

親水性ナノダイヤモンド粒子を用いたMRリンパイメージングに向けた新規造影剤の開発

○矢野 浩作¹、松本 知博^{1,2}、岡本 穰¹、富田 康介²、亀井 俊佑²、山本 章太²、長谷部 光泉^{1,2,3}、堀田 篤¹

¹慶應義塾大学大学院理工学研究科開放環境科学専攻、²東海大学医学部専門診療学系画像診断学/附属八王子病院、³慶應義塾大学医学部医学科

【目的】磁気共鳴イメージング(MRI)を用いたリンパ系イメージング(MRリンパイメージング)のための造影剤は存在しない。造影剤としての粒子が間質からリンパ管内に選択的に取り込まれるためには、直径3 nm以上が必要とされる。一方、腎排泄されるためには直径10 nm以下でなければならない。そこで我々は、生体適合性が高く化学的に安定な直径5 nm程度のナノダイヤモンド(ND)粒子に焦点をあて、それに直径0.2 nm程度の既存造影剤であるガドリニウム(Gd)錯体(Gd-DTPA)を複合したGd-DTPA-NDに着目した。しかし、このGd-DTPA-NDは水中でマイクロスケールの凝集塊を形成する問題点が存在した。本研究の目的は、この凝集の問題を解決し、高分散で、間質からリンパ管内に選択的に取り込まれるMRリンパイメージングのための新規造影剤を作製することである。【方法】NDを酸化処理し、親水性のカルボン酸基をND表面に多数導入した(カルボン酸修飾ナノダイヤモンド(CND))。そのCNDに対してGd錯体を複合することでGd-DTPA-CNDを作製し、以下の検討をおこなった。①動的光散乱法(DLS)及び透過型電子顕微鏡(TEM)によって、水への浸漬後におけるGd-DTPA-CNDの分散性を評価した。②1.5T MRIを用いてGd-DTPA-CNDの水中における造影能を評価した。③TEM及び1.5T MRIによって血漿への浸漬後におけるGd-DTPA-CNDの分散性及び造影能を評価した。④ラット尾静脈からGd-DTPA-CND懸濁液を静注し、3.0T MRIでの15分間連続撮影により、生体内での経時的造影能評価および腎排泄性の分析をおこなった。【結果】①DLSによる粒径分布測定において、Gd-DTPA-CNDの粒径は4-5 nm程度であり、先行研究に比べて分散性が向上していた。TEMにより、先行研究における凝集塊の形成が水へ浸漬後も抑制されたことを確認した。②1.5T MRIによる撮像において、Gd-DTPA-CNDは水中で造影能を有しており、既存造影剤の6-7 %のGd濃度で同程度の造影能を有していた。③1.5T MRIによる撮像およびTEMによる分析において、血漿への浸漬後もGd-DTPA-CNDは分散しており、造影能も良好であった。④ラット尾静脈へのGd-DTPA-CND懸濁液の静注で、全身の造影効果が確認された。また、静注から15分後には膀胱が描出されており、Gd-DTPA-CNDが腎排泄されていることが確認できた。【結論】本研究で作製したGd-DTPA-CNDは、水中および血漿中において分散しており、直径3-10 nmの範囲内の大きさを有していた。また、Gd-DTPA-CNDは良好な造影効果が確認され、かつ腎排泄性であることが分かった。以上から、Gd-DTPA-CNDはMRリンパイメージングに向けた実用的な新規造影剤として期待できる。

シリカナノ粒子による酸化ストレスの誘導と神経細胞死

○上窪 裕二¹、橋本 祥江¹、櫻井 隆¹

¹順天堂大・医・薬理

微細加工・合成技術などの発展に伴い様々な化学組成、形状、およびサイズの微小粒子が作成され、工業(微細構造の研磨剤、触媒)、美容(化粧品、日焼け止め)、医療などの多方面で利用されている。金属などのナノメートルサイズの粒子(ナノ粒子)はバルクの状態とは異なった化学的、物理学的性質を示すことから、様々な分野において応用され、研究・開発が進められている。しかしながら、現在利用されているナノ粒子の中には生理活性が評価されていないもの多く、バルクの状態での安全性に基づき環境中に破棄されている。そのため、環境中の動植物や人体への障害性が報告され始め、その影響が不安視されている。一方で、ナノ粒子は組織透過性が高いため医療面への応用が期待されている。二酸化ケイ素(シリカ)を原料とするナノ粒子(シリカナノ粒子)は、安価で加工が容易であり、粒子表面に様々な加工ができるため、ドラッグデリバリーシステム(DDS)のキャリアなどへの応用が進められている

近年、シリカをはじめとする様々なナノ粒子の毒性が報告されているが、細胞障害性については不明な点が多い。そこで本研究では、様々な粒子径のシリカ粒子を用い、HEK293細胞株とラット海馬由来培養神経細胞を標本として、細胞障害性を評価した。細胞の生存率についてはATPアッセイおよびMTTアッセイを行い評価した。

その結果、シリカナノ粒子は粒子径が小さいほど毒性が高く、粒子の表面積がナノ粒子の毒性に相関することが明らかとなった。シリカナノ粒子の毒性は、粒子表面の官能基化やタンパク質被覆などで弱まることが明らかとなった。さらに、シリカナノ粒子投与が細胞に与える影響を検討したところ、粒子は細胞表面に付着し酸化ストレスを惹起し、細胞死を引き起こすことが明らかとなった。上記の結果は、シリカナノ粒子のバイオ、医療応用に寄与するものであると期待される。

X線照射誘導性細胞傷害に対する抗酸化剤の保護効果の測定法の検討

○坂上 宏¹、中谷 儀一郎²、小川 由香里³、白戸 亮吉³、上田 大輔²、延澤 忠真²、中谷 祥恵⁴、古旗 賢二⁴、松田 玲於奈⁵、田村 暢章⁵、竹島 浩⁵

¹明海大学歯科医学総合研究所、²日本医療科学大学保健医療学部診療放射線学科、³日本医療科学大学保健医療学部医療・基礎教育科、⁴城西大学薬学部機能性食品科学講座、⁵明海大学歯学部高齢者歯科学分野

【緒言】X線照射のホルメシス効果の論文のほとんどは、動物を使用した実験であった。また、低線量のX線照射を受けた動物由来の細胞増殖の促進が報告されている。しかし、細胞レベルでの解析は十分になされていない。今回、X線照射の細胞に対する直接的傷害効果を判定できる実験系を先ず構築することに主眼を置き、抗酸化剤や茶抽出液の保護効果を測定する条件検討を行った。【方法】X線照射は、診断用X線装置(UD150L-30W, SHIMAZU)を用いて行った。ヒール効果の影響を考慮し、X線管(X-ray tube, SHIMAZU, P38DE 80s)の陰極側にサンプルを配置した。また、後方散乱減少の目的からアクリル板4 cmをサンプル後方に敷き、焦点—サンプル間距離を36 cmとした。照射条件は、100 kV, 200 mA, 0.2 sとした。線量測定は、医療被ばく線量測定で使用されている患者皮膚被曝線量計(Unfors Instrument Incorporated: Patient Skin Dosimeter 以下PSD)で実施した。PSDの校正については、線量率依存性およびエネルギー依存性等を考慮し、測定値に補正計数を乗じたものを投与線量とした。4種のヒト口腔扁平上皮癌細胞(Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4)、ヒト口腔正常細胞(歯肉線維芽細胞HGF、歯根膜線維芽細胞HPLF、歯髓細胞HPC)、ヒト骨髄性白血病細胞(HL-60, ML-1)を96穴プレートに撒き2日培養して付着させた。これらの増殖期の細胞に、56, 113, 226, 452, 904 mGyの線量のX線を照射し、2日後に、生細胞数をMTT法により計算した。X線照射時に抗酸化剤を存在させるとX線の傷害効果が減弱されるか否かを検討した。【結果】①ヒール効果により、96穴プレートの左側と比較し、右側に到達したX線の線量が、約10%減少することが判明したため、96穴の左側に細胞を播種することにした。②プレートの覆いによるX線量の減弱は、0.7%程度であったので、覆いをしたまま照射した。③抗酸化剤添加により若干のX線傷害回復効果が観察された。【考察】X線照射による細胞傷害の程度が、プレートのwellの置かれた位置により、かなり変動することが判明した。現在、X線照射による細胞傷害効果を定量的に測定できる系の再構築を行い、抗酸化剤の保護効果の有意性について再検討中である。

乳がん細胞における微小管ダイナミクス阻害薬エリブリンによるスタスミン動態の調節機構

○石田 あかり¹、吉江 幹浩¹、田村 和広¹¹東京薬科大学薬学部薬理学教室

【背景・目的】エリブリンは、手術不能または再発性乳がんなどに適応される微小管重合阻害薬である。スタスミンは、 $\alpha\beta$ チューブリンヘテロダイマーを捕捉することにより微小管の脱重合を促進するリン酸化タンパク質であり、乳がん細胞では高発現が認められている。スタスミンの微小管脱重合活性は、N端側に存在するセリン残基のリン酸化により制御されている。スタスミンは、細胞内の微小管動態を調節する重要因子であるが、エリブリンの抗腫瘍活性とスタスミンとの関係は不明である。本研究では、ヒト乳がん細胞株を用い、エリブリンの作用発現におけるスタスミンの関与について調べた。【方法】乳がん細胞株MCF7とMDA-MB-231(トリプルネガティブ乳がん細胞株)を用い、スタスミンのリン酸化に対するエリブリンの効果を検討した。また、エリブリンによるスタスミンのリン酸化が観察されたので、その機構についてプロテインキナーゼA(PKA)阻害薬(H89)、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性キナーゼII(CaMKII)阻害薬(KN62)、セリン/スレオニンホスファターゼPP2A阻害薬(オカダ酸)、PP2A活性化薬(FTY720)を用いて検討した。【結果・考察】MCF7及びMDA-MB231においてエリブリンは、スタスミンのリン酸化を誘導した。このエリブリンによるスタスミンのリン酸化は、H89やKN62の前処置により減弱した。さらに、スタスミンのリン酸化は、オカダ酸の前処置により促進され、その一方でFTY720により抑制された。以上、乳がん細胞においてエリブリンが、PKAとCaMKIIの活性化とPP2Aの阻害を介してスタスミンのリン酸化を誘導することを明らかとし、エリブリンの抗腫瘍活性におけるスタスミンのリン酸化誘導機構の関与を示唆した。

立体的構造を有する創薬候補化合物ライブラリーを用いたオピオイド受容体およびTRP channelファミリーに対する活性評価-新規鎮痛薬開発の基盤構築を目指して-

○田崎 若葉^{1,2}、高森 太郎³、田口 あい^{2,3}、唐木 文霞³、宮野 加奈子²、羽田 紀康¹、平山 重人³、藤井 秀明³、上園 保仁^{2,4}

¹東京理科大学薬学部生薬・薬用植物学研究室、²国立がん研、³北里大・薬・生命薬化学、⁴国立がん研究センター先端医療開発センター支持療法開発分野

【目的】国民病と言われる「がん」において、がん患者のQOLを著しく低下させるがんの痛みは、モルヒネなどの鎮痛薬でも十分な制御ができないことが少なくなく、患者のQOL向上のために新規鎮痛薬を開発することは喫緊の課題である。北里大学薬学部生命薬化学研究室では、7-アザノルボルナンという立体的なテンプレート分子を修飾することで、薬物として有利な性質を持ちやすいとされる立体的な化合物ライブラリーを構築している。本研究では、同方法を用いて合成された化合物を用い、「痛み」に関するターゲット分子(チャンネル・受容体)であるオピオイド受容体(μ 、 δ 、 κ OR) およびtransient receptor potential (TRP)チャンネルへの作用に着目し、各化合物の活性評価を行った。

【方法】新規化合物は、テンプレート分子を含む96wellプレートに種々の化合物を添加することにより合成を行なった。新規化合物の評価は、薬剤投与で生じる細胞内外の電気抵抗変化をイオンチャンネルおよび受容体の活性として評価できるCellKey™システムを用いて行った。 μ 、 δ 、 κ ORならびにTRPチャンネルであるTRPA1、TRPV1、TRPM8を安定発現させた6種類のHuman Embryonic Kidney 293細胞を用い、それらの活性を評価した。

【結果】96wellプレート上で合成された新規の88化合物を精製せずに μ 、 δ 、 κ ORおよびTRPA1、TRPV1、TRPM8発現細胞に投与し、その活性を評価したところ、 δ ORと κ ORに対してそれぞれ1wellに含まれる化合物が活性を示した。一方TRPA1、TRPV1、TRPM8および μ ORに関しては、用いた化合物の中に活性を示すものは認められなかった。

【考察】 δ ORおよび κ OR活性を示したそれぞれの化合物は、ベンジル基やフェニル基などの大きな構造を有しており、これらのサイズおよび形状が受容体活性化に関与していることが考えられた。今後は、上記活性を示した化合物を単離・精製し純度を高め、さらに詳しい解析を行う。さらに同合成法を改良発展させることで新規鎮痛薬開発のための基盤構築を目指す。

子宮内膜症における脈管新生を制御する神経ペプチドCGRPの役割

○本田 雅子^{1,2}、伊藤 義也^{1,3}、服部 響子^{1,2}、細野 加奈子¹、中本 修司^{1,3}、大高 史聖^{1,4}、津留 世里^{1,5}、馬嶋 正隆¹

¹北里大・医・薬理、²北里大学医学部産婦人科、³北里大学医学部外科、⁴北里大学医学部消化器内科、⁵北里大学医学部麻酔科

【目的】月経困難症、不妊症などで生殖年齢女性のQOLを損ねる子宮内膜症の進展に血管およびリンパ管新生の関与が示唆されている。カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)は痛み刺激や炎症などによって知覚神経終末から遊離される神経ペプチドである。我々はCGRP受容体のサブユニットである受容体活性調節蛋白1(RAMP1)が血管やリンパ管を新生して腫瘍増殖や創傷治癒に関与することを報告した。そこで、RAMP1シグナルが脈管新生を増強して子宮内膜症を進展させる可能性と、RAMP1の役割を解明することを本研究の目的とした。

【方法】 9-12週令C57BL/6マウス(野生型,WT)とRAMP1ノックアウトマウス(KO)を用いた。ドナー(WTまたはKO)マウスの子宮内膜移植片を、あらかじめ卵巣摘出術を施行した宿主(WTまたはKO)の腹膜に移植するマウス異所性子宮内膜症モデルを作成した(WT→WT,KO→KO)。移植後14日目に移植片を摘出し、子宮内膜移植片面積、血管・リンパ管新生およびその関連因子について、免疫染色やPCRなどで比較検討した。

【結果】移植後14日目の、子宮内膜移植片面積ならびに移植片内の血管密度・リンパ管密度はWT→WTに比べてKO→KOで減少した。また血管新生因子(VEGF-A)やリンパ管新生因子(VEGF-C,D)の発現もKO→KOで減弱した。二重免疫染色にてRAMP 1は移植片のマクロファージ(CD11b陽性細胞)や線維芽細胞(S100A4陽性細胞)に共発現した。また脈管新生に関与する細胞はマクロファージと線維芽細胞であった。さらに移植片集積マクロファージと線維芽細胞はWT→WTに比べてKO→KOで減少した。分離培養骨髄由来マクロファージをCGRPで刺激するとRAMP1シグナルに依存して脈管新生因子発現が増強した。また培養線維芽細胞(L929)においてもCGRP刺激でリンパ管新生因子発現が増強した。

【結論】異所性子宮内膜症モデルにおいて、神経ペプチドCGRPはマクロファージや線維芽細胞のRAMP1受容体に作用して血管・リンパ管新生を促進させ、子宮内膜症進展に貢献していることが示唆された。

新規気道粘液MUC5AC産生抑制薬の探索および作用機序の解明

○石橋 純平¹、松山 真吾¹、磯濱 洋一郎¹¹東京理科大・薬・応用薬理

【背景・目的】気道粘液の過剰産生すなわち痰は、種々の炎症を伴う呼吸器疾患に共通する症状の一つである。過剰な粘液産生を是正することは、気道での細菌感染の予防や換気路を確保する上で重要であるものの、従来、痰は炎症の結果と捉えられ、多くの呼吸器疾患の治療は抗炎症に主眼が置かれてきた。しかし、近年になって、吸入ステロイド薬などで炎症をコントロールできている喘息患者でも、屢々、痰が問題となるなど、痰に特化した治療の重要性が認識されてきている。一方、痰の排出を促す現行の去痰薬は、その実効性の面で十分ではなく、新たな薬物の開発が求められている。そこで本研究では、気道粘液の産生そのものを制御する新規薬物の創製を究極的な目的とし、特に既存医薬品ライブラリーから気道粘液の主要成分であるムチンMUC5ACの産生抑制作用を有する薬物の探索を行った。

【方法】実験標本として粘液MUC5AC産生能をもつヒト気道上皮細胞株NCI-H292細胞を用いた。本細胞にTGF- α (10 ng/ml) および被験薬 (2 μ M) を24時間共処理し、培養上清中に分泌されたMUC5ACのタンパク量をELISA法により測定した。被験薬として、東京大学創薬機構より譲受した既存薬ライブラリー640種を用い、本実験系に供した。

【結果・考察】640種の既存薬の中で、25種に陽性対照薬として用いたdexamethasone に匹敵する強いMUC5AC産生抑制作用を見出した。このうち大半はステロイド類であったが、本来、抗炎症薬ではないcompound Xに90%以上の著明な抑制作用を見出した。compound Xは濃度 (0.1~1 μ M) 依存的にTGF- α で刺激した細胞の培養上清中のMUC5ACタンパク質を減少させ、そのED₅₀は約0.31 μ Mであった。また、TGF- α 刺激後のMUC5ACのmRNA発現についても調べたが、これも濃度 (0.1~1 μ M) 依存的に抑制した (ED₅₀=0.49 μ M)。これらの成績から、compound Xは少なくとも一部、MUC5AC mRNA発現の抑制を介してMUC5AC産生を抑制していると推定された。現在、本薬物によるMUC5AC mRNA発現抑制の詳細な機序を調べているが、その解明を通じて、気道粘液産生を制御するための新たな薬理学的概念を提唱できる可能性もあり興味深い。

抗原誘発気道過敏性モデルマウスの収縮性アゴニスト誘発気管支平滑筋収縮反応における Rac1 活性化亢進

○甲斐 友規¹、茂木 桃子¹、鈴木 悠太¹、竹内 滉人¹、原田 優衣¹、里 史明²、今 理紗子¹、五十嵐 信智¹、亀井 淳三¹、千葉 義彦³、酒井 寛泰¹

¹星薬科大学生体分子薬理学、²星薬科大学疾患病態解析学、³星薬科大学生理分子科学

【目的】近年、気管支喘息発症率は世界的に増加傾向にあるが、発症の詳細なメカニズムは未だほとんど解明されていない。また、気道過敏性 (airway hyperresponsiveness; AHR) は、アレルギー性気管支喘息患者共通に認められ、喘息病態の本質因子であり増悪因子とされている。当研究グループは、気道過敏性モデルマウスより摘出した気管支平滑筋の carbachol (CCh) に対する反応性は、正常動物のものと比較して、著明かつ有意に亢進していることが明らかにしている。その原因の1つとして低分子量 G タンパク質である Rac1 の発現増加を介した収縮反応性の亢進が原因の一端であることを示唆している。しかしながら、AHR 状態の気管支平滑筋における収縮性アゴニスト誘発 Rac1 活性化の変化については明らかにしていない。そこで本研究では、抗原誘発気道過敏性モデルマウス気管支平滑筋における特異的 Rac1 GEF である Tiam1 および Trio の発現変化を検討し、さらに収縮性アゴニスト誘発 Rac1 の活性化を比較検討した。【方法】抗原誘発気道過敏性モデルは、BALB/c 系マウスに ovalbumin 抗原にて感作し、同抗原を反復吸入チャレンジさせることにより作成した。最終抗原チャレンジ終了24時間後に実験を供した。タンパク質およびリン酸化タンパク質量の比較には Western blot 法、mRNA 発現量の比較には定量的 RT-PCR 法を用いた。また、Rac1 活性化の検出には pull-down 法を用いた。【結果および考察】気道過敏性マウスの気管支平滑筋は high K⁺ に対する反応性に変化が認められないものの、CCh に対する反応性は有意に亢進していることを確認した。この CCh による過剰な気管支平滑筋収縮反応は Rac1 inhibitor である NSC23766 および EHT1864 により有意に抑制された。さらに、同モデルマウスにおいて、Rac1、Tiam1 および Trio の有意な発現上昇および Rac1 の活性化が認められ、CCh によりさらなる Rac1 の活性化がみられた。以上の結果より、抗原誘発 AHR 時における過剰な気管支平滑筋収縮反応の亢進には Rac1 の発現増加だけでなく、Tiam1 および Trio の発現上昇を介した Rac1 の活性化を伴う収縮反応機構が亢進している可能性が示唆された。

抗原誘発気管支平滑筋過敏性に及ぼす cyclooxygenase 阻害薬前処置の効果

○矢形 真奈美¹、土山 実紗規¹、須藤 航¹、花崎 元彦²、片山 浩³、酒井 寛泰⁴、千葉 義彦¹

¹星薬科大学薬学部生理分子科学、²国際医療福祉大学医学部麻酔・集中治療、³川崎医科大学医学部麻酔・集中治療、⁴星薬科大学薬学部生体分子薬理学

【目的】喘息時の気道過敏性(AHR)の一因として、過剰な気管支平滑筋(BSM)収縮が挙げられる。演者らはこれまでに、喘息マウスのBSM組織を用いたDNAマイクロアレイ解析の結果、arachidonic acid metabolism pathwayの変化を証明した。さらに、気管支肺胞洗浄液(BALF)を用いたlipidomics解析の結果、prostaglandin D₂(PGD₂)やPGE₂等各種 prostanoidsの増加を見出した。本研究では、抗原誘発BSM過敏性に対するcyclooxygenase (COX)阻害薬*in vivo*前処置の効果を観察し、喘息時のAHR発現におけるCOX代謝産物の役割について検討を行った。【方法】雄性BALB/cマウス(7週齢)を用い、ovalbumin抗原にて感作、追加感作および抗原反復吸入チャレンジを行うことにより気管支喘息モデルマウスを作製し、実験に供した。COX阻害薬としてaspirin (ASP)を用い、各抗原チャレンジの1 hr前に80 mg/kgを腹腔内投与した。さらに、摘出BSM組織へのindomethacin (Indo)処置を行い、acetylcholine (ACh)収縮に対する影響を観察した。【結果および考察】正常群と比較して、喘息群のAChに対するBSM収縮反応性は著明かつ有意に増大しており、BSM過敏性の獲得が確認できた。ASPの*in vivo*前処置は正常群BSM組織のACh収縮反応性を有意に増加させ、Indoの*in vitro*前処置でも同様の結果が得られた。一方、COX阻害薬によるこれら収縮反応性の変化は喘息群のBSM組織では認められなかった。したがって、正常時にはおもに収縮抑制性COX代謝産物がBSM toneを調節しており、喘息時にはこれら抑制性因子の産生が減弱している可能性が示唆された。さらに、COX代謝産物産生の非特異的な阻害では、AHRを改善できない可能性が示唆された。一方、正常群では*in vivo*持続的COX阻害によりBSM過敏性が形成される可能性が示唆され、アスピリン喘息との関連性が興味深い。

マウスにおけるLPS、poly(I:C)及びOVA刺激により誘発させた気道炎症に対する抗凝固薬の効果

○木村 元気¹、青野 優佳¹、乾 夏乃¹、市村 仁志¹、浅香 和輝¹、上田 敬太郎¹、西本 裕樹¹、木澤 靖夫¹

¹日本大・薬・機能形態

【目的】慢性閉塞性肺疾患（COPD）や一部の重症喘息などの慢性呼吸器疾患では、症候の背景にある気道炎症に対して、ステロイド抗炎症薬が奏功せず治療が困難となっている。そのため、ステロイド抗炎症薬に代わる新しい治療薬が求められている。近年、慢性呼吸器疾患における病態形成に血液凝固・線溶系の関与が示唆されているが、詳細は明らかではない。我々はこれまでにマウスにおいて、数種類の抗凝固薬の中から抗炎症作用を有するものを見出している。そこで本研究では、LPS、poly(I:C)及びOVAで誘発させた気道炎症に対する抗凝固薬及びステロイド抗炎症薬との併用効果について検討した。

【方法】雄性A/Jマウスに、OVAを7日おきに2回腹腔内投与することで感作させたのち、OVAを1日1回、4日間経鼻曝露、5日目に吸入曝露した。OVA曝露最終日翌日から1日2回3日間 fluticasone propionate (FP:ステロイド抗炎症薬)及びdabigatranを、イソフルラン吸入麻酔下で経鼻投与した。LPSまたはpoly(I:C)は、1日2回3日間経鼻曝露させ、気道炎症を誘発させた。薬物は、LPSまたはpoly(I:C)曝露2時間前にイソフルラン吸入麻酔下で経鼻投与した。最終薬物投与翌日、気管支肺胞洗浄液（BALF）を採取した。BALF中の全細胞数を計測後、flow cytometryにより、好酸球及び好中球を計測した。BALF中のCXCL1、TNF- α 及びosteopontin (OPN)量はELISA法により測定した。

【結果及び考察】マウスにおいて、OVA曝露で誘発させた気道炎症で有意に増加したBALF中の好酸球及び好中球数、CXCL1、TNF- α 及びOPN量は、抗凝固薬であるdabigatranの経鼻投与により用量依存的に抑制された。また、LPSあるいはpoly(I:C)曝露で誘発させた気道炎症においても、dabigatranの経鼻投与により用量依存的に抑制効果を示した。さらに、ステロイド抗炎症薬であるFPとdabigatranを併用することでステロイド治療抵抗性が改善され、dabigatran単独投与よりも低濃度で抑制効果が観察された。以上の結果から、慢性呼吸器疾患で観察される気道炎症において、dabigatranのような抗凝固薬が改善効果を示す可能性が示唆された。

L-PGDSがエストロゲン枯渇による骨破壊に与える影響

○今井 大貴¹、大森 啓介¹、壺阪 義記¹、永田 奈々恵¹、小林 幸司¹、中村 達郎¹、村田 幸久¹

¹東京大・院農・放射線動物科学

【背景・目的】

骨は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨破壊によりその平衡が保たれている。閉経期以降の女性ではエストロゲンの産生量が減少し、破骨細胞による骨破壊が亢進して骨粗鬆症を発症しやすくなる。プロスタグランジン₂ (PGD₂)の合成酵素であるリポカリン型PGD合成酵素(L-PGDS)は、エストロゲンによりその発現量が変化することが報告されているが、骨代謝におけるその意義は明らかにされていない。本研究では、L-PGDSがエストロゲン枯渇による骨代謝異常に与える影響を解明することを目的とした。

【方法と結果】

CTを用いた脛骨近位端の骨量測定により、野生型マウス(WT)と比較して同週齢のL-PGDS欠損マウス(L-PGDS^{-/-})では、骨量が減少していることがわかった。免疫染色により、骨芽細胞と破骨細胞の両方がL-PGDSを発現していることが確認された。カルセイン標識とHE染色により、L-PGDSの欠損が骨芽細胞を活性化して骨形成を亢進すると同時に、破骨細胞を増加・活性化して骨破壊も亢進することが分かった。これらのマウスの卵巣を摘出(OVX)して6週間後、WTの脛骨で破骨細胞の増加・活性化と骨量の減少が確認された。それに伴い、L-PGDSのmRNA発現の減少が確認された。一方で骨破壊が亢進しているL-PGDS^{-/-}では、OVXにより骨量が減少しなかった。またエストロゲン(10 ug)の皮下への補充は、減少したWTの脛骨骨量を回復したが、L-PGDS^{-/-}は回復しなかった。WTから単離した骨芽細胞にエストロゲン(0.01 nM)を処置するとL-PGDSのmRNAの発現量が上昇と、培養上清中のPGD₂産生量が上昇した。一方、L-PGDS^{-/-}より単離した骨芽細胞では、これらの反応はみられなかった。単離した骨芽細胞を骨形成培地で培養したところ、WTと比較してL-PGDS^{-/-}の骨芽細胞で石灰化能が高く、破骨細胞分化を誘導するRANKLのmRNA発現量が高かった。骨髄細胞を破骨細胞分化条件で培養したところ、L-PGDSの欠損は破骨細胞の分化に影響を与えなかった。

【結論】

L-PGDSは骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨破壊を抑制することが分かった。また、エストロゲンの枯渇によりL-PGDSの発現が減少して骨代謝の平衡が崩れた結果、骨破壊が亢進する可能性が示唆された。

歯の移動に伴う炎症性サイトカイン発現へのTRPV1の関与

○長谷川 尚哉¹、湯川 未郷¹、土屋 隆子¹、佐々木 会¹、須田 直人¹、安達 一典²

¹明海大・歯・歯科矯正、²明海大・歯・歯科薬理

【目的】これまで我々は、歯の移動に伴って発現する疼痛が、開口反射を誘発する電気刺激閾値（TH）の低下として定量評価できることを報告してきた。さらに、TRPV1拮抗薬（A-889425、AMG9810）の投与は、THを有意に上昇させ、歯の移動に伴う疼痛に対して有効と考えられた。しかしながら、TRPV1拮抗薬の歯の移動に伴う疼痛の鎮痛効果の作用機序は不明な点が多い。また、TRPV1は成熟破骨細胞の誘導因子であることから、それらの阻害は歯の移動に影響を与える可能性がある。そこで、TRPV1拮抗薬ならびに、歯科で頻用される酸性非ステロイド性抗炎症薬の投与が及ぼす影響を、THが有意に低下する矯正力負荷1日後の炎症性サイトカイン量を指標とし、また、歯の移動量が有意に上昇する矯正力負荷7日後では歯の移動量と成熟破骨細胞数を指標として評価した。【材料および方法】実験的矯正力負荷のため、ラットの上顎右側第一臼歯と上顎両側門歯間にコイルスプリングを装着した。矯正力負荷直後より、A-889425（5.0 mmol/kg）、AMG9810（10.0 mmol/kg）ならびにアスピリン（100 mg/kg）、を腹腔内投与（3回/日）した。矯正力負荷1日後、上顎右側第一臼歯を抜歯し、歯根表面の歯周組織のホモジナイズを行い、各サンプル内のタンパク質量を30 mgに調整し、メンブレン抗体アレイを用いて炎症性サイトカインを測定した。歯の移動量は、歯の移動前後に上顎臼歯部を印象採取し、石膏模型を作製後、石膏模型上で測定した。成熟破骨細胞は、灌流後、摘出した上顎右側第一臼歯部歯周組織の脱灰標本を作製し、TRAP染色陽性の3核以上の細胞を破骨細胞として評価した。それぞれ矯正力負荷1日、3日、7日後に計測した。【結果】矯正力負荷1日後に上昇したIL-6はTRPV1拮抗薬、アスピリンの投与により有意に抑制された。またCINC-2はアスピリンの投与では有意な変化を認めなかったが、TRPV1拮抗薬の投与により有意に抑制された。矯正力負荷7日後のアスピリン、TRPV1拮抗薬の投与は、成熟破骨細胞数を有意に減少させた。歯の移動量は各薬物投与で減少傾向を示したが、有意差は認められなかった。【考察】TRPV1の拮抗は、歯根膜自由神経終末のTRPV1を遮断することで、歯の移動に伴う疼痛を抑制すると考えられる。また、TRPV1を介して生じる疼痛はCINC-2の発現を介して起こることが示唆された。一方、TRPV1の拮抗は成熟破骨細胞数を抑制したが、歯の移動量は保持されたことから、適切な投薬プロトコルを確立することで有効な治療薬となりうる可能性も示唆された。

矯正力の負荷によって引き起こされる三叉神経節の興奮性

○湯川 未郷¹、土屋 隆子¹、長谷川 尚哉¹、佐々木 会¹、須田 直人¹、安達 一典²

¹明海大学歯学部形態機能成育学講座 歯科矯正学分野、²明海大学歯学部病態診断治療学講座 薬理学分野

【目的】矯正治療では歯の移動に伴い末梢に疼痛を生じる。末梢性疼痛は、一次求心性線維の神経節サテライトグリア細胞にGFAP(グリア線維性酸性タンパク質)発現を伴う興奮を引き起こすことが知られている。そこで、本研究では歯の移動に伴う疼痛を開口反射誘発閾値(TH)の変化によって定量評価可能な動物モデルを用いて、矯正力による疼痛と三叉神経節GFAP陽性サテライトグリア細胞数の関連性と、投薬の効果を検討した。【試料および方法】イソフルラン(2-3%,1.0L/min)による全身麻酔下で雄性Wistar系ラットの上顎両側門歯と右側第一臼歯間(M1)にNi-Tiコイルスプリングを装着し矯正力(50 g)を負荷した。薬物投与群には矯正力負荷直後より、アスピリン(100 mg/kg)、モルヒネ(1.0 mg/kg)を投与(8時間毎、3回/日)した。矯正力負荷1(D1)、3(D3)、7(D7)日後に、ラットにイソフルラン(2-3%,1.0L/min)全身麻酔下で気管挿管を行い、筋電図(顎二腹筋)採取用電極と、電気刺激用電極を両側M1部歯肉に留置した。手術終了後、麻酔濃度を約1.5%まで下げ下肢回避反射を確認し、右側からTHを測定し矯正力誘発疼痛を評価した。次に、三叉神経節の組織学的な変化と疼痛の強度の関連を検討するために4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後に三叉神経節を摘出し、灌流固定で用いた同様の固定液にて約24時間以上後固定した。摘出組織から通常に従い水平断凍結切片(5mm)を作製し、GFAP免疫蛍光染色を行い観察した。三叉神経節I、II、III枝領域において、周囲2/3以上をGFAP免疫反応性(IR)細胞に囲まれた神経細胞体数を計測した。【結果および考察】本モデルでは、D1は右側THが左側と比較して有意に減少し、D3で回復傾向を示し、D7で上昇する事が示されている。それに伴い、右側I・II枝領域でGFAP-IR細胞に囲まれた細胞体が左側に比較して有意に増加したが、D3、D7では有意差はなかった。いずれの鎮痛薬も、D1で右側のTHを有意に上昇させ、右側I・II枝領域のGFAP-IR細胞に囲まれた細胞体の有意な減少を伴った。これらの結果は、矯正力誘発疼痛が三叉神経節サテライトグリアのGFAP活性上昇を伴うこと、また異なる作用機序の鎮痛薬でもその活性を阻止できることを示した。