

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10130

研究課題名(和文)創薬スクリーニングによるNR4A1を標的にした薬物性歯肉増殖症の治療薬の探索

研究課題名(英文) To identify novel therapy drug of Drug induced gingival overgrowth targeting NR4A1 by drug screening

研究代表者

松田 真司 (Shinji, Matsuda)

広島大学・病院(歯)・病院助教

研究者番号：30611321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：薬物性歯肉増殖症(DIGO)は免疫抑制薬のシクロスポリンA、抗てんかん薬のフェニトイン、降圧剤のカルシウム拮抗薬の副作用で、歯肉肥厚を特徴とする。歯肉増殖症の治療法は変薬もしくは歯肉切除を必要とするが、全身状況や、服薬の内容によっては、治療法がない場合もある。そこで、変薬や歯肉切除を必要としない治療法の開発を目指した。核内受容体のNR4A1は、過剰な線維化を抑制する働きを持つが、3つの薬剤によって、その機能不全を起こしていることを確認した。そこで、本研究では、ブチリデンフタリドを用いて、その効果を調べたところ、歯肉線維芽細胞のNR4A1を上昇させ、DIGOを改善させることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、薬物性歯肉増殖症の決定的なメカニズム解明には至っていなかった。本研究では、歯肉増殖に関与する一つの分子を同定し、さらに治療法開発に応用できる可能性を追求できたことは大きな意義がある。今後さらなる研究が進めば、薬剤の変更や、歯肉切除術を必要としない、治療法の開発に繋がる可能性がある。以上の点で、本研究の成果は意義があり、発展性がある重要な課題に取り組んだと考える。

研究成果の概要(英文)：Drug-induced gingival overgrowth (DIGO) is a side effect of CyclosporineA, Phenytoin and calcium channel blockers. The management of DIGO is changing the drug and gingivectomy. However, for systemic condition and the role of drugs, there are limitation to use the current management for those patients. Therefore, the novel therapy is needed. The goal of the present study is to develop new therapy for DIGO. We previously identified a nuclear receptor (NR4A1) is associated with DIGO. NR4A1 function to improve fibrosis, but the three drugs disfunction of NR4A1. We hypothesized drugs which activate NR4A1 function will improve DIGO. The aim of the present study is to identify the chemical compound to activate NR4A1 and improve DIGO. We firstly used butylydenphthalide(BP) which increase the level of NR4A1. BP increased NR4A1 mRNA and protein levels in gingival fibroblasts and improved gingival overgrowth.

研究分野：歯周治療

キーワード：薬物性歯肉増殖症 NR4A1 ブチリデンフタリド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬物性歯肉増殖症(以下、増殖症)は抗てんかん薬フェニトイン (PHT)、降圧薬 (ニフェジピン (NIF)、Ca拮抗薬)、シクロスポリン A (CsA) の副作用で歯肉の過形成を特徴とした歯周疾患である。現在の治療法は、変薬や歯肉切除術であるが、コントロール良好な薬剤の変更は困難で、切除術は重度の全身疾患患者には適応できない。変薬や切除術が必要ない新規治療法が求められている。当研究室でこれまでに、NR4A1 の機能抑制が発症に関与していることを明らかにした。NR4A1 の機能を維持もしくは活性化することが出来れば、増殖症を治癒出来る可能性がある。そこで、本研究では、NR4A1 の発現を促進する薬剤をスクリーニングすることで、増殖症新規治療薬開発を目指す。

### 2. 研究の目的

変薬や歯肉切除術を必要としない、薬物性歯肉増殖症の治療薬の探索を目的とした。

### 3. 研究の方法

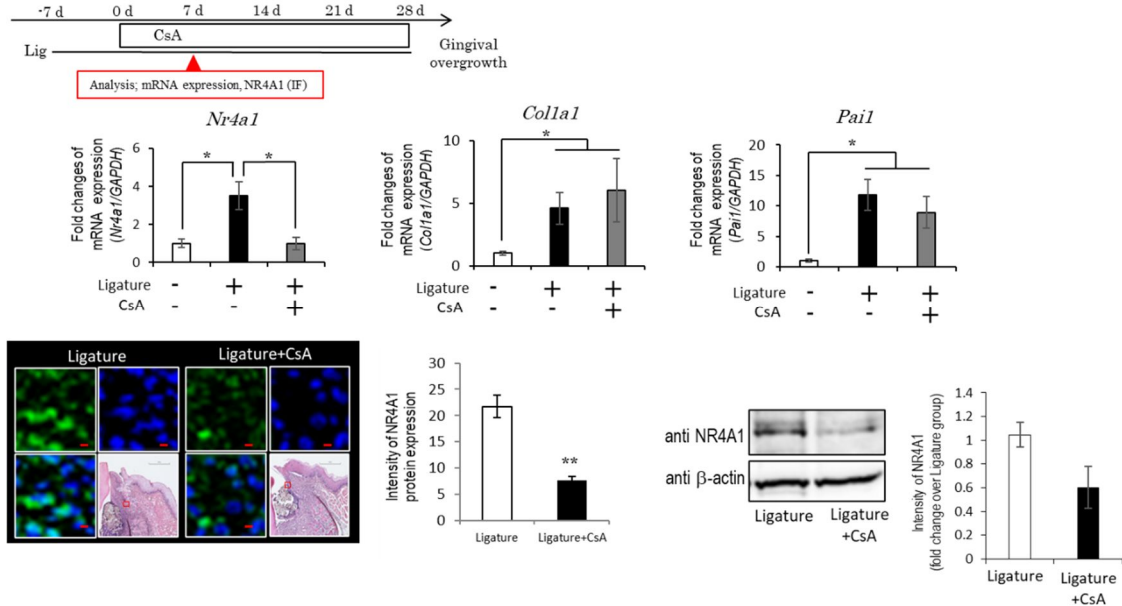
- I. 当研究室で開発した CsA 誘導性歯肉増殖症マウスモデル(Okanobu A et al.,) を用いて、歯肉線維化に関連する遺伝子、タンパク質の発現解析を行う。また NR4A1 の歯肉増殖に及ぼす影響を解析するため、NR4A1 のノックアウトマウスを用いて、詳細に検証する。
- II. 上記モデルを応用し、NIF および PHT の歯肉増殖症モデルの開発を行う。
- III. 歯肉線維芽細胞 (HGF) を用いた、培養薬物性歯肉増殖症モデルの確立
- IV. で確立した培養モデルを用いた、メカニズムの解明
- V. NR4A1 を上昇させる化合物の探索

### 4. 研究成果

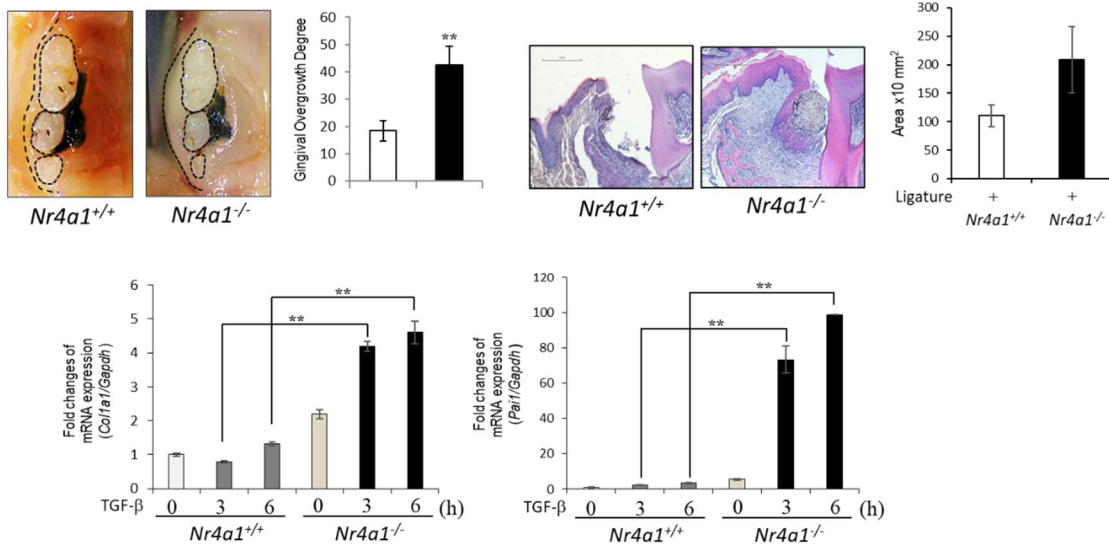
- I. CsA 歯肉増殖症モデルの線維化関連分子の発現解析  
CsA 誘導性歯肉増殖症マウスモデルを用いて、関連分子の発現解析を行った。増殖症モデルでは、発症段階において、NR4A1 の遺伝子、タンパク質発現は抑制されており、発症後には、コラーゲン発現が上昇していることを確認した (図 1)  
また、NR4A1 のノックアウトマウスを用いて、歯肉増殖症の発症を確認したところ、野生型マウスと比較して、歯肉増殖症の発症を確認した。  
またノックアウトマウスから分離した歯肉線維芽細胞は野生型歯肉線維芽細胞と比較して、Col1a1 の遺伝子発現、TGF- $\beta$  の標的遺伝子、PAI1 の発現が有意に上昇し、NR4A1 の過剰発現によって、その発現は抑制された。(図 2)
- II. NIF および PHT の歯肉増殖症マウスモデルの確立  
NIF および PHT の増殖症マウスモデル開発を試みたが、発症至適濃度が、致死量に近づくため、モデル開発を断念した。
- III. 薬物性歯肉増殖症培養モデルの構築およびメカニズム解明  
で動物モデルの開発は困難であったため、NIF、PHT の細胞培養モデルを構築することで、それぞれの薬剤と NR4A1 の関係を検証した。NIF、PHT で、TGF- $\beta$  刺激による NR4A1 の発現上昇を抑制することを確認し、それは NFATc3 の核内移行抑制が関係していることが確認された (図 3)。また細胞内カルシウム濃度の上昇が NR4A1 の上昇に関与していることを見出し、それぞれの薬剤がカルシウム濃度を抑制することで NR4A1 の発現を抑制していることが示された (図 4)。
- IV. NR4A1 を上昇させることができる化合物の探索  
当初、NR4A1 の発現を上昇させることができる薬剤のスクリーニングを行う予定であったが、効率よく臨床応用できる薬剤を探索するために、まずは既に NR4A1 を上昇させることが知られているブチリデンフタリドに注目して歯肉増殖症の治療効果を検証した。  
ブチリデンフタリドの投与で歯肉線維芽細胞の NR4A1 が上昇することを確認、歯肉増殖症モデルマウスに投与し、歯肉増殖症を改善させることを確認した。(図 5)

### 考察

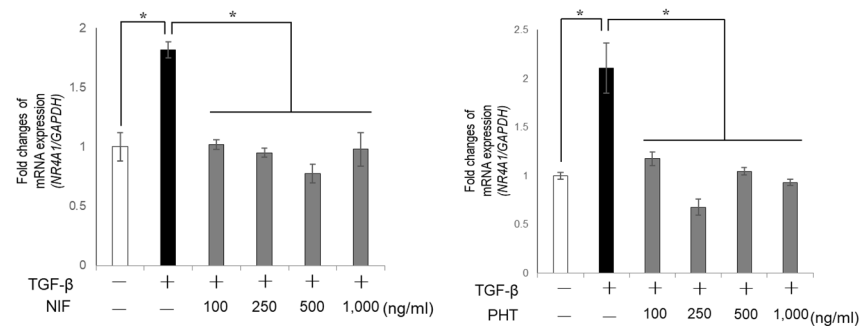
本研究で、3つの薬剤で発症する薬物性歯肉増殖症の発症にNR4A1が関与していることを見出した。またNR4A1を上昇させるプチリデンフタリドを用いることで、歯肉増殖症を改善させることができることを確認できた。今後、プチリデンフタリドを用いた薬物性歯肉増殖症の治療効果をさらに検証し、臨床応用を目指す予定である。



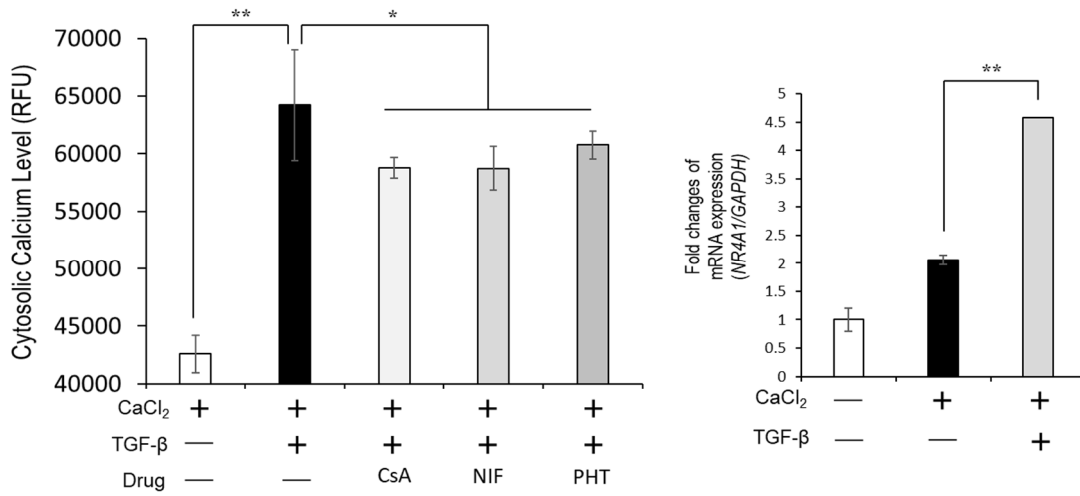
☒ 1



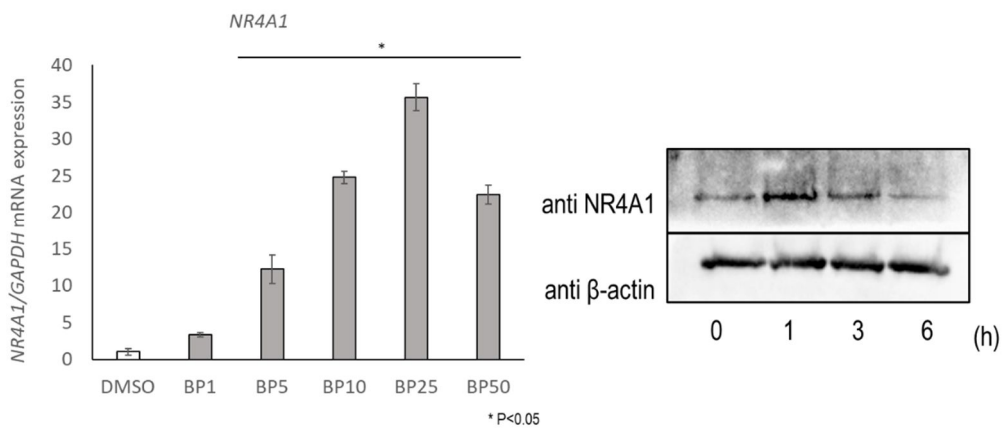
☒ 2



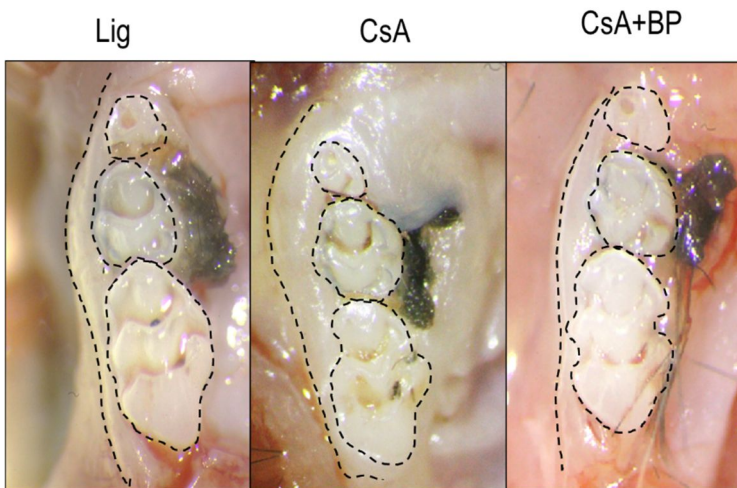
☒ 3



4



5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hatano Saki, Matsuda Shinji, Okanobu Ai, Furutama Daisuke, Memida Takumi, Kajiya Mikihiro, Ouhara Kazuhisa, Fujita Tsuyoshi, Mizuno Noriyoshi, Kurihara Hidemi	4. 巻 35
2. 論文標題 The role of nuclear receptor 4A1 (NR4A1) in drug induced gingival overgrowth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21693
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202100032R	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 薬物性歯肉増殖症におけるNR4A1の役割
3. 学会等名 広島大学歯学会総会
4. 発表年 2019年

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 秋季日本歯周病学会学術大会
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 分 担 者	加治屋 幹人  (Kajiya Mikihiro)  (00633041)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教    (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	藤田 剛  (Fujita Tsuyoshi)  (80379883)	広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授    (15401)	

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