

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：32650

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890213

研究課題名（和文） 唾液腺に発現するジアゼパム結合阻害因子（DBI）を介した口腔乾燥の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of xerostomia through diazepam binding inhibitor (DBI) in rat salivary glands

研究代表者

塚越絵里 (TSUKAGOSHI ERI)

東京歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：60615384

研究成果の概要（和文）：本研究では、ジアゼパム投与によるモデルラットを作成した時の PAC1-R、CYP11A1 の遺伝子発現と変動を調べた。PAC1-R、CYP11A1 の遺伝子の発現については、ラットの唾液腺組織において存在が確認され、また、継続的にジアゼパムを投与されたラットの唾液腺組織において、PAC1-R、CYP11A1 の遺伝子量が増加したこと、その時の唾液分泌量が減少したことがわかった。これらの結果により、ラット唾液腺での PAC1-R、CYP11A1 での存在が証明され、ジアゼパムにより産生が促進されたことにより、ベンゾジアゼピン受容体の感受性および機能が修飾され、唾液分泌の抑制（ベンゾジアゼピン誘発性の口腔乾燥の発現）が起きたと考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effects of repetitive administration of diazepam (DZP) on expression of PAC1-R and CYP11A1 mRNA in rat salivary glands. The present study has shown clearly that repetitive administration of DZP increased expression of PAC1-R and CYP11A1 mRNA and decreased secretion of saliva in rat salivary gland. These results suggest that repetitive administration of DZP stimulates PAC1-R and CYP11A1 expression, which may result in an increase in the suppressive effect of DZP on salivary secretion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：歯科薬理学

## 1. 研究開始当初の背景

ベンゾジアゼピン受容体は、1)細胞膜上の GABA(A) 受容体 ( $\gamma$ -aminobutyric acid A receptors; GABA(A)-R) に内在する中枢型 (central-type benzodiazepine receptors; CBR) と、2)ミトコンドリア外膜に存在する末

梢型 (peripheral-type benzodiazepine receptors; PBR) に分類される。本研究室では、ベンゾジアゼピン誘発性の口腔乾燥の発現はこれら受容体による唾液分泌の抑制的調節によるものであることを証明してきた。これまでに、唾液腺において、CBR と PBR

の結合親和性と受容体数を調べ、これら受容体の存在と特性を明らかにした。さらに、ベンゾジアゼピン受容体がイノシトール三リン酸の産生の抑制に関与していること、GABA(A)-R、CBR、PBR がアミラーゼ分泌の抑制に関与していることを明らかにした。これらの発見は CBR と PBR の二つの受容体を介した唾液分泌の抑制機構が存在することを支持するものであった。

これら受容体には内因性リガンドが存在するはずであるが、唾液腺については確認されていない。脳では、これら受容体の内因性リガンドとしてジアゼパムバインディングインヒビター(diazepam binding inhibitor; DBI)が存在し、1)では inverse agonist として作用し、クロライドチャンネルを閉鎖して不安作用を現すこと、2)では agonist として作用し、GABA(A)-R のポジティブな修飾因子であるニューロステロイドの産生と分泌に関与することが知られている。また、DBI の発現は、脳下垂体アデニール酸シクラーゼ(pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; PACAP)により、PACAP 受容体(PACAP-selective receptors; PAC1-R)を通して調節されていることが知られている。さらに、DBI の PBR への結合により、CBR を活性化させるプレグネノロン(pregnenolone; PRG)の形成を促すこと。PRG は酵素 CYP11A1(the cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme; P450sc)の作用によりコレステロールから作られることが知られている。このような機構が唾液腺にあるならば、唾液分泌の抑制機構の新たなメカニズムの存在が示唆される。

## 2. 研究の目的

前述の通り、中枢での DBI や DBI 関連遺伝子(PBR、PACAP、PAC1-R、CYP11A1)の機能と役割についての報告はあるが、唾液腺については明らかにされていない。我々は近年、ベンゾジアゼピン類のジアゼパム(diazepam; DZP)による唾液分泌抑制効果と、DBI、PBR、PACAP の唾液腺での存在を示し、それらがジアゼパム継続投与により産生が促進され、ベンゾジアゼピン受容体の感受性および機能が修飾されることを明らかにした。

これら研究成果のさらなる発展として、唾液腺での DBI 関連遺伝子である PAC1-R、CYP11A1 の存在を明らかにし、各唾液腺組織で細胞レベルでの DBI、PBR、PACAP、PAC1-R、CYP11A1 の発現動態を解析し、相互作用を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

ジアゼパム投与によるモデルラットを作成した時の PAC1-R、CYP11A1 の遺伝子発現と

変動を調べる。ジアゼパムは、ジアゼパムの投与方法は、ジアゼパムを1回投与する単回投与群と、ジアゼパムを14日間に亘って投与する継続投与群とに分ける。ジアゼパムの濃度は、1回投与ではラットの唾液分泌抑制が生じない用量(ヒト治療量の最大量: 0.4mg/kg)を使用する。また、ジアゼパムはジメチルスルホキシド(DMSO)に溶かして投与され、DMSO投与群を対照群とした。ジアゼパム最終投与の2時間後と16時間後にラットの大脳皮質、耳下腺、顎下腺、舌下腺を摘出し、遺伝子の変動を見るため RT-PCR 法による定量をおこなう。

また、ジアゼパムを14日間に亘って継続投与したときの唾液分泌量の変化を調べる。唾液採取は、カンヌレーションによる純唾液採取をおこない、口腔内細菌の影響を排除し、耳下腺、顎下腺、舌下腺ごとに採取した唾液量を測定し、ジアゼパム投与による唾液抑制効果を調べる。

## 4. 研究成果

(1) ジアゼパムを1回投与する単回投与群では、投与の2時間後と16時間後ともどの部位でも PAC1-R、CYP11A1 の遺伝子量に変化は見られなかった。(図1、図2)

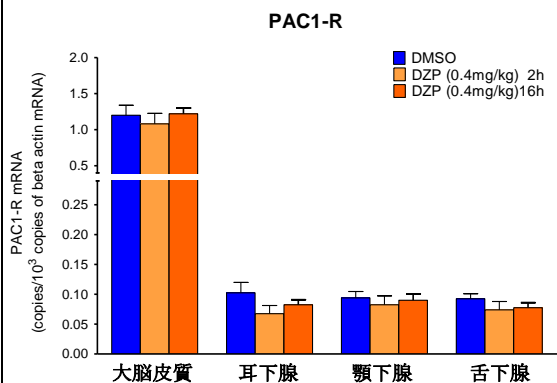


図1 PAC1-R の遺伝子発現 (DZP1 回投与)

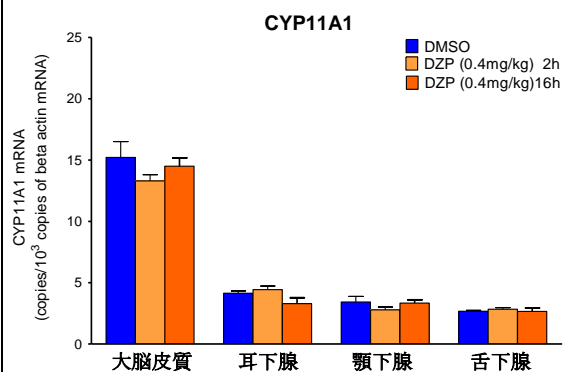


図2 CYP11A1の遺伝子発現 (DZP1回投与)

(2) ジアゼパムを 14 日間に亘って投与する継続投与群は、最終投与の 2 時間後に PAC1-R、CYP11A1 の遺伝子量に変化が見られた。PAC1-R、CYP11A1 の遺伝子量は 2 時間後全ての部位で有意に増加した。(図 3、図 4)ジアゼパムを継続投与することで、0.4mg/kg という少ない濃度でも各遺伝子は著明に増加した。また、16 時間後には PAC1-R、CYP11A1 の遺伝子量は、ともにもとの遺伝子レベルに戻っていた。

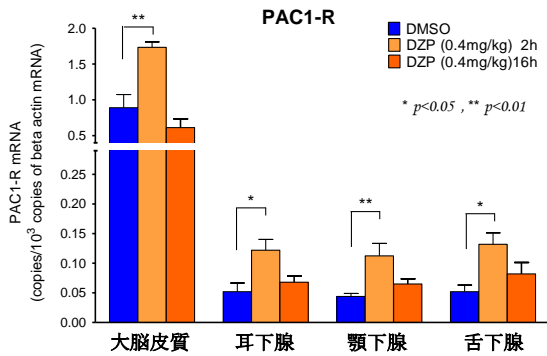


図 3 PAC1-R の遺伝子発現 (DZP14 回継続投与)

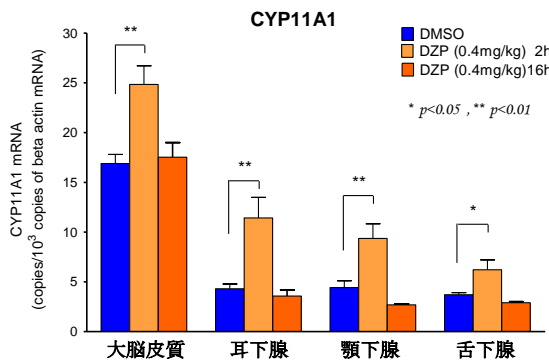


図 4 CYP11A1 の遺伝子発現 (DZP14 回継続投与)

(3) ジアゼパム継続投与の唾液分泌量の測定結果について、単回投与ではみられない唾液の抑制がみられた。ジアゼパムの最終投与の 2 時間後と 16 時間後とを比較したところ、どの腺組織でも 2 時間後に最も唾液の分泌は抑制された。2 時間後の唾液の分泌は、各腺組織で 40% から 50% に抑制された。16 時間後になるとほぼ 60% 前後に回復した。(図 5)

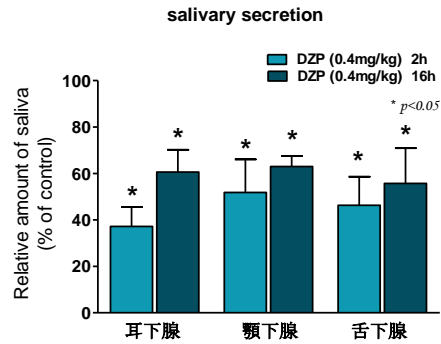


図 5 唾液分泌量の変化

(4) これまでに、ジアゼパム継続投与により DBI、PBR、PACAP の発現が増加することが示されており、さらに今回の研究では、PAC1-R、CYP11A1 の発現が増加したことがわかった。ジアゼパムにより、これら遺伝子の産生が促進され、GABA (A)-R の感受性および機能が修飾されることを明らかにした。これらの結果から、唾液分泌の抑制が起こるメカニズムを図 6 に示した。

- ①ジアゼパム継続投与により、PACAP が増え PACAP が PAC1-R に結合する。
- ②DBI の合成が促進する。
- ③DBI は PBR に結合する。
- ④その結果 CYP11A1 が活性化され、プレグネノロンの合成が行われる。
- ⑤プレグネノロンは、GABA (A)-R の機能を亢進し、細胞内 Cl<sup>-</sup>を増加させるが、Ca<sup>2+</sup>に変化がないため Ca<sup>2+</sup>依存性 Cl<sup>-</sup>チャネルが開口せず、Cl<sup>-</sup>の流出は起こらず、水の細胞間移動は低下するため唾液分泌は抑制される。

本研究では、ラット唾液腺では、PAC1-R、CYP11A1 が存在すること、PAC1-R、CYP11A1 はベンゾジアゼピン受容体の感受性と機能を修飾して唾液分泌を抑制すること、ジアゼパムは PAC1-R、CYP11A1 の産生を促進するために、唾液分泌抑制を促すことが証明された。

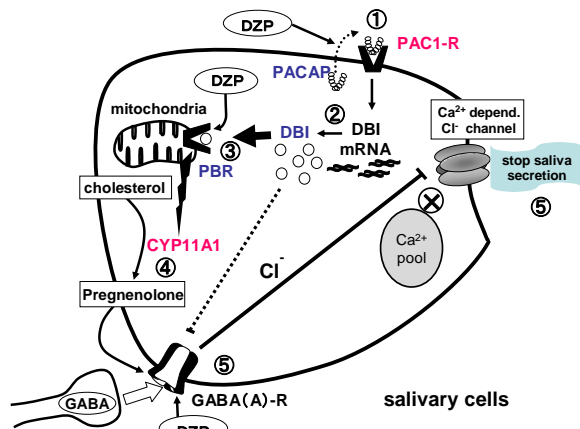


図 6 唾液分泌抑制のメカニズム

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計3件)

①塚越絵里、ラット唾液腺における PAC1-R と CYP11A1 の発現に及ぼす diazepam の効果、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14 日～16 日、国立京都国際会館 (京都市)

②塚越絵里、唾液分泌抑制機構における diazepam binding inhibitor (DBI) と GABA(A)/CBR 複合体の協調的役割、第 126 回日本薬理学会関東部会、2013 年 7 月 24 日、北里大学薬学部白金キャンパス (東京都)

③ 塚越 絵里、Effect of diazepam on producing a negative saliva secretion regulator、91<sup>st</sup> General Session & Exhibition of the IADR、2013 年 3 月 19 日～22 日、Washington State Convention Center (シアトル、アメリカ合衆国)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塚越 絵里 (TSUKAGOSHI ERI)

東京歯科大学、歯学部、非常勤講師

研究者番号：60615384