

令和元年6月20日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10508

研究課題名(和文) 局所麻酔薬の神経毒性のメカニズム: ナノ磁性体を用いた探索研究

研究課題名(英文) Lidocaine binding assay to investigate the toxicity of lidocaine

研究代表者

石田 高志 (Ishida, Takashi)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：60531952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：リドカイン毒性のメカニズムを解明するために、FGビーズを用いたリドカイン結合蛋白の網羅的探索を行った。リドカイン固定化磁性ビーズを作成し、HeLa細胞破碎液を用いてリドカインに結合するタンパクの探索を行った。抽出したタンパクに対しウェスタンブロットを行ったところ40, 50, 60 kDaでバンドを認めた。特異的な結合の探索を行うために競合阻害を行ったが競合的に阻害されるバンドは認めなかった。以上の結果より、本研究で認められたバンドは非特異的に結合した結果であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、リドカインの毒性のメカニズムを明らかとすることを目的として研究を行った。リドカイン結合磁性ビーズを用いてリドカインの結合するタンパクを探索した。この研究により、数種類のタンパクがリドカインに結合することが明らかとなった。これらのタンパクのうち特異的に結合するものを調べたが、特異的に結合するタンパクを見つけるには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the protein binding site of lidocaine to elucidate the target of the lidocaine toxicity. Lidocaine and FG beads were immobilized for using as probe of lidocaine binding protein. Lysate of Hela cells was mixed with the probe and the fractions were corrected to western blotting for detection of the receptor. Several bands were detected at 40 kDa, 50 kDa, and 60 kDa in the wester blotting. However, affinity of the lidocaine binding probe was very low and the specific binding could not be detected.

研究分野：麻酔科学

キーワード：局所麻酔薬 毒性

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な手術の周術期鎮痛法に区域麻酔が盛んに用いられ、局所麻酔薬（局麻薬）の重要性が増している。しかし、局麻薬は決して安全な薬物ではなく、中枢・局所の神経毒性が知られているにも関わらずその機序の詳細はいまだ明らかになっていない。

局麻薬は血中濃度が高くなると痙攣を引き起こすだけでなく、痙攣を起こさないレベルの血中濃度でも海馬や扁桃体の神経細胞に形態学的異常を引き起こす (Vabessa et al., *Life Sciences* 2007)。さらに、脊髄くも膜下や硬膜外に局麻薬を投与した際に馬尾症候群や一過性神経症状が報告されており、対麻痺などの重篤な障害も報告されている (Wu et al., *Reg Anesth Pain Med*, 2004)。これらの中枢・局所神経毒性は局麻薬による神経細胞のアポトーシスが原因と考えられている (Johnson et al. *Anesthesiology* 2004)。

局麻薬による神経障害は様々な実験モデルで示されおり、薬剤の濃度、薬剤の暴露時間が関与し (Myers et al., *Anesthesiology*, 1986)、局麻薬のナトリウムチャンネル阻害作用は直接は神経障害に関与していないことが示されている (Sakura et al., *Anesth Analg*, 1995)。リドカインは局麻薬の中で神経毒性について最も研究されている薬剤である。リドカインによる神経障害の機序として細胞膜への直接的な破壊作用 (Kanai et al., *Anesth Analg*, 2000)、細胞内カルシウム濃度の上昇 (Gold et al., *J Pharmacol Exp Ther*, 1998)、アポトーシス (Boselli et al., *Anesth Analg*, 2006; Werdehausen et al., *Anesthesiology* 2007)などが考えられている。しかし、神経障害を起こす起点や経路の詳細、局麻薬の作用部位については明らかとなっていない。神経細胞のアポトーシスの原因の一つに Transient receptor potential vanilloid type-1 (TRPV1) の活性化がある。TRPV1 の活性化により、細胞内へ Ca^{2+} の流入が起き、p38 MAPK が活性化されアポトーシスが誘導されることが知られている (Lee et al., *Cancer Lett.*, 2000)。リドカインも TRPV1 を活性化することが知られており、この経路によりアポトーシスを誘導している可能性がある。アポトーシスは様々な経路で起こりうるが、いずれも膜タンパク、ミトコンドリア、核内タンパクなどのタンパクにリガンドが結合することで細胞内伝達系が活性化し誘導される。局麻薬が結合するアポトーシスの起点となるタンパクを同定できれば局麻薬の神経障害を予防する方法を開発できる。

従来、局麻薬のような低分子が結合するタンパクを網羅的に調べることは困難であったが、機能性ナノ磁性微粒子を用いて薬剤の標的となるタンパクを同定する手法が近年開発された (Nishio et al., *Colloids Surf. B.*, 2008)。この手法を用いて様々な領域で薬剤の標的となるタンパク質が同定され、薬剤の作用や副作用のメカニズムが明らかとなってきた (Uga et al., *Mol Pharmacol*, 2006; Ito et al., *Science*, 2010)。本研究でもこの手法を用いれば局麻薬が結合する全てのタンパクを網羅的に探索でき、その中から局麻薬の毒性に関与しうるタンパクを同定することができる。アポトーシスの起点となるタンパクが明らかとなればその経路も明らかとなり、アポトーシスの経路を阻害し神経毒性の予防研究を行い、臨床での神経毒性予防法が確立できる可能性がある。

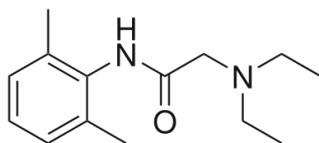
2. 研究の目的

本研究ではリドカインが結合する標的タンパクの中からアポトーシスに関与する蛋白を明らかにし、リドカインが中枢・末梢で神経毒性を起こすメカニズムを明らかとすることを目的とした。リドカインの中枢・末梢神経毒性のメカニズムが明らかとなれば、その機序を阻害することで神経毒性の予防が行えるか検討を行うことを目的とした。

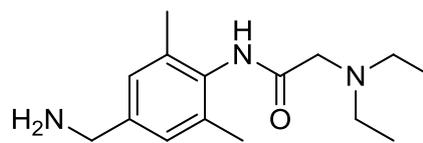
3. 研究の方法

(1) リドカイン固定化ビーズの作成

リドカインの非活性部位にアミド基を結合させた薬剤を作成し、磁性ビーズを固定化させる。リドカイン固定化ビーズの薬効および毒性を評価するために、磁性ビーズを固定化する部位にメチル基を結合させたリドカインを作成し、以下の実験で用いる (図 1)



リドカイン



リドカインアミノ化誘導体

図 1 リドカインアミノ化誘導体

(2) リドカイン固定化ビーズの作用評価

ラットくも膜下にカテーテルを留置し、カテーテルよりくも膜下にリドカイン、メチル基結合リドカイン、溶媒をそれぞれ投与し、足底への機械刺激逃避閾値、下肢運動麻痺の程度を評価する。

(3) リドカイン固定化ビーズによる結合タンパク探索

HeLa 細胞を用いて Dignam 法にて細胞破碎液を作成する。100 mM KCl バッファーにて調整した細胞破碎液を遠心分離し不溶物を除去する。遠心分離した細胞破碎液とリドカインを固定化したビーズを混合し、ローテーターにて攪拌しながら結合反応を行なう。結合反応後、混合液の磁気分離を行いバッファーにより洗浄を行う。1 M KCl バッファーを用いて溶出させた後、上清を回収し加熱処理を行なう。溶出サンプルを電気泳動し結果を解析する。単離されたタンパク質の中からアポトーシスへの関与が示唆されるタンパク質を同定する。

(4) リドカイン固定化ビーズの特異的結合の探索

前実験より網羅的に抽出されたタンパクの中からより特異的にリドカインに結合しているタンパクを抽出するために競合阻害、競合溶出実験を行なう。これにより得られたタンパクを候補タンパクとしてアポトーシスに關与するタンパクの同定を行う。

4. 研究成果

(1) リドカイン誘導体の作成

リドカイン誘導体を作成し、磁性ビーズを結合させることに成功した。

(2) リドカイン誘導体の薬効

ラットくも膜下にリドカイン、リドカイン誘導体、溶媒を投与したところ、リドカイン、リドカイン誘導体では投与 5 分後から 30 分後まで歩行障害、運動麻痺を認め、投与 45 分後まで足底機械刺激逃避閾値の上昇を認めた。溶媒投与群では運動麻痺は認めず、投与前と比べ機械刺激逃避閾値の上昇は認めなかった。

以上の結果より、リドカイン誘導体はリドカインと同等の薬理学的作用を有していることが明らかとなった。

(3) リドカイン誘導体結合タンパクの探索

リドカイン誘導体が結合するタンパクを探索するために HeLa 細胞から抽出を行った HeLa 細胞破碎液を用いて研究を行った。リドカイン誘導体に磁性ビーズを結合させ、HeLa 細胞破碎液と反応させ結合蛋白の抽出を行いウエスタンブロットを行ったところ、図 2 のように薬剤溶出、塩溶出どちらでも 60 KDa, 50 KDa, 40 KDa 付近を主とした多数の結合タンパクのバンドを認めた。

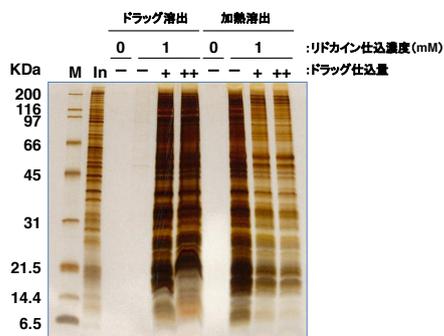


図 2. リドカイン結合タンパク

以上の結果より、リドカイン誘導体が様々なタンパクに結合することが明らかとなったが、ターゲットタンパクの絞り込みには至らず、より特異的な結合を示すタンパクを探索するためにリドカインによる競合阻害実験を行うこととした。

(4) 競合阻害実験

リドカイン誘導体がより特異的に結合するタンパクを探索するために、リドカイン誘導体に磁性ビーズを結合させた化合物とリドカインを加え、リドカインによって競合的に結合が阻害されるタンパクの同定を行った(図3)。その結果、リドカイン濃度を上昇させても結合蛋白に変化はなく特異的な結合が起こるタンパクを明らかとすることができなかった。リドカイン誘導体の結合するタンパク量が過多であることが一因と考えられたため、リドカイン誘導体濃度、細胞破碎液濃度の調整を行ったが、結果は同様であった。

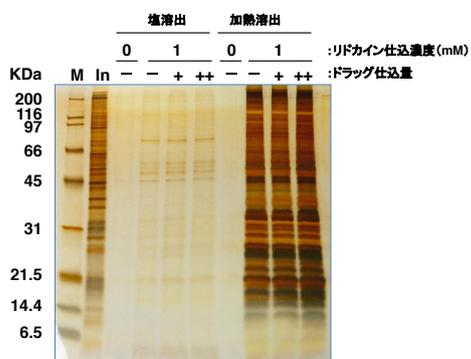


図3 リドカイン結合蛋白競合阻害

以上の結果より、本研究で認められたリドカイン誘導体が結合するタンパクは特異的な結合により得られたタンパクである可能性は低いと考えられた。リドカインの毒性に関しても非特異的に作用することで毒性を表している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Ishida T, Tanaka S, Sakamoto A, Hirabayashi T, Kawamata M: Plasma ropivacaine concentration after TAP block in a patient with cardiac and renal failure. Local Reg Anesth 11: 57-60, 2018.
- ② Ishida T, Tanaka S, Sekiguchi T, Sugiyama D, Kawamata M: Spinal nociceptive transmission by mechanical stimulation of bone marrow. Mol Pain 12: 1-15, 2016
- ③ Kozuka Y, Kawamata M, Furue H, Ishida T, Tanaka S, Namiki A, Yamakage M: Changes in synaptic transmission of substantia gelatinosa neurons after spinal cord hemisection revealed by analysis using in vivo patch-clamp recording. Mol Pain 12: 1-14, 2016.

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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、研究者個人に帰属されます。