

## 論文要旨等報告書

氏	植田 紘貴
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3 8 3 7 号
学位授与の日付	平成 2 1 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	ラット上唾液核ニューロンにおけるセビメリンの興奮性作用に関する電気生理学的解析

論文審査委員 教授 北山 滋雄 教授 松尾 龍二 准教授 市川 博之

### 学位論文内容の要旨

#### 【諸言】

セビメリン( $C_{10}H_{17}NSO$ : (±)-cis-2-methylspiro [1,3-oxathiolane-5,3'-quinuclidine])はムスカリン様受容体作動薬である。当初、脳神経変性疾患である Alzheimer 病の記憶・学習・認知機能障害の改善を目的に開発が進められた。しかし、第一相臨床試験および一般薬理試験において副次的に唾液分泌の促進を認めたことから、口腔乾燥症治療薬として承認されている。

その作用機序は、唾液腺に存在するムスカリン様受容体に結合することにより唾液分泌を促進すると考えられている。しかし、中枢神経作動薬として開発された経緯や血液脳関門を通過することから、セビメリンが中枢神経系を介して唾液分泌に影響を与えている可能性が考えられるが、未だ明らかではない。

唾液分泌は自律神経により中枢性に制御されている。上唾液核ニューロンは延髄外側網様体の吻側に位置する副交感神経の起始核であり、顎下神経節を介して顎下腺、舌下腺の唾液分泌を支配する。近年、ラット上唾液核ニューロンにおける興奮性入力グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体および non-NMDA 受容体) を介することが明らかになった。しかし、ムスカリン受容体についての報告はない。

本研究では、セビメリンが中枢神経系を介して唾液分泌に影響を与える可能性を検討するため、ラットを使用し上唾液核ニューロンに対するセビメリンの影響を電気生理学的に検討した。さらに、免疫組織化学的に上唾液核ニューロンに存在するムスカリン様受容体のサブタイプを検討した。

#### 【材料および方法】

##### 1: 上唾液核ニューロンの逆行性蛍光標識および新鮮脳スライス標本の作製

生後 6~10 日齢の Wistar 系ラット (n=28) の鼓索-舌神経に 5-10% Dextran-Texas Red-lysine を注入し、逆行性に上唾液核ニューロンを蛍光標識した。手術 2 日後、ハロセン麻酔下にて断頭後、速やかに脳を摘出し、厚さ 200  $\mu\text{m}$  の矢状断スライス標本作製した。

##### 2: 神経活動の記録

ホールセルパッチクランプ法により、上唾液核ニューロンの電気的活動を記録した。保持電位  $-70\text{ mV}$ 、0.5  $\mu\text{M}$  テトロドトキシン存在下で、セビメリン (10~1000  $\mu\text{M}$ ) により誘発される微小興奮性シナプス後電流 (miniture excitatory postsynaptic current, mEPSC) および膜電流を測定した。また、ムスカリン様受容体の阻害剤が上唾液核の興奮性に与える影響を検討した。阻害剤は全て 2  $\mu\text{M}$  で使用した。薬物は、電磁弁を用いた Macro Y tube 法により 15 秒間投与した。膜電位は、静止膜電位 ( $-70\text{ mV}$ ) から電流注入を行い ( $-50\text{ mV}$ ) に維持して測定した。

##### 3: 免疫組織化学的二重染色

生後 9 日齢の Wistar 系ラット (n=4) の鼓索-舌神経に 1% FluoroGold (FG) を注入し、逆行性に上唾液核ニューロンを蛍光標識した。手術 2 日後、上唾液核を含む凍結切片 (8  $\mu\text{m}$ ) を作成し、ムスカリン様受容体 (M1-M5) に対する一次抗体を反応させた後、Rhodamine Red-X で蛍光標識した二次抗体を反応させた。

#### 4:統計分析

結果は平均値±標準誤差にて示した。有意差検定は Student's *t* 検定を行い、危険率 5%以下を有意差ありと判定した。

#### 【結果】

- 1) 観察した全ての上唾液核ニューロン (n=14) において、セビメリンにより内向き電流が発生した。また、内向き電流は用量依存的に増大した。
- 2) セビメリンにより mEPSC の発生頻度が上昇した (n=8/14)。
- 3) セビメリンにより膜電位が脱分極方向へ上昇し発火した(n=3)。
- 4) M1 受容体遮断薬の存在下で、セビメリンにより誘発される内向き電流の大きさが有意に減少した ( $p < 0.05$  student *t* test)。
- 5) 免疫組織化学的実験 (n=4) において、FG 陽性細胞である上唾液核ニューロンと M1, M3 受容体陽性細胞が一致した。

#### 【考察】

- 1) 観察した全ての上唾液核ニューロンにおいて、セビメリンにより内向き電流が発生し、その大きさは用量依存的に増大したことから、上唾液核ニューロンのシナプス後膜にムスカリン様受容体が存在することが示唆された。
- 2) 14 例中 8 例において、セビメリンにより mEPSC の発生頻度が上昇したことから、これらのニューロンではシナプス前膜にもムスカリン様受容体が存在する可能性が示唆された。
- 3) セビメリンにより膜電位の上昇と発火が認められたことから、興奮性の作用を有することが示唆された。
- 4) M1 受容体遮断薬の存在下で、セビメリンにより誘発される内向き電流の大きさが有意に減少したことから、M1 受容体が上唾液核ニューロンの興奮性の促進に関与している可能性が示唆された。
- 5) 免疫組織化学的実験において、FG 陽性細胞と M1, M3 受容体陽性細胞が一致したことから、上唾液核ニューロンに M1 受容体および M3 受容体が存在することが示唆された。

#### 【結論】

1. セビメリンは上唾液核ニューロンの興奮性を促進する。
  2. 観察した全ての上唾液核ニューロンのすべてのシナプス後膜にムスカリン様受容体が存在する。そのうち、約 60%のニューロンにおいては、シナプス前膜においてもムスカリン様受容体が存在する。
  3. 上唾液核ニューロンに存在するムスカリン様受容体は M1 および M3 受容体である。このうち M1 受容体を介した反応が大きい。
- 以上のことから、顎下腺・舌下腺の唾液分泌の一次中枢である上唾液核ニューロンには M1 受容体および M3 受容体が存在し、そのうち、セビメリンは主に M1 受容体を介して上唾液核ニューロンの興奮性を促進する可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

セビメリンはムスカリン様アセチルコリン受容体 (mAChR) 作動薬であり、口腔乾燥症の治療薬として使用されている。この薬剤は脳血液関門を通過することから、唾液腺に直接作用するだけでなく中枢神経系にも作用すると考えられる。

本論文では、顎下腺・舌下腺を支配する上唾液核ニューロン (副交感神経性) に対するセビメリンの興奮作用を電気生理学的に検討し、免疫組織化学的にmAChRを観察したものである。

実験には幼若ラットの脳スライス標本を用い、上唾液核ニューロンからホールセル・パッチクランプ法にて神経反応を記録した。その結果、1) 全ての上唾液核ニューロンはセビメリンの投与により内向き電流を発生したため、シナプス後膜にmAChRが存在することが分かった。2) 約60%のニューロンではセビメリンの投与により微小興奮性シナプス後電流の発生頻度が上昇したことから、シナプス前膜にもmAChRが存在することが示唆された。3) 免疫組織化学的にmAChRを観察すると、上唾液核ニューロンにはM1とM3受容体が存在した。4) 電気生理学的には、M1受容体遮断薬がセビメリンの効果を有意に減少させたことから、セビメリンは主にM1受容体を介して上唾液核ニューロンを興奮させることが分かった。

本論文はセビメリンが唾液腺だけでなく唾液分泌中枢 (上唾液核) にも作用することを示すとともに、上唾液核ニューロンにmAChRが存在することを初めて明らかにした。この所見は、今後の口腔乾燥症の治療法にも大きく貢献する知識を与えるものである。よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。