

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591978

研究課題名（和文） リドカインの腫瘍細胞増殖抑制および致死機序の解明

研究課題名（英文） The mechanisms of lidocaine induce apoptosis in cancer cells

研究代表者

鬼塚 信 (ONIZUKA SHIN)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20264393

研究成果の概要（和文）：腫瘍細胞におけるリドカインのアポトーシス誘導機序や局麻薬の種類による効果の違いは不明である。そこで、各局麻薬のアポトーシス誘導に関して培養腫瘍細胞（HL60：ヒト骨髄性白血病細胞）を用いて比較した。結果：リドカインは臨床使用濃度以下から HL60 細胞にアポトーシスを誘導することを観察した。リドカインなどの局所麻酔薬の暴露で、細胞内が著明にアルカリ化するとともに、ミトコンドリアも脱分極した。これらの局麻薬による細胞内アルカリ化を酢酸やプロピオン酸などの弱酸で中和すると、ミトコンドリアの脱分極やアポトーシスは著明に抑制されたことから、局麻薬によるアポトーシス誘導機序の一因は細胞内アルカリ化であると結論した。

研究成果の概要（英文）：BACKGROUND: Depolarization of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$), one of the markers of mitochondrial failure, is regulated by the proton electrochemical gradient (ΔH^+). Therefore, intracellular pH ($[pH]_{in}$) and mitochondrial pH ($[pH]_m$) are important factors for modifying $\Delta\psi_m$. However, the effects of local anesthetics on $[pH]_{in}$ and $[pH]_m$ are unclear. To investigate mitochondrial responses to local anesthetics, we simultaneously measured $[pH]_m$ and $[pH]_{in}$, along with mitochondrial membrane potential. Our study demonstrated that uncharged (base) forms of local anesthetics induce mitochondrial membrane potential depolarization. One of the causes is intracellular and mitochondrial alkalization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：麻酔学

1. 研究開始当初の背景

【本研究に関連する国内・国外の研究動向および位置づけ】

局所麻酔薬は、神経ブロックや硬膜外麻酔あるいは脊椎麻酔等に用いられている。しかし、局所麻酔薬については、神経毒性を示すこと

が報告された (Drasner et al. Reg Anesth Pain Med 2002; 27: 576-80)。この原因として、ナトリウムチャンネル遮断によるアポトーシスが誘発されるという報告 (Isomoto et al. J pharmacol Sci 2006;101:318-24)、ミトコンドリアが障害されアポトーシスが誘発されるという報告 (Werdehausen et al. Anesthesiology 2007;104:136-43)、MAPキナーゼなどの酵素に特異的に作用するという報告 (Lirk et al. Anesthesiology 2006;104:1266-73)、DNA を脱メチル化し、遺伝子発現に影響するという報告 (Villar-Garea et al. Cancer Res 2003;63:4984-9) など多岐に及ぶ。この局所麻酔薬の細胞毒性を用いて、癌細胞自体を殺傷しつつ疼痛緩和も行える可能性がある。

【応募者のこれまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯】

研究代表者は、リドカインが、細胞毒性を有することを研究してきた (Onizuka et al. Anesthesiology 2005;102:353-63)。この過程で、Hela あるいは HL-60 といった腫瘍細胞において、リドカインが臨床使用濃度 (1% リドカイン=40mM) 以下、すなわち 5mM 程度で、これら腫瘍細胞にアポトーシスを誘導し (図 1、2) 死細胞を増加させることを見いだした (図 3)。

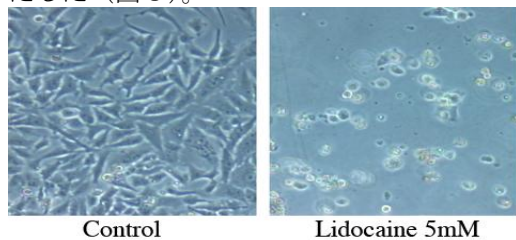


図 1 : 5mM リドカイン 6 時間の暴露でアポトーシス様の形態的变化を伴う細胞死を誘発した Hela 細胞(右図)。

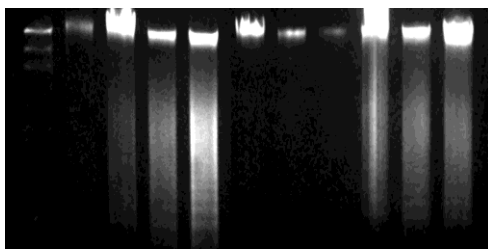


図 2 : HL-60 細胞における局所麻酔薬による DNA の断片化 (フラグメンテーション) およびラダーリング。これらはアポトーシスに特徴的な現象である。

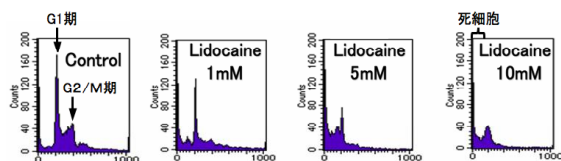


図 3 : HL-60 細胞をエタノールで固定後、ヨウ化プロビジウムで染色し、フローサイトメトリーで測定した。リドカインの 6 時間の暴露で G1 期および G2/M 期 (DNA 合成期) の細胞数は濃度依存性に減少し、死細胞数は有意に増加した。

2. 研究の目的

局所麻酔薬は、アポトーシスを誘導することで腫瘍細胞を致死させるということが示唆された。しかし、局所麻酔薬の種類、濃度、暴露時間の違いによるアポトーシス誘導率の変化、アポトーシスの誘導経路、そしてアポトーシス誘導の原因に関して不明な点が多い。

すなわち、以下の 3 点を研究期間内に明らかにする。

(1) 局所麻酔薬の腫瘍細胞におけるアポトーシス誘導を明確にする。

選択した腫瘍細胞は、神経細胞と違いナトリウムチャンネルが発現しておらず、ナトリウムチャンネルを介したアポトーシスを除外できる。リドカインの誘导体である QX-314 は荷電型で、細胞膜を通過しない。一方、ベンゾカインは非荷電型であり細胞膜透過性が高い。このような細胞膜透過性などの性状の違いによるアポトーシス誘導の違いを検討する。

(2) 局所麻酔薬の腫瘍細胞におけるアポトーシス誘導経路を明確にする。

アポトーシスにはミトコンドリア経路および細胞死受容体経路などの経路がある。それぞれのカスパーゼ活性を測定することで局所麻酔薬がいずれの経路でアポトーシスを誘導しているのか検討する。

(3) 局所麻酔薬の腫瘍細胞におけるアポトーシス誘導の原因を明確にする。

局所麻酔薬によるアポトーシスがミトコンドリア経路で誘導される可能性として、

(I) 塩基型局所麻酔薬の細胞内水素イオン捕捉 (トラッピング) が考えられる。これは、ミトコンドリア電位は水素イオンによって形成されているため、細胞質における水素イオンの減少によりミトコンドリアが脱分極し、結果としてアポトーシス誘導のトリガーとなりうる。

これを証明するために、細胞内 pH とミトコンドリア電位を同時記録する。

3. 研究の方法

1. 要旨

(1) : 局所麻酔薬の濃度、暴露時間によるアポトーシス誘導を測定する。

(2) : 局所麻酔薬の腫瘍細胞におけるアポトーシス誘導経路を解明する。

(3) : 局所麻酔薬の腫瘍細胞におけるアポトーシス誘導の原因を明確にする。

2. 概要

HL-60 細胞(ヒト白血病細胞)、Hela 細胞(ヒト子宮癌由来細胞)を継代培養する。

局所麻酔薬のうちリドカイン、QX-314、ベンゾカイン、テトラカイン、プリピバカインを比較する。

各局所麻酔薬の濃度は臨床使用濃度以下で毒性を發揮する濃度 (0.1、1、5、10 mM) とする。

(1) : 局所麻酔薬によるアポトーシス誘導の測定について

局所麻酔薬によるアポトーシス誘導の程度を DNA の断片化を定量することで評価する。細胞を各濃度の局所麻酔薬を含有した培養液で培養し、経時的に DNA を抽出し、電気泳動した後、臭化エチジウムで染色し、蛍光強度を測定する (図 2)。

局所麻酔薬の細胞周期および細胞致死率への影響をフローサイトメトリーを用いて測定する。

実験 (1) と同条件の細胞をエタノールで固定後、ヨウ化プロピジウムで染色し、フローサイトメトリーで細胞周期および細胞致死率を測定する (図 3)

(2) : 局所麻酔薬の腫瘍細胞におけるアポトーシス誘導経路について

局所麻酔薬により誘導されるアポトーシスがどの経路によるものかを検証するため、それぞれのカスパーゼ活性を測定する。カスパーゼ活性の測定には、合成基質法で直接カスパーゼ活性を測定する方法およびウェスタンブロット法でカスパーゼの前駆体および活性体の蛋白量の変化を測定する。 図 4 図 4 : HL-60 のカスパーゼの前駆体および活性体の蛋白量をウェスタンブロット法で測定した。リドカイン暴露でカスパーゼ 9、8、3 の前駆体は減少し、活性体は増加した。すなわち、それぞれのカスパーゼの活性化が示唆された。

(3) : 局所麻酔薬の腫瘍細胞におけるアポトーシス誘導の原因の解明について

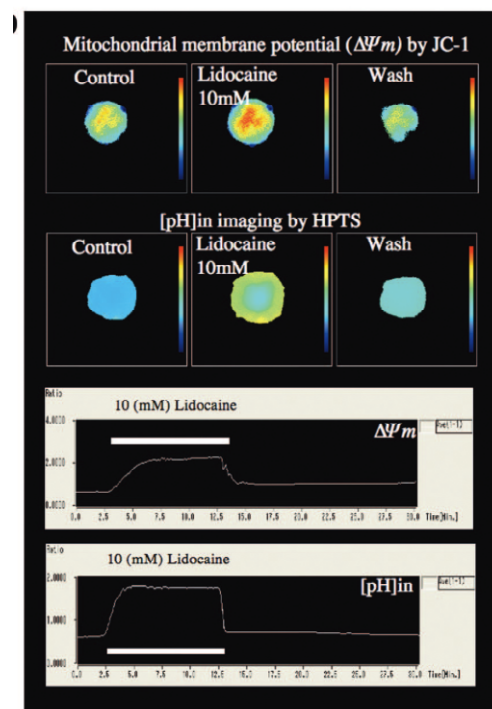
(I) 塩基型局所麻酔薬の細胞内水素イオンの捕捉によるアポトーシス誘導の検証。

ミトコンドリア経路でアポトーシスが誘導される可能性として塩基型局所麻酔薬の細胞内水素イオンの捕捉が考えられる。細胞内水素イオンが局所麻酔薬に捕捉されると水素イオンの減少により細胞内がアルカリ化されることで、ミトコンドリアが脱分極し、アポトーシスが誘導されると予想する。これを証明するために、細胞内 pH とミトコンドリア電位を同時記録する。細胞内 pH を蛍光色素 HPTS で、ミトコンドリア電位を蛍光色素 JC-1 で同時に測定し、細胞内 pH とミトコンドリア電位の相関を検証する。

4. 研究成果

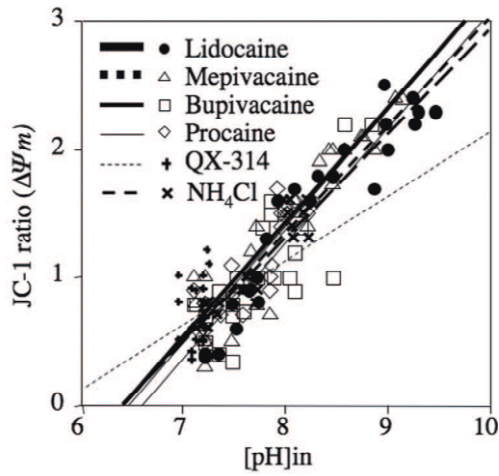
リドカインやプロカインなどの局所麻酔薬で、腫瘍細胞の増殖は抑制され、アポトーシスが誘導されることがわかった。さらに、ミトコンドリア経路のアポトーシス誘導のキエンザイムであるカスパーゼ 9、カスパーゼ 3 の酵素活性を高めたことで、局所麻酔薬によるアポトーシスがミトコンドリア経路である可能性が高いことがわかった。

(Onizuka et al. J Anesth Clinic Res. 2011; 2:116-21)。そこで、細胞内 pH とミトコンドリア電位を同時測定したところ、局所麻酔薬は、細胞内 pH をアルカリ化するとともにミトコンドリア電位を脱分極させた (図 4)。そして、細胞内 pH とミトコンドリア電位は相関した (図 5)。これらの結果から、局所麻酔薬によるミトコンドリア経路のアポトーシス誘導機序としてリドカインをはじめとした局所麻酔薬は塩基で細胞膜を通過し、水素イオンと結合してカチオンとなりナトリウムチャンネルを遮断するが、この過程で水素イオンが局所麻酔薬に補足されることで細胞内は極度のアルカローシスとなる。ミトコンドリアは、電子伝達系で水素イオンの濃度勾配を形成する、すなわち、呼吸し、ATP を産生しているが、局所麻酔薬はこの水素イオンの濃度勾配を小さくすることで、電子伝達系を阻害し、しいてはミトコンドリアストレスそしてミトコンドリア経路のアポトーシスを誘導することを解明した (Onizuka et al. Anesth Analg. 111:775-83, 2010)。

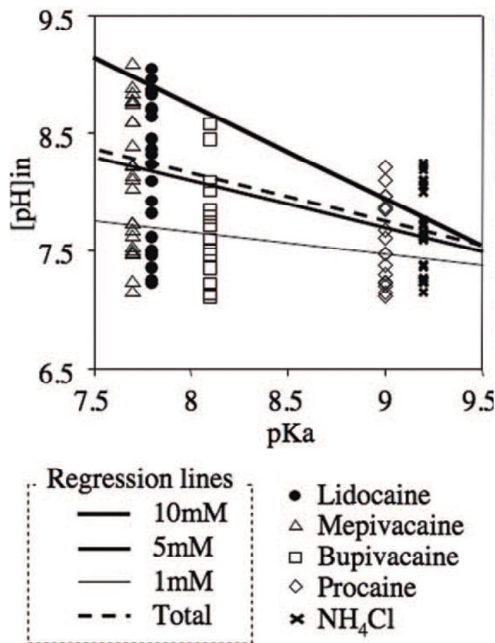


(図 4) : ラット DRG 細胞をミトコンドリア電位依存性蛍光プローブ JC-1 および pH 反応

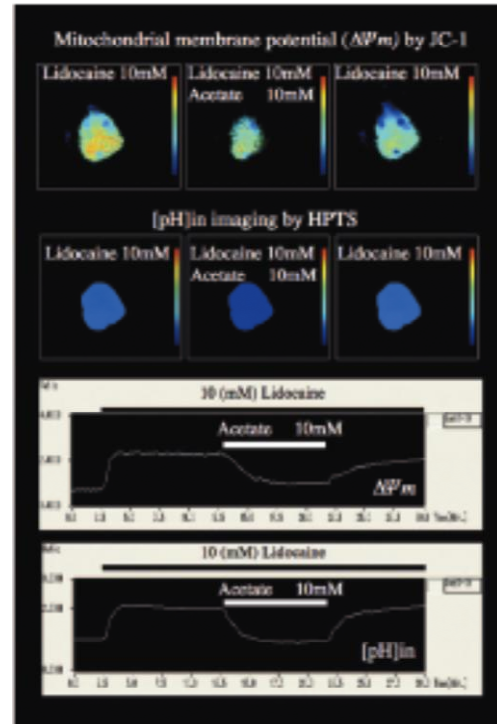
性蛍光プローブ HPTS で同時測定した。リドカインの暴露で細胞内 pH はアルカリ化するとともに、ミトコンドリア電位は著明に脱分極した。



(図5) : この細胞内 pH とミトコンドリア電位はそれぞれの局所麻酔薬において相関した。



(図6) : とくに、pKa が pH7.4 に近いリドカインやメピバカインなどの局所麻酔薬ほど、より強い相関が見られた。



(図7) : リドカインによるミトコンドリア電位の脱分極は、弱酸で、細胞内 pH のアルカリ化を中和した場合には、ミトコンドリアの脱分極も抑制された。このことは、リドカインによるミトコンドリア電位の脱分極は、細胞内 pH の増加 (アルカリ化) に起因することを裏付けている。

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 6 件)

- ① Onizuka S, Tamura R, Yonaha T, Oda N, Kawasaki Y, Shirasaka T, Shiraishi S, and Tsuneyoshi I. Clinical dose of lidocaine destroys cell membrane and induces both necrosis and apoptosis in an identified Lymnaea neuron. J Anesth (査読有) 26: 54-61, 2012.
- ② Onizuka S, Shiraishi S, Tamura R, Yonaha T, Oda N, Kawasaki Y, Syed NI, Shirasaka T, and Tsuneyoshi I. Lidocaine treatment during synapse reformation periods permanently inhibits NGF-induced excitation in an identified reconstructed synapse of Lymnaea stagnalis. J Anesth (査読有) 26: 45-53, 2012.
- ③ Onizuka S, Yonaha T, Tamura R, Hosokawa N, Kawasaki Y, Kashiwada M, Shirasaka T, Tsuneyoshi I. Capsaicin indirectly

suppresses voltage-gated Na⁺ currents through TRPV1 in rat dorsal root ganglion neurons. Anesth Analg (査読有) 112: 703-9, 2011.

- ④ Onizuka S, Yonaha T, Tamura R, Kasiwada M, Shirasaka T, Tsuneyoshi I. Lidocaine depolarizes the mitochondrial membrane potential by intracellular alkalization in rat dorsal root ganglion neurons. J Anesth (査読有) 25: 229-39, 2011.
- ⑤ Onizuka S, Yonaha T, Tsuneyoshi I. Local Anesthetics with High Lipophilicity are Toxic, While Local Anesthetics with Low p_{ka} Induce More Apoptosis in Human Leukemia Cells. J Anesthe Clinic Res (査読有) 2: 116-21, 2011.
- ⑥ Onizuka S, Tamura R, Hosokawa N, Kawasaki Y, Tsuneyoshi I: Local anesthetics depolarize mitochondrial membrane potential by intracellular alkalization in rat dorsal root ganglion neurons. Anesthesia and analgesia (査読有) 111: 775-83, 2010.

[学会発表] (計4件)

- ① 鬼塚 信, 田中信彦, 與那覇 哲, 田村隆二, 恒吉勇男: 培養腫瘍細胞からの腫瘍致死因子 (TNF- α) の分泌. 日本麻酔科学会第58回学術集会, 2011年5月19日, 神戸.
- ② 鬼塚 信, 田中信彦, 與那覇 哲, 田村隆二, 恒吉勇男: 腫瘍細胞分泌液は, ラット脊髄神経節ニューロンにおいて電位依存性ナトリウムチャンネル NaV1.3 の発現量を増加する. 九州麻酔科学会第48回大会, 2010年9月25日, 福岡.
- ③ 鬼塚 信, 山下幸貴, 田村隆二, 恒吉勇男: リドカインによるミトコンドリア経路のアポトーシス誘発について: 腫瘍細胞を用いた検討. 日本麻酔科学会第57回学術集会, 2010年6月3日, 福岡.
- ④ 鬼塚 信, 山下幸貴, 田村隆二, 恒吉勇男: リドカインはヒト白血病細胞にアポトーシスとネクローシスそれぞれを誘発する. 日本麻酔科学会第56回学術集会, 2009年8月18日, 神戸.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼塚 信 (ONIZUKA SHIN)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号: 20264393