palais des Congres de Paris (France).*

[図書] (1 件)

(1) Kitahata H, Kawahito S; Contrast Echo Method, Transesophageal echocardiography 2nd edition, Chapter 21: Transesophageal Echocardiography 2nd edition, Edited by Ryozo Omoto, Steven Konstadt, and Kazumasa Orihashi, Shindan-to-Chiryosya, Tokyo
2012, p354-369
2012.11.30

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高石 和美 (TAKAISHI KAZUMI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：20325286

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

安藝 謙嗣 (AKI KENJI)
徳島文理大学・研究科学研究所・教授
研究者番号：20035405

北畑 洋 (KITAHATA HIRSOHI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：60161486