

学位研究紹介

ラット炎症歯髄に対する薬物輸送担体を介した Prostaglandin E₂ 輸送経路解析 Prostaglandin Transporting Protein-mediated Prostaglandin E₂ Transport in Lipopolysaccharide-inflamed Rat Dental Pulp

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻
口腔健康科学講座 う蝕学分野

大倉直人

Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics,
Department of Oral Health Science Niigata University Graduate
School of Medical and Dental Sciences

Naoto Ohkura
研究指導者 興地隆史

【目 的】

薬物輸送担体（トランスポーター）は体内における薬剤や生理活性物質に対して細胞膜を隔てた内向 / 外向輸送の重要な機能タンパクである。歯髄においても多彩なトランスポーターが遺伝子レベルにおいて発現し¹⁾、その機能調節に関与することが想定されるが、基質輸送解明の基礎となるトランスポーター解析はほとんど行われておらず、その役割は不明である。一方、prostaglandin (PG) E₂ は血管拡張などの炎症性変化に関与する代表的化学伝達物質であり、歯髄炎においても関与が確認されている。この際、PGE₂ はトランスポーターによって細胞膜輸送されることで機能が発揮すると考えられる。特に、multidrug resistance associated protein (Mrp) 4 や prostaglandin transporter (Pgt) は prostaglandin (PG) の輸送に大きく寄与しており^{2,3)}、炎症調節因子として重要である。

そこで、本研究では、実験的炎症歯髄を用いた歯髄炎時での Pgt および Mrp4 における PGE₂ 輸送経路について免疫組織学的・分子生物学的に解明することを目的とした。

【材料と方法】

1. 実験的炎症歯髄炎モデルラット作製

8週齢の Wistar 系ラットを全身麻酔科で上顎切歯歯

冠部を切断後、K-file で7mm程度の窩洞を形成し、止血確認後、起炎剤としてLPS (20mg/mL) を浸したペーパーポイントを挿入し、仮封剤で封鎖した。術後24時間で歯髄を摘出し、以下の実験を施行した。

2. 免疫組織化学蛍光染色

摘出した歯髄を液体窒素で凍結後、クライオスタットで厚さ8μmの切片を作製した。Pgt, Mrp4 および PGE₂ 合成酵素の一つである microsomal PGE₂ synthase (mPGES) の局在を CD31 (抗血管内皮細胞) との蛍光抗体二重染色法で解析した。

3. 歯髄からの PGE₂ 排出量解析

摘出した歯髄をミンズしたのち、Mrp4の阻害剤(dipyridamol)を添加後、強制的にPGE₂を産生させるためボルテックス震盪による刺激を行い、遠心をかけて上清を採取し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて PGE₂ の排出量を解析した。

【結果および考察】

本研究において、ラット切歯歯髄組織では Pgt, Mrp4 および mPGES とも CD31 陽性の血管内皮細胞の一部に共発現することが観察された。さらに、炎症歯髄からの PGE₂ 排出量は Mrp4 阻害剤によって有意に減少した。以上のことから、ラット歯髄では Pgt および Mrp4 を介した PGE₂ 輸送が主として血管内皮細胞で営まれること、および Mrp4 が歯髄炎症時に PGE₂ の外向排出輸送調節に関与することが示唆された。トランスポーターによる外向輸送によって血管内皮細胞から放出された PGE₂ は、オートクラインもしくはパラクライン様式で血管拡張や血管透過性亢進に関与することが推察される。さらに、産生された PGE₂ は感覚神経を興奮させることで急性炎症時の疼痛に深く関わる可能性があると思われる。

【結 論】

ラット切歯正常歯髄において Pgt, Mrp4 および mPGES が血管内皮細胞に発現しており、血管内皮細胞で PGE₂ が合成され、Mrp4 によって膜輸送されていることが示唆された。さらに、炎症歯髄で Mrp4 阻害剤によって PGE₂ 排出量が減少したことから、炎症歯髄では Mrp4 が PGE₂ の排出輸送に関与することが示唆された。

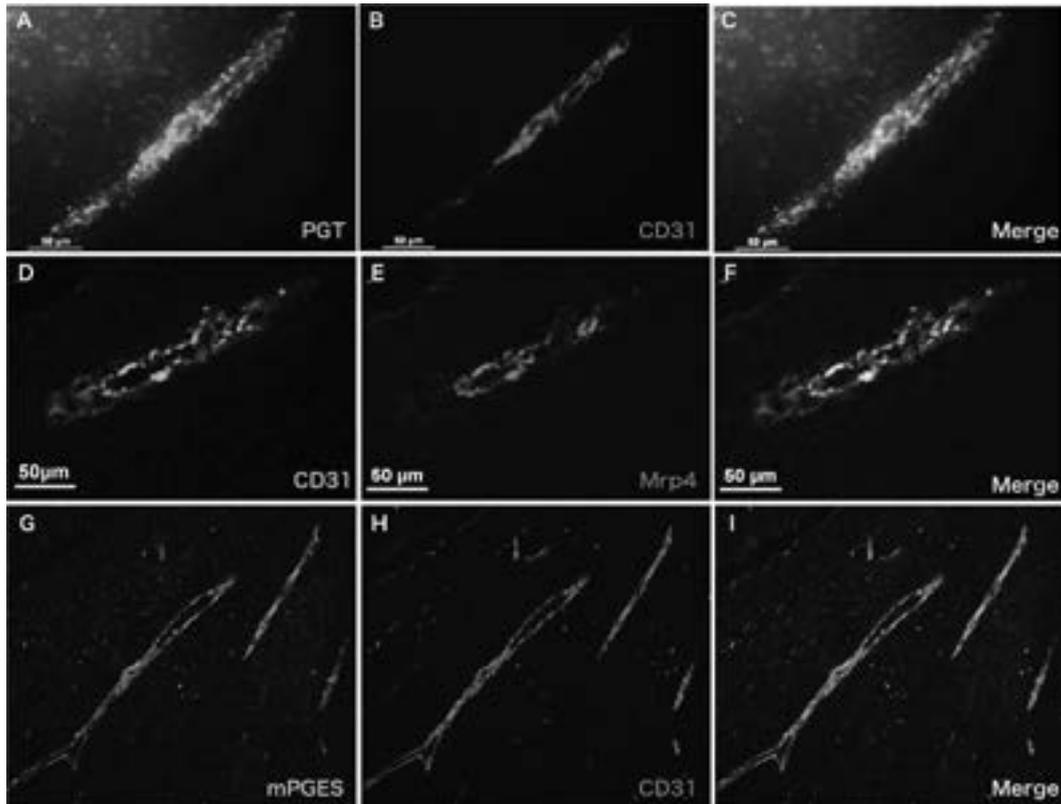


図1 Pgt, Mrp4 および mPGES の正常歯髄における免疫組織化学的局在解析
 A-C: PGT と CD31 との免疫染色, D-F: Mrp4 と CD31 との免疫染色, G-I: mPGES と CD31 との免疫染色
 ラット切歯正常歯髄では Mrp4, Pgt および mPGES 陽性反応は CD31 (血管内皮細胞マーカー) 陽性反応と同一部位に観察

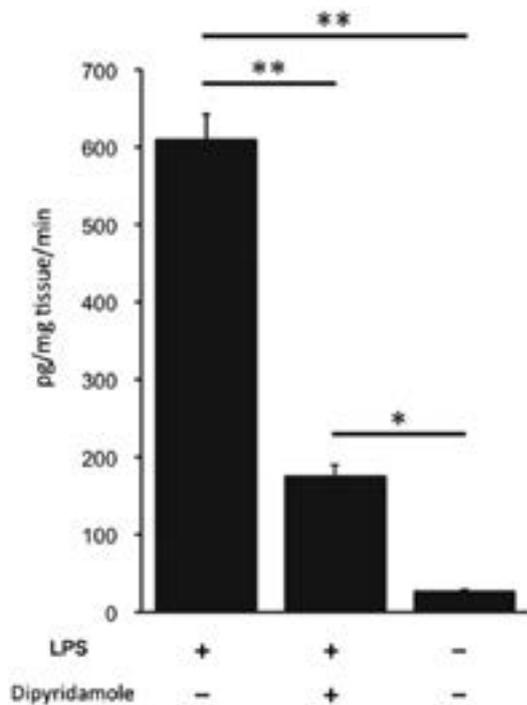


図2 PGE₂ の排出輸送への Mrp4 の関与
 炎症歯髄 (LPS 貼付 24 時間後) あるいは正常歯髄からの
 PGE₂ 排出量を ELISA で測定
 Mrp4 阻害剤として dipyridamole を使用
 (n = 3; *P < 0.01, **P < 0.05 Bonferroni 検定)

【参考文献】

- 1) Ohkura N, Shigetani Y, Yoshiba N, et al. Gene expression analysis of membrane transport proteins in normal and lipopolysaccharide-inflamed rat dental pulp. *J Endod* 2012;38:648-52.
- 2) Reid G, Wielinga P, Zelcer N, et al. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9244-9.
- 3) Kanai N, Lu R, Satriano JA, et al. Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* 1995;268:866-9.