

氏 名	前田 勉
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博士 甲第753号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成28年 3月 10日
学位論文題目	Lidocaine Induces ROCK-Dependent Membrane Blebbing and Subsequent Cell Death in Rabbit Articular Chondrocytes (リドカインはウサギ軟骨細胞において ROCK 依存性の膜ブレブと細胞死を起こす)
審査委員	主査 教授 宇田川 潤 副査 教授 山田 尚登 副査 教授 大路 正人

論文内容要旨

※整理番号	760	(ふりがな) 氏名	まえだ つとむ 前田 勉
学位論文題目	Lidocaine Induces ROCK-Dependent Membrane Blebbing and Subsequent Cell Death in Rabbit Articular Chondrocytes (リドカインはウサギ軟骨細胞において ROCK 依存性の膜ブレブと細胞死を起こす)		
<p>《目的》</p> <p>リドカインを始めとするアミド型局所麻酔薬は整形外科領域において手術や日常診療において広く用いられている。ところが post-arthroscopic glenohumeral chondrolysis (Hansen et al, <i>AJSM</i>, 2007) の 12 症例が報告され、術後鎮痛に使用した局所麻酔薬が軟骨溶解を引き起こす可能性が指摘された。さらには基礎研究の面からもブピバカイン (Chu et al, <i>Arthroscopy</i>, 2006) ならびにリドカイン (Karpie and Chu, <i>AJSM</i>, 2007) により臨床濃度の局所麻酔薬が軟骨細胞の生存率を著しく低下させることが明らかにされた。その後も局所麻酔薬の軟骨細胞毒性に関する基礎研究がなされているものの、その作用機序については依然として定説はない。</p> <p>臨床使用濃度のリドカインを細胞に暴露すると、細胞表面に膜ブレブが形成されることが知られている (Nicolson et al, <i>JCB</i>, 1976)。細胞膜ブレブは、アクトミオシンの活性化により細胞骨格から外れた細胞形質膜が球状に膨隆する現象であり、ROCK (Rho-kinase) の活性化を介する現象である (Mills, <i>JCB</i>, 1998)。われわれはリドカインが ROCK 活性化を介して膜ブレブ現象がおこし、これらが軟骨細胞毒性に関与しているという仮説を立てた。すなわち、本研究は ROCK 活性化がリドカインによる軟骨細胞の膜ブレブ形成や細胞死に関わる可能性について検討することを目的とする。</p> <p>《方法》</p> <p>軟骨細胞の単離</p> <p>日本白色家兎 (2.5~3.5 kg) の両膝・股・肩関節から軟骨切片組織を採取後 1 週間以内に collagenase 処理し、細胞を単離した。単離した細胞は当日中に実験に使用した。</p> <p>細胞形態の観察</p> <p>単離した軟骨細胞をガラス上に散布し、各薬剤を灌流した。細胞形態を光学顕微鏡で観察した。細胞に半球状の細胞膜突出が出現した時点でその細胞はブレブしたと判定し、各時間における膜ブレブ出現率とその推移について検討した。</p> <p>Rho A 活性・カスパーゼ活性の測定</p> <p>単離軟骨細胞を 10 mM リドカインで 20 分間処置した後、sandwich ELISA 法により Rho A 活性を、生物発光アッセイによりカスパーゼ活性を、それぞれプレートリーダーで測定した。</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

(続 紙)

細胞生存率の測定

単離軟骨細胞を 30 mM リドカインで 1 時間処置した後、Live/Dead assay (Life Technologies) で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。生細胞数 (緑) と死細胞数 (赤) を ImageJ (NIH) を用いて数えることで細胞生存率を計測した。

《結果》

3-30 mM のリドカインは濃度依存性に軟骨細胞表面に膜ブレブを発生させた。細胞外 pH が高いほうが膜ブレブの発生は強くなり、これは非イオン型リドカインの濃度に依存していた。ROCK 阻害薬はリドカインによる膜ブレブ発生を完全に抑制した。このことはリドカインによる膜ブレブが ROCK 依存性であることを示唆した。リドカイン (10 mM) により GTP-RhoA 活性が 3.01 ± 0.76 倍 ($N = 5$, $p < 0.001$) に上昇し、これは Rho-ROCK 経路が関与することが示唆されたが、Rho inhibitor-1 は膜ブレブを阻害しなかった ($p = 0.875$)。カスパーゼ活性はリドカイン暴露後 20 分では上昇せず ($p = 0.325$)、また z-VAD-fmk (カスパーゼ阻害薬) が膜ブレブを阻害しなかった ($p = 0.964$) ことから、カスパーゼはリドカインによる膜ブレブに関与していないことがわかった。30 mM リドカインは単離軟骨細胞および *in situ* の軟骨細胞の生存率を低下させた ($p < 0.001$)。ROCK 阻害薬は細胞生存率を有意に改善した ($p < 0.001$)。

《考察》

リドカインは臨床的には 0.5~1.5% (18-55 mM) の濃度で関節内に用いられている。このような高濃度のリドカインは神経をはじめとしてさまざまな細胞に対して有害な作用を及ぼすおそれがあることが知られている。これまでに軟骨細胞以外の細胞にも局所麻酔薬毒性に関する多数の基礎研究がなされており、膜ブレブに関して言及している報告も散見されるが、膜ブレブに関して詳細に検討された論文はない。我々は膜ブレブを引き起こす機序には ROCK 活性化が不可欠であることを示し、さらには ROCK 阻害薬により膜ブレブを抑制することが、リドカインによる細胞毒性を軽減させることを初めて示した。また、リドカインによる膜ブレブが投与後急速に出現し、3mM 以上の濃度で濃度依存性に出現頻度が高くなることを示した。リドカインの中でも特に脂溶性で細胞膜透過性を有する非イオン型リドカイン濃度が膜ブレブ形成の決定因子であることも示した。これらの知見は臨床的には高濃度のリドカインを中性~アルカリ性条件で用いると細胞毒性が増強することを示唆している。軟骨基質や関節液の pH は変形性関節症では酸性化しているものの、若年者では 7.4 に近い。若年者の関節軟骨のほうがリドカインに対する毒性が強くなる恐れがあるかもしれない。

《結論》

- i) 臨床使用濃度のリドカインは単離軟骨細胞に短時間で膜ブレブと引き続いて細胞死を引き起こす。
- ii) ROCK 活性化がリドカインによる膜ブレブに必要である。
- iii) 膜ブレブ抑制がリドカインによる細胞毒性を緩和する。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	760	氏名	前田 勉
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>リドカインなどの局所麻酔薬は整形外科手術や診療で用いられるが、関節内麻酔により軟骨融解症を引き起こす可能性が指摘されている。関節軟骨内の軟骨細胞は増殖能力に乏しく、硝子軟骨組織の再生は現在のところ不可能であるため、軟骨細胞の保護は関節疾患の治療において重要である。一方、臨床使用濃度のリドカイン暴露により、アポトーシスなど細胞死に関連する膜ブレブが細胞表面に形成されることが知られている。膜ブレブはアクチオシンや Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase (ROCK) の活性化を介して生じる現象と考えられている。</p> <p>本研究では、ウサギの関節軟骨を用いてリドカインによる軟骨細胞の膜ブレブ形成や細胞死のメカニズムについて検討し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 臨床使用濃度のリドカインは軟骨細胞において膜ブレブ形成と細胞死を引き起こす。 2) 膜ブレブは非イオン型リドカインにより引き起こされる。 3) リドカインによる膜ブレブ形成には ROCK 活性化が重要である。 4) 膜ブレブ抑制はリドカイン細胞毒性の緩和につながる。 <p>本論文は、リドカインが軟骨細胞毒性を引き起こすメカニズムについて新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 590 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 28 年 1 月 26 日)</p>			