

## (論文博士) (様式 4)

## 学位論文の内容の要旨

鈴木 (原口) 景子

## 主論文

Local anesthetic lidocaine-inducible gene, growth differentiation factor-15 suppresses the growth of cancer cell lines

(局所麻酔薬リドカインにより誘導される GDF-15 遺伝子は癌細胞株の増殖を抑制する)

**Scientific Reports** 12;14520. 2022 年

**Keiko Haraguchi-Suzuki**, Reika Kawabata-Iwakawa, Toru Suzuki, Takashi Suto, Tomonori Takazawa, Shigeru Saito

## 副論文

Local anesthetic lidocaine induces growth suppression of HeLa cells by decreasing and changing of the cellular localization of the proliferation marker Ki-67

(局所麻酔薬リドカインは増殖マーカーKi-67 の減少と局在を変化させることにより、子宮頸癌 HeLa 細胞の増殖を抑制する)

**Genes to Cells** 11; 675-684. 2022 年

**Keiko Haraguchi-Suzuki**, Reika Kawabata-Iwakawa, Toru Suzuki, Takashi Suto, Tomonori Takazawa, Shigeru Saito

【主論文の要旨】 癌は本邦における死因のトップであり、高齢化に伴い患者数は増加している。治療は化学療法や放射線療法、分子標的療法など様々であるが、依然として手術が重要な治療法である。しかし手術は生体にとって大きな侵襲であり、術後、炎症反応が亢進し、免疫能が抑制される surgical stress と言う病態が知られている。近年、手術の麻酔方法が surgical stress の病態に関与し、麻酔薬が癌の生命予後に影響していることが報告された。大規模な後向き臨床研究により、乳癌や前立腺癌において術後鎮痛としてオピオイドよりも局所麻酔薬を使用した群は生命予後が良いことが報告されて以来、癌細胞株を用いた局所麻酔薬の作用に関する基礎研究が行われるようになった。しかし、局所麻酔薬の抗腫瘍効果に関する詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。

本研究は4種の癌細胞株(大腸癌、肝細胞癌、骨肉腫、子宮頸癌)へ0.1~5 mMリドカインを投与し、これら細胞株の増殖が抑制されるかを colony formation assay により検討したところ、リドカイン濃度依存的に増殖が抑制された。リドカインによる増殖抑制効果を解析するために、次世代シーケンサーを用いたRNAシーケンス法 (RNA-seq) により、リドカイン投与後の癌細胞株において、発現量に変化する遺伝子を網羅的に探索した。その結果、癌細胞株に共通して発現上昇が認められる遺伝子として細胞死 (アポトーシス) を誘導する Tribbles homologue 3 (TRIB3) 遺伝子のほか、Growth differentiation factor-15 (GDF-15) 遺伝子を同定した。GDF-15遺伝子はTransforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) スーパーファミリーに属し、様々な生理活性を有している。GDF-15はNSAIDにより誘導される遺伝子NSAID activated gene-1 (NAG-1) とも呼ばれ、NSAIDの投与により大腸癌の発症が抑制されることから、GDF-15は腫瘍抑制作用を持つと言われている。一方で、進行癌ではグリア細胞由来神経栄養因子受容体ファミリーであるGFRAL受容体に作用し、癌性悪液質に関与していることから、GDF-15は癌の進行段階で機能が異なると予想されている。

定量PCR (qPCR) 法によりリドカイン投与後、子宮頸癌HeLa細胞においてGDF-15のmRNAが増加し、RNA-seqの結果と一致してリドカイン濃度依存的にGDF-15遺伝子の発現が促進されていた。

GDF-15は完全型のほか、N末端が切断される成熟型が存在するが、Western Blot法によりリドカインにより誘導されるGDF-15は完全型であることが明らかになった。前立腺間質に存在する完全型GDF-15の減少は前立腺癌の予後不良と相関していることから、完全型GDF-15は腫瘍抑制に重要であると示唆されている。また蛍光免疫染色法により、リドカイン投与後、増加したGDF-15は小胞体のほか、細胞膜にも局在していた。ELISA法とWestern Blot法により増加した完全型GDF-15は細胞外へ分泌され、分泌されたGDF-15のレベルとHeLa細胞の増殖抑制は相関していた。さらに、siRNA法を用いた発現抑制実験により、完全型GDF-15の発現を抑制するとリドカインによるHeLa細胞の増殖抑制効果が低下したことから、リドカイン投与後、GDF-15の発現が誘導されることにより癌細胞株の増殖が抑制されることが明らかになった。

リドカイン投与により癌細胞株の増殖は抑制されるが、HeLa細胞において高濃度 (3 mM) のリドカインを投与するとアポトーシスが誘導された。リドカイン投与後、細胞核においてアポトーシス誘導因子であるTRIB3の発現が増強したが、TRIB3の発現抑制により、リドカインにより誘導されるアポトーシスは減少した。さらに、転写因子C/EBP homologous protein (CHOP) はGDF-15のほか、TRIB3の発現を誘導する。RNA-seqとqPCR法により、リドカイン投与後のHeLa細胞においてCHOPの発現が上昇していたことから、分泌された完全型GDF-15はTRIB3とともに腫瘍抑制効果を発揮していることが示唆された。本研究により、局所麻酔薬リドカインは癌細胞株の増殖抑制効果を有し、新規の癌治療法として発展できる可能性を示した。

**【副論文の要旨】** 麻酔薬は手術において、鎮痛、鎮静などを提供する。術後鎮痛として硬膜外麻酔や末梢神経ブロックなどの区域麻酔に局所麻酔薬を使用することにより癌患者の良好な予後が示唆されているが、そのメカニズムは十分に解明されていない。

本研究ではリドカイン投与後、子宮頸癌HeLa細胞とヒト胎児性腎細胞HEK293T細胞のviability assayを行った。リドカイン投与により、HeLa細胞とHEK293T細胞の増殖はともに抑制されたが、HEK293T細胞と比較し、HeLa細胞は低濃度 (0.3 mM) のリドカインにより効果的に増殖が抑制された。一方で、高濃度 (5 mM) のリドカイン処理ではHeLa細胞と比較し、HEK293T細胞は効果的に増殖が抑制され、癌細胞株と非癌化細胞株ではリドカインに対する感受性が異なっていた。次にリドカインを投与したHeLa細胞において、Ki-67の細胞内局在を免疫蛍光染色法により調べた。Ki-67は活発に増殖している細胞の核に発現し、臨床において癌の生命予後を示唆する重要な増殖マーカーの一つである。リドカイン投与により細胞核に局在するKi-67が減少した一方で、細胞質に局在するKi-67が増加し、リドカイン濃度依存的なKi-67の局在変化を認めた。共焦点顕微鏡を用い詳細な局在を調べたところ、リドカイン投与後、小胞体シャペロンの一つであるGlucose-regulated protein 78 (GRP78) の発現が増強し、細胞質においてKi-67はGRP78と部分的に局在が一致したほか、免疫沈降法によりKi-67とGRP78は結合していることが明らかになった。癌細胞は制御を受けずに増殖するため蛋白質を産生する結果、細胞内の恒常性が失われ小胞体ストレスが生じる。GRP78は小胞体ストレスにおいて重要な役割を果たしており、蛋白質のfoldingや異常蛋白質の分解に寄与している。リドカイン投与によりKi-67が低下するメカニズムとして、小胞体ストレスが関与している可能性が示唆された。さらに、リドカインによる増殖抑制効果を検討するために、フローサイトメーターを用いて解析したところ、リドカインを投与したHeLa細胞はG0/G1期の細胞が増加していた。Ki-67は休止期であるG0期の細胞には発現しておらず、リドカイン投与によりKi-67の発現が低下することと一致する。これまで、局所麻酔薬は細胞死を誘導することで腫瘍抑制効果を持つという報告があったが、本研究により、リドカイン投与後Ki-67が低下し、休止期の細胞が増加することにより増殖が抑制されるメカニズムが明らかになった。