

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17070

研究課題名(和文) フェニトイン・ニフェジピン誘導性歯肉増殖症のメカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of PHT and NIF induced gingival overgrowth

研究代表者

岡信 愛 (OKANOBU, AI)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：00806581

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)：申請者は、フェニトイン(PHT)、ニフェジピン(NIF)誘導性歯肉増殖症モデルにおけるNR4A1が薬物性歯肉増殖症メカニズムの中心であることを調べることを目的として研究を行った。まずPHT、NIF誘導性歯肉増殖症モデルマウスの確立を目指し、さまざまな濃度、投与方法、投与時間で実験を行ったが、顕著な増殖症の発症には至らなかったため、in vitroにおいてPHT、NIFとNR4A1が歯肉増殖症に及ぼす影響を調べた。結果として、ヒト歯肉線維芽細胞において、NIF、PHTがNFATc3の核内移行を抑制しNR4A1の発現も抑制することで、結果として型コラーゲンの発現が亢進することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は申請者が過去に実施してきたCsA誘導性歯肉増殖症の研究成果をもとに、PHT、NIFで誘導された歯肉増殖症モデルを作製し、NR4A1が薬物性歯肉増殖症メカニズムの中心的な役割を持つ分子であることを調べることを目的としている。本研究のNR4A1を中心としたメカニズムの解明は、新規治療法や予防法の開発につながり、薬剤変更や外科処置が困難な患者、口腔衛生管理が困難な超高齢の薬物性歯肉増殖症患者にとって大きな負担軽減となる。

研究成果の概要(英文)：The applicant conducted a study to investigate whether NR4A1 is a central mechanism of drug induced gingival overgrowth in the model of phenytoin (PHT) and nifedipine (NIF) induced gingival overgrowth. First, to establish PHT and NIF induced gingival overgrowth mice model, we conducted experiments at various concentrations, dosing methods, and dosing times, but did not develop prominent overgrowth. So, PHT and NIF and the effect of NR4A1 on gingival overgrowth was investigated in vitro. As a result, it was shown that in human gingival fibroblasts, NIF and PHT suppress the nuclear translocation of NFATc3 and also suppress the expression of NR4A1, resulting in the enhanced expression of type I collagen.

研究分野：歯周病学

キーワード：薬物性歯肉増殖症 マウスモデル フェニトイン ニフェジピン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在日本は超高齢社会に突入し、有病高齢者が急速に増加している。さらに医療の高度化によって様々な治療薬が開発され、多くの疾患が治療可能となってきたが、その一方で様々な副作用が問題となっている。

薬物性歯肉増殖症は、抗てんかん薬フェニトイン (PHT)、降圧薬のうちカルシウム拮抗薬のニフェジピン (NIF)、免疫抑制薬のシクロスポリン A (CsA) を長期服用する患者に生じる副作用であり、歯肉結合組織の肥大、コラーゲン線維の増加や歯肉上皮幅の増大を特徴とする歯周疾患である。薬物性歯肉増殖症は歯肉の増殖や歯周炎の悪化、審美障害や歯の移動を引き起こし、患者の QOL を著しく低下させる。現在の薬物性歯肉増殖症の治療法は服用薬剤の変更や歯肉切除術であるが、超高齢社会の今、要介護者や有病者に対しこれらの治療方法は制限されることもある。したがって、低侵襲で安全な薬物性歯肉増殖症の新規治療薬の開発が望まれている。そのためには、本疾患の詳細な分子メカニズムを解明する必要がある。

薬物性歯肉増殖症の研究はすでに多くあるが、メカニズムの解明には至っていない。申請者らは、薬物性歯肉増殖症が歯の周囲にのみ発症し、口蓋中央や他の臓器には発症しないことや、歯周治療のみで薬物性歯肉増殖症が改善したとの報告 (G.L. Pilatti *et al.*, 1997) から、薬物性歯肉増殖症の発症にとって、歯周組織の炎症が重要な誘導因子であると考えた。そして、絹糸結紮歯周炎モデルマウスに CsA を腹腔内投与して、再現性の高い顕著な歯肉増殖症の発症に成功した (Okanobu *et al.*, 2017)。さらにこのモデルマウスの歯肉を使用して、組織の線維化に関連する分子 NR4A1 が CsA 誘導性歯肉増殖症に関与していることを明らかにした。NR4A1 は生理的な創傷治癒過程では TGF- $\beta$  シグナルを制御し、コラーゲンの蓄積を抑制しているが、薬剤の刺激などで NR4A1 の制御機構が破綻すると、TGF- $\beta$  シグナルが過剰となり、コラーゲンが蓄積して肺線維症や全身性強皮症といった線維化疾患が発症する (K.Palumbo-Zerr *et al.*, 2015)。申請者は上記の CsA 誘導性歯肉増殖症モデルマウスで、CsA が NR4A1 の遺伝子発現を抑制することで、歯肉組織中のコラーゲンが蓄積することを明らかにした。

### 2. 研究の目的

本研究は CsA 誘導性歯肉増殖症モデルマウスを改変し、PHT、NIF によって誘導された歯肉増殖症モデルマウスを作製し、NR4A1 が薬物性歯肉増殖症メカニズムの中心的な役割を持つ分子であるかを調べることを目的としている。本研究の NR4A1 を中心としたメカニズムの解明は、新規治療法や予防法の開発につながり、薬剤変更や外科処置が困難な患者、口腔衛生管理が困難な超高齢の薬物性歯肉増殖症患者にとって大きな負担軽減となる。

### 3. 研究の方法

#### 実験 1. PHT、NIF 誘導性歯肉増殖症モデルマウスの確立と細菌感染の関与の検討

CsA 誘導性歯肉増殖症モデルマウスを改変し、PHT あるいは NIF を様々な濃度、投与期間を調整し発症の有無について検討する。また、これまでに PHT の代謝産物 5-HPPH が歯肉増殖症の発症に関与しているという報告がある (Ieri *et al.*, 1995)。したがって、絹糸結紮歯周炎モデルマウスに経口投与を行う、あるいは代謝産物を腹腔内投与することで歯肉増殖症発症の可否を肉眼的、組織学的に評価する。また、結紮絹糸を除去することで歯肉増殖症の改善の程度を検討する。

#### 実験 2. PHT、NIF 誘導性歯肉増殖症モデルマウスを用いた分子メカニズムの解明

##### I. PHT、NIF 誘導性歯肉増殖症モデルマウスにおける NR4A1 の発現解析

実験 1 で確立した歯肉増殖症モデルマウスから歯肉組織を採取し、ホモジネートした組織中の *Nr4a1*、*Tgfb1*、*Col1*、また線維症における TGF- $\beta$  シグナルの標的分子である *Pai1* および *Smad7* の mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析する。

##### II. PHT、NIF によるヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) のコラーゲン産生における NR4A1 の役割

これまでに申請者らは TGF- $\beta$  による NR4A1 の発現上昇に関与しているかを検討するため、PHT あるいは NIF と TGF- $\beta$  を作用させ、*Col1* および *Nr4a1* の発現量をリアルタイム PCR および Western blotting 法で解析する。

##### III. PHT、NIF が NR4A1 の発現を抑制するメカニズムの解明

NR4A1 の転写に MAP kinase, protein kinase C, NFAT などの酵素や転写因子が関与しているという報告がある。HGF に TGF- $\beta$  を作用させ、上記分子の活性を蛍光免疫染色法で確認する。

### 4. 研究成果

まず、PHT、NIF 誘導性歯肉増殖症モデルマウスの確立を目指し、さまざまな濃度、投与方法、投与時間で実験を行ったが、顕著な増殖症の発症には至らなかった。そこで、実験計画を変更し *in vitro* において PHT、NIF と NR4A1 が歯肉増殖症に及ぼす影響を調べるため、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) を用いて実験を行った。

NIF、PHT 誘導性歯肉増殖症の分子メカニズムを解析した結果を以下に示す。

TGF- $\beta$  を 1 時間単独作用すると NR4A1、型コラーゲンの mRNA 発現が有意に上昇した

が、NIF、PHTの1時間前投与で、NR4A1のmRNA発現は有意に抑制した。一方型コラーゲンのmRNA発現は更に有意に上昇した。(図1)  
 TGF-βを1時間単独作用し上昇したNR4A1のmRNA発現に対し、NFATc1 siRNAを導入してもその発現に有意差は認めなかった。一方、NFATc3 siRNAを導入すると、NR4A1のmRNA発現は有意に抑制した。(図2)  
 TGF-βを30分間単独作用するとNFATc3は核内に多く発現していたが、NIF、PHTの1時間前投与でNFATc3は細胞質に多く発現していた。(図3)

図1

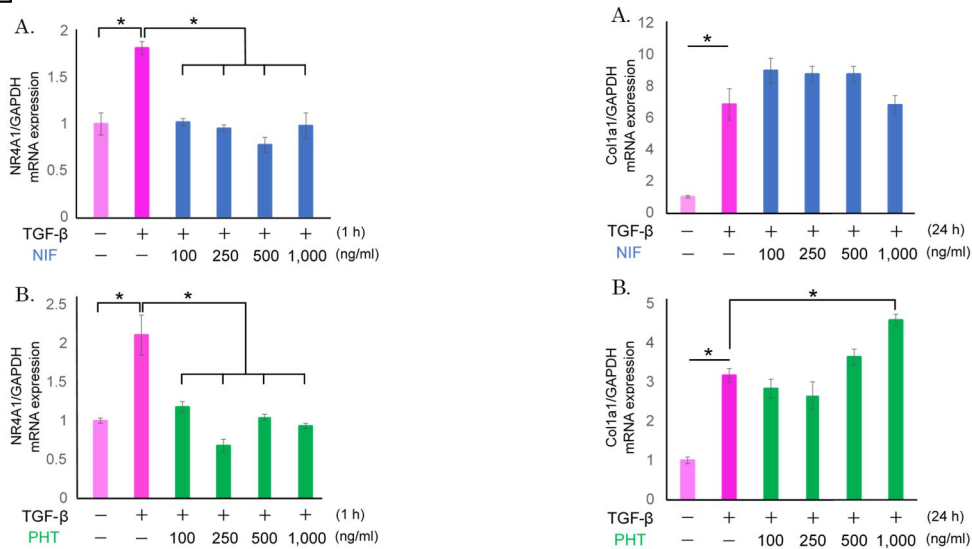


図2

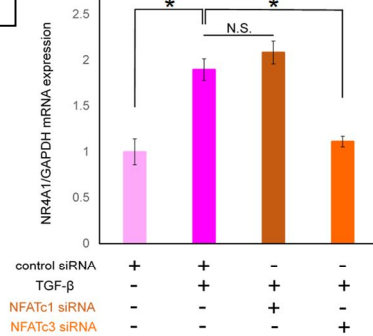
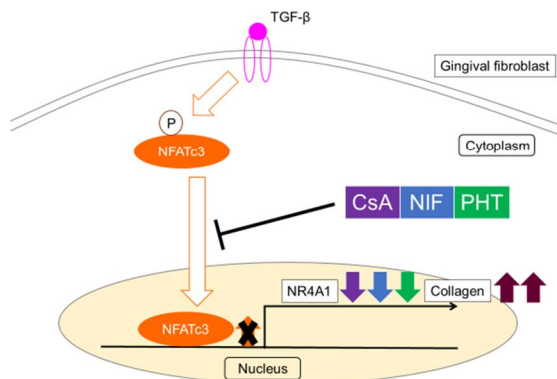
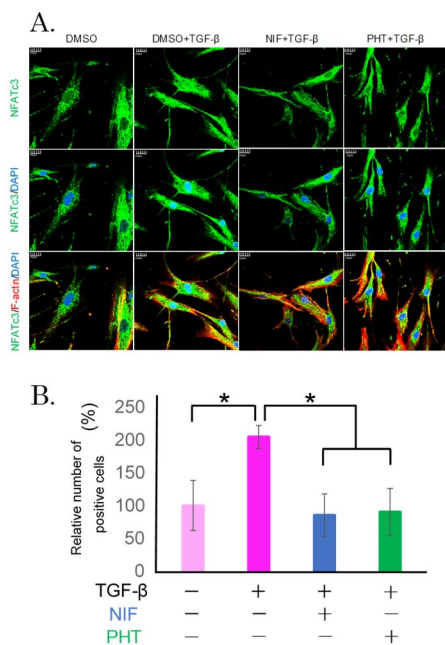


図3



CsA、NIF、PHT誘導性増殖症のコラーゲン産生亢進の分子メカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 畑野 紗希、松田 真司、岡信 愛、加治屋 幹人、古玉 大祐、目見田 匠、藤田 剛、栗原 英見
2. 発表標題 ニフェジピン、フェニトイン誘導性歯肉増殖症におけるNR4A1の役割
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國本 愛
2. 発表標題 薬物性歯肉増殖症のメカニズム解明に向けて
3. 学会等名 日本歯周病学会中国四国3大学・日本臨床歯周病学会中国四国支部合同研修会
4. 発表年 2019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
研究協力者	松田 真司  (MATSUDA SHINJI)		
研究協力者	加治屋 幹人  (KAJIYA MIKIHITO)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	水野 智仁 (MIZUNO NORIYOSHI)		
研究協力者	畑野 紗希 (HATANO SAKI)		