

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17248

研究課題名(和文)ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体を介した麻酔薬の抗炎症作用の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the anti-inflammatory mechanism of anesthetic through peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation

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) 3,100,000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。Raw264.7細胞を用いて、DEXの抗炎症効果を検討した。抗炎症作用を有するとされる15-デオキシ-12,14-PGJ2(15d-PGJ2)の産生がDEXの投与により増加し、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR γ)に作用し抗炎症作用をもたらすのではないかと仮説した。Raw264.7において炎症性サイトカインの抑制および15d-PGJ2の産生量、PPAR γ の遺伝子発現量の増加を確認した。よって、DEXは15d-PGJ2、PPAR γ を介して抗炎症作用をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔内疾患の多くは炎症を併発し、外科処置後、炎症がさらに惹起され、腫脹、疼痛が主な術後合併症になる。術後NSAIDsが使用されるが、臨床投与量では必ずしも炎症症状を完全に抑制することはできない。当教室では、鎮静薬であるデクスメトミジン(DEX)を局所投与することで、抗浮腫・炎症性疼痛抑制作用を示すことを証明してきた。本研究の目的はその機序を解明し、麻酔薬の抗炎症作用を臨床応用に繋げることである。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the mechanism of anti-inflammatory effect of dexmedetomidine (DEX). Anti-inflammatory effect of DEX in Raw264.7 mouse macrophages was examined. We hypothesized that the production of 15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2), which are known to have anti-inflammatory effect, increased via the arachidonic acid cascade by DEX, leading to anti-inflammatory effect. DEX inhibited inflammatory cytokine production, and increased 15d-PGJ2 production and PPAR γ mRNA expression in the cells. These results suggest that DEX inhibits LPS-induced inflammatory responses through 15d-PGJ2 production and PPAR γ activation.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：歯学 薬理学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) デクスメトミジン (以下 DEX) は選択的 α_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、炎症性サイトカイン産生抑制および炎症性疼痛抑制効果を認めることが、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)。

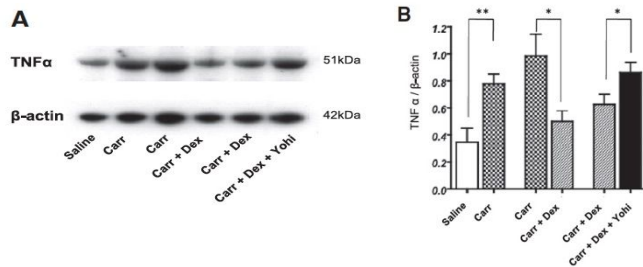


図1: デクスメトミジンの抗炎症作用¹⁾

カラゲニンの投与により TNF- α が増加し、デクスメ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。抗炎症の経路として、アラキドン酸代謝の過程で生じる 15-デオキシ-^{12, 14}-PGJ₂ (以下 15d-PGJ₂) を介する機序がある。当科では、これまでに静脈麻酔薬であるミダゾラムの抗炎症効果について、15d-PGJ₂ を介する機序を報告している。また当教室の研究において、DEX の炎症性疼痛抑制作用は、COX 阻害薬であるインドメタシンとの併用により増強されたため、DEX の抗炎症作用の機序は 15d-PGJ₂ およびその受容体であるペロオキシソーム増殖因子活性化受容体 (以下 PPAR γ) を含めた経路が関与するのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

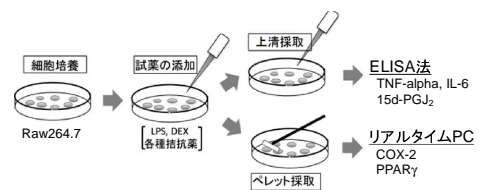
本研究の目的は、DEX の抗炎症作用の機序を解明し、その作用を臨床応用に繋げることである。そのために、炎症反応・疼痛発生に関与するアラキドン酸カスケードの代謝産物であり、抗炎症作用を有する 15d-PGJ₂ と、その受容体である PPAR γ の経路に着目し、DEX の抗炎症機序を解明することを目的とした。

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 (ELISA 用) 1.0×10^6 個/ml (リアルタイム PCR 用) 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+DEX1 μ M、LPS10ng/ml+DEX10 μ M、LPS10ng/ml+DEX50 μ M 群) の 4 群に分けた。LPS と DEX を共に作用させる群に



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=5)。さらに、DEX による抗炎症効果が α_2 アドレナリン受容体を介したものを検証するため、LPS と DEX、そして α_2 アドレナリン受容体アンタゴニストであるヨヒンピン (YOH) を投与する群 (LPS10ng/ml+DEX10 μ M+YOH100 μ M) についても検証した (n=5)。作用時間は 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 にて、COX-2 遺伝子発現量については、上清を除去し、ディッシュに残った細胞をスクレーパーで集めて回収し、リアルタイム PCR 法にて測定した。

(2) DEX を投与することによる、アラキドン酸カスケードで合成される 15d-PGJ₂ の産生、PPAR γ 遺伝子発現に対する影響

(1) と同様に、細胞は Raw264.7 を用いた。実験前日に、(1) と同様の手法にて細胞を 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+DEX10 μ M) LPS と DEX および YOH を投与する群 (LPS10ng/ml+DEX10 μ M+YOH100 μ M) について 5 群に分けた。DEX を作用させる群については、DEX を LPS より 15 分先に作用させた (各群 n=5)。作用時間は 6 時間とした。6 時間後に上清または細胞を回収した。回

回収した上清をサンプルとし、15d-PGJ₂の濃度をELISA kitにて、回収した細胞からcDNAを合成し、PPAR_γ遺伝子発現量をリアルタイムPCR法にて測定した。さらに、COX-2阻害剤であるNS-398(1μM)存在下における、PPAR_γ遺伝子発現への影響についても同様の手法にて評価した。

(3) DEXの抗炎症機序がPPAR_γを介したものであるかの検証

マウスマクロファージ由来の株細胞であるRaw264.7を用いて(1)と同様の手法にて、PPAR_γの特異的拮抗薬であるT0070907存在下における、デクスメドミジンによる炎症性サイトカイン産生抑制効果への影響を検証した。実験前日に、細胞数を0.3×10⁶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+DEX10μM) LPSとT0070907を投与する群(LPS10ng/ml+T0070907100μM) LPSとDEX、T0070907を投与する群(LPS10ng/ml+DEX10μM+T0070907100μM)の4群に分けた(各群n=5)。作用時間は6時間とし、6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にて測定した。

4. 研究成果

(1) 抗炎症効果の検証

TNF- α

6時間経過後のTNF- α の濃度は、それぞれ、LPS群 4055pg/ml、L+DEX1μM群 3734pg/ml、L+DEX10μM群 3381pg/ml、L+DEX50μM群 2641pg/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2A)。一方で、このDEXによる抑制効果はヨヒンビンにより拮抗された(図3A)。

IL-6

6時間経過後のIL-6の濃度は、それぞれ、LPS群 2114pg/ml、L+DEX1μM群 1799pg/ml、L+DEX10μM群 1499pg/ml、L+DEX50μM群 1135pg/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(図2B)。一方で、このDEXによる抑制効果はヨヒンビンにより拮抗された(図3B)。

COX-2 遺伝子発現量

6時間経過後のCOX-2遺伝子発現量は、control群(培地のみ)と比較して、それぞれ、LPS群 133.6倍、L+DEX1μM群 75.88倍、L+DEX10μM群 50.9倍、L+DEX50μM群 32.22倍であり、DEXの投与によりCOX-2遺伝子発現量が抑制され、またそれはDEXの濃度依存性に示される傾向であった(図2C)。一方で、このDEXによる抑制効果はヨヒンビンにより拮抗された(図3C)。

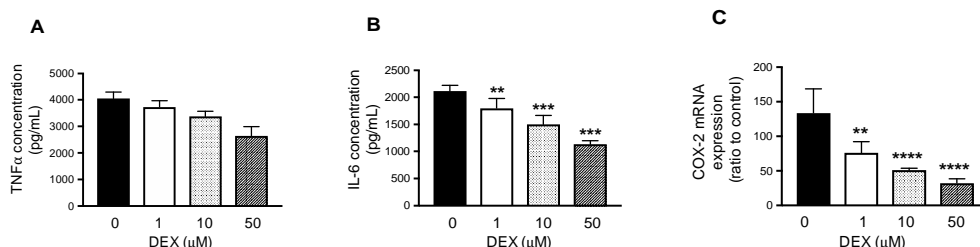


図2: デクスメドミジンの抗炎症作用²⁾

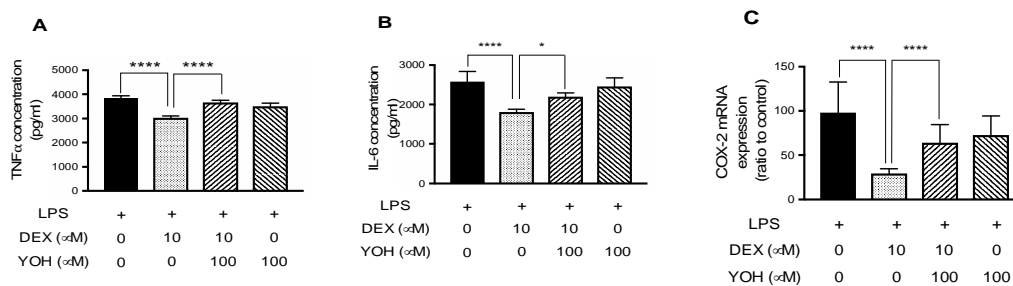


図3: ヨヒンビン存在下でのデクスメドミジンの抗炎症作用²⁾

(2) DEX を投与することによる 15d-PGJ₂ の産生量、PPAR_γ遺伝子発現量に与える影響についての検証

15d-PGJ₂

6 時間経過後の 15d-PGJ₂ の濃度は、それぞれ、control 群 38.67ng/ml、LPS 群 49.98ng/ml、L+DEX10 μM 群 63.14ng/ml、L+DEX10 μM+YOH100 μM 群 55.59ng/ml であり、DEX の投与により 15d-PGJ₂ の産生量が増加した (図 4)。一方で、この DEX による効果はヨヒンピンにより拮抗された (図 4)。

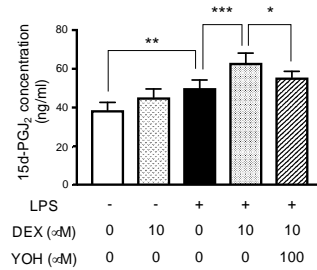


図 4 : デクスメドミジンの添加が 15d-PGJ₂ 産生量に与える影響²⁾

PPAR_γ

6 時間経過後の PPAR_γ遺伝子発現量は、control 群 (培地のみ) と比較して、それぞれ、LPS 群 1.1 倍、L+DEX10 μM 群 4.759 倍、L+DEX10 μM+YOH100 μM 群 1.706 倍であり、DEX の投与により PPAR_γ遺伝子発現量が増加した。一方、この DEX による効果はヨヒンピンにより拮抗された (図 5)。

また、NS-398 存在下での PPAR_γ遺伝子発現量は、control 群 (培地のみ) と比較して、それぞれ、LPS 群 2.914 倍、L+DEX10 μM 群 4.44 倍、L+DEX10 μM+NS-398 10 μM 群 3.245 倍であり、DEX を投与しても PPAR_γ遺伝子発現量は増加しなかった (図 6)。

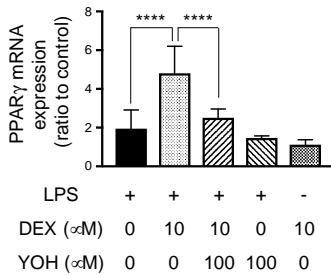


図 5 : デクスメドミジンの添加が PPAR 遺伝子発現量に与える影響²⁾

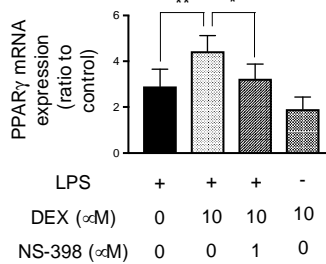


図 6 : NS-398 存在下でデクスメドミジンの添加が PPAR 遺伝子発現量に与える影響²⁾

(3) DEX の抗炎症機序が PPAR_γを介したものであるかの検証

TNF-

6 時間経過後の TNF- の濃度は、それぞれ、LPS 群 5455pg/ml、L+DEX10 μM 群 4240pg/ml、L+DEX10 μM+T0070907 100 μM 群 5008pg/ml、L+T0070907 100 μM 群 4693pg/ml であり、DEX の投与による TNF- の産生抑制効果は T0070907 により拮抗された (図 7A)。

IL-6

6 時間経過後の IL-6 の濃度は、それぞれ、LPS 群 1819pg/ml、L+DEX10 μM 群 727.8pg/ml、L+DEX10 μM+T0070907 100 μM 群 1990pg/ml、L+T0070907 100 μM 群 2175pg/ml であり、DEX の投与による IL-6 の産生抑制効果は T0070907 により拮抗された (図 7B)。

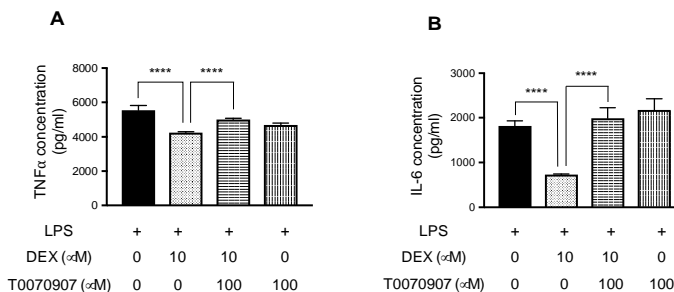


図 7 : T0070907 がデクスメドミジンの抗炎症効果に及ぼす影響²⁾

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- の産生、COX-2 遺伝子発現が抑制され、₂ アドレナリン受容体を介した 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。また、(2) および (3) の結果から、DEX の抗炎症効果は PPAR_γの活性化を介していることが示された。当初、DEX の抗炎症効果は、DEX の投与により PPAR_γが直接活性化されることによりもたらされるものと仮定していた。しかし、(2) で COX-2 阻害薬である NS-398 の存在下で

DEX を投与した際の PPAR γ の遺伝子発現量を検証した結果、NS-398 存在下では DEX は PPAR γ 遺伝子発現量を増加させなかった。このことから、DEX の抗炎症機序として、DEX が直接 PPAR γ を活性化させているのではなく、COX-2 を介した 15d-PGJ $_2$ および PPAR γ の抗炎症経路を活性化させることによるものであると示唆された。

< 引用文献 >

- 1) Sukegawa, S., Higuchi, H., Inoue, M., Nagatsuka, H., Maeda, S. and Miyawaki, T.: Locally injected dexmedetomidine inhibits carrageenin-induced inflammatory responses in the injected region. *Anesthesia & Analgesia*. 2014, 118, 473-480
- 2) Fujimoto M, Hitoshi H, Honda-Wakasugi Y, Miyake S, Maeda S, Yabuki-Kawase A, Miyawaki T., Dexmedetomidine inhibits LPS-induced inflammatory responses through peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) activation following binding to α 2 adrenoceptors. *European Journal of Pharmacology*. 2021, 892: 173733

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujimoto M, Hitoshi H, Honda-Wakasugi Y, Miyake S, Maeda S, Yabuki-Kawase A, Miyawaki T.	4. 巻 892
2. 論文標題 Dexmedetomidine inhibits LPS-induced inflammatory responses through peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR) activation following binding to 2 adrenoceptors.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 173733
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2020.173733	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤本磨希, 若杉優花, 三宅沙紀, 樋口仁, 前田茂, 宮脇卓也
2. 発表標題 デクスメドミジンはペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）活性を介してLPS誘発性炎症反応を抑制する
3. 学会等名 第48回日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujimoto M, Miyake S, Honda-Wakasugi Y, Hitoshi H, Maeda S, Miyawaki T.
2. 発表標題 Dexmedetomidine increases expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) in LPS-stimulated mouse macrophage-like cells.
3. 学会等名 Euroanaesthesia（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 若杉優花, 三宅沙紀, 藤本磨希, 栗田恵理佳, 川瀬明子, 樋口仁, 前田茂, 宮脇卓也
2. 発表標題 マウスマクロファージ由来株細胞（Raw264.7）におけるデクスメドミジンによるIL-6産生抑制効果
3. 学会等名 第45回日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	藤本 磨希 (Fujimoto Maki)	岡山大学・大学病院・医員 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------