

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462808

研究課題名(和文) 内因性カンナビノイド分解阻害剤を利用した嚥下反射機能改善薬開発の検討

研究課題名(英文) Modulation of swallowing reflex by an endocannabinoid-degrading enzyme inhibitor (JZL184).

研究代表者

北川 純一 (Kitagawa, Junichi)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：50373006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、日本では医療目的としても使用禁止であるカンナビノイド系薬物に代わり、医薬品として使用可能な内因性カンナビノイド分解阻害剤を用いて、脳内の内因性カンナビノイド量を増加させることにより、嚥下反射の促進効果を調べた。内因性カンナビノイド(2-AG)の延髄へのIT投与は上喉頭神経の電気刺激による嚥下誘発を促進させた。MAGL(2-AG分解酵素)抗体を用いた免疫組織学的解析は、内因性カンナビノイド分解阻害剤(JZL184)の投与後、嚥下中枢においてMAGLの産生の減少を示した。これらの結果は、JZL184の投与により増加した2-AGが嚥下反射の亢進に関与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study was designed to investigate whether swallowing reflex in rat is modulated by JZL184, an inhibitor of the main degradation enzyme of a major endocannabinoid named 2-arachidonoylglycerol (2-AG). Intrathecal (IT) application of JZL184 reduced the latency of onset of swallowing reflex evoked by electrical stimulation of the superior laryngeal nerve (SLN). Findings of immunohistochemical study indicated that JZL184 application (IT) reduced production of the degradation enzyme monoacylglycerol lipase (MAGL), thereby increased the accumulation of 2-AG in the swallowing center of the nucleus tractus solitaries. These findings suggest that increase accumulation of endocannabinoid by preventing its degradation in the swallowing center can facilitate the triggering of swallowing reflex.

研究分野：口腔生理学

キーワード：嚥下 嚥下障害 内因性カンナビノイド 2-AG 内因性カンナビノイド分解酵素阻害剤 JZL184 上喉頭神経

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に突入した現代日本が抱える問題のひとつに、脳血管障害の後遺症で摂食・嚥下機能に障害をもつ患者さんの増加がある。摂食・嚥下機能の低下に伴い、唾液や食物の一部が気道に侵入し、窒息や誤嚥性肺炎などの重篤な疾患を招く。胃瘻や経管栄養の施術も行われているが、QOL を考慮した場合、可能なら食物の経口摂取が望ましい。現在の嚥下反射機能障害への対応は、誤嚥しないように食物の物性を適度に変える増粘剤や嚥下障害食の開発および摂食訓練などのリハビリテーションが主である。したがって、薬剤により嚥下反射機能の改善が可能であれば、一部の摂食・嚥下機能障害の患者さんや医療スタッフにとって大きな助けになるかもしれない。

申請者の研究グループでは、嚥下反射の中枢機構を解明する際、麻酔下ラットに合成カンナビノイド(WIN 55,212-2: Win)を投与すると、上喉頭神経電気刺激誘発性の嚥下反射が促進することを見いだした (Mostafaezur et al. PloS ONE, 2012)。さらに、嚥下中枢において、CB1 受容体 (カンナビノイド受容体) がグルタミン酸作動性ニューロン (興奮性シナプス) より GABA 含有ニューロン (抑制性シナプス) に多数存在することも証明した。また近年の知見において、シナプス前終末にある CB1 受容体にリガンドが結合すると、神経伝達物質の放出が抑圧されることが知られている (Tanimura et al. Neuron, 2010)。おそらく、投与した Win が嚥下中枢内の CB1 受容体に結合し、多くの抑制性シナプスにおいて伝達物質の放出が抑圧されたため、結果的に興奮性シナプスの作用が有意になり、嚥下反射を促進するのであろうと考えられる (図1)。

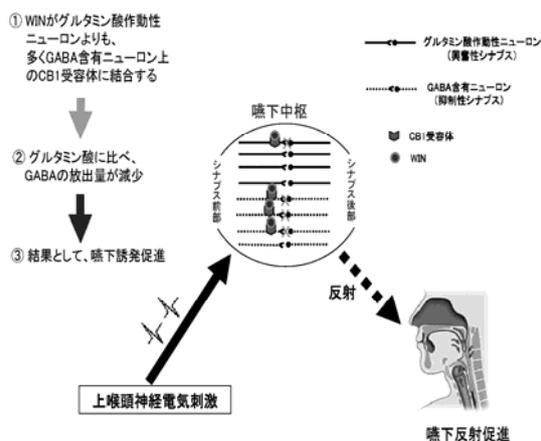


図1: Win 投与による嚥下反射促進の機序
シナプス前終末の CB1 受容体に Win が結合すると、神経伝達物質の放出が抑圧される。

本研究は、医薬品として使用可能な内因性カンナビノイド分解阻害剤を用いて、脳内の内因性カンナビノイド産生量を意図的に増やすことにより、上述の研究結果と同様な嚥

下反射誘発の促進効果を得られるかどうかを調べ、嚥下反射機能障害に対する治療薬開発の可能性を検討する。

2. 研究の目的

本研究は、日本では医療目的としても使用禁止であるカンナビノイド系薬物に代わり、医薬品として使用可能な内因性カンナビノイド分解阻害剤を用いて、脳内の内因性カンナビノイド量を増加させることにより、1) 嚥下反射の促進効果を調べ、2) 嚥下中枢における内因性カンナビノイド産生メカニズムを明らかにし、3) 嚥下反射機能障害の治療薬の開発の可能性を検討する。

1) 内因性カンナビノイド分解阻害剤 (URB597: 脂肪酸アミド加水分解酵素 (FAAH) の阻害剤または JZL187: モノアシルグリセロールリパーゼ (MAGL) の阻害剤) の嚥下誘発効果

通常、生体内で産生させた内因性カンナビノイドは分解酵素によって、速やかに分解されるが、内因性カンナビノイド分解阻害剤の使用により、脳内の内因性カンナビノイド量が増加することが充分考えられる。先述した、合成カンナビノイド(WIN 55,212-2)の投与が嚥下反射を促進する機序は、嚥下中枢のシナプス群 (とりわけ抑制性シナプス) において、シナプス前部ニューロン上の CB1 受容体 (カンナビノイド受容体) にリガンドが結合することが鍵になる。したがって、内因性カンナビノイド分解阻害剤の投与により、内因性カンナビノイド量が充分増加したときの、上喉頭神経電気刺激誘発性嚥下の促進効果を検討する。

2) 嚥下中枢における内因性カンナビノイドの産生メカニズム

内因性カンナビノイドのうち、URB597 の投与によりアナンダミドの量が増加し、JZL187 の投与により 2-AG の量が増加することが報告されている。したがって、URB597 または JZL187 投与後の嚥下誘発促進に対するそれぞれの薬剤の至適投与量を決定し、さらに嚥下中枢における内因性カンナビノイドの増加量を調べ、内因性カンナビノイド分解阻害剤 (URB597 または JZL187) の投与量と嚥下中枢における内因性カンナビノイド量の関連性を明らかにする。

3) 嚥下反射機能障害に対する治療薬開発の可能性を検討

嚥下中枢には、CB1 受容体がグルタミン酸作動性ニューロンより GABA 含有ニューロンに多数存在することが報告されている (Sickle et al. Gastroenterology, 2001)。また、シナプス前終末にある CB1 受容体にリガンドが結合すると、神経伝達物質の放出が抑圧されることが知られており、生体内では内因性カンナビノイド (2-AG) が関与してい

る。2-AGは、シナプス後部ニューロンの活動性が高くなったときに産生され、細胞外に放出される。そして、放出された2-AGはシナプス前部終末のCB1受容体に結合し、そのシナプスの神経伝達物質の放出を抑圧する(Tanimura et al. Neuron, 2010, 谷村ほか. 生化学 2011)。したがって、本申請研究において使用する2種類の内因性カンナビノイド分解阻害剤のうち、2-AGの量を増加させるJZL187の投与が、嚔下誘発促進に効果的である可能性が高いと考えられる。JZL187は、Winとは異なり医薬品として使用が認められているため、嚔下反射機能障害に対する治療薬として有効であるかを検討する。

3. 研究の方法

実験動物には、ラットまたはマウスを用いる。内因性カンナビノイド分解阻害剤であるURB597またはJZL184を投与し、ウレタン麻醉下にて、上喉頭神経を切断し、中枢端に双極ステンレス電極を取り付ける。刺激頻度を変えながら、上喉頭神経を電気刺激し嚔下反射を誘発させ、誘発潜時と嚔下間隔時間を解析する。この実験により、内因性カンナビノイド分解阻害剤の投与量および薬剤の作用発現時間と上喉頭電気刺激誘発性嚔下の促進効果の関係を検討する。また、それぞれの内因性カンナビノイド分解阻害剤の投与後、嚔下中枢が存在する延髄領域の凍結切片を作成し、DAGL(2-AG合成酵素)およびMAGL(2-AG分解酵素)抗体を使用して免疫組織学的解析を行うことにより、内因性カンナビノイド(2-AG)の脳内における産生について考察する。これらの実験結果を総合的に評価し、医薬品として使用が認められている内因性カンナビノイド分解阻害剤の、嚔下反射機能障害に対する治療薬としての可能性を検討する。

1) 内因性カンナビノイド分解阻害剤(URB597またはJZL184)の投与方法

いくつかの研究において、脳内における内因性カンナビノイドの産生機序が報告されているが、内因性カンナビノイド分解阻害剤と内因性カンナビノイドの増加量については、有効的な薬剤の投与方法、投与量または作用時間など詳細が不明な点が多い。そのため、本申請研究の初期においては、腹腔内投与、持続注入ポンプを用いた静脈投与および浸透圧ポンプを使用し嚔下中枢が存在する延髄孤束核領域への持続投与の薬剤投与方法を用いる。投与量については、それぞれの投与方法で、脳内に内因性カンナビノイド(アナンダミドまたは2-AG)量の増加が認められたことを報告している文献(Sticht et al. Br J Pharmacol, 2011, Oleson et al. Neuron, 2012など)を参考にする。

2) 嚔下反射誘発の測定

<刺激電極の装着>

ウレタン麻醉下におけるラットまたはマウスの上喉頭神経を剖出し切断し、神経の中枢端に電気刺激を与えるための双極電極を取り付ける。この際、電気刺激が上喉頭神経以外の部位に漏洩しないように電極周囲を非生体為害性シリコンで覆う。さらに、嚔下誘発の指標となる顎舌骨筋に筋電図記録用の電極を取り付ける。

<刺激電流の決定>

上喉頭神経に嚔下誘発潜時が1.0-1.5秒になる電流刺激電流の大きさ(パルス幅:1.0ms、刺激頻度:20Hz)を調べる。この刺激の決定方法は、申請者が「カンナビノイドが嚔下反射を促進する」と報告した論文(Mostafaezur et al. PloS ONE, 2012)の方法に準ずるものである。

<嚔下反射誘発の測定>

決定した定電流刺激を用いて、内因性カンナビノイド分解阻害剤(URB597またはJZL184)を投与前のウレタン麻醉下ラットまたはマウスの上喉頭神経を、刺激頻度を変えながら(10、20、30・・・70Hz)刺激し、各刺激頻度における嚔下誘発潜時および嚔下間隔時間を測定する。

次に、URB597またはJZL184を投与した後、同じ測定を行い、嚔下誘発潜時および嚔下間隔時間を比較し、上喉頭神経電気刺激誘発性嚔下反射に変調があるかどうかを調べる。

この実験を通して、URB597またはJZL184のどちらが嚔下反射誘発促進効果を持つか(おそらくJZL184と考えられる)、どのような投与方法が効果的なのか、ならびに適切な投与量や降下時間を検討する。

3) 嚔下中枢が存在する延髄領域における内因性カンナビノイドの測定

実験終了後、実験動物の延髄領域をすみやかに摘出し、凍結切片を作成する。DAGL(2-AG合成酵素)およびMAGL(2-AG分解酵素)抗体を使用して免疫組織学的解析を行うことにより、嚔下中枢内における内因性カンナビノイド(2-AG)の産生について検討する。

4) 内因性カンナビノイド分解阻害剤の嚔下反射機能障害薬としての可能性の検討

これらの実験結果を通して、内因性カンナビノイド分解阻害剤が嚔下反射機能障害薬としての可能性を持つかどうかを薬学・薬理学の専門家や嚔下障害の研究者と一緒に検討する。

4. 研究成果

1) URB597 IT投与

URB597 IT投与後の嚔下誘発特性は、低頻度(5 Hz)の上喉頭電気刺激において嚔下反射は有意に促進された。

2) JZL184 IT投与

JZL184 IT 投与後の嚥下誘発特性は、低頻度（5～15 Hz）の上喉頭電気刺激より有意に促進された。

3) JZL184 IP 投与

JZL184 IP 投与後の嚥下誘発特性は、低頻度（5 Hz）の上喉頭電気刺激において嚥下反射は有意に促進された。

4) 免疫組織学的実験

JZL184 の投与後、嚥下中枢において MAGL (2-AG 分解酵素) の産生が減少している知見が得られた。

◎考察

免疫組織学的解析の結果から、JZL184 の投与により内因性カンナビノイド (2-AG) の産生量の増加が示唆された。したがって、ZL184 の投与後の上喉頭神経電気刺激誘発性嚥下反射の亢進は、内因性カンナビノイド (2-AG) の産生量を増加が関与していると考えられる。

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 9 件)

- ① Kamimura R, Hossain MZ, Unno S, Ando H, Masuda Y, Takahashi K, Otake M, Saito I, Kitagawa J: Inhibition of the degradation of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) attenuated orofacial neuropathic pain following an injury to the trigeminal nerve in mice. *J Oral Sci*, 2017. in press. (査読有)
- ② Zakir HM, Shinoda M, Unno S, Anco H, Masuda Y, Iwata K, Kitagawa J: Involvement of microglia and astroglia in modulation of the orofacial motor functions in neuropathic-pain rats. *JOB*, 2017. in press. (査読有)
- ③ Bakri MM, Hossain MZ, Razak FA, Saqina ZH, Misroni AA, Murat NA, Kitagawa J, Saub RB: Dentinal tubules occluded by bioactive-glass containing toothpaste exhibit high resistance toward acidic soft drink challenge. *Aust Dent J*, 2016. in press. (査読有)
- ④ Tadokoro O, Ando H, Kawahara I, Asanuma N, Okumura M, Kitagawa J, Kondo E, Yagasaki H: Distribution and origin of VIP-, SP-, and phospholipase C β 2-immunoreactive nerves in the tongue of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Anat Rec (Hoboken)*, 299: 929-942, 2016. (査読有)
- ⑤ Zakir HM, Kitagawa J, Fathilah AR, Bakri MM: Muscle Spindles Provide Servo-assistance to Jaw-closing

Muscles for Chewing Hard Foods. *Sains Malaysiana*, 44:593-597, 2015. (査読有)

- ⑥ Takatsuji H, Takahashi K, Kitagawa J: Physiological and pharmacological actions involved in the pharyngeal and laryngeal sensation. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 145: 278-282, 2015. (査読有)
- ⑦ 高辻華子, 高橋功次朗, 北川純一: 咽頭・喉頭感覚が関与する生理・薬理作用. *日薬理誌*, 145: 278-282, 2015. (査読有)
- ⑧ Mostafezur RM, Shinoda M, Unno S, Zakir HM, Takatsuji H, Takahashi K, Yamada Y, Yamamura K, Iwata K, Kitagawa J: Involvement of astroglial glutamate-glutamine shuttle in modulation of the jaw-opening reflex following infraorbital nerve injury. *Eur J Neurosci*, 39: 2050-2059, 2014. (査読有)
- ⑨ Takahashi K, Shingai T, Saito I, Yamamura K, Yamada Y, Kitagawa J: Facilitation of the swallowing reflex with bilateral afferent input from the superior laryngeal nerve. *Neurosci Lett*, 562: 50-53, 2014. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 安藤宏, 増田裕次, 北川純一: 喉頭領域を支配する上喉頭神経における TRPV1 および TRPM8 チャネルの発現. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会. 2016 年 8 月 24 日～2016 年 8 月 26 日. 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市).
- ② Kitagawa J: Integration of sensory and motor function in the orofacial region. *Oral Neuroscience 2016*. 2016 年 10 月 1 日. 大阪大学歯学部 (大阪府吹田市). 招待講演.
- ③ Hossain MZ, Ando H, Unno S, Masuda Y, Kitagawa J: TRPV1 and TRPM8 channels expression and activity in the superior laryngeal nerve innervating the laryngopharynx and associated laryngeal regions: an immunohistochemical and electrophysiological study. *Oral Neuroscience 2016*. 2016 年 10 月 1 日. 大阪大学歯学部 (大阪府吹田市).
- ④ Hossain MZ, Ando H, Unno S, Kondo E, Masuda Y, Kitagawa J: Immunohistochemical and electrophysiological evidence of activity of TRPV1 and TRPM8 in the superior laryngeal nerve innervating the laryngopharynx and associated laryngeal regions. 第 10 回三叉神経研究会. 2016 年 11 月 26 日～2016 年 11 月 27 日. 佐久平プラザ 21 (長野県佐久市).
- ⑤ 北川純一: 三叉神経運動核アストログリ

アは眼窩下神経損傷による開口反射の変調に関与する。第57回歯科基礎医学会学術大会。2015年9月11日。朱鷺メッセ（新潟県新潟市）。招待講演。

- ⑥ 北川純一：咽頭・喉頭領域の感覚受容と「こく」。日本食品科学工学会第61回大会。2014年8月29日。中村学園大学（福岡県福岡市）。招待講演。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本歯科大学・歯学部・教授

北川 純一 (KITAGAWA Junichi)

研究者番号：50373006

(2) 研究分担者

日本大学・歯学部・准教授

篠田 雅路 (SHINODA Masamichi)

研究者番号：20362238