

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 25 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592321

研究課題名（和文）薬物誘発性歯肉増殖症の発症メカニズムの解明および治療薬の探索

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism of drug-induced gingival overgrowth and search for its therapeutic drugs

## 研究代表者

服部 敏己（HATTORI TOSHIMI）

松本歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：70064706

研究成果の概要（和文）：歯肉増殖症を引き起こすニフェジピン（高血圧治療薬）およびフェニトイン（抗てんかん薬）は歯肉線維芽細胞のカルシウム（ $\text{Ca}^{2+}$ ）感知受容体に直接作用する。そこからのシグナル伝達により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離および細胞膜上の TRPV1 チャンネルからの  $\text{Ca}^{2+}$  流入により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇する。そのことが引き金となって細胞増殖およびコラーゲン生成が促進され最終的に歯肉増殖症を惹起することが判明した（修正  $\text{Ca}^{2+}$  トリガー説）。

研究成果の概要（英文）：It was elucidated the mechanism of gingival overgrowth as described below. Nifedipine (an anti-hypertension drug) and phenytoin (an antiepileptic drug) directly act on calcium-sensing receptors, which elevate the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) by enhancing the  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and  $\text{Ca}^{2+}$  entry through transient receptor potential V1 channels. The  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation becomes a trigger of evocation of gingival overgrowth (Modified  $\text{Ca}^{2+}$  trigger theory).

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯肉増殖症，ニフェジピン，フェニトイン，カルシウム感知受容体，TRPV1 チャンネル，細胞内カルシウム濃度

## 1. 研究開始当初の背景

高血圧症治療薬（ニフェジピンなどの  $\text{Ca}^{2+}$  拮抗薬），抗てんかん薬（フェニトイン）および免疫抑制薬（シクロスポリン）はいずれも副作用として歯肉増殖症を引き起こす。しかし，その発見<sup>1)</sup> から 70 年以上を経た現在でも発症メカニズムは不明のままである。

薬物による歯肉増殖のメカニズムに関する

る報告は数多く，増殖因子だけでも  $\text{IL-1}\beta$ ， $\text{IL-6}$ ，プロスタグランジン，ブラジキニン，LPS 等の可能性が提唱されている。またその原因として線維芽細胞のアポトーシスの抑制<sup>2)</sup>あるいはコラーゲン異質化の抑制<sup>3)</sup>を主張している研究者もいる。

我々はこれまでの実験から以下のような知見を得た。 $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗薬は電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チ

チャネルをブロックするので、そのことについて歯肉線維芽細胞を用いて確認しようとしたところ、意外にも  $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗薬により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の上昇が観察された<sup>4)</sup>。更に  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇薬 (Bay K8644) は濃度依存的に歯肉線維芽細胞の増殖を促進し、 $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗薬で細胞増殖を起こさない肺、筋および皮膚の線維芽細胞においては  $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗薬は  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を上昇させないという結果を得て“ $\text{Ca}^{2+}$  トリガー説”<sup>5)</sup>の着想に至った。即ち  $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗薬は線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の開口分泌を促進し、FGF レセプターの刺激を介してチロシンキナーゼ活性を上げ、細胞増殖遺伝子の発現を促進し、歯肉線維芽細胞の増殖促進と併行してコラーゲン生成を促進することにより歯肉増殖症を引き起こすと考えられる。今回はフェニトインとシクロスポリンについても歯肉増殖症発症の作用機序を調べる。その成果を踏まえて原因療法的治療薬を探索する。

- 1) Kimball OP., J Am Med Assoc 112:1244-1245. (1939)
- 2) Shimizu Y. et al., J Periodontol 73:861-867. (2002)
- 3) Kataoka K. et al., J Periodontol 72:1078-1083. (2001)
- 4) Hattori T. Wang PL., Pharmacol Res 51:137-139. (2005)
- 5) Hattori T. Wang PL., Eur J Pharmacol 583:37-39. (2008)

## 2. 研究の目的

- (1)  $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗薬は歯肉線維芽細胞の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を上昇させる。フェニトインおよびシクロスポリンについても同様の作用があるのか否かを *in vitro* 実験により調べる。更にその  $\text{Ca}^{2+}$ の由来 (細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ ストアからの遊離または細胞外からの流入か) を究明する。
- (2) フェニトインおよびシクロスポリンについて歯肉線維芽細胞の増殖との関係を明らかにする。
- (3) 細胞が増殖すれば DNA 量も増える\*ので、その合成能に対するフェニトインおよびシクロスポリンの作用を明らかにする。\*Sun W., Chin J Dent Res 4:49-53. (2000)
- (4) 薬物誘発性歯肉増殖には I 型コラーゲン量の増加も密接に関与しているので、ELISA 法によりフェニトインおよびシクロスポリンのコラーゲン量に対する作用を明らかにする。
- (5) 歯肉線維芽細胞において  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇は塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の遊離を促進するので、フェニトインおよびシクロスポリンについて bFGF 遊離量に対する作用を明らかにする。
- (6) 遊離された bFGF はパラクラインおよびオートクラインにより bFGF 受容体に結合する。その結果、チロシンキナーゼの活性を上げるはずであるから、フェニトインおよびシクロスポリンによるチロシンキナーゼ活性の変化の有無を明らかにする。
- (7) チロシンキナーゼの活性化によりリン酸

化タンパクの増量が推測されるので、それに対するフェニトインおよびシクロスポリンの影響を明らかにする。

- (8) 細胞増殖・細胞周期関連遺伝子の発現が推測されるので、それに対するフェニトインおよびシクロスポリンの作用を明らかにする。
- (9) 歯肉増殖ではコラーゲン mRNA 量が增大しているはずであるから、それに対するフェニトインおよびシクロスポリンの作用を RT-PCR により明らかにする。
- (10) 歯肉増殖症の治療薬として抗炎症作用のある漢方薬“柴苓湯”を選び、*in vitro* 実験により歯肉線維芽細胞の増殖に対する作用を明らかにする。

## 3. 研究の方法

*In vitro* の実験における材料は培養細胞として確立されたヒト正常歯肉線維芽細胞 (Gin-1) を用いる。 *In vivo* の動物実験では材料としてラットを用いる。歯肉増殖症を引き起こす薬物としてニフェジピン、フェニトインおよびシクロスポリンを用いる。その治療薬として漢方薬である柴苓湯を試みる。

- (1) ニフェジピン、フェニトインおよびシクロスポリンによる歯肉線維芽細胞の増殖メカニズムを解明する。

- ① DNA 合成量の測定  
増殖中の細胞 DNA にピリミジンアナログである BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) を取り込ませ細胞分裂を行なっている細胞数を測定し、ニフェジピンが細胞分裂を促進しているのか否かを検討する。
- ② チロシンキナーゼ活性の測定  
Oncogene 社の protein tyrosine kinase assay kit および Upstate biotechnology 社の Protein tyrosine kinase assay kit などを用いて、チロシンのリン酸化と脱リン酸化を測定し、チロシンリン酸化経路の活動を確かめる。
- ③  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  と bFGF 遊離量の測定  
 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は蛍光性  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 fura-2/AM を用いて、古沢ラボアプライアンス社製細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度解析装置を使い、ビデオ画像解析法により測定する。その結果を受けて  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の変化と bFGF 遊離量との関係を調べる。bFGF 遊離量は R&D system 社製の ELISA kit を用いて測定する。
- ④ コラーゲン mRNA の検出  
Bradsten et al.\*の方法に準じて行なう。End point において増幅量に差が見られた場合は、RT-PCR をサイバークリーンを用いて行なう。\*J Dent Res 78:11-19. (1999)
- ⑤ 細胞増殖・細胞周期関連遺伝子の検出  
細胞増殖因子である *bcl-2* や細胞周期関連因子である p21 Cip/Waf 1 などを RT-PCR 法により検出し、欠落している因子や過剰発現している因子を検出する。
- ⑥  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  と細胞増殖との関係の解明  
 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は細胞内に fura-2/AM を負荷し、試験薬物を適用した場合の fura-2 発光強度からビデオ画像解析法により測定する。その

変化と細胞増殖の関係を調べる。増殖細胞数の計測は 96 穴マイクロプレート中で培養した Gin-1 細胞を同仁化学社製 Cell counting kit (WST-1)で標識してマイクロプレートリーダー (BioRad 社製) を用いて行う。

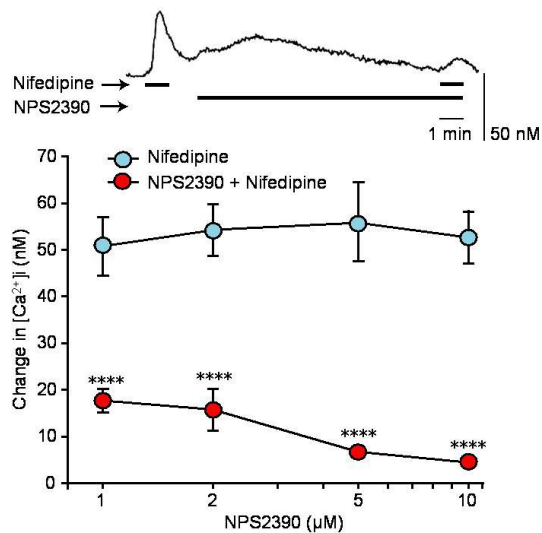
(2) 歯肉増殖症の原因療法的治療薬の探索を行う。

- ① 柴苓湯の bFGF 遊離量に対する作用の解明  
bFGF 遊離量に対する柴苓湯の濃度変化の影響を調べる。bFGF 遊離量は R&D system 社製の ELISA kit を用いて測定する。
- ② コラーゲン生成に対する柴苓湯の影響  
Chondrex 社製の ELISA kit によりタイプ I コラーゲンを定量し、その生成量に対する柴苓湯の影響を調べる。
- ③ 柴苓湯の細胞増殖に対する作用の解明  
細胞培養液に柴苓湯を添加し、細胞増殖に対する作用を調べる。96 穴マイクロプレート中で増殖した細胞の数は同仁化学社製 WST-1 を用いて計測する。

#### 4. 研究成果

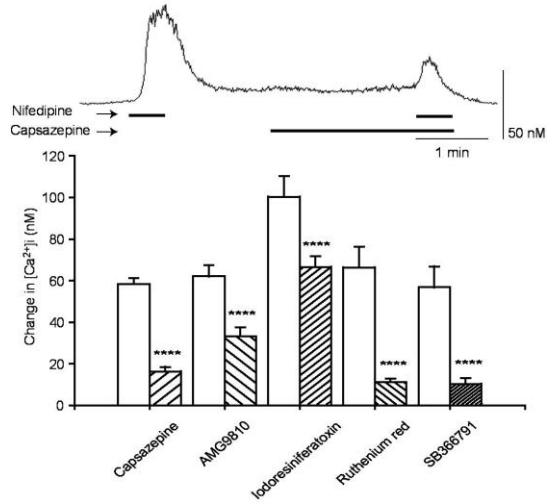
(1)  $Ca^{2+}$  感知受容体 (CaSR) アゴニストの gentamicin, neomycin, spermine および  $LaCl_3$  はそれぞれ  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させた。Verapamil は  $[Ca^{2+}]_i$  を濃度依存的に上昇させた。Gentamicin だけでなく nifedipine 適用でも見られた  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は U73122 (phospholipase C 阻害薬), xestospongin C ( $IP_3$  受容体拮抗薬) および SKF-96365 (非特異的陽イオンチャンネル遮断薬) により抑制された。CaSR アンタゴニストの NPS2390 は gentamicin あるいは nifedipine による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を抑制した (図 1)。以上の結果から歯肉線維芽細胞における nifedipine の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇作用に CaSR が関与している可能性が高まった。

図 1



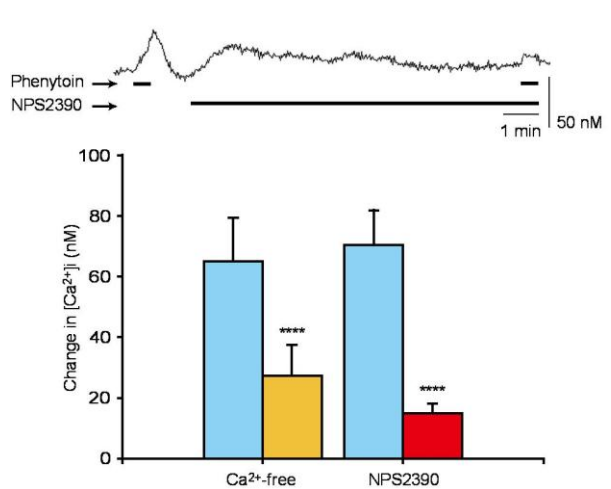
(2) TRPV1 チャンネルの作用薬 (capsaicin, olvanil および resiniferatoxin) および活性化薬 (anandamide および 2-APB) は濃度依存的に  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させた。TRPV1 チャンネル拮抗薬 (capsazepine, AMG9810, iodoresiniferatoxin, ruthenium red, SB366791 および) はニフェジピンによる  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を有意に抑制した (図 2)。得られた結果から歯肉線維芽細胞におけるニフェジピンの  $[Ca^{2+}]_i$  上昇作用には TRPV1 チャンネルが関与している可能性が考えられる。

図 2



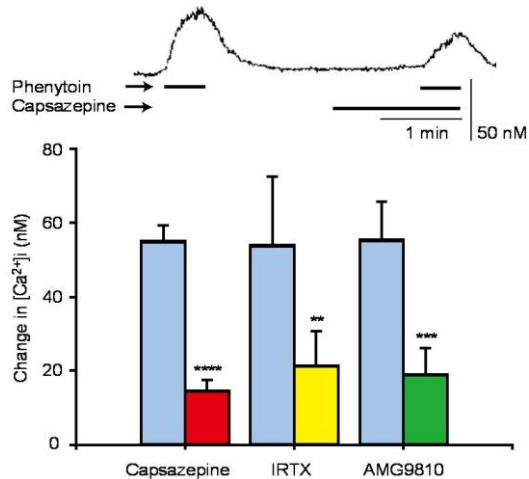
(3) フェニトイン (10–200 μM) は濃度依存的に  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させた。  $Ca^{2+}$  を除去した灌流液および NPS2390 (CaSR アンタゴニスト) はフェニトインによる  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を抑制した (図 3)。TMB-8 (細胞内  $Ca^{2+}$  ストア  $IP_3$  受容体遮断薬) はフェニトインによる  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を抑制した。U73122 (ホスホリパーゼ C 阻害薬) はフェニトインによる  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を抑制した。一方 m-3M3FBS (ホスホリパーゼ C 活性化薬) はフェニトインによる  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を増強した。これらの結果からフェニトインによる  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇にはカルシウム感知受容体と、更に細胞内  $Ca^{2+}$  ストアからの  $Ca^{2+}$  遊離が関与していることが考えられる。

図 3



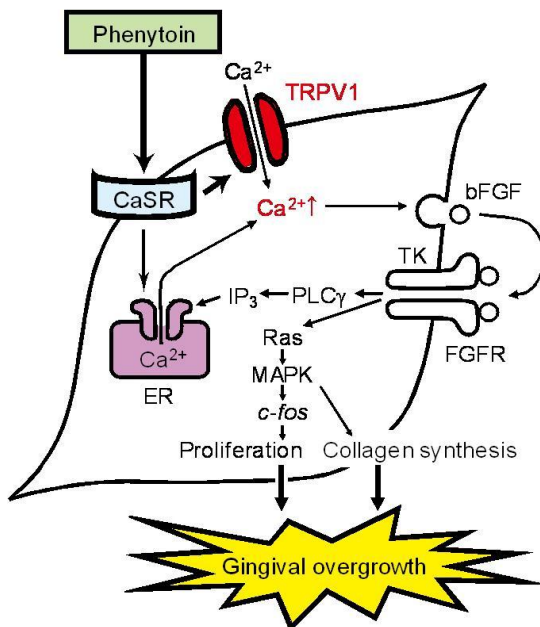
(4) U73122 および TMB-8 はフェニトインによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制した. Calphostin C および Gö 6983 (プロテインキナーゼ C 阻害薬)はフェニトインによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制した. PMA (プロテインキナーゼ C 活性化薬)はフェニトインによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を促進した. Capsazepine, iodoresiniferatoxin および AMG9810 (TRPV1 チャンネルアンタゴニスト)はフェニトインによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制した (図 4). これらの結果よりフェニトインによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇には TRPV1 チャンネルからの $Ca^{2+}$ 流入が関与していることが考えられる.

図 4



以上の知見から到達した薬物誘発性歯肉増殖症のメカニズムが図 5 に示す修正 $Ca^{2+}$ トリガー説である.

図 5



(5) 歯肉増殖症の発症メカニズムとして歯肉線維芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$ との関連を推察した報告はある. しかし我々のように実験によりその両者を詳細に論理的に解明した報告はない. 従って我々が提唱している“ $Ca^{2+}$

トリガー説”は世界初と言える.

(6) 国内外での学会発表では詳細なメカニズムを問う質問に度々出くわす. これは上記した $Ca^{2+}$ トリガー説にインパクトがある証拠と考えている.

(7) 歯肉増殖症発症薬物の直接的な作用部位として歯肉線維芽細胞の CaSR を, そしてそのシグナル伝達先として $Ca^{2+}$ ストア (小胞体) および TRPV1 チャンネルを考えている. しかし我々はその存在を薬理学的にこそ証明したが, 他にも免疫組織化学的あるいは分子生物学的にも証明されなければならない. その時, 初めて修正 $Ca^{2+}$ トリガー説が確証され, 且つ安全で確実な治療薬の開発または探索が可能となるであろう.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Hattori T, Nakano K, Kawakami T. (2013) Phenytoin-induced elevation of the intracellular calcium concentration by stimulation of calcium-sensing receptors in gingival fibroblasts. *Pharmacol Pharmac.* 査読有り **4**: (in press).

(2) Hattori T, Ara T, Fujinami Y. (2012) Pharmacological evidence for the involvement of calcium entry through TRPV1 channels in nifedipine-induced  $[Ca^{2+}]_i$  elevation in gingival fibroblasts. *Pharmacol Pharmac* 査読有り **3**: 427-432. DOI: 104236/pp.2012.34057.

(3) Hattori T, Ara T, Fujinami Y. (2011) Pharmacological evidences for the stimulation of calcium-sensing receptors by nifedipine in gingival fibroblasts. *J Pharmacol Pharmacother* 査読有り **2**: 30-35. DOI: 10.4103/0976-500x.77111.

[学会発表] (計 6 件)

(1) 服部敏己、川上敏行. 歯肉線維芽細胞における TRPV1 チャンネルに対するフェニトインの作用. 第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 23 日, 福岡.

(2) 服部敏己、中野敬介、川上敏行. 歯肉線維芽細胞におけるフェニトインとカルシウム感受容体との関係. 第54回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会. 2012年9月16日, 郡山.

(3) Hattori T, Ara T and Fujinami Y. Pharmacological evidences for involvement of calcium entry through TRPV1 channels in nifedipine-induced gingival overgrowth. 7<sup>th</sup> Conference of the European Federation of Periodontology. 2012年6月6日, ウィーン(オーストリア).

(4) 服部敏己、荒 敏昭、藤波義明. 歯肉線維

芽細胞におけるフェニトインによる細胞内カルシウム濃度の上昇. 第 85 回日本薬理学会年会. 2012 年 3 月 14 日, 京都.

(5)服部 敏己、荒 敏昭. 歯肉線維芽細胞におけるニフェジピンとTRPV1チャンネルとの関係. 第53回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会. 2011年9月30日, 岐阜.

(6)服部 敏己、荒 敏昭、藤波 義明. 歯肉線維芽細胞における TRP チャンネルに対するニフェジピンの作用. 第 84 回日本薬理学会年会. 2011 年 3 月 23 日, 横浜.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

服部 敏己 (HATTORI TOSHIMI)

松本歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号:70064706

### (2)研究分担者

荒 敏昭 (ARA TOSHIAKI)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号:90387423

### (3)研究協力者

川上 敏行 (KAWAKAMI TOSHIYUKI)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

研究者番号:80104892

中野 敬介 (NAKANO KEISUKE)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授

授

研究者番号:10325095