

令和元年6月17日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17098

研究課題名(和文) PAC1-Rの阻害薬を利用した唾液腺機能維持薬の開発

研究課題名(英文) Development of medicine for improving salivation function by PAC1-R inhibitor

研究代表者

塚越 絵里 (TSUKAGOSHI, ERI)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・任期付研究員

研究者番号：60615384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、ベンゾジアゼピン系薬物のジアゼパムを長期間投与した口腔乾燥発現モデルラットにおいて、抗潰瘍薬のレバミピドが、唾液分泌の抑制を回復させること、ジアゼパムにより抑制された細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる結果が得られた。レバミピドのほうが、PACAP-DBI pathwayのレセプターの阻害薬よりも唾液分泌の改善に有効であることがわかった。また、唾液分泌機能維持薬を局所に投与するために、レバミピドの至適濃度の検討を行ったところ、培養唾液腺細胞に対する安全な濃度において、口腔内細菌に対しては菌の増殖を抑制するという副次的な結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、精神性疾患患者に対して投与される抗不安薬が副作用として口腔乾燥症を発症することから、口腔状態を改善すべく唾液腺機能維持薬の開発を行うものである。本研究により、抗潰瘍薬のレバミピドが、抗不安薬投与下でも唾液分泌の抑制を抑えることができることを動物レベルで明らかにすることができた。レバミピドはすでに一般的に処方されている薬剤で、全身投与が一般的であるが、眼科領域ではすでに局所投与されている薬剤である。レバミピドを唾液腺にも応用し局所投与できるよう薬剤の開発が期待される。本研究により、唾液腺機能維持薬作製に向けて有効な結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether rebamipide, an antistomach ulcer agent, ameliorated benzodiazepine-induced hyposalivation in rat parotid gland (PG) and submandibular gland (SMG). Repetitive administration of rebamipide reversed inhibitory effect of diazepam (DZP) on pilocarpine-induced salivary secretion. The present study has shown that rebamipide weakens the downregulatory effect of DZP on salivary secretion by preventing DZP-induced suppression of increase in $[Ca^{2+}]_i$. In addition, we examined the optimum concentration of rebamipide, and at the concentration that is safe for cultured salivary gland cells, inhibited the growth of bacteria against oral bacteria.

研究分野：医歯薬学

キーワード：口腔乾燥 精神疾患 抗不安薬 ジアゼパム レバミピド

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、精神性疾患の患者数は増加の一途を辿っている。精神性疾患の治療は、抗不安薬や睡眠薬の投与が一般的だが、これらの薬物はその期待される作用のために長期連用する場合はほとんどである。しかしながら、副作用として唾液分泌の抑制を伴い、唾液のもつ抗菌作用を失わせてしまう。これにより、カンジタ症や歯周疾患といった細菌に起因する様々な歯科疾患の発生率が高まってしまふ。精神性疾患患者において抗不安薬の投薬を止めることは事実上不可能であるため、これらの疾患の唾液分泌機能の改善が必要である。

(2) 我々はこれまで、精神性疾患患者の口腔状態を改善すべく、脳と唾液腺に対する抗不安薬の影響について探索してきた。臨床では抗不安薬や睡眠薬としてベンゾジアゼピン系薬物が広く使用されている。我々は、脳に存在するベンゾジアゼピン系薬物の受容体が唾液腺に存在することを明らかにし、また、脳に存在する PACAP-DBI pathway もまた唾液腺に存在することを明らかにした。この DBI と唾液腺機能に着目し、唾液腺において DBI は、唾液分泌抑制時に増加することも明らかにした。抗不安薬の投与により、抗不安効果と唾液分泌抑制効果が、DBI の発現増加を伴う同経路で起こることが示唆された。そこで臨床応用をふまえ、この PACAP-DBI pathway のレセプターである PAC1-R の阻害薬を作用させることで、抗不安薬投与時の唾液分泌抑制を発現させないという着想に至った。PAC1-R の阻害薬を全身投与した場合、脳における抗不安効果の抑制が考えられる。そこで、薬剤送達技術を利用した局所投与によって、唾液腺のみに選択的に PAC1-R の阻害薬を投与し、唾液分泌機能を維持するという考えに至った。

2. 研究の目的

これまでに、抗不安薬による口腔乾燥症の発症メカニズム解析結果により、DBI は、唾液分泌抑制時に増加することが明らかになった。PACAP-DBI pathway のレセプターである PAC1-R の阻害薬が DBI の増加を抑制することにより、唾液分泌抑制を改善することが予想された。本研究の目的は、PAC1-R の阻害薬の唾液分泌抑制の改善効果を明らかにし、動物に局所投与した場合でも同様に、抗不安薬投与下での唾液分泌機能が維持され、唾液分泌の抑制を抑えることができるかどうかを明らかにすることである。本研究により、口腔乾燥症の治療薬の開発への足がかりとなる研究が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 動物実験による唾液分泌抑制の改善効果の判定

口腔乾燥症を発現するモデルラットを作成するために、ベンゾジアゼピン系薬物のジアゼパム (DZP : 0.2 mg / kg) を、1日2回、7日間に亘ってラットの腹腔内に継続投与し、唾液分泌量の変化を調べる。唾液採取は、口腔内細菌の影響を排除するため、カニューレシオンによる純唾液採取をおこなう。耳下腺、および顎下腺ごとに採取した唾液量を測定し、DZP 投与による唾液抑制効果を調べる。ピロカルピン (1mg / kg) を腹腔内投与した後、15分毎に1時間、耳下腺管と舌下乳頭にそれぞれ挿入したカニューレシオンにより耳下腺および顎下腺の唾液を採取する。実験群として、PAC1-R 阻害薬の PACAP(6-38)、また、抗潰瘍薬のレバミピド (Reb) を 10、20、30、100 mg / kg で DZP と同時に投与して、唾液分泌低下に対する PACAP(6-38) と Reb の効果を判定する。単離した耳下腺腺房細胞における、細胞内カルシウム ($[Ca^{2+}]_i$) の移動に対する PACAP(6-38) と Reb の効果を、 Ca^{2+} を検出するために使用される蛍光色素である Fluo 4 を使用して分析を行う。

(2) 唾液腺機能維持薬の作製と抗菌効果の判定

Reb を使用し、唾液腺機能維持薬としての抗菌効果について検討する。唾液存在下での、唾液腺機能維持薬による細菌の増殖を抑制する相乗効果の検討を行う。使用する細菌は歯周病原性細菌である、*Prevotella intermedia* (Pi) と *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) を使用する。菌株は寒天培地により嫌気チャンパーにて 37°C にて 4 ~ 7 日間前培養する。いずれの菌株についても、寒天培地に形成したシングルコロニーを植菌し、嫌気チャンパーにて 37°C にて 1 日間培養する。その後、新しい液体培地に植菌しさらに 1 日間培養し、うち 100 μ L 菌液を実験に供する。Reb を 5 ~ 500 μ M に調整し、液体培地に菌液 100 μ L と各濃度に調整した Reb 100 μ L を入れ、1 ~ 2 日間嫌気培養する。判定は OD660nm による濁度測定で行う。

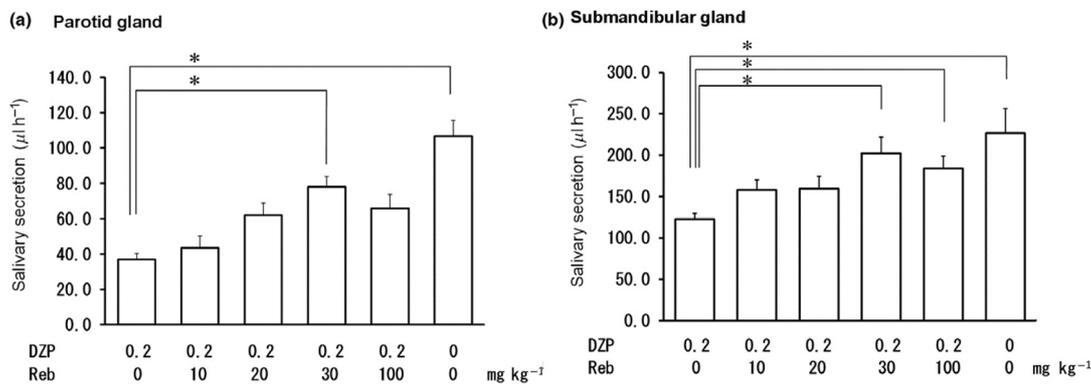
4. 研究成果

(1) 動物実験による唾液分泌抑制の改善効果の判定

DZP (0.2 mg / kg) を、1日2回、7日間に亘ってラットの腹腔内に継続投与したところ、DZP の反復投与により唾液分泌量は減少した (Fig. 1)。

DZP の投与により、耳下腺 (Fig. 1a) および顎下腺 (Fig. 1b) において、それぞれ唾液分泌量を減少させた。Reb (10、20、30、100 mg / kg) を DZP と同時に投与すると、耳下腺及び顎下腺の DZP の抑制効果を用量依存的に弱めた。DZP の唾液分泌量の抑制効果は Reb によって有意に回復した ($p < 0.05$)。本研究は、PAC1-R 阻害薬の PACAP(6-38)、と抗潰瘍薬の Reb を使用して、唾液分泌低下に対する効果の判定を行ったところ、抗潰瘍薬の Reb が唾液分泌の改善

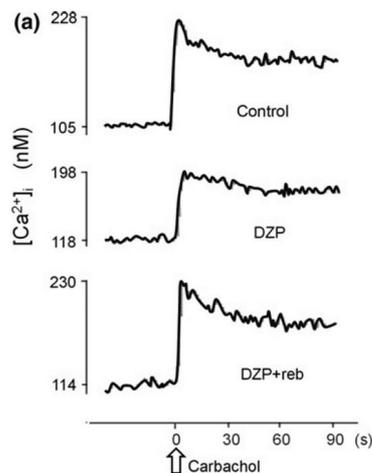
に有効との結果が得られたため、一部変更して研究を進めた。



(Fig.1) 唾液分泌抑制の改善

耳下腺腺房細胞における細胞内カルシウム ($[Ca^{2+}]_i$) の移動に対する Reb の効果を、蛍光分光光度計を用いて測定したところ、カルバコール刺激 ($10^{-7}M$) により $[Ca^{2+}]_i$ を増加させた。増加した $[Ca^{2+}]_i$ は DZP ($10^{-6}M$) によって 63.8% に抑制された。DZP の抑制効果は、Reb ($5 \times 10^{-4}M$) との併用により、92.1% まで弱まった (Fig. 2)

DZP の抑制効果は、Reb との併用により改善された。また、 $[Ca^{2+}]_i$ の増加は、Reb 単独では変化を示さなかった。

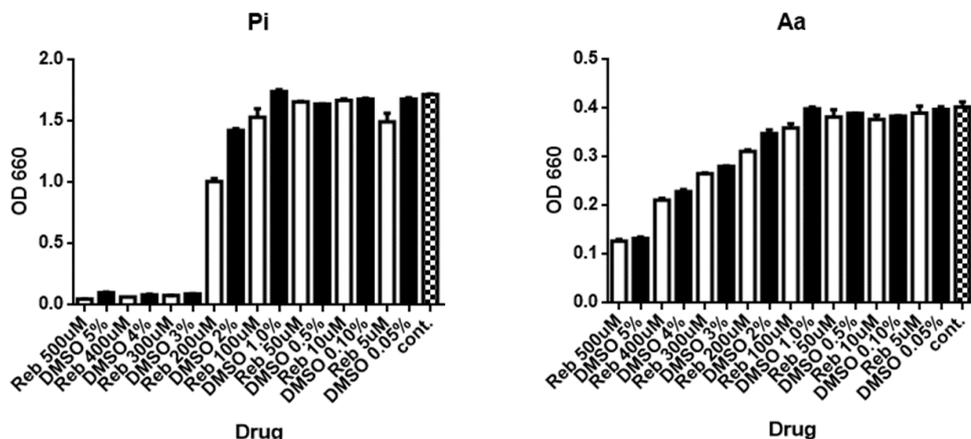


(Fig. 2) 細胞内カルシウムの変化

(2) 唾液腺機能維持薬の作製と抗菌効果の判定

Reb を使用した唾液腺機能維持薬としての抗菌効果について検討したところ、菌株、*Prevotella intermedia* (Pi) と *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) について、Reb に菌を抑制する傾向がみられた (Fig. 3)

液体培地に菌液 100 μL と、Reb (5~500 μM) を 100 μL 入れ、1~2 日間嫌気培養し、濁度測定を行った。Reb の溶媒 (DMSO) と比較すると、Reb を入れた菌液に対して、菌の抑制がみられた。Pi、Aa とともに、DMSO 2% 以上の濃度で菌数の減少がみられた。これは、DMSO による影響を受けて菌が死滅していることによるものと考えられる。菌に対しては DMSO 2% 以上の濃度で菌の生存に影響するため、今後、DMSO の濃度についても検討する必要があることがわかった。Reb は 5 μM の濃度においても、Pi、Aa に対して、菌を抑制する傾向がみられた。唾液存在下での、唾液腺機能維持薬による細菌の増殖を抑制する相乗効果が期待される。



(Fig. 3) 抗菌効果の判定

本研究から、ベンゾジアゼピン系薬物のジアゼパムを長期間投与した口腔乾燥発現モデルラットにおいて、レバミピドが唾液分泌の抑制を回復させること、ジアゼパムにより抑制された細胞内カルシウムイオン濃度を改善させる結果が得られた。また、唾液分泌機能維持薬を局所に投与するために、レバミピドの至適濃度の検討を行ったところ、培養唾液腺細胞に対する安全な濃度において、口腔内細菌に対しては菌の増殖を抑制するという副次的な結果が得られた。

レバミピドはすでに一般的に処方されている薬剤で、全身投与が一般的であるが、眼科領域ではすでに局所投与されている薬剤である。今後、レバミピドを唾液腺に応用し局所投与できるよう、唾液腺機能維持薬の剤形や至適濃度の検討を進めていく予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Yajima Y, Kawaguchi M, Yoshikawa M, Okubo M, Tsukagoshi E, Sato K, Katakura A., The effects of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) on the nephrotoxicity in the mouse during repeated cisplatin (CDDP) treatments, Journal of Pharmacological Sciences, 134(2):108-115, 2017. (査読有)

<https://dx.doi.org/10.1016/j.jphs.2017.05.006>

Tanabe K, Miura T, Yang L, Kasahara M, Tsukagoshi E, Yoshinari M., The Effect of Dexamethasone on the Proliferation and Osteoblastic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Treated with Fluvastatin, Journal of oral tissue engineering, 14(3):151-156, 2017. (査読有)

<https://doi.org/10.11223/jarde.14.151>

Ogane M, Okubo M, Yoshikawa M, Shinomiya T, Tsukagoshi E, Kawaguchi M., Rebamipide, an anti-ulcerative drug, inhibits induction of salivary dysfunction by benzodiazepines, Oral Diseases, 23(4): 511-517, 2017. (査読有)

<https://doi.org/10.1111/odi.12642>

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：三浦 直

ローマ字氏名：(MIURA, tadashi)

研究協力者氏名：田邊 耕士

ローマ字氏名：(TANABE, koji)

研究協力者氏名：大久保 みぎわ

ローマ字氏名：(OKUBO, migiwa)

研究協力者氏名：小菅 康弘

ローマ字氏名：(KOSUGE, yasuhiko)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。