

令和元年6月20日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11830

研究課題名(和文) NR4A1を標的とした薬物性歯肉増殖症の新しい治療法開発のための基礎研究

研究課題名(英文) Research to develop new therapy targeting NR4A1 for drug-induced gingival overgrowth

研究代表者

松田 真司 (Matsuda, Shinji)

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：薬物性歯肉増殖症はシクロスポリン、ニフェジピン、フェニトインの副作用で、歯肉の肥厚を特徴とする。現在の治療法は薬剤の変更であるが、変薬が困難な場合も多く、治療が難しいケースも多く見られる。変薬の必要ない新規治療法の開発が求められている。新規治療法開発のためにはメカニズムの解明が不可欠である。これまでに、当研究室でシクロスポリン誘導性の歯肉増殖症マウスモデルの開発に成功している。本モデルを使用し、線維化に関与しているNR4A1の関与について解析したところ、NR4A1の機能抑制が確認された。またその機能抑制はシクロスポリンの標的分子であるNFATc1が関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、薬物性歯肉増殖症の新規治療法開発につながる重要な知見と考える。これまで多くの研究がなされてきたが、いずれもその表現型を表すことが多く、治療に直接つながる結果とはなりにくかった。本研究では薬物性歯肉増殖症の新規標的分子としてNR4A1を同定することに成功した。これまで課題であった、薬剤の変更なしに、薬物性歯肉増殖症を治療させる治療法の開発につながり将来性のある研究結果となった。

研究成果の概要(英文)：Drug-induced gingival overgrowth is side effect of Cyclosporine (CsA), Nifedipine and Phenytoin. The main treatment of this is alternation of the drug, whereas there is many case that it is difficult to change the drugs. It is needed to develop new treatment institute to alternation of drugs. We previously developed CsA-induced gingival overgrowth mice model. In this study, We checked the role of NR4A1 which associates with fibrosis in this mice model. We found that suppression of NR4A1 mRNA expression in CsA-induced gingival overgrowth mice model, and it was suppressed through NFATc3 in gingival fibroblasts.

研究分野：歯周治療

キーワード：薬物性歯肉増殖症 メカニズム NR4A1

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

### 1. 研究開始当初の背景

近年、日本は超高齢社会に突入し、さらに高齢化は進行している。歯科医療の現場においても、高齢者の患者数は増加していると考えられ、全身疾患を併発している患者、またそれに対して複数の薬剤を服用している患者も増加している。また医療の発展に伴い、若年者も同様に複数の薬剤を服用しているケースも少なくない。薬物性歯肉増殖症は抗てんかん薬フェニトイン、カルシウム拮抗薬、免疫抑制薬シクロスポリンを服用している幅広い年齢層で発症し、口腔衛生管理を困難にすることで蝕や歯周炎を悪化させる。高齢化や医療の高度化に伴い、上記薬剤を服用している患者は増加している。現在行われている歯肉増殖症の治療は歯肉切除や薬剤変更といった対症療法に留まっており、薬剤の変更が困難な場合や切除後も薬剤を服用している場合は再発するケースも少なくない。さらに、免疫抑制剤を服用している患者にとって薬剤の変更や中止は拒絶を起こす可能性があり、困難な場合が多く、また歯肉切除といった外科処置も制限される場合が多い。現在、歯肉増殖症治療薬の開発が期待されているが、その発症メカニズムはいまだ不明であり問題となっている。申請者は本研究に先立ちカルシニューリン阻害剤(シクロスポリン A (CsA)、FK506)誘導のマウス歯肉増殖症モデルの作製に成功した(Okanobu A., Matsuda S. et al, 2017)。一方、核内受容体 NR4A1 (Orphan nuclear receptor 4A1) が全身性強皮症、腎臓・肝臓・肺の線維化に関与しているという報告がなされた(Nature Med. 2015)。結合組織の肥厚とコラーゲンの蓄積を特徴とする各種線維症は歯肉増殖症の特徴と一致しており、同様のメカニズムにより発症していると予想される。そのメカニズムは創傷治癒過程で発現が上昇する transforming growth factor (TGF)- $\beta$  の負の制御として働く NR4A1 の機能障害が TGF シグナルを抑制できず線維化が進行する。シクロスポリン誘導性歯肉増殖症マウスモデルを使用すれば NR4A1 と歯肉増殖症の関与の解明、またそれを標的とした治療法の開発が可能となると考える。以上の点が本研究を遂行することに至った学術的背景である。

### 2. 研究の目的

薬剤の変更や歯肉切除の必要のない新規治療法・治療薬の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

- i. 絹糸結紮歯周炎マウスモデルにおける TGF- $\beta$  及び NR4A1 の発現解析  
絹糸結紮歯周炎マウス(結紮一週間後)の歯肉組織中における、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$  の標的分子 PAI-1 及び NR4A1 の発現を real-time PCR で解析した。
- ii. CsA 誘導歯肉増殖症マウスモデルにおける NR4A1 の発現解析  
CsA 投与 1 週間後(歯肉増殖症発症過程)及び 4 週後(発症完遂後)の歯肉組織中での Col-1、PAI-1 及び NR4A1 の mRNA の発現を real-time PCR で解析した。また NR4A1 の局在、発現について傾向免疫染色を用いて評価した。
- iii. NR4A1 のアゴニスト CytosporonB の投与による歯肉増殖症の程度の評価  
歯肉増殖症マウスに NR4A1 のアゴニストを投与、増殖症の発症を抑制できるか評価した。
- iv. NR4A1 のノックアウトマウスの歯肉肥厚の程度を評価  
NR4A1-/-マウスに絹糸結紮のみ行い、歯肉肥厚の程度を評価した。
- v. 歯肉線維芽細胞を用いた CsA による NR4A1 発現抑制のメカニズム評価  
歯肉線維芽細胞(HGF)に TGF- $\beta$  を CsA 存在下または非存在下で投与、NR4A1 及び col-1 の mRNA の発現を real-time PCR で評価した。また、CsA の元来の標的が T 細胞の NFAT であることから、NFAT の siRNA 導入により NR4A1 の発現が抑制できるか検討した。さらに CsA の投与により NFAT の局在、発現について western blotting を用いて評価した。

### 4. 研究成果

- i. 絹糸結紮歯周炎マウスモデルにおける TGF- $\beta$  及び NR4A1 の発現解析  
絹糸結紮により歯肉組織中の TGF- $\beta$ 、PAI-1 及び NR4A1 の mRNA 発現は非結紮群と比較して上昇していた。(図 1)
- ii. CsA 誘導歯肉増殖症マウスモデルにおける NR4A1 の発現解析  
CsA 誘導歯肉増殖症マウス 1 週間投与後の歯肉組織中の NR4A1 の発現は絹糸結紮のみの群と比較し有意に低かった。さらに、4 週間投与後には、絹糸結紮のみの群も NR4A1 の発現は減少していた。しかし、CsA 投与 4 週群では、Col-1 の発現の上昇を維持していた。(図 2)

- iii. NR4A1 のアゴニスト CytosporonB の投与による歯肉増殖症の程度の評価  
CytosporonB の投与で歯肉組織中の NR4A1 の発現を上昇させることを確認した。  
CytosporonB の前投与により、歯肉増殖症の発症は抑えられた。(図3)
- iv. NR4A1 のノックアウトマウスの歯肉肥厚の程度を評価  
NR4A1<sup>-/-</sup> に絹糸結紮を行うことで、薬剤非投与で歯肉増殖を発症させた。(図4)
- v. 歯肉線維芽細胞を用いた CsA による NR4A1 発現抑制のメカニズム評価  
HGF に TGF-β を投与することで NR4A1 の発現を上昇させることを確認した。さらに、  
CsA を前投与することで、その発現は有意に抑制された。コラーゲンの発現は CsA の  
前投与で TGF-β 単独投与群と比較して有意に上昇させた。NFATc3 の siRNA の導入で  
NR4A1 の発現を抑制した。さらに CsA の投与により、TGF-β 刺激による NFATc3 の核内  
移行を抑制することを確認した。(図5)

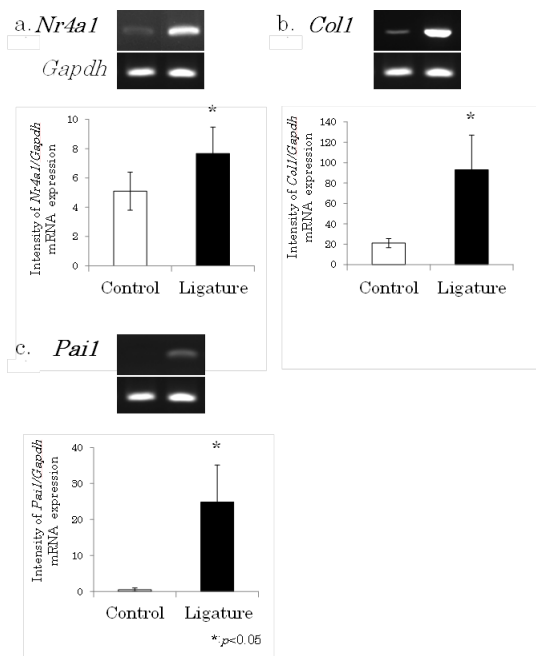


図 1

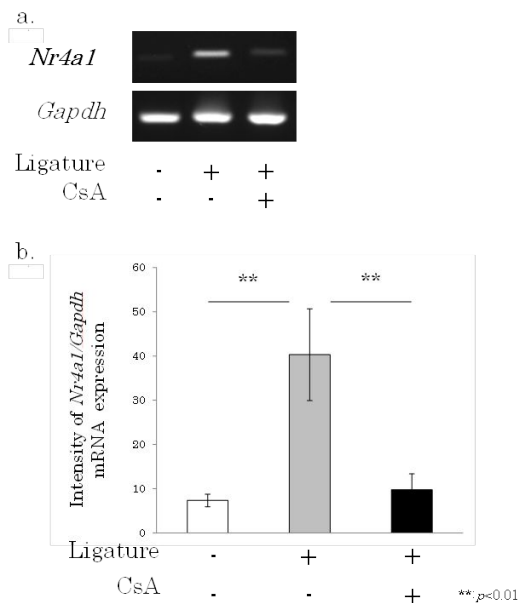


図 2

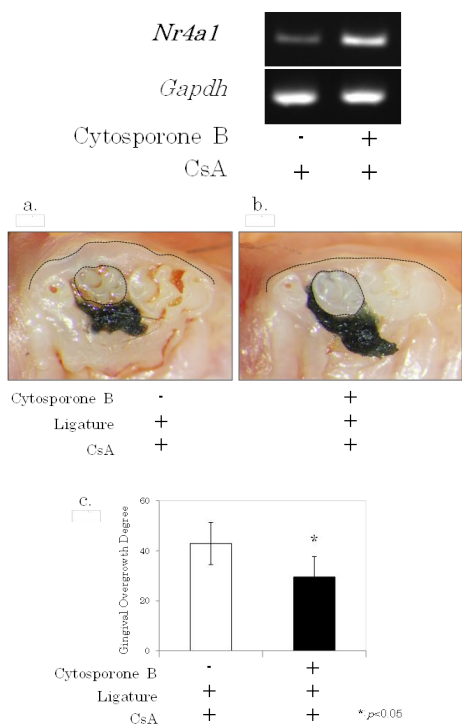


図 3

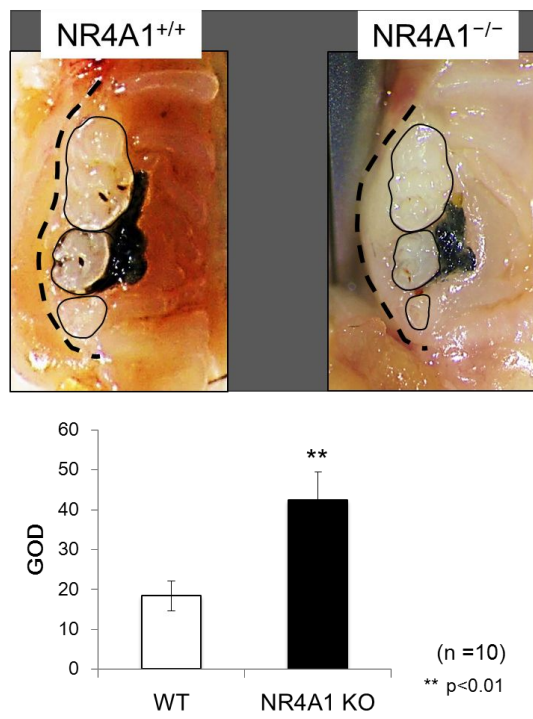


図 4

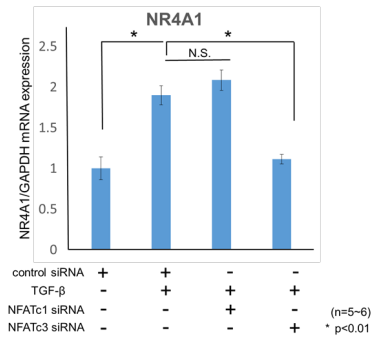
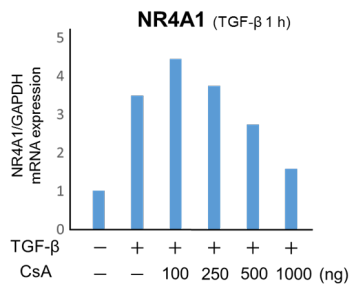


図 5

## 5. 主な発表論文等

[国際学術誌](計 2 件)

1. Matsuda S, Okanobu A, Hatano S, Kajiya M, Sasaki S, Hamamoto Y, Iwata T, Ouhara K, Takeda K, Mizuno N, Fujita T, Kurihara H. Relationship between periodontal inflammation and calcium channel blockers induced gingival overgrowth—a cross-sectional study in a Japanese population. Clin Oral Investig. 2019 Feb 15. 査読有
2. Okanobu A, Matsuda S, Kajiya M, Fujita T, Kittaka M, Shiba H, Kurihara H. A novel gingival overgrowth mouse model induced by the combination of CsA and ligature-induced inflammation. J Immunol Methods. 2017 Jun;445:31-36. 査読有

[学会発表](計 4 件)

1. 松田 真司、岡信愛、加治屋幹人、藤田 剛、栗原英見、NR4A1 を標的とした薬物性歯肉増殖症の新規治療法の開発、第 32 回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い、2016 年 09 月 03 日、東京
2. 岡信 愛、松田真司、加治屋幹人、藤田 剛、栗原英見、Elucidation of the role of NR4A1 in drug induced gingival overgrowth、第 49 回広島大学歯学会総会、2016 年 7 月 2 日
3. 岡信 愛、松田真司、加治屋幹人、藤田 剛、栗原英見、NR4A1 に着目した薬物性歯肉増殖症のメカニズム解明の研究、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年 08 月 24 日
4. 岡信 愛、松田真司、加治屋幹人、藤田 剛、栗原英見、NR4A1 に着目した薬物性歯肉増殖症のメカニズム解明の研究、第 59 回秋季歯周病学会学術大会、2016 年 10 月 06 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：加治屋 幹人

ローマ字氏名：Mikihito Kajiya

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科(歯)

職名：助教

研究者番号(8桁): 00633041

研究分担者氏名：藤田 剛

ローマ字氏名：Fujita Tsuyoshi

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科（歯）

職名： 准教授

研究者番号（8桁）：80379883

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。