

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23026

研究課題名（和文）薬剤性歯肉増殖症における細胞接着分子を介した上皮-結合組織相互作用の解明

研究課題名（英文）Elucidation of epithelial-connective tissue interactions mediated by cell adhesion molecules in drug-induced gingival hyperplasia

研究代表者

上田 亜美（UEDA, TSUGUMI）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：90876963

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：薬剤性歯肉増殖症の症状は歯肉辺縁に局限し、口腔清掃状態を良好に保つことによりその発症をある程度抑えられる。このことから、歯周ポケットの上皮組織への細菌感染やそれに伴う炎症が、歯肉増殖症の発症に関与している可能性が考えられる。本研究では、薬剤が、細菌バイオフィーム防御において重要な歯肉上皮に及ぼす影響を明らかにするために、ヒト歯肉上皮細胞、増殖症モデルラットを用いてin vitroおよびin vivo実験系にて検討した。RNAマイクロアレイのGO解析により、細胞膜の主成分であるリン脂質に関連する遺伝子発現が、コントロールと比較してシクロスポリン投与において有意に上昇していることが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、薬剤が歯肉上皮に及ぼす影響を明らかにするために、ヒト歯肉上皮細胞、増殖症モデルラットを用いて検討したところ、RNAマイクロアレイのGO解析により、細胞膜の主成分であるリン脂質に関連する遺伝子発現が、コントロールと比較してシクロスポリン投与において有意に上昇していることが認められた。このような結果は、歯肉増殖を惹起するプロセス解明の一端を担うと考えている。本研究の結果をもとにして、歯肉上皮をターゲットにした薬剤性歯肉増殖症の新規予防・治療法の開発に繋げていきたい。

研究成果の概要（英文）：Symptoms of drug-induced gingival overgrowth are confined to the gingival margin, and its development can be controlled to some extent by maintaining good oral hygiene. This suggests that bacterial infection of the epithelial tissues of periodontal pockets and associated inflammation may be involved in the development of gingival overgrowth. In this study, the effects of drugs on the gingival epithelium, which is important in bacterial biofilm defense, were investigated in vitro and in vivo experiment using human gingival epithelial cells and a rat model of gingival overgrowth. GO analysis of RNA microarrays showed that gene expression associated with phospholipids, a major component of cell membranes, was significantly elevated in cyclosporine treatment compared to controls.

研究分野：歯周

キーワード：薬剤性歯肉増殖症 歯肉上皮細胞 細胞接着

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎え、様々な全身疾患を抱える患者が増加し、薬剤服用患者数も増加しており、一部の薬剤はその副作用として歯肉増殖を誘発することが知られている。薬剤性歯肉増殖症は発症すると、増殖した歯肉がプラークコントロールを妨げ、プラークが蓄積することでさらなる歯肉増殖を招き、歯周組織の健康を大きく損なう。現在行われている治療法は対処療法に限られるため、根本的な予防・治療法の開発が急務となっている。

歯肉増殖症は、歯肉辺縁にのみ発症し、口腔清掃状態を良好に保つことでその発症をある程度抑えられることが分かっている。このことから、歯周ポケットの上皮組織への細菌感染やそれに伴う炎症が、歯肉増殖症の発症に関与している可能性が考えられる。これまでに想定されている薬剤性歯肉増殖症発症メカニズムとしては、薬剤による歯肉結合組織中の線維芽細胞のカルシウムシグナル阻害とそれに伴う葉酸取り込み阻害 (Brunet L *et al.*, Drug Saf, 1996)、薬剤による線維芽細胞のコラーゲン産生能の亢進 (Kim SS *et al.*, Journal of Periodontal Res, 2013) 並びに細胞外基質 (ECM) 分解に関与するプロテアーゼの抑制 (Kato T *et al.*, J Periodontol, 2005) などが報告されている。しかしながら、歯肉線維芽細胞に及ぼす投与薬剤の作用に着目した報告がほとんどであり、歯肉上皮への影響や、歯肉上皮と歯肉結合組織の相互作用に関してはほとんど明らかとなっていない。

そこで、「薬剤が、免疫・炎症応答の中心となる歯肉上皮の細胞接着分子にも作用し、歯肉結合組織の増殖を誘導する」との仮説に基づいて、これらの未解決の課題を解明するために、薬剤が歯肉上皮細胞の細胞接着分子に及ぼす影響を検討し、歯肉結合組織の増殖を誘導するメカニズムを検討する必要があると考え、以下の実験を行った。

2. 研究の目的

薬剤性歯肉増殖症は、歯肉辺縁に限局し、プラークコントロールを良好に保つことで発症が抑えられることから、歯周ポケットの上皮組織への細菌感染やそれに伴う炎症が、歯肉増殖症の発症に関与している可能性が考えられる。歯肉は、歯肉上皮細胞と歯肉線維芽細胞により構成されており、歯肉上皮細胞は物理的バリアとしての役割を果たすのみならず、免疫応答の制御に関与していることが明らかとなっている。このことから、薬剤が上皮細胞の細胞接着分子に影響を与え、結合組織内の細胞外基質の蓄積という臨床病態をより増悪させているのではないかと推察される。しかしながら既出の研究は、歯肉線維芽細胞に及ぼす投与薬剤の作用に着目した報告にとどまり、歯肉上皮の細胞接着および歯肉上皮と歯肉結合組織の相互作用に着目した検討はほとんどされていない。そこで本研究では、増殖症の原因となる薬剤の影響を歯肉上皮の観点から検討し、歯肉増殖反応につながる発祥のメカニズムを解明することを目指す。

3. 研究の方法

1) 細胞接着関連分子の発現解析

ヒト歯肉上皮細胞にフェニトイン (PHT) 0~100ng/ml、ニフェジピン (NFD) 0~100ng/ml、シクロスポリン A (CsA) 0~10000ng/ml をそれぞれ添加し、24 時間及び 48 時間培養後、RNA を回収し、細胞接着関連分子の発現を real-time PCR 法にて検討した。さらに透過電子顕微鏡を用いて細胞表面の観察を行なった。

2) シクロスポリン誘導性歯肉増殖症モデルラットの作製

4 週齢の雄 F344/Jcl ラットに CsA 混和飼料を与え、55 日間飼育した。CsA は最初の 1 週間は 100µg/g、以後は 300µg/g の濃度で普通粉末飼料に混和し、実験終了まで自由摂取させた。対照群として、CsA を含まない飼料を与え、実験群と同一条件下で飼育した。1 週間毎に口腔内写真を撮影し歯肉の状態を観察した。実験終了日にラットを屠殺し、10%パラホルムアルデヒドにて還流固定した後、左右の上顎を分離して臼歯部周囲の軟組織とともに摘出した。歯肉肥大を評価した後、摘出した上顎試料を EDTA 液にて脱灰、パラフィン包埋し、厚さ 4µm の薄切切片を作製した。この切片を免疫組織化学的染色を用いて評価した。

3) RNA マイクロアレイによる網羅的解析

ヒト歯肉上皮細胞に CsA 10000ng/ml もしくは DMSO を添加し、48 時間培養後、それぞれの RNA を抽出し、RNA マイクロアレイにて網羅的解析を行なった。さらに、シクロスポリン誘導性歯肉増殖症ラット及び Ctrl ラットの歯肉よりそれぞれ RNA を抽出し、同じく RNA マイクロアレイにて網羅的解析を行なった。

4. 研究成果

1) 細胞接着関連分子として報告のある遺伝子リスト (27 遺伝子) を作製し、1) の全サンプルにおいて real-time PCR 法を用いて解析を行なった。リストのほとんどの遺伝子では、コントロー

ルと比較して薬剤添加によりその発現に有意差は認められなかった。1つだけ濃度依存的に発現が有意に上昇した遺伝子があったが、免疫組織化学的染色や Western blot 法などによるさらなる検討が必要である。また透過電子顕微鏡を用いて細胞表面の観察を行なったが、薬物添加により細胞接着に明らかな変化は認められなかった。

2)シクロスポリン誘導性歯肉増殖症モデルラットの作成を試みたが、実態顕微鏡下で採取した上顎試料の歯肉を観察したところ、コントロールと比較してシクロスポリン投与ラットに肉眼的な変化は見られなかった。摂取させるシクロスポリンの濃度を上げる、シクロスポリン投与に加え歯牙結紮により歯根膜に炎症を与えるといった検討も行なったが、変化は認められなかった。

3)シクロスポリン投与によって歯肉上皮において変化する因子を網羅的に検討するために、ヒト歯肉上皮細胞及びラット歯肉上皮を用いて RNA マイクロアレイによる検討を行なった。GO 解析により、細胞膜の主成分であるリン脂質に関連する遺伝子発現が、コントロールと比較してシクロスポリン投与において有意に上昇していることが認められた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------