

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20468

研究課題名(和文)炎症惹起歯髄のPGE2経路に対するユーギノールの作用

研究課題名(英文)Effect of eugenol on PGE2 pathway in inflamed pulps of rats

研究代表者

深田 哲也(Fukada, Tetsuya)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：20386254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯科領域で用いられているユーギノールの抗炎症作用をラット歯髄炎症モデルを用いて検討した。機械的に炎症を惹起したラット下顎切歯に酸化亜鉛ユーギノール練和物(ZOE)を適用した。H-3標識ユーギノールを用いて作製したZOE適用歯髄内のユーギノール量を検討した。歯髄内には組織重量当たり最大で  $3.6 \pm 0.7$  mmol/g のユーギノールを認めた。また、歯髄へのZOEの適用は、プロスタグランジン(PG)E2受容体サブタイプのなかで EP2受容体の炎症時の発現誘導を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユーギノールを主成分とする丁子は古くから用いられ、10世紀に著された医心方に歯科治療の記録がある。本研究では、伝統的に用いられてきたユーギノールの抗炎症作用の一部にプロスタグランジンE2合成酵素の抑制とプロスタグランジンE2受容体発現抑制が関与することを明らかとした。これらのメカニズムはより有用な抗炎症薬の治療標的になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effect of eugenol on mandibular incisor pulps of rats inflamed with a mechanical irritation. We applied zinc oxide eugenol mixture (ZOE) to a cavity of incisor, eugenol was released from ZOE at a mount of  $3.6 \pm 0.7$  mmol/g. The application of ZOE to the cavity decreased an expression of prostaglandin E2 receptor (EP) 2 induced with a application of zinc oxide water mixture, as a control.

研究分野：放射線生物学

キーワード：ユーギノール prostaglandin 歯髄炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) プロスタグランジン(PG)は細胞膜のアラキドン酸に由来する。アラキドン酸は膜中のリン脂質に結合した形で貯留され、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> により切り出される。遊離したアラキドン酸はシクロオキシゲナーゼ(COX)により PGH<sub>2</sub> となり、さらに各 PG 合成酵素によって PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> などに変換される。細胞内で合成された PG はトランスポーターを介して細胞外へ放出され、そこで各特異的受容体と結合することで生理作用を発現する。この反応は生体内で恒常的に生じているが、熱や外傷などの物理的ストレスあるいは細菌感染などの炎症性刺激により誘導型の COX-2 が発現することで最終産物である PG が大過剰に生成される。我々はラット炎症惹起歯髄に対するユージオールの作用を調べ、炎症惹起歯髄において PG 類の中で PGE<sub>2</sub> への変換活性が最も高いこと、また炎症惹起歯髄に酸化亜鉛ユージオール練和物を適用すると歯髄中の PGE<sub>2</sub> 含量が低下することを報告した(第 51 回歯科基礎医学会総会)。

(2) PGE<sub>2</sub> の生合成は細胞内、特に核膜近傍や細胞質中で行われるが、その受容体は細胞膜上にある。これまでは細胞内と細胞外の PG の濃度勾配により拡散するとされてきたが、Ohkura らは PGE<sub>2</sub> の細胞膜通過にはトランスポーターが必要であることを報告した。PG 類には本研究課題で扱う PGE<sub>2</sub> をはじめ PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> など多くのサブタイプが知られている。各 PG はそれぞれ対応する特異的受容体を介して作用を発揮する。他の PG 類と異なり PGE<sub>2</sub> 受容体は EP1 から EP4 まで少なくとも 4 種類の受容体が確認されている。Chang らは PCR 法を用いてヒト歯髄細胞に EP1 から EP3 のサブタイプが存在していることを報告した。しかし、歯髄内には繊維芽細胞、象牙芽細胞をはじめ血管や神経が存在し、受容体とこれら細胞の局在は未知である。一方、塗々木は歯髄局所に PGE<sub>2</sub> を適用すると血流量が増大するという報告をしている。このことから、歯髄中の血管内皮細胞においても他の末梢血管内皮細胞と同様に EP2 受容体の存在をうかがわせる。

本研究課題において、EP 受容体の発現細胞を明らかにし、ユージオールが PGE<sub>2</sub> 作用の発現に關与するトランスポーターおよび受容体に影響を与えるか明らかにする。

### 2. 研究の目的

(1) 丁子油は歯科領域において歯髄鎮静、抗菌作用、抗炎症作用を目的に伝統的に用いられてきた。近年、丁子油の主成分であるユージオールは痛覚受容体 TRPV1 の抑制を介して歯髄鎮静作用を発現することが報告された。我々はこれまでに炎症時の PGE<sub>2</sub> 産生を酸化亜鉛ユージオール練和物中のユージオールが PG 合成酵素の抑制により減少させることを報告した。低分子化合物であるユージオールが歯髄内に移行し PG 合成抑制に關与していることが考えられるが、ユージオールの易酸化性および前述の低分子化合物であるという特性からその定量法は存在していない。本研究課題では H-3 標識ユージオールを用いて歯髄中ユージオールの定量を試みた。

(2) さらに PGE<sub>2</sub> の作用発現には特異的受容体との結合と細胞内情報伝達経路の活性化が必要である。本研究課題においてはユージオールの PGE<sub>2</sub> 受容体に対する作用をラット炎症惹起歯髄モデルを用いて検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 7 週齢雄性 Wistar 系ラット下顎切歯に麻酔下で深さ 5 mm の窩洞を形成し、窩洞形成部に酸化亜鉛-ユージオール練和物を填塞した。経時的に切歯および切歯歯髄を摘出し免疫組織化学染色および Western blot 法により PG 受容体発現を検討した。

(2) H-3 標識ユージオールを用いて作製した酸化亜鉛ユージオール練和物を填塞した切歯より、非脱灰凍結切片を作製した。切片をオートラジオグラフィフィルムに密着し、一定時間の後にフィルムを現像、切歯中のユージオール分布を観察した。

(3) (2)と同様に処置した切歯より歯髄を摘出し、填塞物との接触面を除去したのち歯冠部と歯根部に分割した。それぞれ組織化溶加剤を用いて可溶化した後に、液体シンチレーションカウンタで H-3 標識ユージオールに由来する放射能を計測し、歯髄重量当たりのユージオール量を算出した。

(4) 7 週齢雄性 Wistar 系ラットを安楽死の後に下顎切歯を摘出した。摘出した歯髄を細切、酵素処理し細胞培養を行った。細胞は 20 % FBS 添加 DMEM/F-12 培地で培養し、コンフルエントになった細胞

を 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ユーヅノールで 30 分間前処理したのちに 100ng/mL LPS 存在下で一定時間培養した。タンパク質発現は Western blot 法により行った。

#### 4. 研究成果

(1) H-3 標識ユーヅノール含有酸化亜鉛ユーヅノール練和物を填塞した切歯切片のオートラジオグラム像より、歯髄中にユーヅノールの遊離が観察された。歯髄中ユーヅノールの遊離を液体シンチレーションカウンタで定量したところ、填塞部に近い歯髄で組織重量当たり  $3.7 \pm 0.7$  mmol/g (Fig.1 top)であった。またより遠位の歯髄においても  $0.8 \pm 0.2$  mmol/g (Fig.1 bottom) のユーヅノールの存在を確認した。

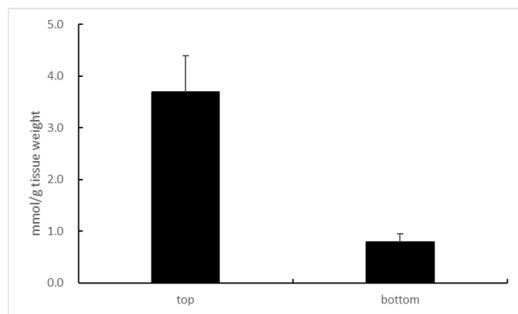


Fig.1 C-14 Eugenol released from ZOE.

(2) 切歯歯髄内の EP 受容体サブタイプ発現を Western blot 法で検討を行った。ラット歯髄には EP2 および EP3 までのサブタイプ発現が認められ、コントロール填塞物として用いた酸化亜鉛水練和物ならびに酸化亜鉛ユーヅノール練和物の填塞で変化がなかった。一方、歯髄の免疫組織化学染色では酸化亜鉛水練和物填塞歯髄において EP2 受容体の発現が異所性に亢進していることが観察された。さらに EP2 受容体は酸化亜鉛ユーヅノール練和物填塞歯髄において、その発現が減少していた (Fig.2)。

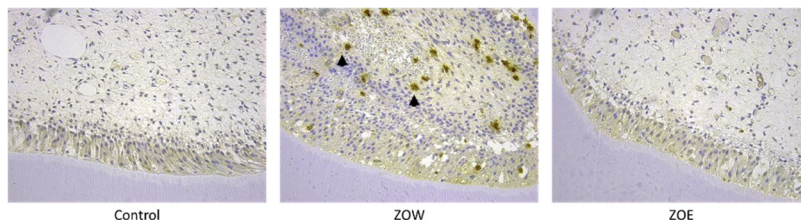


Fig.2 EP2 in pulps with or without treating.

ZOW: zinc oxide water mixture,

ZOE: zinc oxide eugenol mixture.

(3) LPS で処理した歯髄細胞では誘導型プロスタグランジン合成酵素である COX-2 と mPGES-1 の発現が亢進していた。ユーヅノール前処理により mPGES-1 発現亢進は、既に報告した酸化亜鉛ユーヅノール練和物を適用した歯髄と同様に減弱した。

以上より、歯髄に適用された酸化亜鉛ユーヅノール練和物の抗炎症作用には、歯髄中に遊離したユーヅノールの  $\text{PGE}_2$  産生抑制のみでなく、その受容体の発現調節も関与していることが示唆された。この受容体発現制御機構は新たな抗炎症薬のターゲットになりうる可能性があり、さらなる検討を進める予定である。

< 引用文献 >

Prostaglandin Transporting Protein-mediated Prostaglandin E2 Transport in Lipopolysaccharide-inflamed Rat Dental Pulp, Ohkura N, et.al., Journal of Endodontics, 1112, 2014.

Cytokine induced prostaglandin E2 production and cyclooxygenase 2 expression in dental pulp cells: downstream calcium signalling via activation of prostaglandin EP receptor, Chang M.-C. et.al., International Endodontics Journal, 819, 2006

血管作動薬および下歯槽神経電気刺激のイヌ歯髄血流量におよぼす影響, 塗々木和男, 日薬理誌, 61, 1988

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深田哲也, 前田宗宏, 西田太郎, 戸円智幸, 橋本修一, 五十嵐 勝, 筒井健夫
2. 発表標題 ラット歯髄炎症モデルにおける酸化亜鉛ユージノール練和物によるPGE2産生抑制機序の解析
3. 学会等名 日本歯科保存学会 2019年度春季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深田哲也, 戸円智幸, 橋本修一
2. 発表標題 ラット歯髄細胞のprostaglandin E2合成系酵素に対するユージノールの作用
3. 学会等名 第60回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 深田哲也
2. 発表標題 ラット炎症惹起歯髄内の prostaglandin E 受容体に対する酸化亜鉛ユージノール練和物の作用
3. 学会等名 第59回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 深田哲也
2. 発表標題 ラット歯髄炎症モデルにおける prostaglandin E2合成酵素と酸化亜鉛-ユージノール練和物の作用
3. 学会等名 日本歯科大学歯学会ウインターミーティング
4. 発表年 2016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
--	---------------------------	-----------------------	----