

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 大倉直人  
学位 博士(歯学)  
学位記番号 新大院博(歯)第309号  
学位授与の日付 平成26年3月24日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 Prostaglandin transporting protein-mediated prostaglandin E<sub>2</sub> transport in lipopolysaccharide-inflamed rat dental pulp  
(リポ多糖で誘発したラット炎症歯髄におけるプロスタグランジン輸送担体を介したプロスタグランジン E<sub>2</sub> 輸送の解析)

論文審査委員 主査 教授 興地 隆史  
副査 教授 朔 敬  
副査 教授 織田 公光

博士論文の要旨

【目的】プロスタグランジン(PG) E<sub>2</sub>は炎症、発熱、疼痛などに関与する化学伝達物質であり、歯髄炎においてもその生合成が亢進し、血管透過性亢進や歯痛に関与することが確認されている。一方、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、さまざまな内因性、外因性物質の細胞膜を介した内向もしくは外向輸送を司ることが知られている。PGもトランスポーターの作用により細胞膜を通過するが、この際 **multidrug resistance associated protein (Mrp) 4**、**prostaglandin transporter (Pgt)**などのトランスポーターの関与が注目されている。我々はラット切歯歯髄において **Mrp4** や **Pgt** の mRNA 発現をすでに確認している。ところが、炎症歯髄における PG トランスポーターの局在や機能については、歯髄炎の病態機序に関する有用な知見が期待されるにもかかわらず、我々の知る限り解析が行なわれていない。そこで本研究では、炎症歯髄において **Mrp4** および **Pgt** が PGE<sub>2</sub> レベルの調節に関与していると仮定し、①リポ多糖(LPS)で誘発した炎症歯髄における **Mrp4** および **Pgt** タンパク質の局在、および、② *ex vivo* における PGE<sub>2</sub> 放出に対する **Mrp4** 阻害剤(dipyridamole)の影響を解析することを目的とした。

【方法】8週齢のWistar系ラットに全身麻酔を施したのち、上顎切歯歯冠を歯肉縁部で切断し、Kファイルで歯髄腔に深さ7 mmの穿掘形成後、LPS (20 mg/ml)を染みこませたペーパーポイント(長さ5 mm)を貼付し、水硬性仮封材で封鎖することにより歯髄炎を誘起させた。術後24時間に歯髄を摘出して以下の実験に使用した。正常歯髄は未処置ラットから摘出した。

・免疫蛍光二重染色

**Pgt**、**Mrp4**、およびPGE<sub>2</sub>合成酵素の一つであるmicrosomal PGE<sub>2</sub> synthase (mPGES)の局在を、CD31抗体(血管内皮細胞マーカー)あるいはCD68抗体(マクロファージマーカー)を併用した蛍光抗体二重染色により解析した。すなわち、摘出した歯髄から厚さ8 μmの凍結切片を作成し、二種の一次抗体を混合して作用させたのち、蛍光標識二次抗体混合溶液を反応させて染色後、蛍光顕微鏡で観察した。さらに、デジタル画像を取得後に画像解析ソフトウェアを用いて共発現の有無を解析した。

・Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

炎症歯髄からのPGE<sub>2</sub>放出量に対する**Mrp4**阻害剤(dipyridamole)の影響をELISAを用いて解析した。すなわち、摘出した歯髄をHank's balanced salt buffer中に静置したのち細切後、

dipyridamole (1 mM) を10分間作用させた。次いでVortex震盪によりPG産生を刺激したのち、遠心分離後、上清中のPGE<sub>2</sub>をELISAによって測定した。

【結果および考察】炎症歯髄において好中球およびCD68陽性マクロファージ様細胞の浸潤が観察された。また、蛍光抗体二重染色により、炎症歯髄、正常歯髄とも、Pgt、Mrp4およびmPGESがいずれも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。また、炎症歯髄においてmPGESがCD68陽性細胞の一部に共発現する事も観察された。従って、Pgt、Mrp4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PGE<sub>2</sub>生合成活性を有することが示唆された。

また、ELISAによる解析の結果、炎症歯髄からのPGE<sub>2</sub>放出量は正常歯髄と比較して有意に増加するとともに、dipyridamoleにより71.3%の有意な減少を示すことが明らかとなった。従って、Mrp4が炎症歯髄におけるPGE<sub>2</sub>の外向輸送に関与することが示唆された。

以上の結果から、LPSで誘発した炎症歯髄では、血管内皮細胞で生合成されたPGE<sub>2</sub>がMrp4を介して細胞外に排出輸送される可能性が示唆された。細胞外に放出されたPGE<sub>2</sub>が、自己分泌あるいは傍分泌により血管内皮細胞に作用し、血管拡張や血管透過性亢進に関与することが推測された。

【結論】LPSで誘発した炎症歯髄では、Mrp4、PgtおよびmPGESの局在は主として血管内皮細胞で検出され、これらの細胞がPGE<sub>2</sub>の合成および膜輸送機構を備えることが示唆された。Mrp4阻害剤添加によってPGE<sub>2</sub>放出量が減少したことから、Mrp4がPGE<sub>2</sub>を排出方向へ輸送することが示された。

#### 審査結果の要旨

膜輸送担体(トランスポーター)は、細胞膜上に発現する一群のタンパク質であり、脂質二重膜を通過できない有機イオン、糖、薬物などの内向もしくは外向輸送を行うことで、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知られている。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推定されるが、この方面の解析はこれまで全く実施されていない状況であった。申請者はこの点に着目して、ラット切歯歯髄における各種トランスポーターの遺伝子発現についての先駆的報告を行っており、multidrug resistance associated protein (Mrp)ファミリー、organic anion transporter polypeptide (Oatp)ファミリーなどに属するさまざまなトランスポーターのmRNA発現がみられることをすでに報告している。

一方、プロスタグランジン(PG) E<sub>2</sub>は、急性炎症の調節物質として血管拡張、血管透過性亢進あるいは炎症性疼痛の増強に関与することが知られており、歯髄炎においてもこれらの病態の発現に関与すると考えられている。この際、PGE<sub>2</sub>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、標的細胞のレセプターと結合することで機能を発揮すると推定されるが、トランスポーターを介したPGE<sub>2</sub>輸送機構については、歯髄に限らず不明確な部分が残されている。

本研究は以上の背景をもとに、mRNA発現が歯髄で確認された各種トランスポーターの中から、PGE<sub>2</sub>輸送への関与が推定されるものとしてMrp4およびOatp2a1 (prostaglandin transporter; Pgt)に着目し、実験的炎症歯髄におけるこれらの局在や機能を明確にすることを目的として実施されたものである。

本研究では、ラット上顎切歯歯髄にリポ多糖(LPS)を24時間作用させることにより、実験的歯髄炎の誘発が行われている。また、Mrp4およびPgt、さらにはPGE<sub>2</sub>合成酵素の一つであるmicrosomal PGE<sub>2</sub> synthase (mPGES)の正常歯髄あるいは炎症歯髄におけるタンパク局在を蛍光抗体法で解析しているが、この際、CD31陽性血管内皮細胞あるいはCD68陽性マクロファージとの二重染色が採用されており、陽性細胞の確実な同定が図られている。さらには、PGE<sub>2</sub>外向輸送に対するMrp4の関与を明確とするため、*ex vivo*における歯髄からのPGE<sub>2</sub>放出量に対するMrp4阻害剤(dipyridamole)の影響がenzyme-linked immunosorbent assayを用いて解析されて

おり、ここにも研究手法上の特色が認められる。

以上の解析の結果、Mrp4、Pgtとも、正常歯髄・炎症歯髄のいずれにおいても血管内皮細胞に明瞭な免疫組織化学的局在を示すことが確認されている。また、血管内皮細胞、および炎症歯髄に浸潤したマクロファージの一部が明瞭なmPGES免疫反応性を示すことも観察されている。さらには、*ex vivo*における炎症歯髄からのPGE<sub>2</sub>放出量は、正常歯髄と比較して有意に高値を示すこと、およびMrp4阻害剤の添加により非添加群と比べて有意に低下することが示されている。これらの知見から、ラット切歯歯髄においては血管内皮細胞にMrp4、Pgtを介したPGE<sub>2</sub>輸送機構とmPGESによるPGE<sub>2</sub>産生機構の両者が備えられるとともに、Mrp4が炎症歯髄におけるPGE<sub>2</sub>の細胞外への排出輸送に関与するものと結論づけられている。加えて、炎症歯髄では細胞外に放出されたPGE<sub>2</sub>が自己分泌あるいは傍分泌により血管内皮細胞に作用し、血管拡張や血管透過性亢進に関与する可能性が考察されている。

以上のように本研究は、実験的歯髄炎に対するPGE<sub>2</sub>の関与の実態について、トランスポーターによる膜輸送という新たな視点から解析を加えたものであり、歯髄疾患の病態機序の解明に資するところが大きい。よってここに学位論文としての価値を認める。