

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：30110

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21048

研究課題名(和文) 歯肉線維芽細胞のCa<sup>2+</sup>シグナルと薬物性歯肉増殖症関連遺伝子の発現制御機構の解明研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of Ca<sup>2+</sup> signaling and expression of drug-induced gingival enlargement-related genes in gingival fibroblasts

研究代表者

蓑輪 映里佳(MINOWA, Erika)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：40751160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗てんかん薬フェニトインによる歯肉増殖症は、服用者の約50%に発症するが、その詳細は明らかではない。

網羅的遺伝子解析によってPHTによるHGFの遺伝子発現の変化を比較した結果、複数のコラーゲンの発現上昇とコラーゲン分解に關与する酵素の発現低下がみられた。また、細胞増殖に關与する複数の遺伝子の発現は減少した。PHTによる歯肉増殖症は歯肉線維芽細胞の増殖によるものではなく、コラーゲンの生合成のバランスが崩れることで発症する可能性が示唆された。さらに、炎症性サイトカインやプロスタグランジンの発現が上昇した結果から、PHTによる歯肉増殖が口腔内の炎症と関連し、病態の増悪に繋がることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去の研究では、薬物性歯肉増殖症の臨床的所見に基づいて細胞増殖やコラーゲン代謝に關わる遺伝子が解析の対象であった。本研究では、次世代シーケンサーによる解析によって新しい関連遺伝子が明らかになった。これは薬物性歯肉増殖の発症や増悪のメカニズム解明のために新たな展望が期待できる。

今までの報告はフェニトイン単独の作用と歯肉増殖の発症を調査しているのに対し、歯肉増殖発症にはフェニトインと炎症性生理活性物質との相互作用が關与するという新たな発想に基づいているのが本研究の特徴である。口腔内の炎症と薬物性歯肉増殖のメカニズムを解明することで薬物性歯肉増殖症増悪の予防に繋がることを考えている。

研究成果の概要(英文)：Drug-induced gingival enlargement caused by the anticonvulsant drug phenytoin occurs in about 50% of patients taking phenytoin, but the details are unclear.

Comprehensive genetic analysis of HGF gene expression changes induced by PHT revealed an increase in the expression of several collagens and a decrease in the expression of enzymes involved in collagen degradation. In addition, the expression of several genes involved in cell proliferation was decreased. These results suggest that PHT-induced gingival enlargement may not be caused by gingival fibroblast proliferation but by an imbalance in collagen biosynthesis. Furthermore, the results of elevated expression of inflammatory cytokines and prostaglandins suggest that PHT-induced gingival enlargement is associated with oral inflammation, leading to exacerbation of the condition.

研究分野：小児歯科学分野

キーワード：Ca<sup>2+</sup>イメージング ライブセルイメージング 薬物性歯肉増殖症 炎症 フェニトイン

## 1. 研究開始当初の背景

抗てんかん薬フェニトイン (PHT) による薬物性歯肉増殖症 (Drug-induced gingival enlargement : DIGE) は、服用者の約 50% に発症するが、その詳細は明らかではない。申請者はこれまでに、PHT がヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) において細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 上昇を引き起こすという点に着目し、 $Ca^{2+}$  蛍光指示薬 Fura-2 を使ったライブセルイメージング解析によって、PHT が HGF の主要な  $Ca^{2+}$  排出機構である  $Na^+/Ca^{2+}$  交換体を抑制し、ATP やヒスタミンによる  $Ca^{2+}$  シグナルを増強することを明らかにした。この PHT による  $Ca^{2+}$  応答の増強作用は、低濃度の刺激による  $Ca^{2+}$  応答に対してより顕著であることから、PHT が軽度の炎症によって生じる生理活性物質による  $Ca^{2+}$  応答を増強することによって、HGF の増殖や DIGE 関連遺伝子の発現に影響する可能性が示唆された。今までの報告の多くは PHT 単独の作用と DIGE の発症を調査しているのに対して、PHT が ATP やヒスタミンによる  $Ca^{2+}$  シグナルを増強するという結果から、DIGE 発症には PHT と炎症性生理活性物質との相互作用が関与するという新たな発想に基づいているのが本研究の特徴である。

また DIGE 関連遺伝子として MMPs や TIMPs が報告されている。これらは DIGE においてコラーゲンなどの結合組織が増加するとの臨床所見に基づいて得られた知見である。本研究で計画している NGS による網羅的遺伝子発現解析では、これらとは全く異なる DIGE 関連遺伝子が同定され、DIGE の新しい発症・増悪の機序が明らかになる可能性が期待される。 $Ca^{2+}$  はセカンドメッセンジャーとして細胞の増殖、分化、遺伝子発現などの調節に関与することが知られており、本研究で計画している HGF における  $Ca^{2+}$  シグナルに対する PHT の作用と DIGE 関連遺伝子を解析によって、DIGE 発症機序の解明は新たな治療・予防法の開発に繋がると期待される。

## 2. 研究の目的

PHT の副作用である歯肉増殖症の発症要因は未だ不明な点が多く、新しい視点からのアプローチが必要である。そこで本研究では、その他の炎症性オタコイドや細胞増殖や分化に関連する増殖因子による  $Ca^{2+}$  応答と、それらに対する PHT の作用を明らかにすることを目的とする。また、それらの  $Ca^{2+}$  シグナルと歯肉増殖症に関わる遺伝子発現の関係を明らかにし、薬物性歯肉増殖症の発症メカニズムを解明する。

本研究では、PHT の  $Ca^{2+}$  排出の抑制による  $Ca^{2+}$  シグナルの増強作用という新しい知見に基づいて、炎症性サイトカインや成長因子と PHT の相互作用による  $Ca^{2+}$  応答と遺伝子発現を解析する。 $Ca^{2+}$  排出の抑制は、様々な刺激による  $Ca^{2+}$  応答を増強するため、単独では  $Ca^{2+}$  応答を起こさない弱い刺激に対して強い増強作用を示すことになる。よって、これまで見逃されてきた低濃度のサイトカインや成長因子による  $Ca^{2+}$  シグナルを増強する可能性がある。また、従来の研究は、HGF の増殖や線維化など DIGE の臨床的所見に基づいて、細胞増殖やコラーゲン代謝に関わる遺伝子が解析の対象になってきた。NGS を使った解析によって、新しい DIGE 関連遺伝子を同定することで、DIGE の発症や増悪のメカニズムに関する新しい知見が期待できる。

## 3. 研究の方法

ATP やヒスタミンを使ったこれまでの研究を進展させ、次世代シーケンサー (NGS) を使った網羅的遺伝子発現解析を用いて、ヒスタミンやカルシウムシグナル関連遺伝子と PHT の単独および相互作用によって変化する遺伝子を明らかにし、新しい DIGE 関連遺伝子を同定する。また、これらの遺伝子発現を指標にして、調節機構を明らかにする。これらの結果から、DIGE の発症・増悪の仕組みや薬物作用の共通点および相違点を明らかにし、将来的な治療法および予防法を検討する。

具体的には、HGF を培養した後 PHT およびヒスタミン、カルシウム阻害剤等を添加、刺激後 24 時間経過した HGF およびコントロールの RNA を抽出、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析を行なった。解析の結果を参考に、RT-PCR および定量 PCR で解析、遺伝子発現を比較した。

## 4. 研究成果

「NGS を用いた網羅的遺伝子発現解析による PHT による HGF の遺伝子発現の変化」

### (1) PHT による DIGE 発症メカニズムについて

網羅的遺伝子解析によって、倍率変化 (fold-change) が高かった遺伝子を抽出した。まず、コラーゲン関連遺伝子として、細胞外マトリックスの構造維持やコラーゲンの恒常性、細胞接着に関わる Collagen type 21 1、Matrix metalloproteinase 28、EGF like domain multiple 6 の発現は増加。一方、細胞外マトリックス分解に関わる MMP12 の発現は低下。細胞分裂や増殖に関与する MCM10、MKI67、PIK3CG の発現は低下した。炎症関連遺伝子として、IL16 および Prostaglandin D2 synthase の発現は上昇した。DIGE 関連遺伝子として今までも報告されている細胞外マトリックスを構成する複数のタイプのコラーゲンが増加した(図 1)。一方、コラーゲンの分解に関与する酵素や細胞分裂に関連する遺伝子の発現は低下した(図 2)。これらの結果は、DIGE の原因として HGF の増殖よりも、コラーゲン増生や代謝の不均衡を支持するものといえる。

### (2) 炎症メディエーター関連遺伝子の発現について

興味深いのは、炎症性サイトカインやプロスタグランジンなどの発現が増加していることが明らかになったことである。ATP やヒスタミンの他にも、炎症やコラーゲン合成に関連する様々な生理活性物質が知られており、そのなかには  $Ca^{2+}$  応答に関与するものも少なくない。プロスタグランジン E2 (PGE2) は、炎症歯肉組織中で発現レベルが亢進するとされているが、PGE2 が結合する PGE2 (EP) 受容体は ATP およびヒスタミン同様 G タンパク質共役受容体 (GPCR) であり、PGE1~4 の 4 つのサブタイプが存在する。そのなかでも細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇を惹起するのが EP1 受容体である。PGE2 は HGF において EP1 受容体あるいは EP2/EP4 受容体を介して IL-6 産生や MMP-1, 3 産生を調整し、特に歯周炎組織由来の HGF において EP1 受容体が活性化され、亢進的に働くことがわかっている。EP1 受容体を介した  $Ca^{2+}$  上昇が炎症性サイトカイン産生やコラーゲンの生合成を調整していることが示唆されており、HGF に対して PGE2 刺激を行った場合も、申請者が明らかにしたような PHT による GPCR を介した  $Ca^{2+}$  応答の増強作用が認められる可能性が考えられる。よって、GPCR および他の受容体を介する他の炎症メディエーターによる HGF の  $Ca^{2+}$  応答とそれらに対する PHT の作用を明らかにすることが今後の課題といえる。

### (3) 今後の展望について

本研究はコロナ禍で実施され、網羅的遺伝子解析結果の取得が、当初の計画よりもかなり遅くなってしまった。中国国内の業者に解析を委託していたが、長期間のロックダウンにより半年程解析開始が遅れてしまったためである。しかしながら、解析の結果、PHT による発現上昇遺伝子は SARS-CoV-2 シグナリングに関係したパスウェイとの相関性が示唆された(図 3)。SARS-CoV-2 シグナリングには、自然免疫系によるウイルス排除には IL-6 などの炎症性サイトカインも深く関わっている。また、SARS-CoV-2 感染ではサイトカインストームが生じることが明らかになっているが、免疫応答が亢進する際にも多数の炎症性サイトカインやケモカインの過剰分泌が報告されている。今後これらのシグナル経路を参考にし、PHT による DIGE との関連が示唆された遺伝子発現および調節機構を明らかにする必要があると考えている。

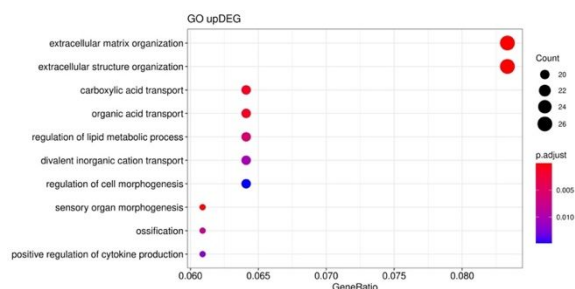


図 1: PHT による発現上昇遺伝子の Gene Ontology 解析

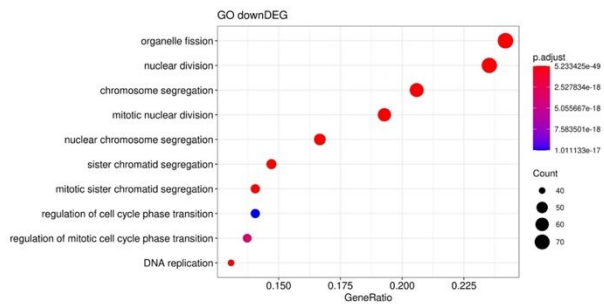


図 2:PHT による発現低下遺伝子の Gene Ontology 解析

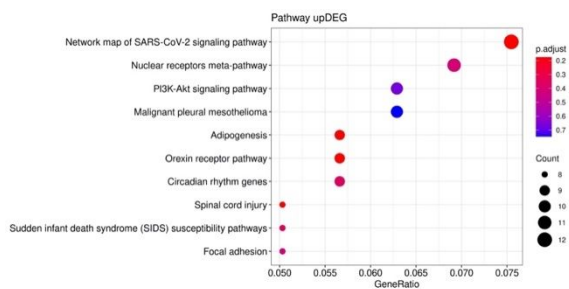


図 3:PHT による発現上昇遺伝子の Pathway 解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Minowa Erika, Kurashige Yoshihito, Islam Syed Taufiqul, Yoshida Koki, Sakakibara Sayaka, Okada Yunosuke, Fujita Yusuke, Bolortsetseg Dembereldorj, Murai Yuji, Abiko Yoshihiro, Saitoh Masato	4. 巻 54
2. 論文標題 Increased integrity of cell-cell junctions accompanied by increased expression of claudin 4 in keratinocytes stimulated with vitamin D3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 346 ~ 355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-021-00299-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Islam Syed Taufiqul, Kurashige Yoshihito, Minowa Erika, Yoshida Koki, Paudel Durga, Uehara Osamu, Okada Yunosuke, Bolortsetseg Dembereldorj, Sakakibara Sayaka, Abiko Yoshihiro, Saitoh Masato	4. 巻 12
2. 論文標題 Analysis of the cells isolated from epithelial cell rests of Malassez through single-cell limiting dilution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-04091-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 袁輪映里佳, 倉重圭史, 根津顕弘, 齊藤正人, 谷村明彦.
2. 発表標題 フェニトインの細胞内Ca <sup>2+</sup> 排出抑制作用による作動性Ca <sup>2+</sup> 応答の増強.
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 袁輪映里佳, 庄内喜久子, 高田一江, 倉重圭史, 齊藤正人
2. 発表標題 ヒト歯肉線維芽細胞におけるフェニトインによる作動性Ca <sup>2+</sup> 応答の増強
3. 学会等名 第60回日本小児歯科学会本大会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------