

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11685

研究課題名(和文) 水素水を応用した薬物性歯肉増殖症の新規治療法・予防法の開発

研究課題名(英文) Application of hydrogen water to develop new therapy for drug-induced gingival overgrowth

研究代表者

竹内 麗理 (TAKEUCHI, Reiri)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：60419778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：薬物性歯肉増殖症は、歯肉が増殖し、放置すれば歯の咬合面を覆い、咀嚼機能に重大な影響を及ぼし、また審美性にも問題を生じる疾患である。その主たる治療法は歯肉切除と薬剤変更であるが、患者の状態によってはこれらの選択が困難な場合も多いため、新規治療法の開発が望まれている。本研究では、水素水を薬物性歯肉増殖症の治療に応用するために、ラットの炎症モデルを使用し基礎実験を行った。その結果、水素水がインターロイキン6等のmRNA発現を抑制し、ラットに対し抗炎症効果を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水素水を応用した新規治療法の開発には、生体を丸ごと扱う動物実験で、生体内の複雑な生理機能に対する水素水の効果を評価することが必要である。本研究では、ラット舌に炎症を生じ、水素水がその炎症症状を緩解することを確認し、さらに、水素水の抗炎症作用の機序として、インターロイキン6等の炎症性因子発現が変化することも明らかになった。一方、治療のためには疾患の発症機序解明も必要である。本研究では、原因薬物の一つであるフェニトインが歯肉線維芽細胞アポトーシスを抑制することを明らかにした。研究成果は、本疾患の新たな治療法開発および発症機序の解明に寄与した。

研究成果の概要(英文)：The experiments using animals are beneficial to develop the new therapy using hydrogen water for the drug-induced gingival overgrowth. In this study, the effects of hydrogen water were investigated using rats induced the inflammation on the tongue. The hydrogen water showed the anti-inflammatory effect on the rat tongue through the decreased in the mRNA expression of interleukin 6. Also, the development of new therapy requires to investigate the mechanism of the drug-induced gingival overgrowth. In this study, it was showed that the mechanism of the phenytoin-induced gingival overgrowth was related to the reduction of the apoptosis in the gingival fibroblasts exposed to phenytoin. The results of the research contribute to develop the new therapy for the drug-induced gingival overgrowth, and also to investigate the mechanism of this disease.

研究分野：生化学 分子生物学 薬理学

キーワード：薬物性歯肉増殖症 ラット 病態モデル 歯肉線維芽細胞 アポトーシス 細胞増殖 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

薬物性歯肉増殖症は、フェニトイン、シクロスポリン、ニフェジピンなどの薬物が原因で発症し、歯間乳頭や辺縁歯肉の付着歯肉部に線維性の増殖を呈する。直接生命を脅かすものではないが、放置すれば歯の咬合面まで歯肉が増殖し、咀嚼機能に重大な影響を及ぼすことや審美性に問題があることなど、患者の QOL に多大な問題を生じる。

薬物性歯肉増殖症は超高齢社会の到来により罹患者数が増加し、今後さらにこの現象が大きくなることは自明の理である。この疾患は診断および治療が困難であるとともに罹患者 QOL の著しい低下を招くことも知己の事実である。本疾患の主たる治療法は歯肉切除と薬剤変更であるが、患者の基礎疾患の状態によってはこれらの選択が困難な場合が多く、特にシクロスポリンなどの免疫抑制薬は他剤への変更が難しく、外科的侵襲も制限される。さらにニフェジピンも、他の多くのカルシウム拮抗薬でも歯肉増殖を生じるため、薬剤変更が困難である。一方、本疾患の有効な予防法は開発されていない。このような背景から、薬物性歯肉増殖症の新規治療法および予防法の開発が望まれていた。

水素医学に関する最初の論文が 2007 年に発表され (Nature Med 13, 688-694, 2007) その後 2015 年までの僅か 8 年で計 321 報の原著論文が世界中で発表された。その約 3/4 の論文ではマウス・ラット疾患モデル実験によって水素の有効性が証明されており、また 19 報もの論文で動物実験での結果がそのままヒト臨床試験で実証され、さらにその数は増加していた (Med Gas Res, 5:12, 2015)。このように水素医学は異例の速さで進展し、臨床試験でも大きな成果が得られていた。

酸化ストレスと歯周疾患に関する報告が数多くなされており、抗酸化物質による歯周疾患の治療や予防効果も示されていた。水素分子は活性酸素種の中で最も反応性の高いヒドロキシラジカルを選択的に還元し、細胞を酸化ストレスから防御し、水素分子が抗酸化剤として疾患の治療と予防に応用できることが報告されており (Nature Med 13, 688-694, 2007) 水素水は治療効果のある抗酸化物質として注目を集めていた (Methods Enzymol 555, 289-317, 2015; Pharmacol Ther 144, 1-11, 2014)。

薬物性歯肉増殖症の原因は炎症、歯肉線維芽細胞の過度の増殖、コラーゲンなど細胞外基質の堆積であると報告され、これらの現象はフェニトイン、シクロスポリン、ニフェジピンが炎症性サイトカイン IL-1、IL-6、TGF- β 等の産生、化学伝達物質ヒスタミン、プロスタグランジン、TNF- α の脱顆粒を促すことで生じると示されている。研究代表者は過去に、水素水が歯肉増殖症患者由来歯肉線維芽細胞の増殖を抑制することを確認しており、さらに水素分子は IL-1、IL-6、TNF- α の発現抑制による抗炎症作用や癌細胞など多くの細胞で細胞増殖抑制作用をもつことも示されている。以上の点から、水素水は薬物性歯肉増殖症の治療および予防に応用可能であると期待できた。

2. 研究の目的

水素水を応用した薬物性歯肉増殖症の新規治療法および予防法の開発を目的とする。具体的には、水素水が歯肉組織の炎症症状を緩解すること、さらに、その機序を明らかにする。また、薬物性歯肉増殖症の発症機序を解明するため、歯肉線維芽細胞の細胞周期やアポトーシスに対するフェニトインの影響を解析する。

3. 研究の方法

(1) 口腔粘膜の炎症モデルラットにおける水素水の抗炎症効果の検討

ラットの舌に炎症症状を誘発し、その部位に水素水を適用した。その後、水素水の抗炎症効果を評価するため、病変部組織における炎症性因子の mRNA 発現を DNA マイクロアレイ法およびリアルタイム PCR 法にて解析した。

(2) 歯肉線維芽細胞の細胞周期・アポトーシスに対するフェニトインの影響の評価

ヒト培養歯肉線維芽細胞をフェニトインで刺激し、トリパンブルー染色法にて生細胞数、死細胞数を、ELISA 法にてアポトーシス細胞数を測定した。また、RT-PCR 法にて CYCLIN D 及び CYCLIN E mRNA 発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 口腔粘膜の炎症モデルラットにおける水素水の抗炎症効果の検討

水素水中の水素濃度はラット適用前 1.07 ± 0.06 ppm、適用 12 時間後 0.32 ± 0.05 ppm であった。水素水によって、ラットの体重は変化しなかった。

炎症性因子 43 種類の mRNA 発現に対する水素水の効果を検討したところ、水素水適用群では対照群と比べ、ICAM1 は 0.45 倍、IFNG は 0.47 倍、IL12A は 0.37 倍、IL1B は 0.19 倍、IL6 は 0.12 倍、TNF は 0.49 倍、発現量が減少していた。その他の因子では両群の発現量に大きな差は認められなかった (表 1)。ICAM1、IFNG、IL12A、IL1B、IL6、TNF については、さらにリアルタイム PCR 法による解析をおこなった。これら全ての因子において、水素水は mRNA 発現量を減少させ、特に IL6 の変化が顕著であった (図 1)。

表 1

Symbol	Full Name	Ratio
B2M	beta-2-microglobulin	1.02
BCL6	B cell CLL/lymphoma 6	0.97
C3AR1	complement C3a receptor 1	1.30
C4A	complement C4A	1.36
CCL11	C-C motif chemokine ligand 11	0.90
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2	1.04
CCL5	C-C motif chemokine ligand 5	0.96
CCR3	C-C motif chemokine receptor 3	1.18
CCR4	C-C motif chemokine receptor 4	1.39
CD40	CD40 molecule	0.99
CD40LG	CD40 ligand	1.18
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein beta	1.07
CSF1	colony stimulating factor 1	1.14
CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2	1.16
CXCR1	C-X-C motif chemokine receptor 1	1.22
CXCR2	C-X-C motif chemokine receptor 2	1.12
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4	1.37
FASLG	Fas ligand	1.13
FOS	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	1.22
HDAC4	histone deacetylase 4	1.02
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	0.45
IFNG	interferon gamma	0.47
IL10	interleukin 10	1.19
IL12A	interleukin 12A	0.37
IL12B	interleukin 12B	0.72
IL1B	interleukin 1 beta	0.19
IL1F10	interleukin 1 family member 10	1.08
IL22	interleukin 22	1.15
IL4	interleukin 4	1.25
IL6	interleukin 6	0.12
IL8	interleukin 8	1.14
ITGB2	integrin subunit beta 2	1.18
LY96	lymphocyte antigen 96	1.30
NFATC3	nuclear factor of activated T cells 3	1.04
NFKB	nuclear factor kappa B	0.80
NR3C1	nuclear receptor subfamily 3 group C member 1	1.16
RPL13A	ribosomal protein L13a	1.04
TLR2	toll like receptor 2	1.28
TLR3	toll like receptor 3	1.20
TLR5	toll like receptor 5	1.13
TLR7	toll like receptor 7	0.99
TNF	tumor necrosis factor	0.49
TNFSF14	TNF superfamily member 14	1.22

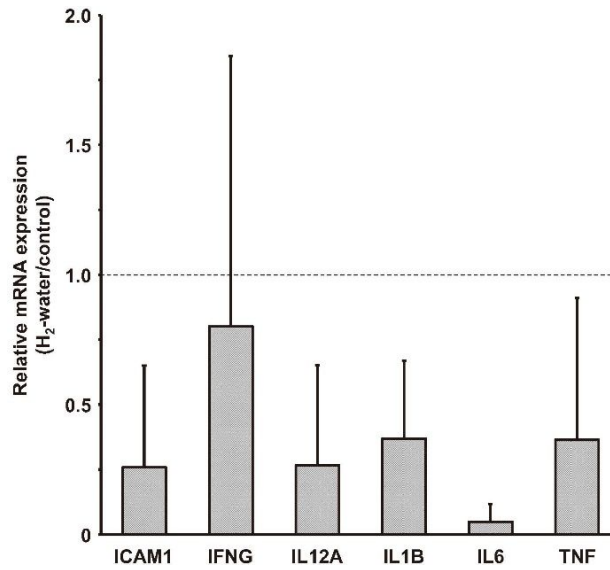


図 1

(2) 歯肉線維芽細胞の細胞周期・アポトーシスに対するフェニトインの影響の評価
 歯肉線維芽細胞においてフェニトインの影響によって、生細胞数は増加し、死細胞数は減少し (図 2)、アポトーシス細胞数は減少した (図 3)。また、CYCLIN D mRNA 発現は亢進し、CYCLIN E mRNA 発現は変化しなかった (図 4)。

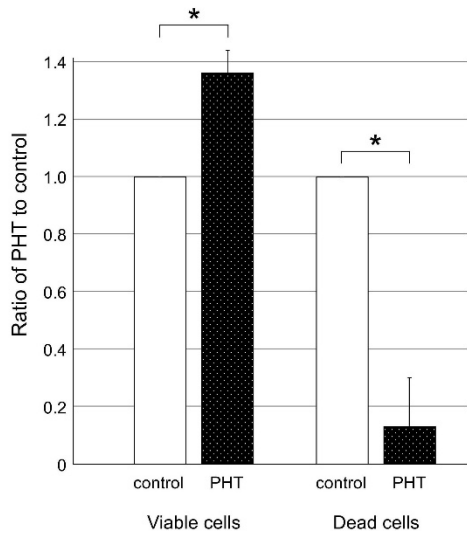


図 2

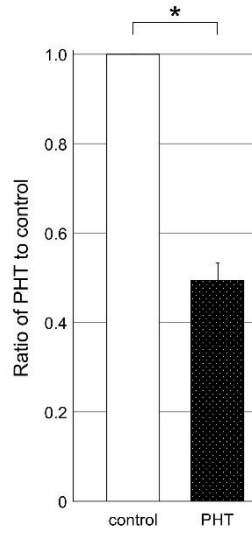


図 3

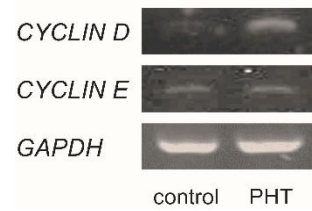


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Reiri Takeuchi, Hiroko Matsumoto, Chieko Taguchi, Yuichiro Okada, Masaru Mizuta, Takashi Yamada, Toru Aso, Haruka Sakazume, Kazumune Arikawa, Koichi Hiratsuka	4. 巻 20
2. 論文標題 Mechanism of drug-induced gingival overgrowth: Phenytoin inhibits the apoptosis of human gingival fibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 109-116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5466/ijoms.20.109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiroko Matsumoto, Masatoshi Suzuki, Reiri Takeuchi, Koichi Hiratsuka, Hidenori Yamaguchi	4. 巻 20
2. 論文標題 Anti-apoptotic effects of propofol on Akt/GSK3 pathway and intracellular pH in alveolar epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 126-131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5466/ijoms.20.126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 竹内麗理、有川量崇、田口千恵子、末光正昌、森川美雪、丸山満博、渡邊信幸、久山佳代、平塚浩一	4. 巻 44
2. 論文標題 水素水の抗炎症作用による口腔粘膜炎の予防効果の検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日大口腔科学	6. 最初と最後の頁 39-46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Hiroko Matsumoto, Hidenori Yamaguchi, Reiri Takeuchi, Hitoshi Nishimura, Masamichi Komiya, Koh Shibutani
2. 発表標題 Propofol reduces MAPK phosphorylation induced by interleukin-1 in HSMCs
3. 学会等名 4th Meeting of the IADR Asia Pacific Region 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Reiri Takeuchi, Hiroko Matsumoto, Chieko Taguchi, Akinobu Aoki, Kazumune Arikawa, Koichi Hiratsuka
2. 発表標題 Basic study on medication for gingival overgrowth
3. 学会等名 97th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Reiri Takeuchi, Hiroko Matsumoto, Chieko Taguchi, Kazumune Arikawa, Ko Ito, Akinobu Aoki, Kosuke Takahashi, Toshiro Kondoh, Koichi Hiratsuka
2. 発表標題 Cell cycle and apoptosis in gingival fibroblasts exposed to nifedipine
3. 学会等名 18th WORLD CONGRESS OF BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chieko Taguchi, Reiri Takeuchi, Masaaki Suemitsu, Miyuki Morikawa-Saito, Kazumune Arikawa, Kayo Kuyama, Koichi Hiratsuka
2. 発表標題 Fundamental research for establishment of oral mucositis animal model
3. 学会等名 18th WORLD CONGRESS OF BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Reiri Takeuchi, Hiroko Matsumoto, Ko Ito, Akinobu Aoki, Kosuke Takahashi, Toshiro Kondoh, Koichi Hiratsuka
2. 発表標題 18alpha-glycyrrhetic acid activates the cytochrome c-mediated death pathway
3. 学会等名 38th World Congress of the International Union of Physiological Sciences (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究分担者	有川 量崇 (ARIKAWA Kazumune) (50318325)	日本大学・松戸歯学部・教授 (32665)	
研究分担者	伊藤 耕 (ITO Ko) (20419758)	日本大学・松戸歯学部・講師 (32665)	削除：2020年5月14日
研究分担者	田口 千恵子 (TAGUCHI Chieko) (80434091)	日本大学・松戸歯学部・助教 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------