

### C. 研究結果

昨年度までの PCVG 細胞を用いた探索研究により、六君子湯はラット PC12 細胞内の cAMP を増加させる可能性が示唆された。そこで、免疫学的測定法により細胞内 cAMP を直接測定したところ、六君子湯は用量依存的に PC12 細胞内 cAMP 濃度を上昇させるとともに、アデニルシクラーゼの活性化薬である forskolin の作用を増強した (図 1)。

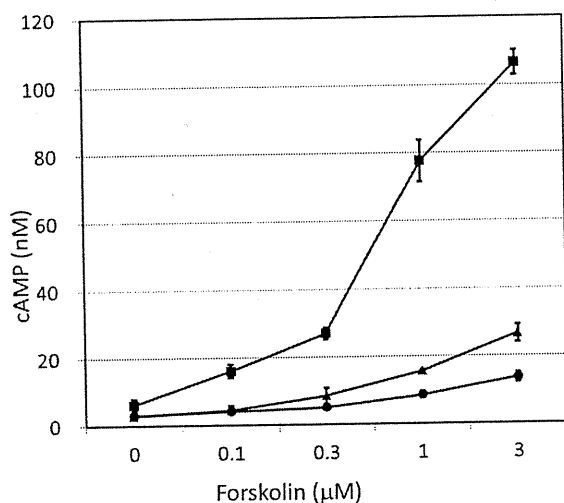


図1. 六君子湯抽出液で30分刺激した後の PC12細胞内cAMP濃度。n=3, Mean±SE.  
●コントロール、▲六君子湯1%、■六君子湯3%

六君子湯による細胞内 cAMP の増加が副腎髄質細胞において cAMP 応答遺伝子の発現を増強することを確認するために、副腎髄質細胞で組織特異的に発現する代表的な cAMP 応答遺伝子であるチロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase, TH) 及び血管作動性腸管ペプチド (vasoactive intestinal peptide, VIP) の両遺伝子の mRNA 量を定量した。その結果、六君子湯は forskolin 刺激をしない場合及び低濃度刺激の場合に、両遺伝子の発現を促進することが明らかになった (図 2)。

一方、高濃度の forskolin 刺激のもとでは、六君子湯による遺伝子発現促進効果は明瞭でなかった。以上のように、六君子湯は両遺伝子の forskolin による誘導を増強するが、forskolin 刺激による最大反応より有意に強い反応を惹起することはできなかった (図 2)。

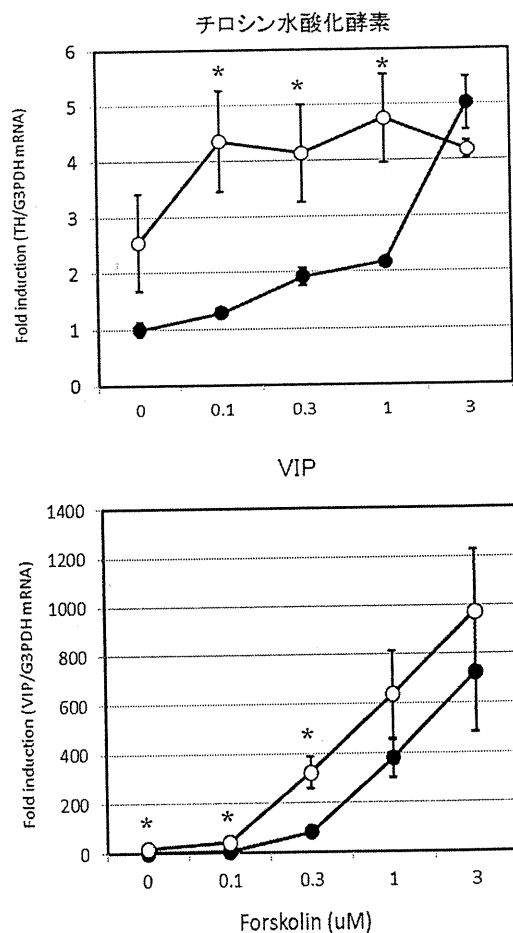


図2. PC12細胞のチロシン水酸化酵素及びVIPの mRNA 量の六君子湯刺激による変化。  
●コントロール、○六君子湯3%抽出液。  
n=3, Mean±SE. \*: P<0.05

さらに PC12 細胞由来 PCVG 細胞の VIP 遺伝子プロモーターにより発現する β ガラクトシダーゼの活性を指標として、六君子湯による cAMP 応答遺伝子の発現変化を詳細に検討した。その結果、六君子湯は forskolin による遺伝

子発現誘導を増強するが、最大反応には影響しないことが確認できた(図3)。一方、protein kinase C 活性化薬の 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)や phosphodiesterase 阻害薬である isobutyl methylxanthine (IBMX) は forskolin による cAMP 応答遺伝子発現の最大値をさらに増加した。したがって、六君子湯に含まれる cAMP 応答遺伝子誘導因子は、TPA や IBMX とは異なる機序により cAMP を増加させる可能性が示唆された(図3)。

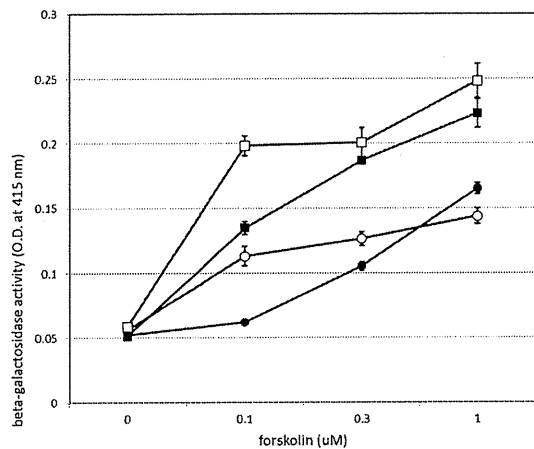


図3. PCVG細胞におけるcAMP依存性プロモータ活性。  
●コントロール、○六君子湯3%、■TPA 100 nM、□IBMX 0.5 mM  
n = 4, Mean ± SE.

さらに、PC12 細胞からのカテコラミン分泌に対する六君子湯の影響を検討した。その結果、六君子湯が dopamine 及び norepinephrine の分泌を用量依存的に促進することが明らかになった(図4)。

#### D. 考察

六君子湯は食欲増進を目的として、がん悪液質の治療に用いられるが、その効果の発現機序は必ずしも明らかではない。本研究により、六君子湯が副腎髄質細胞に直接作用して、カテコラミン分泌を促進することが初めて示さ

れたことにより、動物実験から推定される交感神経ベータ受容体作動薬の筋委縮防止効果を六君子湯に期待できることがわかった。一方、カテコラミンの末梢組織に対する基礎代謝促進作用により、筋や脂肪の消耗を来す可能性も否定できない。したがって、生体の筋や脂肪に対する六君子湯の影響をカテコラミン動態とともに検討する必要があると考えられ、六君子湯による悪液質治療研究の今後の方向性を示す結果となった。

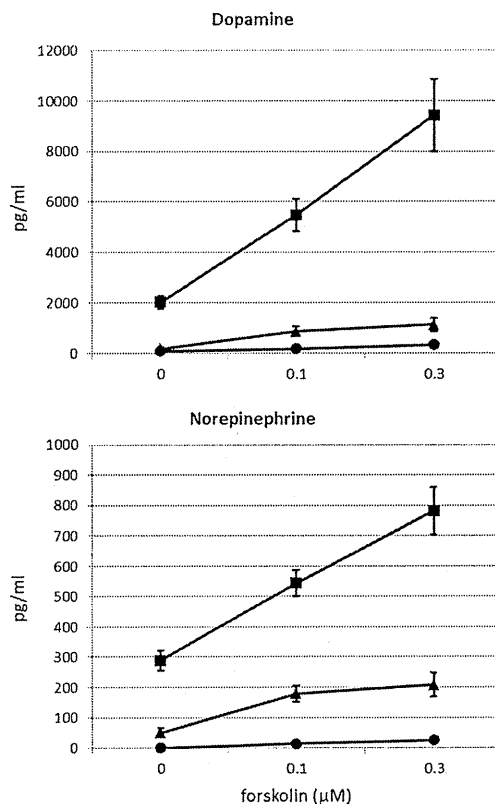


図4. PC12細胞からのカテコラミン分泌に対する六君子湯の影響。  
●コントロール、▲六君子湯1%、■六君子湯3%  
n=3, Mean ± SE.

#### E. 結論

六君子湯は副腎髄質細胞に直接作用して、細胞内 cAMP を増加させ、カテコラミン生合成律速酵素遺伝子などの

cAMP 依存性遺伝子の発現を誘導するとともに、カテコラミンの分泌を促進することが明らかになった。ストレス反応において六君子湯はカテコラミンシグナルにはたらき、生体調節を行っている可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Shimazu S, Nagamura Y, Yaguchi H, Ohkura N, Tsukada T. Correlation of mutant menin stability with clinical expression of multiple endocrine neoplasia type 1 and its incomplete forms. *Cancer Sci*, 102 (11): 2097-2102 (2011).
2. Shimazu S, Shimatsu A, Yamada S, Inoshita N, Nagamura Y, Usui T, Tsukada T. Resistance to dopamine agonists in prolactinoma is correlated with reduction of dopamine D2 receptor long isoform mRNA levels. *Eur J Endocrinol*, 166 (3): 383-390 (2012).
3. Nagamura Y, Yamazaki M, Shimazu S, Sano K, Tsukada T, Sakurai A. A novel splice site mutation of the *MEN1* gene identified in a patient with primary hyperparathyroidism. *Endocr J*, in press.

##### 2. 学会発表

1. Tsukada T, Shimazu S, Nagamura Y, Terawaki K, Uezono S. Cyclic AMP-dependent gene expression is enhanced by a traditional Japanese medicine Rikkunshito in PC12 cells. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋市 (2011年10月).

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

六君子湯、大建中湯のがん悪液質（特に消化器症状）に対する効果の基礎実験

研究分担者 藤宮峯子 札幌医科大学解剖学第2講座 教授

研究要旨 無麻酔ラットを用いた消化管運動測定装置を用いて、cisplatin 腹腔内投与で胃・十二指腸運動および近位・遠位運動がどのように傷害されるかを調べた。また、cisplatin 投与前に六君子湯を経口投与した際に、cisplatin でおこる消化管運動の異常がどのように改善されるかを調べた。cisplatin 投与で胃の空腹期運動が消失し、異常な胃運動の亢進を認めた。cisplatin で誘発される胃運動の異常は六君子湯の投与で改善した。一方、cisplatin は近位大腸運動を亢進させ、遠位大腸運動は影響を受けなかった。cisplatin で誘発される近位大腸運動の亢進は、六君子湯の投与で改善した。以上の結果より、六君子湯は cisplatin で起こる上部および下部消化管運動の異常を改善することが判明した。

#### A. 研究目的

抗がん剤でおこる嘔吐は患者の QOL を著しく低下させる。本来嘔吐は 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗剤の投与で消失することが知られているが、その場合、便秘などの副作用が避けられない。六君子湯が抗がん剤による嘔吐に効果があるとするれば、きわめて有用な治療法と言える。今年度の研究では、抗がん剤投与で起こる消化管運動の異常が六君子湯の前投与で改善されるかどうかを調べた。

#### B. 研究方法

無麻酔ラットを用いた消化管運動測定装置を用いて、cisplatin (5 mg/kg)

腹腔内投与で胃・十二指腸運動および近位・遠位運動がどのように傷害されるかを調べた。また、cisplatin 投与の 150 分前に六君子湯 (1g/kg) を経口投与した際に、cisplatin でおこる消化管運動の異常がどのように改善されるかを調べた。

(倫理面への配慮)

動物実験は札幌医科大学動物実験委員会の承認を受けて行った。

#### C. 研究結果

cisplatin 投与で胃の空腹期運動が消失し、異常な胃運動の亢進を認めた。十二指腸運動は cisplatin の影響を受

けなかった。cisplatin で誘発される空腹期運動の消失は六君子湯の投与で reverse された。また、cisplatin 投与後 30 分間に見られる異常な胃運動の亢進も六君子湯の投与で reverse された。一方、cisplatin は近位大腸運動を亢進させ、遠位大腸運動は影響を受けなかった。cisplatin で誘発される近位大腸運動の亢進は、六君子湯の投与で reverse された。以上の結果より、六君子湯は cisplatin で起こる上部および下部消化管運動の異常を改善することが判明した。

#### D. 考察

cisplatin はエンテロクロマフィン (EC) 細胞からのセロトニン分泌を刺激し、血中セロトニン濃度を上昇させる事が知られている。一方、胃の運動に関連するセロトニン受容体は 5-HT<sub>3</sub>, 4 受容体で近位大腸運動に関連する受容体は 5-HT<sub>3</sub> 受容体である。従って、六君子湯が cisplatin で起こる胃運動や大腸運動の異常を改善するメカニズムとして 5-HT<sub>3</sub>, 4 受容体の関与が示唆される。しかし、Takeda H ら (Gastroenterology 2008) の報告によれば、六君子湯の各成分は 5-HT<sub>3</sub> や 5-HT<sub>4</sub> 受容体には作用しないとのことである。従って今回見られた六君子湯の作用は、EC 細胞からのセロトニン分泌そのものをブロックしている可能性が考えられる。

#### E. 結論

無麻酔ラットにおける消化管運動測定実験によって、cisplatin は異常な胃運動の亢進を引き起こすことが分か

り、ヒトで起こる抗がん剤による嘔吐の病態が実験動物で再現できることが判明した。さらに cisplatin の投与で大腸運動にも異常を来すことが分かった。六君子湯の前投与で、胃や大腸運動の異常が改善されたことより、六君子湯が抗がん剤でおこる嘔吐の制吐剤としてはたらく可能性が判明した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Asakawa A, Ataka K, Fujino K, Chen CY, Kato I, Fujimiya M, Inui A. Ghrelin family of peptides and gut motility. *J Gastroenterol Hepatol*, 26 (Suppl 3): 73-74 (2011).
2. Nozu T, Kumei S, Takakusaki K, Ataka K, Fujimiya M, Okumura T. Central orexin-A increases colonic motility in conscious rats. *Neurosci Lett*, 498 (2): 143-146 (2011).
3. Fujimiya M, Ataka K, Asakawa A, Chen CY, Kato I, Inui A. Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin on the gastrointestinal motility. *Peptides*. 2011; 32: 2348-51.
4. Furness JB, Hunne B, Matsuda N, Yin L, Russo D, Kato I, Fujimiya M, Patterson M, McLeod J, Andrews ZB, Bron R. Investigation of the presence of ghrelin in the central nervous system of the rat and mouse. *Neuroscience*. 2011;193:1-9.
5. Fujimiya M, Ataka K, Asakawa A, Chen CY, Kato I, Inui A. Regulation of gastroduodenal motility: acyl ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin and hypothalamic peptides. *Digestion*. 2012; 85: 90-4.

##### 2. 学会発表

1. 藤宮 峯子. グレリン、デスアシルグレリン、オベスタチンによる上部消化管運動の制御と脳腸相関. 第7回日本消化管学会. 京都市 (2011年2月).
2. 藤宮 峯子. 視床下部ペプチドと消化管運動の機能相関. 第116回日本解剖学会. 横浜市 (2011年3月誌上開催).
3. 藤宮 峯子. 視床下部ペプチドと消化管運動. 第15回日本摂食障害学会. 鹿児島市 (2011年9月).
4. 藤宮 峯子. 骨髄由来ミクログリアと脳腸相関. 第13回日本神経消化器病学会. 宇都宮市 (2011年11月).

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

がん悪液質モデル動物末梢組織の解析と六君子湯、大建中湯投与による影響

研究分担者 樋上 賀一 東京理科大学薬学部分子病理・代謝学研究室 教授

研究要旨 健康長寿を示すカロリー制限が白色脂肪組織に及ぼす影響を検討し、がん悪液質ラットおよびマウスモデルの白色脂肪組織と比較した。その結果、カロリー制限モデルの白色脂肪組織では亢進している *de novo* 脂肪酸合成系が、悪液質モデルのそれでは抑制されること、また同悪液質モデルへの六君子湯投与はこの抑制を一部改善することが明らかとなった。本研究結果より、白色脂肪組織における *de novo* 脂肪酸合成系の抑制ががん悪液質病態に関連する可能性、および六君子湯によるがん悪液質改善効果の一部はこの抑制を阻害することにある可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

カロリー制限（CR）によるやせ（健康長寿を示す）とがん悪液質によるやせの、特に脂肪組織における相違点を明らかにし、さらに六君子湯が脂肪組織に及ぼす影響を分子細胞レベルで解析する。そして、がん悪液質での脂肪組織の萎縮抑制に対する六君子湯の作用点を明らかにする。

#### B. 研究方法

自由摂食群の70%を給餌したCRラットと自由摂食群の白色脂肪組織において、発現量が異なるタンパク質を二次元電気泳動およびTOF-MSを用いたプロテオーム解析により同定した。次に、悪液質モデルである横紋筋肉腫細胞による担がんマウスや胃癌細胞に

よる担がんラットにおいて、CRにより発現量が異なることが明らかになったタンパク質群の発現量や酵素活性を解析し、CRと悪液質による相違を検討した。さらに、胃癌細胞による担がんモデルラット白色脂肪組織を用いて、六君子湯投与による変化とCRによる変化との相違を検討した。

（倫理面への配慮）

本実験計画は、東京理科大学動物実験委員会にて承認されている（承認番号Y11060）。

#### C. 研究結果

プロテオーム解析により、CRモデル白色脂肪組織において、脂肪酸合成関連タンパク質、ピルビン酸/リンゴ酸回路関連タンパク質、ミトコンドリア

関連タンパク質の発現が亢進していた。またクエン酸回路に関連する citrate synthase 活性及び呼吸鎖関連酵素である cytochrome c oxidase 活性の亢進が観察された。以上のような CR による発現や酵素活性の変化を横紋筋肉腫細胞および胃癌細胞による 2 種の悪液質モデルと比較したところ、CR により増加した fatty acid synthase mRNA レベルが、両悪液質モデルで抑制されていた。また、この抑制は悪液質モデルへの六君子湯の投与により改善傾向を示した。

#### D. 考察

白色脂肪組織における de novo 脂肪酸合成系の抑制ががん悪液質病態に関連する可能性があること、および六君子湯によるがん悪液質改善効果の一部はこの抑制を阻害することにある可能性が示唆された。腫瘍細胞はその栄養源を主として糖質に依存している（ワーバーグ効果）。宿主に比較的選択性の高い栄養源である脂質を脂肪組織により合成することが、がん悪液質に対する耐性に重要である可能性が示唆された。

#### E. 結論

六君子湯投与による白色脂肪組織における de novo 脂肪酸合成系の維持ががん悪液質病態の抑制に重要である可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Matsushima S, Okita N, Oku M, Nagai

W, Kobayashi M, Higami Y. An Mdm2 antagonist, Nutlin-3a, induces p53-dependent and proteasome-mediated poly(ADP-ribose) polymerase1 degradation in mouse fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 407 (3): 557-561 (2011).

2. Uchiumi F, Watanabe T, Hasegawa S, Hoshi T, Higami Y, Tanuma S. The effect of resveratrol on the Werner syndrome RecQ helicase gene and telomerase activity. *Curr Aging Sci*, 4 (1): 1-7 (2011).
3. 樋上 賀一. 脂質代謝の変化からみたカロリー制限による抗老化・寿命延長作用のメカニズム. *心身医学*, 52: 194-200 (2012).
4. Nagai W, Okita N, Matsumoto H, Okado H, Oku M, Higami Y. Reversible induction of PARP1 degradation by p53-inducible cis-imidazoline compounds. *Biochem Biophys Res Commun*, 421 (1): 15-19 (2012).
5. Okita N, Hayashida Y, Kojima Y, Fukushima M, Yuguchi K, Mikami K, Yamauchi A, Watanabe K, Noguchi M, Nakamura M, Toda T, Higami Y. Differential responses of white adipose tissue and brown adipose tissue to caloric restriction in rats. *Mech Ageing Dev*, Epub ahead of print (2012).

##### 2. 学会発表

1. 樋上 賀一. 長期カロリー制限による抗老化・寿命延長作用の分子メカニズム—脂質代謝を中心として—. 第 52 回日本心身医学会総会ならびに学術講演会. 横浜市 (2011 年 6 月).



G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得

- Higami Y, Okita N, Matsushima S,  
PCT 出願, Method of treating  
ischemia/reperfusion,  
PCT/JP2012/052565,  
出願日 ; 2012/01/27

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

臨床試験ネットワーク、およびデータセンターの構築

研究分担者 岩瀬 哲 東京大学医学部附属病院緩和ケア診療部 副部長

研究要旨 多施設共同臨床試験の実施のためには、症例登録や症例データを中央で管理し、試験の運営を担う組織が必要とされている。本研究班において、質の高い臨床試験を実施するため、医師、薬剤師、生物統計家、データマネージャーなどにより構成されたデータセンター/運営事務局を設立し、研究支援と試験の品質管理を行う。

A. 研究目的

本研究班において計画された以下の2つの医師主導型臨床試験について、効率的かつ正確にデータが収集できるよう、また、試験を安全に実施できるよう、データセンター/運営事務局の立場から研究支援を行い、試験の運営を行う。

1. ゲムシタビン投与膀胱がん患者における軽度悪液質または前悪液質状態に対する六君子湯の悪液質行進抑制効果-無作為化第Ⅱ相比較試験
2. シスプラチンを含む化学療法を施行される子宮がん患者の食欲不振に対する六君子湯の効果-無作為化第Ⅱ相比較試験

B. 研究方法

1. ゲムシタビン投与膀胱がん患者における軽度悪液質または前悪液質状態に対する六君子湯の悪液質行

進抑制効果-無作為化第Ⅱ相比較試験

生物統計、データマネジメント、また、臨床的観点から、プロトコル作成に参画し、その支援を行った。臨床試験の科学性、倫理性、安全性を担保するために、第三者で構成されるプロトコル審査委員会（Protocol Review Committee: PRC）と効果安全評価委員会（Data and Safety Monitoring Committee）を設置した。臨床試験の経験者を5名以上選出して、メンバーには両委員会委員の兼任を依頼した。Web上で臨床データを取得し、欠損や整合性などのデータチェックを自動で管理するためのシステム（EDC）を利用するため、米国のVanderbilt大学が提供しているREDCap（Research Electronic Data Capture）を導入した。また、本試験で実施するQOL調査で使用する質問票の使用契約を米国と欧州の団体との間で交わした。症例データの収集するためCRF（Case Report Form）の作

成を紙媒体と電子媒体（eCRF）で行った。また、試験開始後、本試験が安全に、かつプロトコルに従って実施されているか、データが正確に収集されているかを確認する目的で、試験の品質管理の観点から中央モニタリングを実施するため、モニタリング計画書を作成した。

## 2. シスプラチンを含む化学療法を施行される子宮がん患者の食欲不振に対する六君子湯の効果- 無作為化第Ⅱ相比較試験

主任研究者をグループ長とするプロトコル作成のワーキンググループを結成し、生物統計学、データマネジメントの観点からプロトコル作成支援を行った。

### （倫理面への配慮）

ヘルシンキ宣言および「臨床研究に関する倫理指針」（平成 20 年厚生労働省告示第 415 号）にしたがって、本試験の研究支援を行った。

また、本研究班は、PRC の承認を得たプロトコルを使用し、施設 IRB の承認を得た施設のみで登録を行う。

プロトコルには、対象者の安全やプライバシーの保護、説明文書を用いた自由意思による同意の取得を必須としており、登録に先立って患者より同意を得、同意文書を保管する。

## C. 研究結果

### 1. ゲムシタビン投与時がん患者における軽度悪液質または前悪液質状態に対する六君子湯の悪液質行進抑制効果-無作為化第Ⅱ相比較試験

次の 7 名の委員を選出し、プロトコル審査委員会/効果・安全性評価委員会を設置した。

本班研究の臨床試験が終了するまで両委員会の委員の兼任を依頼した。

委員長：

坪井正博 神奈川県立がんセンター

副委員長：

井上 彰 東北大学病院

委員：

松尾直樹 埼玉県立がんセンター

宮下光令 東北大学病院

口羽 文 ダナ・ファーバー癌研究所

後藤 悌 東京大学医学部附属病院

石木寛人 国立がん研究センター東病院

東加奈子 東京医科大学病院

プロトコルは、研究代表者、研究事務局、データセンター/運営事務局の 3 者間で本年度 4 度のプロトコル検討会を開催したのち完成させ、PRC の 2 度のプロトコル審査を経て、承認された。

EDC システムの導入については、REDCap を運用するためのサーバー機の構築を行った。また、REDCap 上で e-CRF の作成を行った。QOL 質問票については、FAACT (Functional Assessment of Anorexia and Cachexia Treatment)、FACT-Hep の使用許可を FACIT.org より取得した。また、EQ-5D-3L の使用許可を EuroQol group より取得した。

### 2. シスプラチンを含む化学療法を施行される子宮がん患者の食欲不振に対する六君子湯の効果- 無作為化第Ⅱ相比較試験

ワーキンググループでのコンセプト検討会を経て、試験コンセプトを完成

させた。コンセプトをもとに、現在、フルプロトコールの作成支援を行っている。

#### D. 考察

##### 1. ゲムシタビン投与膺がん患者における軽度悪液質または前悪液質状態に対する六君子湯の悪液質行進抑制効果-無作為化第Ⅱ相比較試験

第三者委員会の設立、また、国際的に認知されている EDC システムを導入できたことから、臨床研究の科学性・倫理性・効率性の向上に寄与できると考えられ、質の高い多施設共同臨床試験を実施できると思われる。

平成 24 年 4 月 14 日（土）に北海道大学病院にて、研究代表者、研究事務局、データセンター/運営事務局、参加施設研究者が一同に会し Kick off meeting が予定されており、その後、各施設の IRB の承認の得た施設から、症例登録を開始する。試験開始後は、データセンター/運営事務局は、モニタリング計画書をもとに定期的に中央モニタリングを実施し、その結果は、モニタリング報告書にて報告される。

##### 2. シスプラチンを含む化学療法を施行される子宮がん患者の食欲不振に対する六君子湯の効果-無作為化第Ⅱ相比較試験

前者の試験で設立した第三者委員会、また導入した EDC を本試験でも活用することを予定しており、試験実施までの準備期間を大幅に短縮でき、かつ、質の高い臨床試験を実施できると考えられる。

#### E. 結論

##### 1. ゲムシタビン投与膺がん患者における軽度悪液質または前悪液質状態に対する六君子湯の悪液質行進抑制効果-無作為化第Ⅱ相比較試験

1 年弱という短い期間で医師主導型の多施設共同臨床試験の計画、また運営体制を構築でき、今後、質の高い臨床試験の実施、エビデンスの創出が期待される。

##### 2. シスプラチンを含む化学療法を施行される子宮がん患者の食欲不振に対する六君子湯の効果-無作為化第Ⅱ相比較試験

プロトコール作成は順調に進んでおり、来年度の早期にフルプロトコールを完成、また PRC の審査を受け、試験実施が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Iwase S, Yamamoto D, Kuroda Y, Kawaguchi T, Kitamura K, Odagiri H, Teramoto S, Akazawa K, Nagumo Y. Phase II trial of preoperative chemotherapy for breast cancer: Japan Breast Cancer Research Network (JBCRN)-02 trial. *Anticancer Res*, 31 (4): 1483-1487 (2011).

##### 2. 学会発表

なし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし。

2. 実用新案登録  
なし。

3. その他  
なし。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yokoyama T, Minami K, Sudo Y, Horishita T, Ogata J, Yanagita T, Uezono Y.	Effects of sevoflurane on voltage-gated sodium channel Na <sub>v</sub> 1.8, Na <sub>v</sub> 1.7, and Na <sub>v</sub> 1.4 expressed in <i>Xenopus</i> oocytes.	J Anesth	25 (4)	609-613	2011
Minami K, Sudo Y, Yokoyama T, Ogata J, Takeuchi M, Uezono Y.	Sevoflurane inhibits the $\mu$ -opioid receptor function expressed in <i>Xenopus</i> oocytes.	Pharmacology	88 (3-4)	127-132	2011
Imai S, Sudo Y, Nakamura A, Ozeki A, Asato M, Hojo M, Devi LA, Kuzumaki N, Suzuki T, Uezono Y, Narita M.	Possible involvement of $\beta$ -endorphin in a loss of the coordinated balance of $\mu$ -opioid receptors trafficking processes by fentanyl.	Synapse	65 (9)	962-966	2011
Narita M, Imai S, Nakamura A, Ozeki A, Asato M, Rahmadi M, Sudo Y, Hojo M, Uezono Y, Devi LA, Kuzumaki N, Suzuki T.	Possible involvement of prolonging spinal $\mu$ -opioid receptor desensitization in the development of antihyperalgesic tolerance to $\mu$ -opioids under a neuropathic pain-like state.	Addict Biol		Epub ahead of print	2011
上園 保仁.	がん患者の症状緩和のために-がん悪液質の予防、症状改善をめざす基礎医学研究.	がん患者と対症療法	22 (1)	58-63	2011
上園 保仁.	がん患者の症状緩和に役立つ漢方薬-漢方薬の有効性を示す、臨床につながる基礎研究-.	がん患者と対症療法	22 (2)	140-146	2011
鈴木 雅美, 上園 保仁.	非ステロイド性鎮痛薬およびアセトアミノフェンによる重篤な副作用.	Anesthesia 21 Century	13 (2)	57-61	2011
上園 保仁, 須藤 結香.	腸管神経叢に発現している消化管運動制御受容体と、それらをターゲットにした消化管機能改善薬.	医学のあゆみ	238 (10)	904-908	2011
宮野 加奈子, 上園 保仁, 仲田 義啓.	パクリタキセル誘発性末梢神経障害のメカニズム.	ペインクリニック	32 (10)	1491-1498	2011
Uezono Y, Miyano K, Suzuki M, Sudo Y, Shiraishi S, Terawaki K.	A review of traditional Japanese medicines and their potential mechanism of action.	Current Pharmaceutical Design		in press	2012
Sudo Y, Hojo M, Ando Y, Takada M, Murata H, Kurata S, Kanaide M, Nishida N, Uezono Y.	GABA <sub>B</sub> receptors do not internalize after baclofen treatment possibly due to lack of the $\beta$ -arrestin association;a real-time visualization study.	Synapse		in press	2012
Terashi M, Asakawa A, Harada T, Ushikai M, Coquerel Q, Sinno MH, Déchelotte P, Inui A, Fetissov SO.	Ghrelin reactive autoantibodies in restrictive anorexia nervosa.	Nutrition	27 (4)	407-413	2011
Asakawa A, Ataka K, Fujino K, Chen CY, Kato I, Fujimiya M, Inui A.	Ghrelin family of peptides and gut motility.	J Gastroenterol Hepatol.	26 Suppl 3	73-74	2011

Fujitsuka N, Asakawa A, Uezono Y, Minami K, Yamaguchi T, Nijima A, Yada T, Maejima Y, Sedbazar U, Sakai T, Hattori T, Kase Y and Inui A.	Potentiation of ghrelin signaling attenuates cancer anorexia-cachexia and prolongs survival.	Transl Psychiatry	1	e23	2011
Sadakane C, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M, Takeda H.	10-gingerol, a component of Rikkunshito, improves cisplatin-induced anorexia by inhibiting acylated ghrelin degradation.	Biochem Biophys Res Commun	412 (3)	506-511	2011
Saegusa Y, Takeda H, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Sadakane C, Nahata M, Hattori T, Asaka M.	Decreased plasma ghrelin contributes to anorexia following novelty stress.	Am J Physiol Endocrinol Metab	301 (4)	E685-E696	2011
Suzuki H, Hashimoto H, Kawasaki M, Watanabe M, Otsubo H, Ishikura T, Fujihara H, Ohnishi H, Onuma E, Yamada-Okabe H, Takuwa Y, Ogata E, Nakamura T, Ueta Y.	Similar changes of hypothalamic feeding-regulating peptides mRNAs and plasma leptin levels in PTHrP-, LIF- secreting tumors-induced cachectic rats and adjuvant arthritic rats.	Int J Cancer	128 (9)	2215-2223	2011
Yokoyama T, Ohbuchi T, Saito T, Fujihara H, Minami K, Nagatomo T, Uezono Y, Ueta Y.	Allyl isothiocyanates and cinnamaldehyde potentiate miniature excitatory postsynaptic inputs in the supraoptic nucleus in rats.	Eur J Pharmacol	655 (1-3)	31-37	2011
Hashimoto H, Ueta Y.	Central effects of ghrelin, a unique peptide, on appetite and fluid/water drinking behavior.	Curr Protein Pept Sci	12 (4)	280-287	2011
Shimazu S, Nagamura Y, Yaguchi H, Ohkura N, Tsukada T.	Correlation of mutant menin stability with clinical expression of multiple endocrine neoplasia type 1 and its incomplete forms.	Cancer Sci	102 (11)	2097-2102	2011
Shimazu S, Shimatsu A, Yamada S, Inoshita N, Nagamura Y, Usui T, Tsukada T.	Resistance to dopamine agonists in prolactinoma is correlated with reduction of dopamine D2 receptor long isoform mRNA levels.	Eur J Endocrinol	166 (3)	383-390	2012
Nagamura Y, Yamazaki M, Shimazu S, Sano K, Tsukada T, Sakurai A.	A novel splice site mutation of the <i>MEN1</i> gene identified in a patient with primary hyperparathyroidism.	Endocr J		Epub ahead of print	2012
Nozu T, Kumei S, Takakusaki K, Ataka K, Fujimiya M, Okumura T.	Central orexin-A increases colonic motility in conscious rats.	Neurosci Lett	498 (2)	143-146	2011
Fujimiya M, Ataka K, Asakawa A, Chen CY, Kato I, Inui A.	Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin on the gastrointestinal motility.	Peptides	32 (11)	2348-2351	2011

Furness JB, Hunne B, Matsuda N, Yin L, Russo D, Kato I, <u>Fujimiya M</u> , Patterson M, McLeod J, Andrews ZB, Bron R.	Investigation of the presence of ghrelin in the central nervous system of the rat and mouse.	Neuroscience	193	1-9	2011
<u>Fujimiya M</u> , Ataka K, Asakawa A, Chen CY, Kato I, <u>Inui A</u> .	Regulation of gastroduodenal motility: acyl ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin and hypothalamic peptides.	Digestion	85 (2)	90-94	2011
Matsushima S, Okita N, Oku M, Nagai W, Kobayashi M, <u>Higami Y</u> .	An Mdm2 antagonist, Nutlin-3a, induces p53-dependent and proteasome-mediated poly(ADP-ribose) polymerase1 degradation in mouse fibroblasts.	Biochem Biophys Res Commun	407 (3)	557-561	2011
Uchiumi F, Watanabe T, Hasegawa S, Hoshi T, <u>Higami Y</u> , Tanuma S.	The effect of resveratrol on the Werner syndrome RecQ helicase gene and telomerase activity.	Curr Aging Sci	4 (1)	1-7	2011
<u>樋上 賀一</u> .	脂質代謝の変化からみたカロリー制限による抗老化・寿命延長作用のメカニズム	心身医学	52 (3)	194-200	2012
Nagai W, Okita N, Matsumoto H, Okado H, Oku M, <u>Higami Y</u> .	Reversible induction of PARP1 degradation by p53-inducible cis-imidazoline compounds.	Biochem Biophys Res Commun	421 (1)	15-19	2012
Okita N, Hayashida Y, Kojima Y, Fukushima M, Yuguchi K, Mikami K, Yamauchi A, Watanabe K, Noguchi M, Nakamura M, Toda T, <u>Higami Y</u> .	Differential responses of white adipose tissue and brown adipose tissue to caloric restriction in rats.	Mech Ageing Dev		Epub ahead of print	2012
<u>Iwase S</u> , Yamamoto D, Kuroda Y, Kawaguchi T, Kitamura K, Odagiri H, Teramoto S, Akazawa K, Nagumo Y.	Phase II trial of preoperative chemotherapy for breast cancer: Japan Breast Cancer Research Network (JBCRN)-02 trial.	Anticancer Res	31 (4)	1483-1487	2011



#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## Effects of sevoflurane on voltage-gated sodium channel $Na_v1.8$ , $Na_v1.7$ , and $Na_v1.4$ expressed in *Xenopus* oocytes

Toru Yokoyama · Kouichiro Minami ·  
Yuka Sudo · Takafumi Horishita · Junichi Ogata ·  
Toshihiko Yanagita · Yasuhito Uezono

Received: 24 February 2011 / Accepted: 28 April 2011 / Published online: 8 June 2011  
© Japanese Society of Anesthesiologists 2011

**Abstract** Sevoflurane is widely used as a volatile anesthetic in clinical practice. However, its mechanism is still unclear. Recently, it has been reported that voltage-gated sodium channels have important roles in anesthetic mechanisms. Much attention has been paid to the effects of sevoflurane on voltage-dependent sodium channels. To elucidate this, we examined the effects of sevoflurane on  $Na_v1.8$ ,  $Na_v1.4$ , and  $Na_v1.7$  expressed in *Xenopus* oocytes. The effects of sevoflurane on  $Na_v1.8$ ,  $Na_v1.4$ , and  $Na_v1.7$  sodium channels were studied by an electrophysiology method using whole-cell, two-electrode voltage-clamp techniques in *Xenopus* oocytes. Sevoflurane at 1.0 mM inhibited the voltage-gated sodium channels

$Na_v1.8$ ,  $Na_v1.4$ , and  $Na_v1.7$ , but sevoflurane (0.5 mM) had little effect. This inhibitory effect of 1 mM sevoflurane was completely abolished by pretreatment with protein kinase C (PKC) inhibitor, bisindolylmaleimide I. Sevoflurane appears to have inhibitory effects on  $Na_v1.8$ ,  $Na_v1.4$ , and  $Na_v1.7$  by PKC pathways. However, these sodium channels might not be related to the clinical anesthetic effects of sevoflurane.

**Keywords** Sevoflurane · Voltage-gated sodium channel · *Xenopus* oocytes

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00540-011-1167-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

T. Yokoyama · K. Minami (✉) · J. Ogata  
Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine,  
Jichi Medical University, Tochigi 329-0483, Japan  
e-mail: kminami@med.uoeh-u.ac.jp

T. Yokoyama · K. Minami · Y. Sudo · Y. Uezono  
Cancer Pathophysiology Division, National Cancer Center  
Research Institute, Tokyo, Japan

Y. Sudo  
Department of Molecular and Cellular Biology,  
Nagasaki University School of Biomedical Sciences,  
Nagasaki, Japan

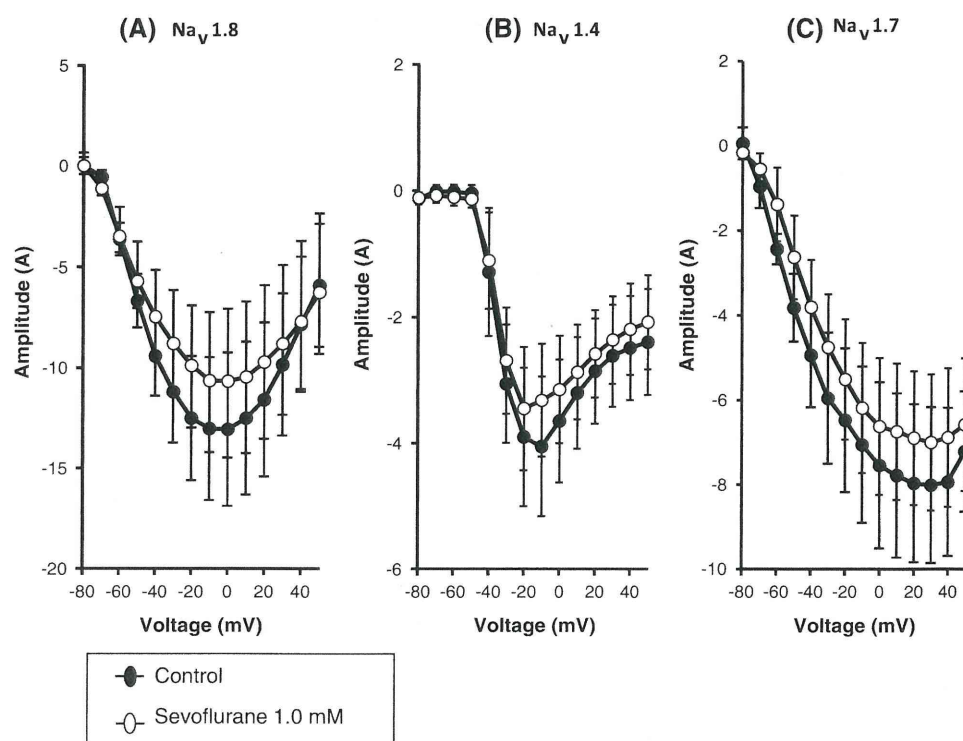
T. Horishita  
Department of Anesthesiology, University of Occupational  
and Environmental Health, Kitakyushu, Japan

T. Yanagita  
Department of Pharmacology, University of Miyazaki,  
School of Medicine, Miyazaki, Japan

Sevoflurane has commonly been used as an anesthetic in clinical practice. Until now, previous studies have examined the mechanisms of sevoflurane [1–4], but many aspects of the mechanism have remained unclear. Voltage-gated sodium channels play important roles in the action of potential initiation and propagation in excitable cells of nerve and muscle [5]. Recent reports have shown a relationship between volatile anesthetics and sodium channels [6–12], suggesting voltage-dependent sodium channels as a target of anesthetics. However, so far as sevoflurane is concerned, there has been little information on the functions of voltage-gated sodium channels.

$Na_v1.8$  is exclusively expressed in dorsal root ganglion (DRG) neurons that give rise to C- and A $\delta$ -fibers [13, 14] and peripheral nerves [15], which play important roles in afferent pain pathways transmitting nociceptive signals to the spinal cord [14].  $Na_v1.7$  expresses in DRG, sympathetic nerves, and peripheral nerves and  $Na_v1.4$  expresses in skeletal muscles and plays a role in action potential initiation and transmission in skeletal muscles [5]. Reflex of muscles and inhibition of sympathetic nerves are necessary during the operation. Thus, it would be interesting to study

**Fig. 1** Effects of sevoflurane on I–V relationship of sodium currents at holding potential of  $-70$  mV:  $\text{Na}_v 1.8$  (a),  $\text{Na}_v 1.4$  (b),  $\text{Na}_v 1.7$  (c). The peak currents were normalized to the maximal currents that were observed at  $-10$  mV ( $\text{Na}_v 1.8$  and  $\text{Na}_v 1.4$ ) and  $30$  mV ( $\text{Na}_v 1.7$ ). Closed circles, control; open circles, sevoflurane



effects of sevoflurane on these voltage-dependent sodium channels.

The purpose of this study was to determine whether sevoflurane affects the functions of voltage-gated sodium channels. To this end, we examined the effects of sevoflurane on the function of  $\text{Na}_v 1.7$ ,  $\text{Na}_v 1.8$ , and  $\text{Na}_v 1.4$  expressed in *Xenopus* oocytes using an electrophysiological method. Moreover, we investigated the mechanisms of the effects of sevoflurane on these channels.

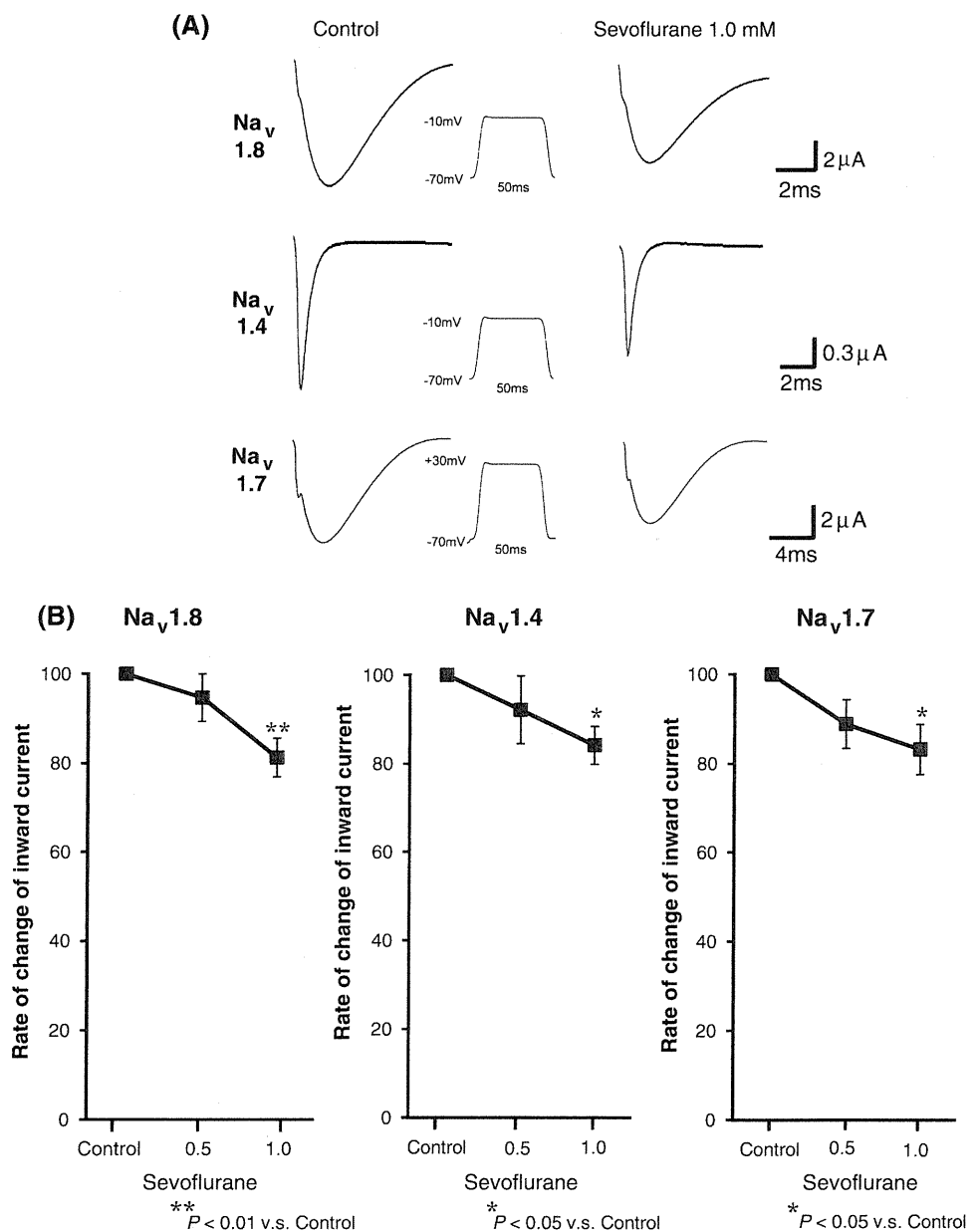
Adult female *Xenopus laevis* frogs were purchased from Kato Kagaku (Tokyo, Japan), sevoflurane from Maruishi Pharmaceutical (Osaka, Japan), and bisindolylmaleimide I (GF109203X) from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Ultracomp *E. coli* Transformation Kit was purchased from Invitrogen (San Diego, CA, USA). Purification of cDNAs was performed with a Qiagen purification kit (Qiagen, Chatworth, CA, USA). Gentamicin, sodium pyruvate, cDNA for rat  $\text{Na}_v 1.6$   $\alpha$ -subunit (a gift from Dr. A.L. Goldin, University of California, Irvine, CA, USA), cDNA for rat  $\text{Na}_v 1.8$   $\alpha$ -subunit (a gift from Dr. A.N. Akopian, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA), and cDNA for human  $\text{Na}_v 1.7$   $\alpha$ -subunit (a gift from Dr. F. Hofmann, Universität München, München, Germany) were prepared.

Each of the cRNAs ( $\text{Na}_v 1.7$ ,  $\text{Na}_v 1.8$ , and  $\text{Na}_v 1.4$ ) was prepared using a mCAP mRNA Capping Kit and transcribed with a SP6 RNA Polymerase in vitro Transcription Kit (Ambion, Austin, TX, USA). cDNA was linearized with  $\text{Na}_v 1.4$ ,  $\text{Na}_v 1.8$ , and  $\text{Na}_v 1.7$ . Preparation of *Xenopus*

*laevis* oocytes and microinjection of the cRNA ( $\text{Na}_v 1.7$ ,  $\text{Na}_v 1.8$ , and  $\text{Na}_v 1.4$ ) were performed as previously described by Horishita et al. [16, 17].

The whole-cell sodium current from oocytes was measured using a two-microelectrode voltage clamp. An oocyte was placed in a  $100\text{-}\mu\text{l}$  recording chamber and perfused with frog Ringer's solution at room temperature ( $22\text{--}24^\circ\text{C}$ ), containing  $115$  mM NaCl,  $2.5$  mM KCl,  $10$  mM HEPES, and  $1.8$  mM  $\text{CaCl}_2$  at pH 7.2, at a rate of  $1.8$  ml/min using a perfusion pump (MINIPLUS3; GILSON, Middleton, France). The electrodes were triple-pulled with a puller (P-97; Sutter Instrument, Novato, CA, USA) from a glass capillary. Microelectrodes were filled with  $3$  M KCl/ $0.5\%$  low-melting-point agarose, and they had a final resistance of  $0.3\text{--}0.5$  M $\Omega$ . The whole-cell voltage clamp was achieved through these two electrodes using a Warner Instrument model OC-725C (Hampden, CT, USA). Currents were recorded and analyzed using pCLAMP software (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). The voltage dependence activation was determined by eliciting  $50\text{-ms}$  depolarizing pulses from a holding potential of  $-70$  mV to potential range from  $-90$  mV to  $50$  mV in  $10\text{-mV}$  increments. We analyzed the peak component of the transient inward currents with methodology described by Horishita et al. [17]. A solution of sevoflurane, freshly prepared immediately before use, was applied for  $2$  min. We calculated the final concentration of sevoflurane in the recording chamber using gas chromatography. To determine whether activation of protein kinase C (PKC) plays a

**Fig. 2** Effects of sevoflurane on peak sodium currents in oocyte expressing  $Na_v$  1.8,  $Na_v$  1.4 and  $Na_v$  1.7 expressed in *Xenopus* oocytes. **a** Representative  $I_{Na}$  traces in control and presence of sevoflurane in oocytes expressing  $Na_v$  1.8,  $Na_v$  1.4,  $Na_v$  1.7. **b** Concentration–response relationship of sevoflurane-induced inward current of voltage gated sodium channels. The effects were expressed as rate of change ( $\pm$  SEM). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  versus control



role in sevoflurane modulation on voltage-dependent sodium channels, oocytes were exposed to a PKC inhibitor, bisindolylmaleimide I (GF109203X)(200 nM) [18–20] in modified Barth’s saline (MBS) for 120 min before recording. We compared the effects of sevoflurane on the peak component of the transient inward currents before and after the exposure to GF109203X.

Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. Results are expressed as percentages of control values obtained by peak current. The control responses were measured before sevoflurane application. Statistical analyses were performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) and the Bonferroni correction using GraphPad Prism 4

(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A  $P$  value  $< 0.05$  was considered significant.

Sevoflurane did not cause a shift in the current–voltage relationship (Fig. 1). Sevoflurane (1.0 mM) significantly inhibited the peak component of the transient inward currents of  $Na_v$  1.8 ( $81.3\% \pm 4.32\%$  of control,  $P < 0.01$ ,  $n = 8$ ),  $Na_v$  1.4 ( $84.2\% \pm 4.35\%$  of control,  $P < 0.05$ ,  $n = 12$ ), and  $Na_v$  1.7 ( $83.2\% \pm 5.64\%$  of control,  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ ) (Figs. 1, 2). However, 0.5 mM sevoflurane had little effect on the peak component of the transient inward currents of these channels.

We next studied the effects of PKC on the inhibition of a high concentration of sevoflurane (1 mM) on  $Na_v$  1.8,  $Na_v$