

令和元年6月7日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11805

研究課題名(和文)p-HPPHを分子標的とした新規創傷治癒促進薬の開発

研究課題名(英文)Development of the new molecular target therapy for wound healing of oral mucosa

研究代表者

中川 弘 (NAKAGAWA, Hiroshi)

徳島大学・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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：抗てんかん薬であるphenytoin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。近年、その副作用を利用して皮膚の創傷の治癒促進にPHTを用いようとする試みがあるが、その強い薬理作用のため生体に応用できていない。そこで、副作用のないPHTの代謝産物である5-(p-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (p-HPPH) を創傷治癒促進に応用できないかと考え、本研究を行った。その結果、p-HPPHはヒト歯肉線維芽細胞における細胞遊走の促進作用と皮膚3次元モデルにおける創傷治癒促進作用があることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科領域において、様々な原因で口腔粘膜の創傷が発生する。抜歯後の抜歯窩、義歯による褥瘡性潰瘍、浸潤麻醉後の咬傷、潰瘍性口内炎、外傷による創傷などがある。これら口腔内の創傷を治癒し口腔粘膜を元の状態に戻すことで、口腔に痛みを感じることなく「食べる」ことができる。

現在、皮膚や粘膜の傷の治療には、創傷被覆材などが使用されているが、根本的な治療はない。本研究によってp-HPPHの創傷治癒促進のメカニズムが明らかになった場合には、皮膚や口腔粘膜の創傷の治癒を促進させる薬剤の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Phenytoin (PHT) is anticonvulsant which has an excellent effect to restrain grand mal of epilepsy, however, causes gingival hyperplasia as a side effect. Recently, trial of therapy is attempt to use of PHT for healing of wound promotion of the skin. But it is not used in clinical pathology because of the strong pharmacological action. 5-(p-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (p-HPPH) is metabolites of PHT has not the side effect. Therefore we conducted this study thought that p-HPPH may be applied to promotion of wound healing. Results indicated that p-HPPH provided the promotion effects of the migration in human gingival fibers blast cells and the promotion of wound healing in a full thickness in vitro human skin model.

研究分野：障害者歯科

キーワード：歯学 創傷治癒 p-HPPH フェニトイン 細胞遊走 皮膚3次元モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトにおいては、組織が損傷した時の反応は再生でなく治癒の形態をとる。肉芽組織が欠損部を埋めて治癒させるのであるが、同じ結合組織でありながら周辺の正常真皮結合組織とは異なる。真皮の細胞も表皮基底細胞も分裂増殖できるが、損傷前と全く同じ組織を再生しない。結合組織の線維成分であるコラーゲンの型や線維配列も違うし、また硬質成分であるプロテオグリカンの種類も違う。このような治癒を修復と呼び、修復後の結合組織を瘢痕という。創傷治癒には以下に示す3つのプロセスがある(図 参照)。

炎症反応期

皮膚が損傷を受けると血液中の血小板が活性化し、活性化した血小板からの凝固因子の働きで止血される。血小板からは凝固因子以外にも色々な化学物質が放出される。これらの化学物質が周囲の組織に、異変が起こったというシグナルを送る。このシグナルに刺激されて血管内皮細胞にすき間が生じ、リンパ球、多核白血球、単核球が浸出液として傷口へと遊走する。これらのうち、一番重要なのは単核球である。単核球は破壊物を取り込む貪食作用によってマクロファージ(=貪食細胞)となり、これがさらに化学物質を放出して、次のシグナルの発生源になる。

増殖期(肉芽形成期)

マクロファージの活動で放出された物質が刺激となり、線維芽細胞が呼び寄せられ、修復の主な材料である膠原繊維(コラーゲン)が生み出される。また血管内皮細胞に対して血管を新生する指令もマクロファージから放出される。線維芽細胞の産生したコラーゲンに支えられて毛細血管が発達し、そこへ流れ込む新鮮な血液が線維芽細胞に栄養や酸素を供給し、更にコラーゲンの産出をうながすという自己増殖のサイクルが構成され欠損部を肉芽組織が埋めていく。肉芽組織は、コラーゲン間の架橋などで結合補強しあい最終的に真皮に近い丈夫な瘢痕組織になる。

安定期

やがて線維芽細胞の活性が落ちてコラーゲンの生成が減少しコラーゲンの生成量と分解吸収量が同じになる。見た目には安定して変化がないが、実際は生成と分解がバランスよく行われている状態である。

2. 研究の目的

抗てんかん薬である phenytoin (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なる。近年、その副作用を利用して皮膚の創傷の治癒促進に PHT を用いようとする試みがある(Baharvand, 2014) が、強い薬理作用がある PHT を生体に応用するには抵抗感があるのも事実である。我々は PHT の副作用である歯肉増殖を抑制および治療する薬剤の開発を目的に研究を進めてきた。その結果、PHT の代謝産物である 5-(p- hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (p-HPPH) が歯肉増殖の副作用に大きく関与していることが明らかとなってきた。p-HPPH には抗てんかんの薬理作用はない。そこで本研究は、PHT の代わりにその代謝産物である p-HPPH を創傷治癒促進剤として応用するという着想のもと、p-HPPH による創傷治癒促進メカニズムを解明し、新しい創傷治癒促進薬の開発を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験 I

細胞はヒト歯肉線維芽細胞、HGF(Science Cell Research Laboratories)を使用し、培地は 10% 濃度の FBS および 1% ペニシリン・ストレプトマイシンを含有する DMEM/F12(gibco)を用い、37、5%CO₂ 条件下にて培養を行った。

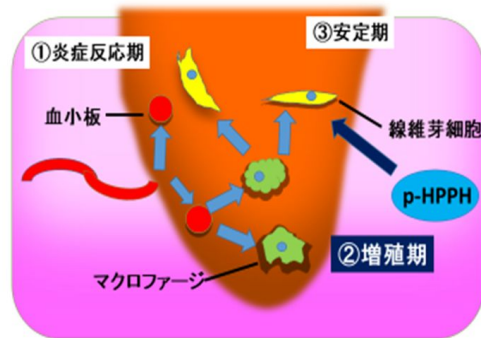
細胞増殖試験：DMSO に溶解した p-HPPH を、10 μ g/ml、15 μ g/ml、20 μ g/ml の濃度に調整した 5% または 10% FBS 含有培地にて HGF を培養した。コントロール群には、実験群と等量の DMSO を加えた培地を用いた。細胞数は、0 日、1 日後、2 日後に Cell counting kit を用いて、マイクロプレートリーダーにて吸光度を測定して求めた。

細胞遊走試験：コントロール(DMSO)、10 μ g/ml、15 μ g/ml、20 μ g/ml の p-HPPH 濃度に調整した 5% FBS 含有培地にて HGF を培養し、Culture-insert(ibidi)を使用した Migration assay にて細胞遊走を検討した。

MAP キナーゼシグナルの検討:濃度 15 μ g/ml の p-HPPH を含有した serum free の培地にて、0 分、5 分、15 分、30 分、60 分間 HGF を刺激後、タンパク質を回収し、Western blotting 法にて、ERK1/2、JNK のリン酸化について検討した。

(2) 実験 II

ヒト皮膚から採取した線維芽細胞と角化細胞から成る、ヒト皮膚 3 次元モデル (EFT-400 ;

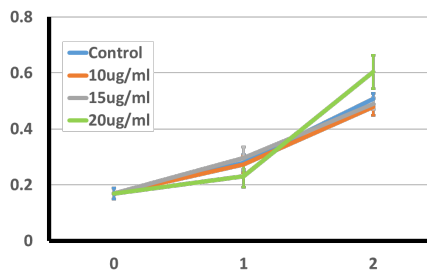


MatTek 社製)の組織中央にトレパンにて3mmの穴を開け、ピンセットで表皮のみを剥離したモデルを使用し、DMSOに溶解したp-HPPHを、30 μ g/mlの濃度に調整したEFT-400維持培地で培養した。コントロール群には、実験群と等量のDMSOを加えた培地を用いた。培養開始後8日目までEFT-400を撮影し、撮影した画像を画像解析ソフト(ImageJ)を用いて処理し、組織中央の穴の面積を測定した。

4. 研究成果

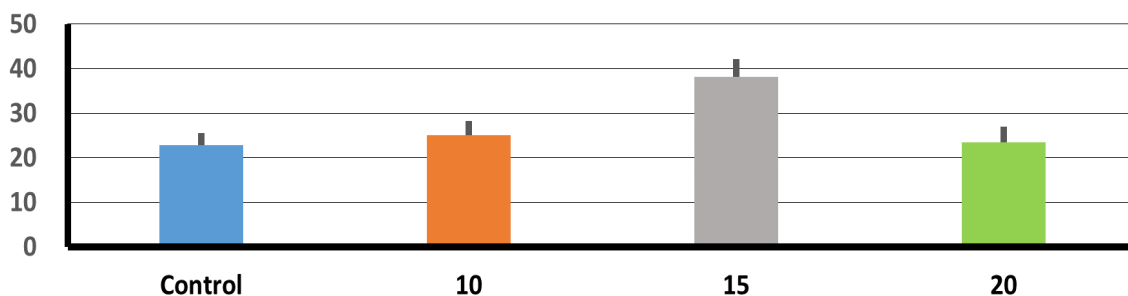
(1) 実験 I-

p-HPPHによるHGFの増殖への影響を検討する目的で、10 μ g/ml、15 μ g/ml、20 μ g/mlの濃度に調整した5%または10%FBS含有培地にてHGFを培養し、コントロールと比較したが有意な差は認められなかった。このことから、p-HPPHはHGFの増殖に影響を及ぼさないことが分かった。



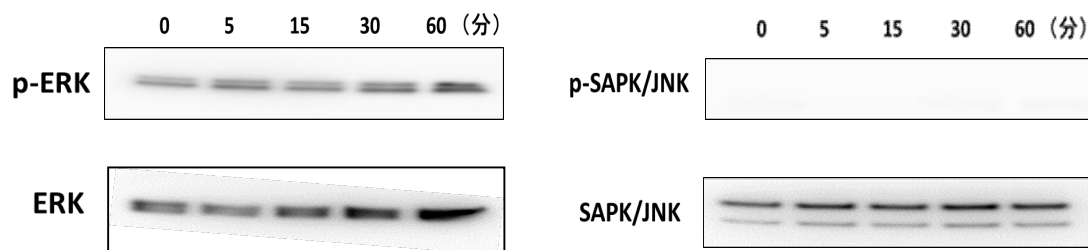
(2) 実験 I-

Migration assayにて細胞遊走を検討したところ、濃度15 μ g/mlのp-HPPHはコントロールと比較して有意($p < 0.01$)に細胞遊走の促進がみられた。



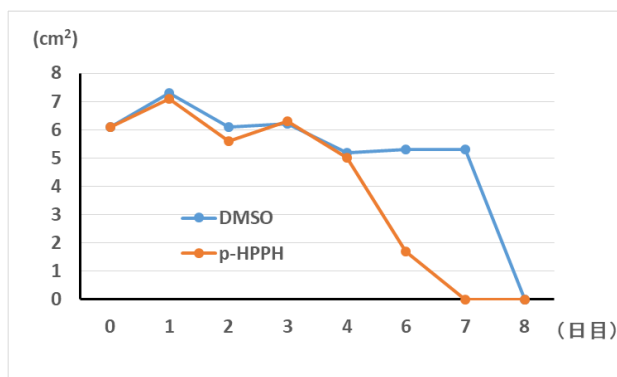
(3) 実験 I-

創傷治癒過程における細胞の遊走には、Rhoファミリーの低分子量Gタンパク質が関与していることが明らかになっている。そこで、その細胞内シグナルの下流に当たるERKとJNKのリン酸化についてWestern blotting法で検討した。その結果、ERKのリン酸化が関与している可能性があることが分かった。



(4) 実験 II

EGF-400は、表皮角化細胞と線維芽細胞から構成される表皮層と真皮層を有する皮膚モデルであり、このモデルを用いることにより、動物実験レベルと同等の創傷治癒効果を検討することができる。その結果、コントロール群に比べp-HPPH投与群の方が治癒の促進が見られることが分かった。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

Hiroshi Nakagawa: Current Status of Dental Care for Patients with Disabilities in Tokushima Prefecture and Future Perspective, Journal of Oral Health and Bioscience, 査読有, 30(1), 40-44, 2017.

[学会発表](計 1件)

中川 弘：p-HPPH を分子標的とした新規口腔粘膜創傷治癒促進剤の開発 - 歯肉線維芽細胞におけるp-HPPHによる細胞遊走の促進作用について - 第34回日本障害者歯科学会 2017年

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：上田 公子

ローマ字氏名：(UEDA, Kimiko)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：40335807

研究分担者氏名：北村 尚正

ローマ字氏名：(KITAMURA, Takamasa)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部(歯学域)

職名：助教

研究者番号(8桁)：50614020

研究分担者氏名：岩本 勉

ローマ字氏名：(IWAMOTO, Tutomu)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部(歯学域)

職名：教授

研究者番号(8桁)：90346916

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、研究者個人に帰属されます。