

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861794

研究課題名(和文) 実験的歯髄炎におけるトランスポーターを介したプロスタグランジンE2輸送機構の解析

研究課題名(英文) Membrane transport protein mediated prostaglandin E2 transport in experimentally inflamed rat dental pulp

研究代表者

大倉 直人(OHKURA, Naoto)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：00547573

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)：本研究では、プロスタグランジンE2(PGE2)の細胞外への輸送経路、および炎症時に展開されるMrp4、PgtおよびEPレセプターの局在解析を解明するために、歯髄炎モデルラットを作製し、遺伝子発現解析、免疫組織化学的解析およびELISAを用いたPGE2輸送の寄与率の解析を行った。その結果、炎症歯髄で、Mrp4、PgtおよびmPGESは主として血管内皮細胞で検出され、これらの細胞がPGE2の合成および排出方向への膜輸送機構を備えることが示唆されるとともに、象牙芽細胞および血管内皮細胞に発現しているEP2およびEP4と結合することで様々な役割を演じることが推定された。

研究成果の概要(英文)：This study attempted to analyze the mRNA and protein expression of Mrp4, Pgt and EPs receptors with real-time PCR and immunofluorescent staining in lipopolysaccharide-inflamed rat incisor pulp tissue. Moreover, the amounts of PGE2 released from the inflamed pulp tissue in the presence of absence of inhibitors were assessed by using an enzyme-linked immunosorbent assay. Mrp4, Pgt, and mPGES expression were detected in the endothelial cells of normal and LPS-inflamed rat incisor pulp tissue, suggesting that these cells are associated with the biosynthesis and transmembrane efflux transport pathway of PGE2. Moreover, EP2 and EP4 were expressed in odontoblasts and endothelial cells, suggesting that EP2 and EP4 might play various roles in dental pulp inflammation by binding the PGE2.

研究分野：歯内療法

キーワード：トランスポーター プロスタグランジンE2 MRP4 PGT

1. 研究開始当初の背景

膜輸送担体(トランスポーター)は細胞膜上に発現するタンパク質であり、脂質二重膜を通過できない有機イオン、糖、薬物などを輸送することで、生命維持に必須の物質交換のみならず、細胞の特異機能や薬物の作用発現などに関与することが注目されている。歯髄においても多彩なトランスポーターが発現し、その機能の調節に関与する事が想定されるが、現在までこの方面の検索は、申請者らの報告を除いて全く行われていない。

一方、プロスタグランジン(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、歯髄炎においてもこの種の関与が確認されている。この際、PGE₂は受動輸送のみならず、種々のトランスポーターにより細胞内から細胞外へ輸送された後、標的細胞の膜表面のレセプターと結合することで機能を発揮すると考えられる。ところが、PGE₂が organic anion transporter(Oat)ファミリーや organic anion transporter polypeptide (Oatp) ファミリーに属するトランスポーターを介して輸送されるとの報告がみられるものの、その輸送経路は不確定であり、検索が急務となっている。

申請者は上述の点に着目して検索を行っており、wild type ラットの切歯歯髄に発現している各トランスポーター群の網羅的解析の所見を得るとともに、歯髄炎モデルラットで各種 PG トランスポーターの遺伝子発現レベルが様々な変動を呈することも報告している。

しかしながら、従来の知見は主として遺伝子発現レベルに関するものであり、各トランスポーター群におけるPGE₂輸送への関与(寄与率)がどの程度のものなのかについては全く検討されていない。この点を明確とするためには、炎症時と非炎症時でのPGE₂に対する排出輸送比較実験が必要不可欠と考えている。また、歯髄における各トランスポーターおよび受け手となるPGレセプターの局在解析もPGE₂の輸送経路を明確にするうえで重要なファクターとなりうる。しかしながら、これらの点に注目した報告は未だなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、これまでの検索解析を更に発展させるために企画されたものであり、歯髄炎モデルラットを用いた、PGE₂を基質とするトランスポーターおよび特異的 PGE₂レセプターを網羅的に検索することで、これまで不明確であったPGE₂の細胞外への輸送経路、および炎症時に展開されるトランスポーターおよびPGE₂レセプターの時空間的局在変化を解明することを目的とする。つまり、ラット切歯歯髄にlipopolysaccharideを貼付して歯髄炎モデルラットを作製し、PGE₂を強制的に産生させた状態下で、以下の検索解析項目について遺伝子発現解析、寄与率の解析ならびに免疫組織化学的解析を行うことにより、炎症歯髄におけるトランスポーター群の役割について、特に PGE₂輸送機

構に着目して検索を行った。

また、これまで未知であった歯髄組織におけるトランスポーター群の発現、局在様式を網羅的に検索するのみならず、歯髄炎発症後の PGE₂輸送経路に着目して、歯髄でトランスポーター群が発揮する機能の一端を解明しようとするものである。各種トランスポーター群がさまざまな組織で演じる多彩な機能を鑑み、本研究の結果が歯髄疾患発症機構の分子・遺伝子レベルでの解析に新たな地平を拓くものとなりうる事が予想される。さらに、トランスポーターは薬物輸送担体として様々な組織における薬物動態に重要な役割を果たすことから、薬効発現部位への効果的なデリバリーが可能な薬物の開発などの視点から創薬での領域でも多大な注目を集めている。従って、効果てきな薬物輸送経路をターゲットとした歯髄疾患に対する新規薬剤の開発等に繋がる基礎的研究の端緒とした目的も含まれている。

3. 研究の方法

(1)遺伝子レベルの発現量解析

Multidrug resistance associated protein (Mrp)-4、Prostaglandin transporter (Pgt)およびPGE₂レセプター群(EPs)の歯髄炎時における遺伝子発現量について、リアルタイム PCR 法を用いて正常時との経時的比較解析を行った。

(2)免疫組織化学的解析

各トランスポーター群(Mrp4 および Prostaglandin transporter (Pgt))およびEPs (EP2 および EP4)に対する特異的抗体を使用して、正常および炎症歯髄におけるこれらの局在に対して蛍光抗体染色法を用いて解析した。

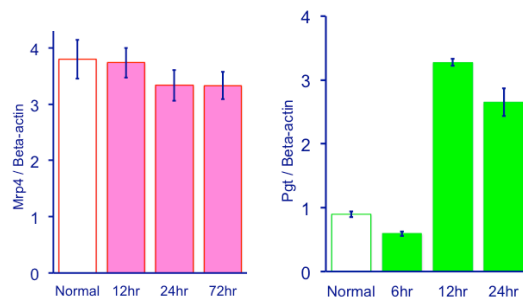
(3)Mrp4 および Pgt の PGE₂細胞内輸送送達に対する寄与率の探索

各トランスポーターの阻害剤を利用して、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法によってPGE₂における寄与率を探索した。

4. 研究成果

(1)遺伝子レベルの発現量解析

炎症歯髄モデルラットの切歯歯髄を用いたリアルタイム PCR 解析を行ったところ、Mrp4 では起炎 2 日後に 1.5 倍に増加、Pgt では起炎 6 時間後に 2.3 倍に増加しその後徐々に減少した。



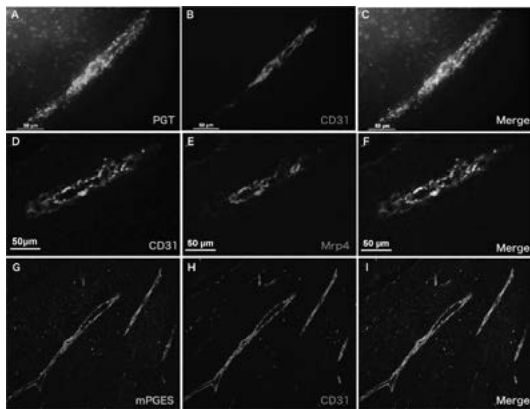
EPレセプターに関しては、EP1は炎症誘発6時間後に0.3倍に減少しその後徐々に増加したが、EP2は6時間後に2.6倍に増加のピークを迎えた後、著明に減少した。またEP3、EP4は類似し

た挙動を呈しており、前者は3日後に0.1倍に、後者は1日後に0.2倍に減少のピークを示した後、緩やかに増加した。

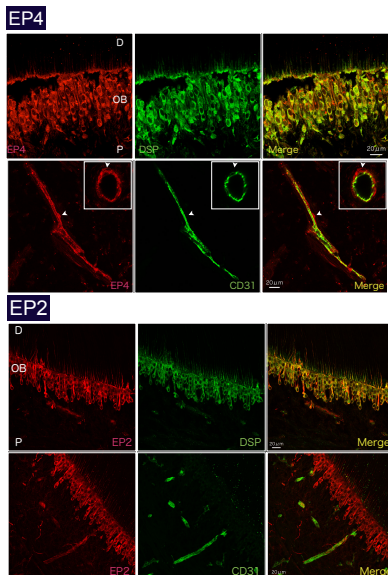
以上の結果から、各トランスポーターが歯髄炎の病態形成や炎症歯髄での薬物動態調節に関与している可能性が示唆された。EPs に関しては、起炎後の挙動が一樣でなかったことから、PGE₂の作用が炎症のステージに応じて異なるシグナル伝達経路を介して発現することが示唆された。

(2)免疫組織化学的解析

炎症歯髄、正常歯髄とも、Mrp4、Pgt、および microsomal PGE₂ synthase がいずれも主として CD31 陽性の血管内皮細胞の一部に共発現することが確認された。従って、Mrp4、Pgt が歯髄では主として血管内皮細胞に局在すること、およびこれらの細胞がPGE₂生合成活性を有することが示唆された。

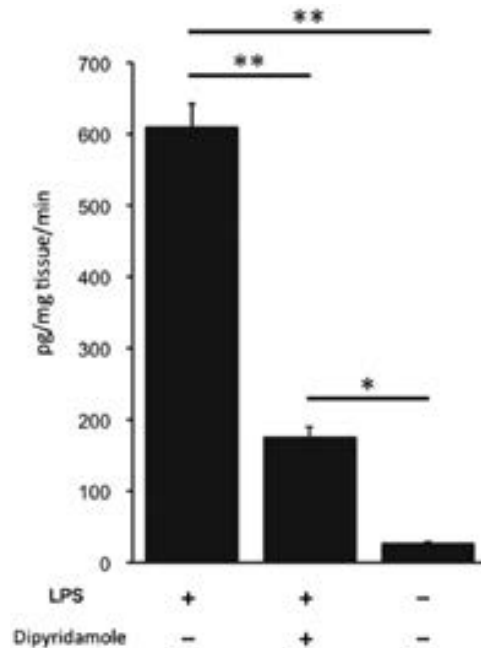


EPs に関しては、EP2 および EP4 がヒト歯髄組織において象牙芽細胞および血管内皮細胞に存在しており、これらの細胞が PGE₂ の標的細胞として性質を備えることが示唆されるとともに、PGE₂ が対応するレセプターとの結合を介して、常態時の血流調節、急性炎症時の疼痛や血管反応、さらには象牙芽細胞の機能調節などのさまざまな役割を演じることが推定された。



(3)Mrp4 および Pgt の PGE₂細胞内輸送送達に対する寄与率の探索

Mrp4 阻害剤であるジピリダモールを使用した場合は、71.3%の PGE₂濃度の減少を認め、Pgt 阻害剤であるプロモクレゾールグリーンを使用した場合でも、85.9%の PGE₂濃度の減少を認めた。これらの結果から、Mrp4 および Pgt は歯髄においてPGE₂を排出方向に輸送していることが示唆された。



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2件)

① Naoto Ohkura, Yoshimi Shigetani, Nagako Yoshiba, Kunihiko Yoshiba and Takashi Okiji. Prostaglandin transporting protein-mediated prostaglandin E₂ transport in lipopolysaccharide-inflamed rat dental pulp. J Endod. 2014; 40(8): 1112-1117 (査読あり)

② 大倉直人

新潟歯学会雑誌 56 巻 3 号 161 頁-168 頁 (2014) (査読あり)

[学会発表](計12件)

① 大倉直人, 重谷佳見, 吉羽永子, 吉羽邦彦, 興地隆史: 培養ヒト歯髄の各種遺伝子発現に対する prostaglandin EP4レセプターアゴニストの影響. 第36回日本歯内療法学会学術大会, 鶴見大学記念館(神奈川県横浜市), 2015年7月11-12日, プログラム・抄録集: 71頁, 2015.

② 大倉直人, 枝並直樹, 吉羽永子, 吉羽邦彦, 依田浩子, 大島勇人, 興地隆史: ヒト歯髄におけるプロスタグランジン E₂ 輸送担体および特異的レセプターの免疫組織学的局在解析. 第57

回歯科基礎医学会学術大会・総会，朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター（新潟県新潟市），2015年9月11-13日，プログラム：367頁，2015。

③大倉直人，吉羽永子，吉羽邦彦，小田陽平，興地隆史：培養ヒト歯髄に対する prostaglandin EP4 レセプターアゴニストの影響。日本歯科保存学会2015年秋季学術大会（第143回），文京シビックホール（東京都文京区），2015年11月12-13日，プログラム・抄録集：28頁，2015。

④Mariko Ohkura, Naoto Ohkura, Isao Saito, Takashi Okiji. Expression analysis of prostaglandin I2 synthase and receptor in rat molar pulp during experimental tooth-movement. 第74回日本歯科矯正学会大会、福岡国際会議場（福岡県福岡市），2015年11月18-20日，プログラム・抄録集：327頁，2015

⑤Naoto Ohkura, Mariko Ohkura, Yohei Oda, Nagako Yoshiba, Kunihiko Yoshiba, Hiroko Ida-Yonemochi, Hayato Ohshima, Takashi Okiji. Immunolocalization and gene-expression of multifrug resistance-associated protein-4 in human dental pulp. 93rd general session & exhibition of the International Association for Dental Research (IADR), Boston, Massachusetts, USA, 2015年3月11-14日，2015

⑥ Mariko Ohkura, Naoto Ohkura, Nagako Yoshiba, Kunihiko Yoshiba, Hiroko Ida-Yonemochi, Hayato Ohshima, Isao Saito, Takashi Okiji. Prostaglandin I2 receptor expression in orthodontic force-applied rat dental pulp. 93rd general session & exhibition of the International Association for Dental Research (IADR), Boston, Massachusetts, USA, 2015年3月11-14日 2015.

⑦大倉直人，重谷佳見，吉羽永子，吉羽邦彦，興地隆史：ヒト歯髄における Prostaglandin レセプターの免疫組織学的局在解析。第35回日本歯内療法学会学術大会，朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター（新潟県新潟市），2014年7月12-13日，プログラム・抄録集：19頁，2014。

⑧大倉直人，大倉麻里子，小田陽平，吉羽永子，吉羽邦彦，依田浩子，大島勇人，興地隆史：ヒト歯髄におけるプロスタグランジン E2 輸送担体および特異的レセプターの免疫組織学的局在解析，福岡国際会議場（福岡県福岡市），2014年9月25-27日，プログラム：38頁，2014

⑨Ohkura N, Shigetani Y, Yoshiba N, Yoshiba K, Okiji T: Prostaglandin transporter mediated prostaglandin E2 transport in inflamed dental pulp. The 9th world endodontic congress of the International Federation of Endodontic Associations (IFEA), 東京国際ホール（東京都千代田区），May 23-26, 2013.

⑩大倉直人，重谷佳見，吉羽永子，吉羽邦彦，興地隆史：ラット炎症歯髄に対する薬物輸送担体の遺伝子発現解析。歯科基礎医学会 2013

年度歯科基礎医学会学術大会・総会（第55回），岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市），2013年9月20-22日，Journal of Oral Biosciences Suppl : p.198, 2013

⑪Ohkura N, Ohkura M, Shigetani Y, Yoshiba N, Yoshiba K, Saito I, Okiji T: Membrane transport protein-mediated prostaglandin E2 transport in experimentally-inflamed rat dental pulp. Health through oral health collaborative education, research and practices, Krabi, Thailand, December 20-22, 2013.

⑫ Mariko Ohkura, Naoto Ohkura, Yoshimi Shigetani, Nagako Yoshiba, Kunihiko Yoshiba, Isao Saito, Takashi Okiji. Orthodontic force application up-regulates prostaglandin I2 receptor expression in rat molar dental pulp. Health through oral health collaborative education, research and practices, Krabi, Thailand, December 20-22, 2013.

6. 研究組織

(1)研究代表者

大倉直人 (OHKURA, Naoto)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号:00547573