

氏名(本籍) : おぐら たか ゆき
小倉 孝之

学位の種類 : 博士 (歯学) 学位記番号 : 歯博第733号

学位授与年月日 : 平成28年3月25日 学位授与の要件 : 学位規則第4条第1項該当

研究科・専攻 : 東北大学大学院歯学研究科(博士課程)歯科学専攻

学位論文題目 : CRACチャンネル阻害を介するユージノールによるヒスタミン遊離の抑制

論文審査委員 : (主査) 教授 坪井 明 人
教授 若森 実 助教 城戸 幹 太

論文内容要旨

ユージノール製剤は歯髄鎮静・鎮痛作用があり、酸化亜鉛と練和するとキレート作用により硬化する為、酸化亜鉛ユージノールセメントとして仮封に用いられている。歯髄充血や単純性歯髄炎などの可逆的病変では、血管透過性が亢進し、閉鎖空間である歯髄腔内圧が高まることで歯の痛みは惹起されると考えられる。血管拡張と血管透過性の亢進は神経性の調節の他、炎症性ケミカルメディエーターであるヒスタミン、セロトニン、ブラジキニン、カリジンやプロスタグランジンが引き起こす。本研究ではこの中よりユージノールとヒスタミンの関係に注目した。炎症局所ではアラキドン酸の生成と代謝が亢進し、肥満細胞からの脱顆粒によりヒスタミンが遊離される。アラキドン酸生成酵素ホスホリパーゼ A₂ の活性や脱顆粒には細胞内での Ca²⁺ 濃度上昇が必要である。興奮性細胞に見られる電位依存性 Ca²⁺ チャンネルやリガンド作動性 Ca²⁺ 透過型チャンネルとは異なり、非興奮性細胞では膜電位変化がない為、細胞内 Ca²⁺ ストアが枯渇した時に開口する特徴的な Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ (CRAC) チャンネルが細胞外から細胞内へ Ca²⁺ を流入させて、Ca²⁺ 濃度上昇を引き起こしていると考えられる。まず、Rat Basophilic Leukemia 2H3 (RBL-2H3) 細胞を Anti dinitrophenyl (DNP) - IgE を含む培養液中で16時間、37℃で培養後、DNP-BSA を投与して、CRACチャンネル電流を記録した。CRACチャンネル電流の2つの特徴、つまり、内向き整流性の電流-電圧関係と50 mVより脱分極側の逆転電位が確認できた。DNP-BSAの代わりにパッチピペット内からIP₃を灌流し惹起させたCRACチャンネル電流をユージノールは0.1 mM~2 mMの狭い範囲で濃度依存的に抑制した。その濃度-反応曲線からユージノールのIC₅₀値は0.54 mM、ヒル係数は2であった。RBL-2H3細胞は肥満細胞のモデル細胞としてヒスタミン遊離の実験に一般的に用いられているため、ユージノールのヒスタミン遊離に対する薬理作用を脱顆粒時にヒスタミンと同時に遊離されるβ-ヘキソサミニダーゼの活性を測定し検討した。ユージノールは脱顆粒も濃度依存的に抑制した。しかし、11%はユージノール非感受性であった。

89%のユージオール感受性部分の IC_{50} 値は0.23 mM, ヒル係数は2.5であり, CRAC電流より脱顆粒の方が低濃度のユージオールで抑制されることが判明した。更に, Ca^{2+} イオノフォアを用いた実験から, 脱顆粒に関わるSNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) タンパク質に対しユージオールは無効であることが判明した。これらのことから, ユージノールは炎症時に活性化するCRACチャネルによる Ca^{2+} 流入を抑制することが薬理作用機序のひとつであり, その結果, 脱顆粒・ヒスタミン遊離を遮断し消炎・鎮痛効果を発揮する可能性が示唆された。

審査結果要旨

ユージオール製剤は歯髄鎮静・鎮痛作用があり, 仮封に用いられている。炎症時の血管拡張と血管透過性の亢進は神経性の調節の他, 炎症性ケミカルメディエーターであるヒスタミン, セロトニン, ブラジキニン, カリジンやプロスタグランジンが引き起こす。本研究ではこの中よりユージオールとヒスタミンの関係に注目している。炎症局所ではアラキドン酸の生成と代謝が亢進し, 肥満細胞からの脱顆粒によりヒスタミンが遊離される。アラキドン酸生成酵素ホスホリパーゼ A_2 の活性や脱顆粒には細胞内での Ca^{2+} 濃度上昇が必要である。電位依存性 Ca^{2+} チャネルやリガンド作動性 Ca^{2+} 透過型チャネルが発現する興奮性細胞とは異なり, 非興奮性細胞では膜電位変化がない為, 細胞内 Ca^{2+} ストアが枯渇した時に開口する Ca^{2+} Release-Activated Ca^{2+} (CRAC)チャネルが細胞外から細胞内へ Ca^{2+} を流入させて, Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こしていると考えられる。

Rat Basophilic Leukemia 2H3 (RBL-2H3)細胞をAnti dinitrophenyl (DNP) - IgEを含む培養液中で16時間, 37°Cで培養後, DNP-BSAを投与して, CRACチャネル電流を記録した。CRACチャネル電流の2つの特徴, 内向き整流性の電流-電圧関係と50 mVより脱分極側の逆転電位が確認できた。DNP-BSAの代わりにパッチピペット内から IP_3 を灌流し, 惹起させたCRACチャネル電流をユージオールは0.1 mM ~ 2 mMの狭い範囲で濃度依存的に抑制した。その濃度-反応曲線からユージオールの IC_{50} 値は0.54 mM, ヒル係数は2であった。RBL-2H3細胞は肥満細胞のモデル細胞としてヒスタミン遊離の実験に一般的に用いられているため, ユージノールのヒスタミン遊離に対する薬理作用を脱顆粒時にヒスタミンと同時に遊離される β -ヘキソサミニダーゼの活性を測定し検討した。ユージオールは脱顆粒も濃度依存的に抑制した。しかし, 11%はユージオール非感受性であった。89%のユージオール感受性部分の IC_{50} 値は0.23 mM, ヒル係数は2.5であり, CRAC電流より脱顆粒の方が低濃度のユージオールで抑制されることが判明した。更に, Ca^{2+} イオノフォアを用いた実験から, 脱顆粒に関わるSNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) タンパク質に対しユージオールは無効であった。これらのことから, ユージノールは炎症時に活性化するCRACチャネルによる Ca^{2+} 流入を抑制することが薬理作用機序のひとつであり, その結果, 脱顆粒・ヒスタミン遊離を遮断し消炎・鎮痛効果を発揮する可能性が示唆された。

本研究は歯科臨床で用いられるユージオールの新たな作用機序を明らかにし, 歯科領域以外での抗炎症薬としての適用拡大を視野に入れた研究として, 評価できる。従って, 本論文は博士(歯学)の学位論文として相応しいと判断する。