

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：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791446

研究課題名（和文） 局所麻酔薬による腫瘍細胞致死機序とその腫瘍特異性に関する研究

研究課題名（英文） Effects of local anesthetics on apoptosis in tumor cells.

研究代表者

田村 隆二（TAMURA RYUJI）

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：40549060

研究成果の概要（和文）：目的：局所麻酔薬のアポトーシス誘導機序および腫瘍特異性は不明である。そこで、リドカインのアポトーシス誘導に関して正常白血球と培養腫瘍細胞（HL60：ヒト骨髄性白血病細胞）を比較した。方法：アポトーシス細胞数は、アネキシンおよびヨウ化プロピジウム（PI）で二重染色し、フローサイトメトリー（FACS）を用いて測定した。

結論：リドカインは、ミトコンドリア活性を抑制することで腫瘍特異的に強力な腫瘍細胞致死作用を有する可能性が示唆された。ミトコンドリアが腫瘍細胞の一弱点であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to clarify the local anesthetics that induce apoptosis or necrosis and their induction-related factors.

Methods: Apoptosis and necrosis were analyzed by double-staining assay with propidium iodide (PI) and annexin-V and were measured by flow cytometry (FACS). DNA fragmentation was used for the analysis of apoptosis.

Conclusion: The results indicate that local anesthetics with high lipophilicity are highly toxic and induce mainly necrosis, while local anesthetics with low pKa induce more apoptosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

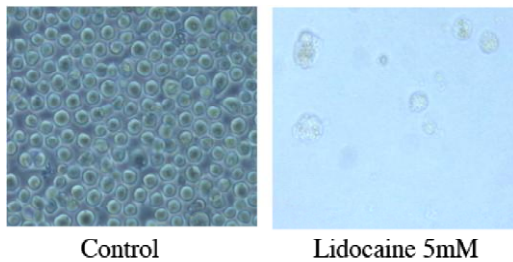
1. 研究開始当初の背景

【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、硬膜外麻酔、脊椎麻酔そして術後鎮痛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) など多岐に及ぶ。この局所麻酔薬の細胞毒性を用いて、癌細胞自体を特異的に殺傷しうる可能性がある。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。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死細胞を増加させることを見いだした (図1)。



ここで注目すべきは、リドカインの暴露で正常白血球と比較して白血病細胞のアポトーシス誘発率が有意に高いことである。この現象は、白血球細胞と正常白血球を混合培養した場合にはより低いリドカイン濃度から観察され、正常白血球の腫瘍免疫能を低下することなく、むしろ相加的に白血病細胞のアポトーシスが誘導される可能性が示唆された。

2. 研究の目的

局所麻酔薬によるアポトーシス誘導の原因、その腫瘍特異性に関して不明な点が多い。すなわち、以下の2点を研究期間内に明らかにしたい。

(1) 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、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。

(2) 局所麻酔薬によるアポトーシス誘導の腫瘍特異性について検討する。

腫瘍細胞は、正常白血球と比較してミトコンドリア経路のアポトーシスが誘導されやすいのかフローサイトメトリーで検証する。その原因について腫瘍細胞はその過剰なエネルギー需要によりミトコンドリア機能に余裕がないと予想する。そこで、ロテノン、

FCCP等のミトコンドリア阻害薬、脱共役剤を用いてミトコンドリア機能不全になる前後でのミトコンドリア膜電位、細胞内 ATP濃度、およびミトコンドリア活性酸素産生量などのミトコンドリア機能とアポトーシスの誘導率を腫瘍細胞と正常白血球とで比較する。

(3) 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点および予想される結果と意義学術的特色は、局所麻酔薬の腫瘍細胞致死機序と腫瘍特異性を証明することである。

独創的な点は、リドカインなどの局所麻酔薬が水素イオンの捕捉によってアポトーシスを誘導するという仮説を証明することである。そして、局所麻酔薬による細胞毒性は腫瘍特異性を有し、その機序として、腫瘍細胞は、正常白血球と比較してミトコンドリア経路のアポトーシスが誘導されやすいという仮説を証明することである。

予想される結果は、リドカインなどの塩基型局所麻酔薬は細胞内水素イオンの捕捉による細胞内アルカリ化でミトコンドリア経路によるアポトーシスを誘導する。正常細胞より、細胞分裂や代謝が旺盛でエネルギー需要の多い腫瘍細胞をより特異的に細胞死へと導くと予想する。

この結果の意義は、腫瘍細胞の弱点を証明するとともにリドカインをはじめとした局所麻酔薬を抗腫瘍剤としての利用することも考えられる。今回の実験で、不死性の腫瘍細胞に腫瘍特異的にアポトーシスを誘発させる機序が検証できれば、新たな抗腫瘍機序あるいは癌治療の展開が期待される。

3. 研究の方法

HL-60細胞(ヒト白血病細胞)を継代培養し、ヒト正常白血球と比較する。

(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。酢酸やプロピオン酸などの弱酸あるいは CCCP やナイジェリシンなどのプロトノフォアで細胞内アルカリ化を中和した場合の細胞内 pH とミトコンドリア電位を測定し、リドカインで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され、ミトコンドリア経路のア

ポトースが誘導されるという仮説を証明する。

(II) 局所麻酔薬がミトコンドリアの膜透過性遷移孔 (permeability transition pore: PTP) を細胞内アルカリ化あるいはカルシウムの増加等で間接的に開口させた場合もアポトース誘導のトリガーとなりうる。これを証明するために、PTP 開口を蛍光色素カルセイン AM (MitoProbe Transition Pore assay kit, Invitrogen 製) で測定する。

局所麻酔薬によるアポトース誘導の腫瘍特異性について検証する。

概要

局所麻酔薬によるアポトース誘導の程度を 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。

局所麻酔薬のアポトース誘導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) と同条件の細胞をアネキシン-V およびヨウ化プロピジウムで二重染色し、フローサイトメトリーでアポトース誘導率を測定する。

局所麻酔薬の腫瘍細胞における主要なアポトース誘導経路を検証する。局所麻酔薬により誘導されるアポトースがミトコンドリア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。

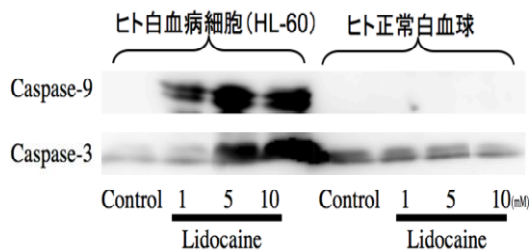


図 2 : HL-60 およびヒト正常白血球において、ミトコンドリア経路によるアポトースに重要なカスパーゼ 9 および 3 の活性体の蛋白量をウェスタンブロット法で測定した。HL-60 においてはヒト正常白血球と比較してリドカイン暴露で有意にカスパーゼ 9、3 の活性体は増加した。すなわち、ミトコンドリア経路によるアポトースを誘導するカスパーゼの活性化が示唆された。

局所麻酔薬のミトコンドリア機能への影響をフローサイトメトリーを用いて測定する。ミトコンドリアの主要な機能は呼吸鎖を介して有害な活性酸素を除去し、生体に必要なエネルギー (ATP) を産生することである。ミトコンドリアの活性酸素除去能をミトコンドリア活性酸素測定用蛍光色素 MitoSOX (Invitrogen 製) で染色し、フローサイトメトリーで測定する。

ミトコンドリアの ATP 産生能をルシフェラーゼ・ルシフェリンを用いた細胞内 ATP 濃度測定キット (ルシフェール 250 セット、キッコーマン社製) で測定し解析する。以上の実験をリドカインだけでなく細胞毒性の強いジブカインやテトラカイン等の局所麻酔薬、ロテノン、FCCP 等のミトコンドリア阻害薬、脱共役剤を用いても同様にミトコンドリア機能不全そしてアポトースが誘導されるのかを腫瘍細胞と正常白血球とで比較検討する。

4. 研究成果

リドカインは臨床使用濃度以下から HL60 細胞特異的にアポトースを誘導することを観察した (図 2)。一方、正常白血球においては、このリドカイン濃度における著明な細胞死は認めなかった。さらに、白血球と HL60 細胞を混合した場合もリドカインは HL60 細胞の死細胞数を選択的に増加した。リドカイン暴露で、HL60 細胞により有意にミトコンドリアの膜電位、活性酸素産生量、カルシウム濃度の増加および細胞内 ATP 濃度の低下が見られた。CCCP などミトコンドリア脱共役剤を用いた実験でもリドカインと同様の結果を得た。

結論 : リドカインは、ミトコンドリア活性を抑制することで腫瘍特異的に強力な腫瘍細胞致死作用を有する可能性が示唆された。ミトコンドリアが腫瘍細胞の一弱点であることが示唆された。

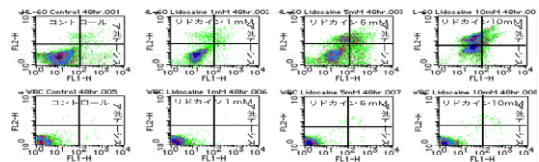


図 3 : 蛍光色素 MitoSOX を用いてミトコンドリア活性酸素産生細胞数をフローサイトメトリーで測定した。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度すなわち活性酸素産生量を示す。リドカインは HL-60 においてはヒト正常白血球と比較して有意に活性酸素産生細胞数を増加した。すなわち、HL-60 細胞はリドカインの暴露でヒト正常白血球と比較してミトコン

ドリア機能不全に陥りやすいことが示唆された。

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5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, Kashiwada 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, 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3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.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 隆二 (TAMURA RYUJI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 40549060