

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463180

研究課題名(和文) TRPA1チャネル阻害剤を応用した薬物性歯肉増殖症の治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of the new molecular target therapy for phenytoin-induced gingival overgrowth using the antagonist of TRPA1 channel

研究代表者

中川 弘 (NAKAGAWA, Hiroshi)

徳島大学・大学病院・講師

研究者番号：70192218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：フェニトインによる歯肉増殖症の発症メカニズムを明らかにする目的として、その代謝産物(p-HPPH)がヒト正常歯肉線維芽細胞(HGF)に及ぼす影響について検討を行った。その結果、p-HPPHはHGFにおけるコラーゲン分解酵素(MMP-1)発現を抑制することが示唆された。

次にTRPA1チャネルの阻害剤(HC030031)がp-HPPHによるMMP-1発現の抑制を阻害するかどうかを検討した。その結果、MMP-1のmRNAの発現の抑制を阻害した。さらにTRPA1阻害物質(Menthol, Camphor, Eucalyptol)についても調査し、いずれの物質もHC030031と同様の作用があった。

研究成果の概要(英文)：For a purpose to determine a disease developing mechanism of gingival hyperplasia with the phenytoin, we examined the effect that metabolites (p-HPPH) of the phenytoin gave to human normal gingiva fibroblasts (HGF). As a result, p-HPPH was suggested to restrain the expression of collagen degrading enzyme (MMP-1) in HGF.

Then, we examined whether the inhibitor of the TRPA1 channel (HC030031) interfered restraint of the MMP-1 expression by p-HPPH to develop a therapeutic drug of gingival hyperplasia. As a result, the expression of mRNA of MMP-1 which decreased by administration of p-HPPH increased by the dosage of HC030031. As a result, we found that all materials have the effects similar to HC030031. Effect of Menthol was found to be the strongest in the three.

研究分野：障害者歯科

キーワード：歯肉増殖症 フェニトイン p-HPPH TRPA1 メンソール カンファ シネオール

1. 研究開始当初の背景

薬物による歯肉増殖のメカニズムに対する研究は数多く提唱されている。しかしながら、歯肉増殖の原因療法についての報告は稀であり、ほとんどされていない。その歯肉増殖のメカニズムを説明すると、最初に起こるのは、線維芽細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇である。次いで、そのカルシウムイオンが bFGF (線維芽細胞増殖因子) の遊離を促進し、その後、傍分泌・自己分泌により受容体チロシンキナーゼに結合し、チロシンキナーゼの活性化、Ras タンパクの活性化、MAP キナーゼの活性化を導き、コラーゲン生成の促進につながり歯肉増殖へと導かれる。また、MAP キナーゼの活性化は c-fos 遺伝子の転写促進となり、これが細胞増殖を引き起こし、歯肉増殖へとつながる。一方で、TRP チャンネルが全身の様々な部位に存在し、種々の機能を担っていることが分かっている。さらに最近の研究により、TRPA1 チャンネルが線維芽細胞に存在することが確認され、TRPA1 チャンネルが歯肉増殖に関わっている可能性が示唆された。そこで我々は TRPA1 の阻害剤が歯肉増殖の治療薬の候補となりえるのではないかと考え、本研究を考案したものである。

2. 研究の目的

(1)5-(p-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (p-HPPH) による歯肉増殖症発症機構の解明

抗てんかん薬であるフェニトイン (PHT) は、てんかんの大発作を抑制するのに優れた効果を持つが、副作用として歯肉増殖症を発症させることが臨床上的問題として挙げられる。PHT は肝臓において、その大部分が (p-HPPH) に代謝され、経時的に尿中に排泄される。p-HPPH による抗てんかんに関わる薬理作用は認められていないが、p-HPPH 血中濃度が高い

患者程、歯肉増殖症および多毛の副作用の発現率が高いとの報告がある。このことは歯肉増殖症に対する p-HPPH を分子標的としたアプローチを行うことによって、PHT による歯肉増殖症を抑制することが可能になると考えた。そこで、本研究は、p-HPPH による歯肉増殖症発症機構の解明を目指して行った。

(2) TRPA1 チャンネル阻害剤の歯肉増殖抑制作用についての研究

研究(1)の結果、フェニトインによる歯肉増殖症が発症する機構には、p-HPPH による HGF におけるコラーゲン分解酵素 (MMP-1) 発現の抑制が関与していることがわかった。また最近の研究により、TRPA1 チャンネルが線維芽細胞に存在することが確認され、TRPA1 チャンネルが歯肉増殖に関わっている可能性が示唆された。そこで研究2では TRPA1 チャンネルの阻害剤が p-HPPH による MMP-1 発現の抑制を阻害するかどうかを検討する目的で行った。

3. 研究の方法

(1)5-(p-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (p-HPPH) による歯肉増殖症発症機構の解明

【材料】実験には、ヒト正常歯肉線維芽細胞、HGF (ScienceCell Research Laboratories) を用いた。培地には、10%ウシ胎児血清・ペニシリン (100U/ml)・硫酸ストレプトマイシン (100 µg/ml) を含む、-MEM (-MEM-10%) を使用した。各群には、下記のように試薬を添加した。

実験群： -MEM-10% に、Dimethylsulfolate (DMSO) で希釈した p-HPPH (20 µg/ml) を添加

対照群： -MEM-10% に、実験群と等量の DMSO を添加

ヒト正常歯肉線維芽細胞(HGF)の増殖に及ぼす影響についての検討

HGF を 96Well のマイクロプレートに分注して培養した。培養を始める時点での細胞数は2000個/Wellとし、実験期間は3日とした。水溶性テトラゾリール(WST)-1による分析キットのマニュアルに従って、分析日にWST-1(10 μ l)を各Wellに添加し、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定し、有意差($p < 0.05$)を検定(t検定)した。分析は各群とも8Wellで行った。

HGFのコラーゲン産生能に及ぼす影響についての検討

各群の培地で2日間培養したHGFを採取し、Trisol(Invitrogen)を使用して、totalRNAを抽出した。各群から抽出したのRNAから、コラーゲンタイプ の mRNA の発現量を測定した。検出は TaKaRa SYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ)によるリアルタイム2 Step RT-PCR 反応により行った。各群の mRNA のレベルは、GAPDHを用いて標準化し、比較 Ct 法による定量を行い、コントロール群を基準(1.0)とした時の実験群の値を算出した後、有意差($p < 0.05$)を検定(t検定)した。測定は、3つのサンプルを作成し、各サンプル3回ずつ行った

培養上清液中のコラーゲン濃度に及ぼす影響についての検討

HGF を各群の培地で7日間培養後、培養液の交換日(2日目・5日目・7日目)に培養上清液を採取した。ヒトコラーゲンタイプ ELISA キット(ACEL)を使用して、マイクロプレートリーダーによる吸光度測定を行った。キット付属のコラーゲン標準液によって標準

曲線を作成し、各群の採取した培養上清液のコラーゲン濃度を求め、有意差($p < 0.05$)を検定(t検定)した。測定は、3つのサンプルを作成し、各サンプル2回ずつ行った。

HGFのコラーゲン分解能に及ぼす影響についての検討(MMP-1 mRNA について)

実験 と同様の方法で real-time RT-PCR 法を行い、MMP-1(コラーゲンタイプ 分解酵素)の mRNA の発現量を測定し、分析を行った。

HGFのコラーゲン分解能に及ぼす影響についての検討(TIMP-1 mRNA について)

実験 と同様の方法で real-time RT-PCR 法を行い、TIMP-1(コラーゲンタイプ 分解酵素の阻害物質)の mRNA の発現量を測定し、分析を行った。

(2) TRPA1 チャネル阻害剤の歯肉増殖抑制作用についての研究

【材料】実験には、ヒト正常歯肉線維芽細胞、HGF(ScienceCell Reseach Laboratories)を用いた。

培地には、10%ウシ胎児血清・ペニシリン(100U/ml)・硫酸ストレプトマイシン(100 μ g/ml)を含む、DMEM(DMEM-10%)を使用した。

各群には、下記のように試薬を添加した。

p-HPPH 群:DMEM-10%にDMSOで希釈したp-HPPH(20 μ g/ml)を添加

p-HPPH + TRPA1 阻害剤 群:DMEM-10%にDMSOで希釈したp-HPPH(20 μ g/ml)とDMSOで希釈したTRPA1阻害剤を添加

TRPA1 阻害剤 群:DMEM-10%にDMSOで希釈したTRPA1阻害剤を添加

対照群:DMEM-10%に、他群と等量のDMSOを添

加

TRPA1 阻害剤(HC030031 : 120 μ M) の MMP-1 の mRNA 発現に及ぼす影響についての検討

各群の培地で1日間培養した HGF を採取し、TrIsol (Invitrogen) を使用して、totalRNA を抽出した。各群から抽出した RNA から、MMP-1 の mRNA の発現量を測定した。検出は TaKaRa SYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ) によるリアルタイム 2 Step RT-PCR 反応により行った。各群の mRNA のレベルは、GAPDH を用いて標準化し、比較 Ct 法による定量を行い、コントロール群を基準(1.0)とした時の実験群の値を算出した後、対照群に対する有意差 ($p < 0.05$) を検定 (t 検定) した。

植物由来の TRPA1 阻害物質 (Menthol, Camphor, Eucalyptol : 100 μ M) の MMP-1 の mRNA 発現に及ぼす影響についての検討

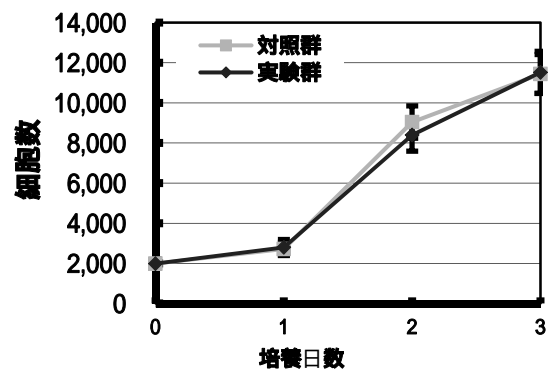
実験の HC030031 の代わりに、Menthol, Camphor, Eucalyptol を用いて、実験 1 と同様の方法で MMP-1 の mRNA の発現量を測定した。各群の mRNA のレベルは、GAPDH を用いて標準化し、比較 Ct 法による定量を行い、コントロール群を基準(1.0)とした時の実験群の値を算出した後、対照群に対する有意差 ($p < 0.05$) を検定 (t 検定) した。

4. 研究成果

(1) 5-(p-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (p-HPPH) による歯肉増殖症発症機構の解明

ヒト正常歯肉線維芽細胞(HGF)の増殖に及ぼす影響についての検討

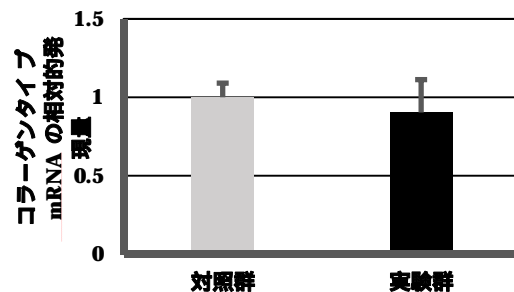
p-HPPH の投与による HGF 細胞数の増加はみられなかった (図 1)。



(図 1)

HGF のコラーゲン産生能に及ぼす影響についての検討

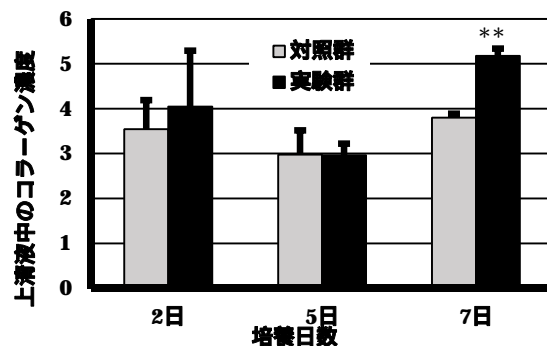
コラーゲンタイプ の mRNA の発現量の変化はみられなかった (図 2)。



(図 2)

培養上清液中のコラーゲン濃度に及ぼす影響についての検討

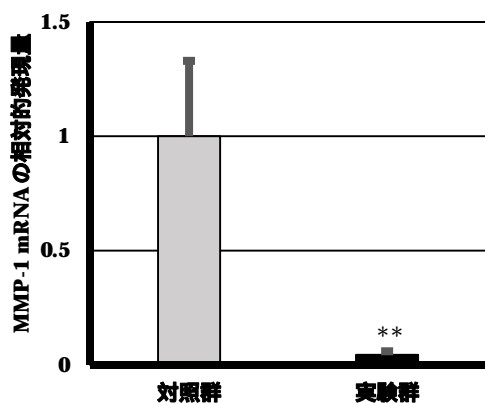
対照群と実験群の間に、2日目、5日目の上清液中のコラーゲン濃度の差は認められなかったが、7日目の上清液中のコラーゲン濃度は実験群の方が有意に高かった (図 3, **: $p < 0.01$)。



(図 3)

HGFのコラーゲン分解能に及ぼす影響についての検討 (MMP-1 mRNA について)

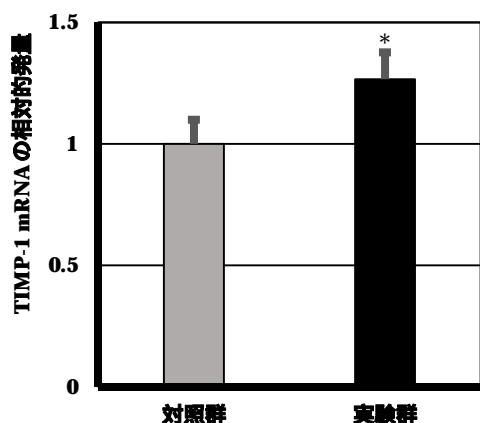
コラーゲン分解酵素の mRNA の発現量は p-HPPH の投与によって減少した (図 4, **: $p < 0.01$)



(図 4)

HGFのコラーゲン分解能に及ぼす影響についての検討 (TIMP-1 mRNA について)

コラーゲン分解酵素阻害物質の mRNA の発現量は p-HPPH の投与によって増加した (図 5, *: $p < 0.05$)



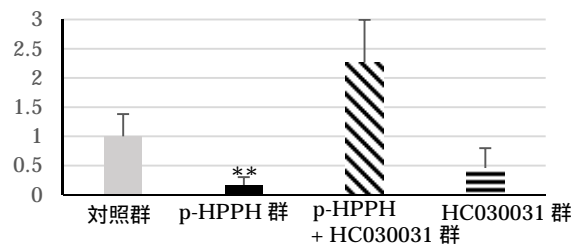
(図 5)

(2) TRPA1 チャンネル阻害剤の歯肉増殖抑制作用についての研究

TRPA1 阻害剤(HC030031 : 120 μ M) の MMP-1

の mRNA 発現に及ぼす影響についての検討

p-HPPH の投与によって減少した MMP-1 の mRNA の発現量は (図 6, **: $p < 0.01$), HC030031 の投与により, 増加した.

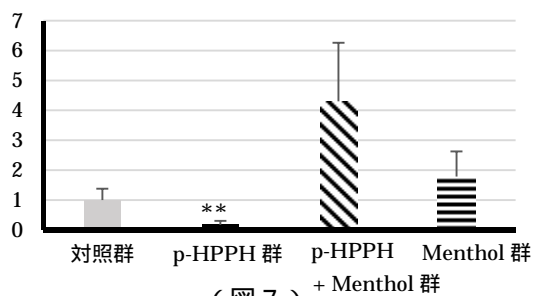


(図 6)

植物由来の TRPA1 阻害物質 (Menthol, Camphor, Eucalyptol : 100 μ M) の MMP-1 の mRNA 発現に及ぼす影響についての検討

【Menthol】

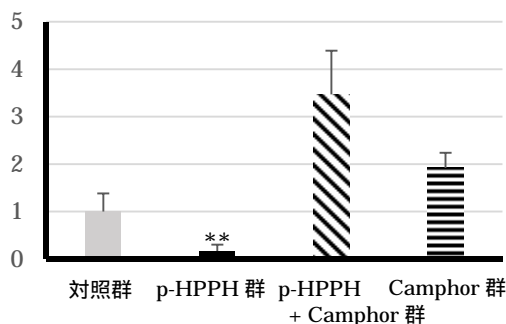
p-HPPH の投与によって減少した MMP-1 の mRNA の発現量は (図 7, **: $p < 0.01$), Menthol の投与により, 増加した.



(図 7)

【Camphor】

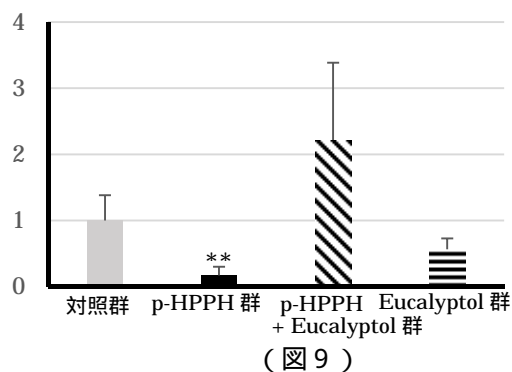
p-HPPH の投与によって減少した MMP-1 の mRNA の発現量は (図 8, **: $p < 0.01$), Camphor の投与により, 増加した.



(図 8)

【Eucalyptol】

p-HPPH の投与によって減少した MMP-1 の mRNA の発現量は (図 9 , ** : $p < 0.01$) , Eucalyptol の投与により , 増加した .



5 . 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

p-HPPH を分子標的としたフェニトインによる歯肉増殖症に対する新規治療法の開発
第 31 回日本障害者歯科学会 (優秀論文賞)

中川 弘 , H26 年 11 月 16 日 ,

仙台国際センター (宮城県仙台市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中川 弘 (NAKAGAWA , Hiroshi)

徳島大学・病院・講師

研究者番号 : 7 0 1 9 2 2 1 8

(2) 研究分担者

松本 文博 (MATSUMOTO , Fumihiro)

徳島大学・病院・講師

研究者番号 : 7 0 2 2 9 5 6 6

北村 尚正 (KITAMURA , Takamasa)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号 : 5 0 6 1 4 0 2 0

山本 愛美 (YAMAMOTO , Aimi)

徳島大学・病院・医員

研究者番号 : 1 0 6 3 0 1 7 1

上田 公子 (UEDA , Kimiko)

徳島大学・病院・助教

研究者番号 : 4 0 3 3 5 8 0 7