

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20526

研究課題名(和文)デクスメトミジンによる抗炎症作用機序の解明ーアラキドン酸代謝経路の解析からー

研究課題名(英文)Elucidation of the anti-inflammatory mechanism of dexmedetomidine - Analysis of arachidonate metabolism -

研究代表者

若杉 優花 (Wakasugi, Yuka)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00749210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、デクスメトミジン(DEX)の抗炎症効果の機序の解明を目的とした。まず、マウスマクロファージ由来株細胞であるRaw264.7において、DEX投与による抗炎症効果を検討した。次に、アラキドン酸カスケードにおいて抗炎症作用を有するとされるEETs(epoxyeicosatrienoic acids)の産生がDEXの投与により増加し、抗炎症作用をもたらすのではないかと仮説した。Raw264.7においてDEXによる抗炎症効果は認められたが、DEXの投与によりEETの産生は低下した。よって、DEXの抗炎症作用はEETを介するのではなく、その産生よりも上位で作用している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the mechanism of anti-inflammatory effect of dexmedetomidine (DEX). First, anti-inflammatory effect of DEX in Raw264.7 mouse macrophages was examined. Next, it was hypothesized that the production of EETs (epoxyeicosatrienoic acids), which are considered to have anti-inflammatory effect, increased via the arachidonic acid cascade by DEX, resulting in anti-inflammatory effect. Although anti-inflammatory effect of DEX was observed in Raw 264.7, the administration of DEX inhibited the production of EET. Thus, the finding suggests that the anti-inflammatory effect of DEX possibly is not via EETs production, but other pathway.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：歯学 薬理学

1. 研究開始当初の背景

(1) デクスメデトミジン (以下 DEX) は選択的 $\alpha 2$ アドレナリン受容体アゴニストとして、中枢のノルアドレナリン神経の活動を抑制することによる鎮静作用を有し、ICU の患者管理に汎用されている。一方、DEX を局所へ投与した場合には、局所の血管収縮作用や抗炎症作用を示すことが、炎症性疼痛モデルのマウスを用いた、われわれの研究によって明らかとなっている (図 1)。

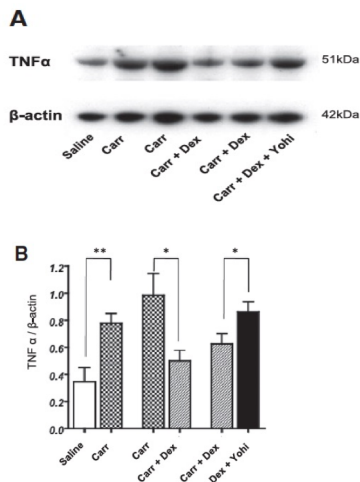


図 1: デクスメデトミジンの抗炎症作用

カラゲニンの投与により TNF- α が増加し、デクスメデトミジンにより抑制された。また、ヨヒンピンの投与により、抑制効果は拮抗された。

A: Western blott
B: A の濃度値を示す。

(2) DEX の局所投与による循環系への影響はほぼ認められないことから、DEX は歯科領域において、アドレナリンに代わる血管収縮薬として局所麻酔薬に添加することにより、循環器疾患を有する患者などに対して、安全に局所麻酔薬の作用増強と止血効果、さらに抗炎症作用をもたらすことが期待される。つまり、幅広い患者層に対して、抜歯などの小手術後の炎症性疼痛を軽減する可能性も期待できる。

(3) 炎症反応を抑制する一つの方法は、アラキドン酸カスケードをコントロールすることである。アラキドン酸はホスホリパーゼ A2 により細胞膜から遊離し、eicosanoids と呼ばれる生物学的活性を有する代謝産物へ変換される。cyclooxygenases (COX) はアラキドン酸からプロスタグランジン (PG) とトロンボキサンを産生し、lipoxygenases (LOX) はロイコトリエンを産生する。そしてアラキドン酸の第三の代謝経路として cytochrome P450 (CYP) は epoxyeicosatrienoic acids (EETs) を合成する。EETs は抗炎症作用を有する上に、この経路の活性化によりプロスタグランジンの合成が相補的に抑制されることから、新たな抗炎症の経路として注目されている。 $\alpha 2$ アドレナリン受容体は EETs の

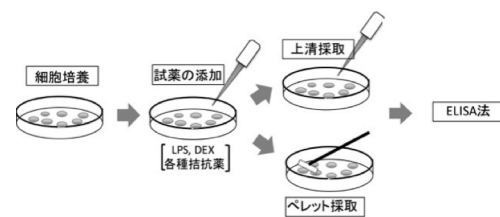
合成に関与するので、DEX の投与により EETs の合成を促進し、抗炎症作用をもたらす可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DEX の抗炎症作用の機序を解明し、その作用を臨床応用に繋げることである。そのために、まず DEX の投与により、IL-6、TNF- α の産生が抑制されることを確かめ、抗炎症効果を細胞レベルで検討する。DEX の抗炎症効果を細胞レベルで確認したのち、DEX 投与時の EETs の産生量を検討し、DEX の抗炎症効果の機序を解明することを計画した。

3. 研究の方法

マウスマクロファージ由来株細胞である RAW264.7 を用いる。



(1) 抗炎症効果の検証

実験前日に、細胞数を 0.3×10^6 個/ml に調整し、35mm ディッシュへ 2ml ずつ分けた。LPS10ng/ml のみを投与する群 (LPS 群)、LPS と DEX を投与する群 (LPS10ng/ml+DEX0.1 μ M、LPS10ng/ml+DEX1 μ M、LPS10ng/ml+DEX10 μ M、LPS10ng/ml+DEX50 μ M 群) の 5 群に分けた。LPS と DEX を共に作用させる群については、DEX を先に作用させ、その 15 分後に LPS を作用させた (各群 n=7)。作用時間は 2, 4, 6 時間とし、反応時間経過後に上清を回収した。回収した上清をサンプルとし、IL-6 および TNF- α の濃度を ELISA kit で測定した。

(2) epoxyeicosatrienoic acids (EETs) の測定

今回は EETs のうち、11, 12-EET/DHET の測定を行った。(1) と同様に、細胞はマウスマクロファージ由来の株細胞である Raw264.7 を用いた。実験前日に、細胞数を 0.3×10^6 個/ml に調整し、35mm ディッシュへ 2ml ずつ分けた。LPS10ng/ml のみを投与する群 (LPS 群)、LPS と DEX の両者を投与する群 (LPS10ng/ml+DEX0.1 μ M、LPS10ng/ml+DEX1 μ M、LPS10ng/ml+DEX10 μ M、LPS10ng/ml+DEX50 μ M 群) の 5 群に分けた。LPS と DEX を共に作用させる群については、DEX を先に作用させ、その 15 分後に LPS を作用させた (各群 n=7)。作用時間は 6 時間とした。6 時間後、上清は除去し、ディッシュに残った細胞をスクレーパーで集め、回収した。回収した細胞は、前処理

として、0.1mMのトリフェニルホスフィン共存下でホモジナイズを行った。その後、酢酸を添加してpHを3~4に調整し、酢酸エチルを用いて抽出を行った。抽出後、窒素ガスで乾固したのち、ELISA kitに適用し測定した。

4. 研究成果

(1) 抗炎症効果の検証

・IL-6

2、4、6時間経過後のIL-6の濃度は、それぞれ、2時間：LPS群 58.01pg/ml、LPS+DEX0.1 μ M群 2.04pg/ml、LPS+DEX1 μ M群 2.04pg/ml、LPS+DEX10 μ M群 1.62pg/ml、LPS+DEX50 μ M群 0.81pg/mlであり、DEXの投与によりIL-6の産生が抑制され、またそれはDEXの濃度依存性に示される傾向であった。4時間：LPS群 847.47pg/ml、LPS+DEX0.1 μ M群 750.78pg/ml、LPS+DEX1 μ M群 663.66pg/ml、LPS+DEX10 μ M群 618.51pg/ml、LPS+DEX50 μ M群 622.432pg/mlであり、DEXの投与によりIL-6の産生が抑制され、またそれはDEXの濃度依存性に示される傾向であった。また、6時間後の結果では、LPS群 2113.61pg/ml、L+DEX0.1 μ M群 2203.64pg/ml、L+DEX1 μ M群 1799.32pg/ml、L+DEX10 μ M群 1499.46pg/ml、L+DEX50 μ M群 1135.18pg/mlであり、4時間後と同様にDEXの投与によりIL-6の産生が抑制され、またそれはDEXの濃度依存性に示される傾向であった(図2)。

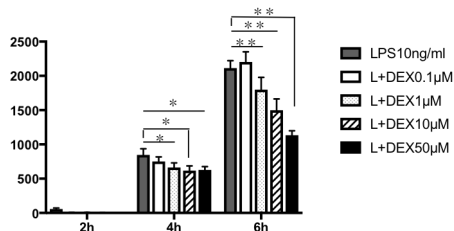


図2：デクスメドミジンによるIL-6産生量の変化

(* $P < 0.0001$ compared with LPS10ng/ml-4h,
** $P < 0.002$ compared with LPS10ng/ml-6h)

・TNF- α

2時間経過後のTNF- α の濃度は、それぞれ、LPS群 41.52pg/ml、L+DEX0.1 μ M群 59.62pg/ml、L+DEX1 μ M群 92.19pg/ml、L+DEX10 μ M群 65.58pg/ml、L+DEX50 μ M群 59.74pg/mlであった。6時間経過後のTNF- α の濃度は、それぞれ、LPS群 90.17pg/ml、L+DEX0.1 μ M群 83.47pg/ml、L+DEX1 μ M群 63.53pg/ml、L+DEX10 μ M群 62.8pg/ml、L+DEX50 μ M群 52.17pg/mlであり、DEXの投与によりTNF- α の産生が抑制され、またそれはDEXの濃度依存性に示される傾向であった(図3)。

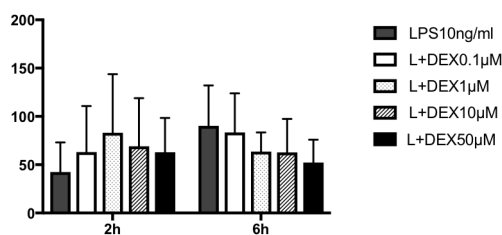


図3：デクスメドミジンによるTNF- α 産生量の変化

(2) epoxyeicosatrienoic acids (EETs)の測定

・11, 12-EET/DHET

6時間経過後の11, 12-EET/DHETの濃度は、LPS群 33242.8、L+DEX0.1 μ M群 2402.85、L+DEX1 μ M群 5258.0、L+DEX10 μ M群 4434.57、L+DEX50 μ M群 13339.9であり、DEXの濃度依存性に11, 12-EETの産生は増加傾向ではあったものの、LPS群で最も高かった(図4)。

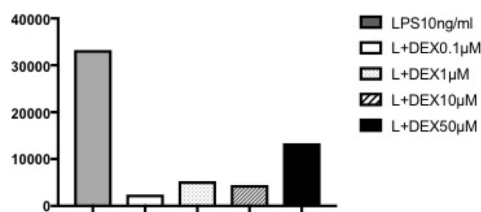


図4：デクスメドミジンによる11, 12-EET産生量の変化

以上、(1)の結果から、DEXの投与により、マウスマクロファージ由来株細胞であるRaw264.7において、IL-6およびTNF- α の産生が抑制され、DEXの抗炎症効果が確認された。またその効果は、濃度依存性に認められる傾向にあった。当初、このDEXの抗炎症効果は、DEXの投与によりEETsの産生が増加し、それによりもたらされるものと仮定していた。しかし、(2)の結果から、仮説とは反対に、DEXの投与によりEETsの産生は抑制された。このことから、DEXの抗炎症効果はEETsによってもたらされるのではなく、EETsの産生よりも上位で作用しているのではないかと考えられた。しかし、今回の研究においては6時間経過後の11, 12-EET/DHETしか測定できておらず、より早期の時点(2時間、4時間後)や、他の位置異性体(5-, 6-, 8-, 9-EET, 14-, 15-EET)についても検討していく必要があると考えられた。

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1件)

1. Honda Y, Higuchi H, Matsuoka Y, Yabuki-Kawase A, Ishii-Maruhama M,

Tomoyasu Y, Maeda S, Morimatsu H, Miyawaki T*. The inhibitory effect of locally injected dexmedetomidine on carrageenan-induced nociception in rats. European Journal of Pharmacology. 査読有, 2015, 764: 215-219.

〔学会発表〕（計2件）

1. Honda Y, Onishi Y, Higuchi H, Tanimura H, Kodama M, Mori M, Takaya K, Suda M, Yabuki-Kawase A, Yamane-Hirano A, Ishii-Maruhama M, Tomoyasu Y, Maeda S, Miyawaki T. The inhibitory effect of locally administered dexmedetomidine on acute inflammatory pain in rats. 14th International Federation of Dental Anesthesiology Societies, Berlin, Germany, October 2015.

2. 若杉優花、三宅沙紀、西岡由紀子、川瀬明子、樋口仁、前田茂、宮脇卓也. マウスマクロファージにおけるデクスメデトミジンによるIL-6の産生抑制効果, 第31回中国・四国歯科麻酔研究会, 広島市, 2016年7月31日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若杉 優花 (Wakasugi, Yuka)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00749210

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

三宅沙紀 (MIYAKE, Saki)