

平成21年5月31日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18390539  
 研究課題名（和文） 学習・記憶増強酵素スルフトランスフェラーゼの発現調節と  
 麻酔薬による修飾機序  
 研究課題名（英文） Mechanisms modulating pregnenolone sulfotransferase expression and  
 effects of anesthetic agents in rat C6 glial cells  
 研究代表者  
 梶谷 淳 (KOHJITANI ATSUSHI)  
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授  
 研究者番号：60304325

## 研究成果の概要：

硫酸プレグネノロンは中枢神経系において学習・記憶に重要な役割を果たすニューロステロイドである。中枢神経系の支持組織であるグリア細胞において、硫酸プレグネノロンの産生を触媒する酵素スルフトランスフェラーゼ（SULT）の発現調節機構を検討した。ラットC6グリア細胞株を種々の興奮性アミノ酸受容体サブタイプの作動薬およびNO産生刺激条件に暴露し、SULT2B1aアイソフォームmRNA発現をリアルタイムPCR法で測定した。培養液中のnitrite濃度をGriess Reactionによって測定し、NO産生量とした。グルタミン酸およびAMPAは、受容体の脱感作を予防するcyclothiazideの存在下で用量依存的にSULT2B1a発現を抑制した。グルタミン酸によるSULT2B1a発現の抑制は、AMPA受容体拮抗薬NBQX、神経型NO合成酵素（nNOS）阻害薬7-NIの前処置により回復した。LPS/TNF $\alpha$ によるサイトカイン反応でC6グリア細胞に誘導型NO合成酵素（iNOS）を誘導するとSULT2B1a発現は抑制され、この抑制はiNOS阻害薬L-NILで部分的に回復した。外因性NOドナーは用量依存的にSULT2B1a発現を抑制した。グルタミン酸、外因性NOドナー、iNOS誘導はいずれもnitrite産生量を増加させた。C6グリア細胞を静脈麻酔薬ミダゾラムに暴露すると、SULT2B1a発現は抑制された。以上より、C6グリア細胞におけるSULT2B1a発現は興奮性アミノ酸受容体のAMPA型サブタイプを介するNOの細胞内シグナル伝達経路により調節されること、ミダゾラムは臨床使用濃度の短時間暴露でSULT2B1a発現を抑制することが明らかになった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	0	0	0
2005年度	0	0	0
2006年度	5,800,000	63,000	5,863,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	7,800,000	663,000	8,463,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：スルフトランスフェラーゼ、ニューロステロイド、学習・記憶、NMDA受容体、麻酔薬、全身麻酔、一酸化窒素、グリア細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年の全身麻酔薬・鎮静薬の進歩にはめ

ざましいものがあり、既存の薬剤と同等あるいはそれ以上の麻酔・鎮静作用を有しな

がらより作用発現が早く、しかも呼吸抑制、臓器障害などの副作用が少ない薬剤が開発されてきた。また Bispectral Index (BIS) を代表とする脳機能モニターは麻酔薬の過量投与を防ぎ、手術後の覚醒遅延や呼吸抑制の頻度を減らすことに貢献している。これらの進歩は確実に歯科・口腔外科手術における患者の周術期クオリティ（安全性、快適性）を向上させてきた。しかし高齢者においては手術後の認知機能の低下がしばしば観察され、頻度は少ないものの術中覚醒（手術中の記憶保持）の問題は依然解決を見ていない。また歯科・口腔外科領域で広く用いられるミダゾラムなどのベンゾジアゼピン系鎮静薬による前向き健忘（投与してから先の記憶が失われる現象）のメカニズムも明らかになっていない。

ニューロステロイドは主に中枢神経細胞の支持組織であるグリア細胞から産生され、神経伝達物質の作用を興奮性または抑制性に調節する物質である。硫酸プレグネノロンは海馬において記憶パフォーマンスを向上し、学習障害を改善するニューロステロイドである。高齢ラットの海馬に硫酸プレグネノロンを選択的に投与すると記憶障害の改善と記憶の増強が見られること、薬物で誘発した健忘・学習障害モデルにおいて硫酸プレグネノロンが拮抗することが報告されている。また最近硫酸プレグネノロンがラット海馬にみられるシナプス発火の長期増強現象（long-term potentiation; LTP）を増強することが報告された。このような硫酸プレグネノロンによる記憶増強作用は、興奮性アミノ酸受容体のNMDA型サブタイプの活性化を介することが示唆されている。

硫酸プレグネノロンは、プレグネノロンを基質としてステロイド代謝酵素スルフォトランスフェラーゼ（sulfotransferase; SULT）によって生合成される。一方中枢神経細胞において、一酸化窒素（nitric oxide; NO）はNMDA受容体の活性化に引き続いて起こる神経型NO合成酵素（nNOS）の活性化によって産生される。しかしながら興奮性アミノ酸受容体を介して産生されるNOおよび各種の麻酔薬が、スルフォトランスフェラーゼ活性に及ぼす影響については報告されていない。

## 2. 研究の目的

本研究計画は、学習・記憶パフォーマンス

を向上するニューロステロイド、硫酸プレグネノロンの産生を触媒する酵素スルフォトランスフェラーゼのNOを介する調節機構を明らかにすることを目的とした。これにより、手術後の認知機能低下のメカニズムの一端を示唆する可能性がある。

## 3. 研究の方法

ラット脳由来 RNA および C6 グリア細胞から抽出した RNA を用いて cDNA を合成した。それぞれの cDNA を鋳型として、SULT2A1, 2B1a, 2B1b の各アイソフォームに特異的なプライマーを用いて PCR を行い、これらアイソフォームのラット脳、肝臓、皮膚および C6 における発現を検討した。

SULT2B1a と  $\beta$ -actin を標的遺伝子として、遺伝子解析ソフトウェアによって設計したプライマー対を 20 組程度作成した。C6 グリア細胞の cDNA を鋳型としてリアルタイム PCR を行い、最も適切な解離曲線が描けるプライマー対を選択した。

ラット脳の cDNA を鋳型とし、SULT2B1a に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。TOP0 ベクターに組み込んだ PCR 生成物を大腸菌中にトランスフォームし、これを増殖・抽出してリアルタイム PCR 用スタンダードプラスミドを作成した。

C6 グリア細胞を、興奮性アミノ酸受容体の①NMDA 型サブタイプの作動薬 NMDA (100~1000 $\mu$ M)、②AMPA 型サブタイプの作動薬 AMPA (30~300 $\mu$ M)、③カイニン酸型サブタイプの作動薬カイニン酸 (100~1000 $\mu$ M)、および④すべてのサブタイプに結合する作動薬グルタミン酸 (100~1000 $\mu$ M) に 8 時間暴露した。反応終了後細胞から RNA を採取し cDNA を作成した。これを鋳型としてリアルタイム PCR を行い、SULT2B1a mRNA 発現に対する用量反応曲線を作成した。

ラット C6 グリア細胞を NO 産生刺激条件（外因性 NO ドナー投与、LPS/TNF $\alpha$  を用いたサイトカイン反応による誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 誘導) に暴露し、SULT2B1a アイソフォームの mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で測定した。また培養液中の nitrite 濃度を Griess Reaction によって測定し、NO 産生量とした。

ラット C6 グリア細胞をミダゾラム (1~100 $\mu$ M) に 2 時間、4 時間暴露した。反応終了後細胞から RNA を採取し cDNA を作成した。これを鋳型としてリアルタイム PCR を行い、SULT2B1a mRNA 発現に対する用量反応曲線を作成した。

#### 4. 研究成果

SULT2B1aはラット脳およびC6グリア細胞に発現し、SULT2B1bはラット脳のみが発現した。SULT2A1はラット脳にもC6グリア細胞にも発現しなかった。このことから、C6グリア細胞において硫酸プレグネノロンの産生を触媒するアイソフォームはSULT2B1aであることが明らかになった。

SULT2B1aと $\beta$ -actinを標的遺伝子として遺伝子解析ソフトウェアによって設計したプライマー対20組程度から、C6グリア細胞のcDNAを鋳型としてリアルタイムPCRを行い最も適切な解離曲線が描けるプライマー対1組を選択し、これを用いて以後のリアルタイムPCRを行った。

グルタミン酸およびAMPAは、受容体の脱感作を予防するcyclothiazide (100 $\mu$ M)の存在下で、用量依存的にSULT2B1a発現を抑制した。グルタミン酸によるSULT2B1a発現の抑制は、AMPA受容体の拮抗薬NBQXにより回復した。NMDAおよびカイン酸はSULT2B1a発現に影響しなかった。

LPS/TNF $\alpha$ によるサイトカイン反応でC6グリア細胞にiNOSを誘導するとSULT2B1a発現は抑制され、この抑制はiNOS阻害薬L-NILで部分的に回復した。外因性NOドナー(sodium nitroprusside; SNP, S-nitroso-N-acetylpenicillamine; SNAP)は用量依存的にSULT2B1a発現を抑制した。グルタミン酸、外因性NOドナー、iNOS誘導はいずれもnitrite産生量を増加させた。

ミダゾラムは2時間群、4時間群ともSULT2B1a mRNA発現を1 $\mu$ Mから濃度依存的に抑制した。

以上よりC6グリア細胞におけるSULT2B1a発現は、興奮性アミノ酸受容体のAMPAサブタイプを介するNOの細胞内シグナル伝達経路により調節されること、ミダゾラムは臨床使用濃度の短時間暴露でSULT2B1a発現を抑制することが明らかになった。

#### 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8件)

1. Kohjitani A, Fuda H, Hanyu O, Strott CA. Regulation of SULT2B1a (pregnenolone sulfotransferase) expression in rat C6 glioma cells: relevance of AMPA receptor-mediated NO signaling. *Neuroscience Letters* 430: 75-80; 2008. (査読有)

2. Hanazaki M, Chiba Y, Yokoyama M, Morita K, Kohjitani A, Sakai H, Misawa M. Y-27632 augments the isoflurane-induced relaxation of bronchial smooth muscle in rats. *Journal of Smooth Muscle Research* 44(6): 189-193, 2008. (査読有)

3. Yoshitomi T, Kohjitani A, Shimada M, Miyawaki T. Dexmedetomidine potentiates local anesthetic action of lidocaine via an  $\alpha$ -2A adrenoceptor. *Anesthesia & Analgesia* 107: 96-101; 2008. (査読有)

4. Hanazaki M, Yokoyama M, Morita K, Kohjitani A, Sakai H, Chiba Y, Misawa M. Rho-kinase (ROCK) inhibitors augment the inhibitory effect of propofol on rat bronchial smooth muscle contraction. *Anesthesia & Analgesia* 106: 1765-1771; 2008. (査読有)

5. Kohjitani A, Egusa M, Shimada M, Miyawaki T. Accumulated oropharyngeal water increases coughing during dental treatment with intravenous sedation. *Journal of Oral Rehabilitation* 35: 203-208; 2008. (査読有)

6. Kohjitani A, Higuchi H, Shimada M, Miyawaki T. Oral midazolam for sedation in minor oral operations in children: a retrospective study. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 46: 330-331; 2008. (査読有)

7. 糞谷 淳. 麻酔薬による一酸化窒素(NO)を介した食道平滑筋弛緩反応の抑制機序. *鹿児島大学歯学部紀要* 27: 1-13, 2007. (査読無)

8. Kohjitani A, Fuda H, Hanyu O, Strott CA. Cloning, characterization and tissue expression of rat SULT2B1a and SULT2B1b steroid/sterol sulfotransferase isoforms: divergence of the rat SULT2B1 gene structure from orthologous human and mouse genes. *Gene* 367: 66-73; 2006. (査読有)

[学会発表] (計13件)

1. 花崎元彦、千葉義彦、横山正尚、森田 潔、糞谷 淳、酒井寛泰、三澤美和: Y-27632はイソフルランの気道平滑筋弛緩作用を増強する. 第82回日本薬理学会年会、2009年3月16日、横浜.

2. Hanazaki M, Yokoyama M, Morita K, Kohjitani A, Chiba Y. Effects of sphingosylphosphorylcholine on rat bronchial smooth muscle. *The 2008 Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists*, Orlando, USA, October 20, 2008.

3. 花崎元彦、横山正尚、森田 潔、糀谷 淳、千葉義彦、三澤美和：気道平滑筋におけるカルシウム感受性調節と麻酔薬。第118回日本薬理学会関東部会、2008年6月7日、東京。

4. Miyawaki T, Maeda S, Higuchi H, Kohjitani A, Shimada M. Dexmedetomidine combined with lidocaine inhibits carrageenin-induced edema at injection site. *The 2007 Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists*, San Francisco, USA, October 14, 2007.

5. Kohjitani A, Okushima K, Miyawaki T, Hanazaki M, Sugiyama K. Midazolam attenuates SULT2B1a (pregnenolone sulfotransferase) expression in rat C6 glioma cells. *The 2007 Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists*, San Francisco, USA, October 13, 2007.

6. Hanazaki M, Yokoyama M, Morita K, Kohjitani A, Chiba Y. Effects of PDE3 inhibitors olprinone and milrinone on rat bronchial smooth muscle contraction. *The 2007 Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists*, San Francisco, USA, October 13, 2007.

7. Hanazaki M, Yokoyama M, Morita K, Kohjitani A, Chiba Y. Effect of furosemide on rat bronchial smooth muscle contraction with acetylcholine. *The 2007 Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists*, San Francisco, USA, October 13, 2007.

8. 糀谷 淳、屋島浩記、宮脇卓也、相山加綱：ラットC6グリア細胞株のスルフォトランスフェラーゼ遺伝子発現に及ぼすミダゾラムの影響。第35回日本歯科麻酔学会総会・学術集会、2007年10月5日、北九州。

9. Hanazaki M, Yokoyama M, Morita K, Kohjitani A, Chiba Y, Misawa M. Effects of

Rho-kinase inhibitors on anesthetics-induced relaxation of rat bronchial smooth muscle. *International Anesthesia Research Society 81st Clinical & Scientific Congress*, Orlando, USA, March 24, 2007.

10. Hanazaki M, Kohjitani A, Yokoyama M, Morita K. Effects of PDE4 inhibitors rolipram and ICI63197 on rat bronchial smooth muscle contraction. *The 2006 Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists*, Chicago, USA, October 15, 2006.

11. Hanazaki M, Kohjitani A, Yokoyama M, Morita K. Effect of Y-27632 on isoflurane-induced inhibitory effect on rat bronchial smooth muscle contraction. *The 2006 Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists*, Chicago, USA, October 15, 2006.

12. Hanazaki M, Kohjitani A, Yokoyama M, Morita K. H-1152 augments the inhibitory effect of propofol on rat bronchial smooth muscle contraction. *The 2006 Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists*, Chicago, USA, October 15, 2006.

13. 糀谷 淳：学習・記憶増強酵素スルフォトランスフェラーゼについて。第3回日本歯科麻酔学会中国・四国地方会、2006年7月29日、岡山。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

糀谷 淳 (KOHJITANI ATSUSHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：60304325

### (2) 研究分担者

(平成18～19年度)

花崎 元彦 (HANAZAKI MOTOHIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60379790

(平成18～19年度)

宮脇 卓也 (MIYAWAKI TAKUYA)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：00219825

(平成 19 年度)

屋島 浩記 (OKUSHIMA KOKI)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
研究者番号：20381155

(3)連携研究者

(平成 20 年度)

花崎 元彦 (HANAZAKI MOTOHIKO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：60379790

(平成 20 年度)

宮脇 卓也 (MIYAWAKI TAKUYA)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：00219825