

## 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24年4月7日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791815

研究課題名（和文） ニフェジピン感受性および非感受性ヒト歯肉線維芽細胞間の細胞周期制御機構の相違

研究課題名（英文） Difference of cell cycle between nifedipine responders and non-responders

研究代表者

竹内 麗理（TAKEUCHI REIRI）

日本大学・松戸歯学部・助手（専任扱）

研究者番号：60419778

研究成果の概要（和文）：ニフェジピン歯肉増殖症の発症機序を解明するために、ニフェジピン感受性および非感受性ヒト歯肉線維芽細胞間で細胞周期分布・アポトーシスを、リポ多糖存在下で比較した。感受性細胞では非感受性細胞より、細胞周期進行の亢進、アポトーシスの低下、アポトーシス制御タンパク質（Bax、Cytochrome c、Caspase-3 and -9）の発現低下が認められた。

研究成果の概要（英文）：In this study, to elucidate the cause of nifedipine-induced gingival overgrowth, it has been evaluated whether there is differences in the cell cycle phase distribution and the apoptosis in the presence of lipopolysaccharide between gingival fibroblasts derived from patients with/without gingival overgrowth during nifedipine-treatment. Nifedipine reactive cells underwent the enhanced cell cycle progression, the diminished apoptosis, and the decreased expression of apoptosis regulatory proteins (Bax, Cytochrome c, Caspase-3 and -9) in comparison with nifedipine non-reactive cells.

交付決定額

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,000,000	300,000	1,300,000

（金額単位：円）

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：薬物性歯肉増殖症、ニフェジピン、歯肉線維芽細胞、細胞周期、アポトーシス、リポ多糖

## 1. 研究開始当初の背景

カルシウム拮抗薬は現在の高齢社会において使用頻度が増加している重要な薬物である。特に高齢者の高血圧症、狭心症などには、カルシウム拮抗薬が好んで用いられる。しかしながら、その結果、歯科臨床においてカルシウム拮抗薬が原因と考えられる歯肉増殖症の増加が顕著に見られるようになってきた。歯肉増殖症は直接生命を脅かすもの

ではないが、放置すれば歯の交合面まで歯肉が増殖し、咀嚼機能に重大な影響を及ぼすことや審美性に問題があることなど、カルシウム拮抗薬服用患者のQOLに問題を生じる。そのため、歯肉増殖症の発症機序を解明し、その治療法を確立することは緊急の課題である。

## 2. 研究の目的

ニフェジピンによる歯肉増殖症の発生頻

度は他のカルシウム拮抗薬を原因とするものよりも有意に高く、多くの研究者によって発症機序が検討されているが、その詳細はいまだ不明である。しかしながら、これまでの研究で本疾患の発症原因として次のことが認められている。

- (1) 歯肉線維芽細胞が大きく関与している。
- (2) 歯肉線維芽細胞にはニフェジピン感受性細胞 (NIFr) と非感受性細胞 (NIFn) の 2 種類が存在する。
- (3) NIFr の増殖能が細胞周期 G1/S 期移行の亢進に伴って高い。
- (4) 歯肉線維芽細胞のアポトーシス能低下が関与している。
- (5) 歯肉線維芽細胞のアポトーシスはリポ多糖によって誘導される。

そこで本研究では、ニフェジピン感受性および非感受性ヒト歯肉線維芽細胞間で細胞周期分布・アポトーシス能を、リポ多糖存在下で比較した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

NIFr および NIFn はそれぞれ抜歯処置時に、ニフェジピン服用により歯肉増殖を起こした患者および起こさなかった患者から得られた。本研究は日本大学松戸歯学部倫理委員会から承認を受け (EC099-001)、患者からインフォームド・コンセントを得ている。両細胞は Semi-confluent 状態まで培養され、その後 0.5%血清含有培地により増殖停止が誘導された。そしてリポ多糖 (1、10  $\mu$ M) によって刺激され、アポトーシス細胞数・細胞周期分布・細胞周期およびアポトーシス制御タンパク発現が測定された。

#### (2) アポトーシス解析

NIFr および NIFn のアポトーシス細胞数が、リポ多糖刺激 48 時間後に、APOPercantage™ Apoptosis Assay Kit を用いて測定された。

#### (3) 細胞周期解析

NIFr および NIFn の細胞周期分布が、リポ多糖刺激 24 時間後に、CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit を用いて測定された。

#### (4) 細胞周期およびアポトーシス制御タンパク質発現解析

NIFr および NIFn の細胞周期およびアポトーシス制御タンパク質 (Bad、Bax、Bcl-xL、Bcl-2、Cytochrome c、p53) の発現が、リポ多糖刺激 12 時間後に、Western blotting 法によって解析された。

#### (5) カスパーゼ活性測定

NIFr および NIFn のカスパーゼ-2、-3、-8、-9 活性が、リポ多糖刺激 12 時間後に、

Caspases Colorimetric Assay Kit を用いて測定された。

### 4. 研究成果

#### (1) アポトーシス

NIFr のリポ多糖誘導アポトーシス細胞数は NIFn よりも有意に減少していた。

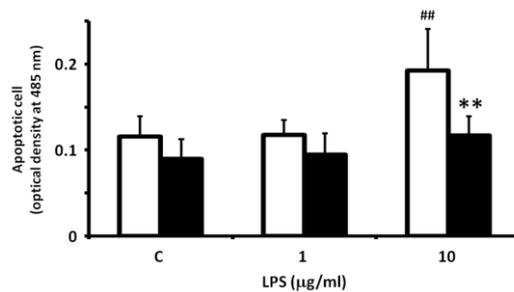
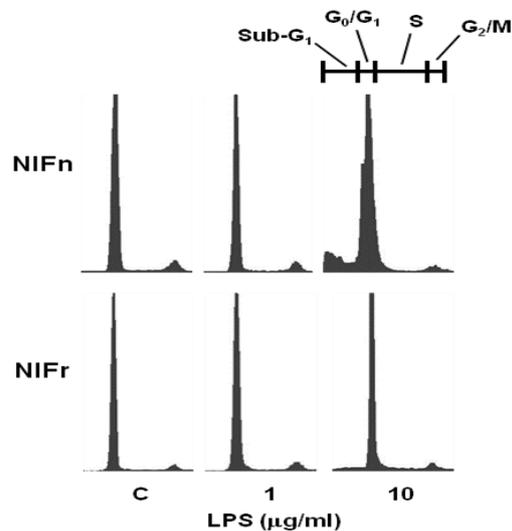


図 1 NIFr および NIFn におけるリポ多糖誘導アポトーシス細胞数

平均値  $\pm$  S.D. (N=5)、\*\* $P < 0.01$  (Bonferroni 補正 Student's t-test vs. NIFn)、## $P < 0.01$  (Bonferroni 補正 Student's t-test vs. 対照群)。□: NIFn、■: NIFr、C: 対照群、LPS: リポ多糖刺激群。

#### (2) 細胞周期分布

NIFr の細胞周期において、リポ多糖存在下で NIFn よりも、Sub-G1 細胞数が有意に減少し、S および G2/M 細胞数が有意に増加していた。



LPS ( $\mu$ g/ml)	NIFn			
	%Sub-G1	%G0/G1	%S	%G2/M
<b>C</b>	0.3 $\pm$ 0.1	92.9 $\pm$ 2.0	0.8 $\pm$ 0.8	6.0 $\pm$ 1.3
<b>1</b>	0.2 $\pm$ 0.1	93.0 $\pm$ 2.2	1.0 $\pm$ 0.8	5.8 $\pm$ 1.7
<b>10</b>	15.9 $\pm$ 3.3 <sup>###</sup>	79.5 $\pm$ 4.1 <sup>#</sup>	2.2 $\pm$ 3.0	2.4 $\pm$ 1.1 <sup>#</sup>

	NIFr			
	%Sub-G1	%G0/G1	%S	%G2/M
LPS( $\mu\text{g/ml}$ )				
<b>C</b>	0.3 $\pm$ 0.0	94.6 $\pm$ 2.6	0.6 $\pm$ 0.4	4.6 $\pm$ 2.2
<b>1</b>	0.2 $\pm$ 0.1	93.7 $\pm$ 1.3	0.5 $\pm$ 0.3	5.6 $\pm$ 1.0
<b>10</b>	3.4 $\pm$ 1.1 <sup>***#</sup>	76.0 $\pm$ 6.8 <sup>#</sup>	13.1 $\pm$ 6.7 <sup>**</sup>	7.5 $\pm$ 1.3 <sup>**</sup>

図 2 および表 1 リポ多糖存在下における NIFr および NIFn の細胞周期分布  
 平均値 $\pm$ S.D. (N=4)、\* $P$ <0.05、\*\* $P$ <0.01、  
<sup>\*\*\*</sup> $P$ <0.001 (Bonferroni 補正 Student's t-test vs. NIFn)、<sup>#</sup> $P$ <0.01、<sup>###</sup> $P$ <0.001  
 (Bonferroni 補正 Student's t-test vs. 対  
 照群)。C:対照群、LPS:リポ多糖刺激群。

### (3) 細胞周期およびアポトーシス制御タンパク質発現

NIFr において、Bax および Cytochrome c のタンパク質発現が、リポ多糖存在下で NIFn よりも低下していた。Bad、Bcl-xL、Bcl-2、p53 のタンパク質発現は NIFr と NIFn で同様であった。

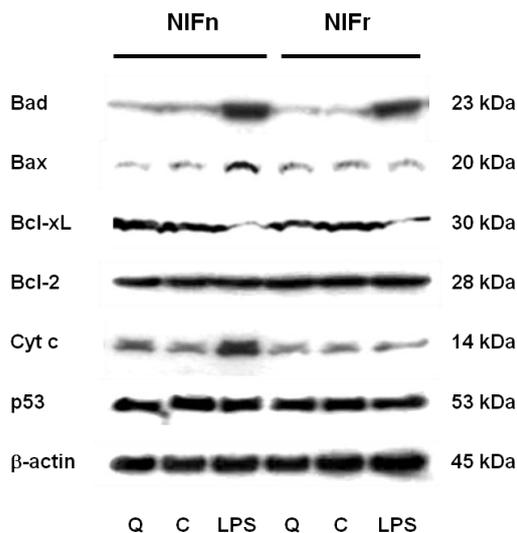


図 3 リポ多糖存在下における NIFr および NIFn の細胞周期およびアポトーシス制御タンパク質発現  
 Cyt c: Cytochrome c、Q: 休止期、C: 対照群、LPS: リポ多糖刺激群。

### (4) カスパーゼ活性

NIFr において、カスパーゼ 3 およびカスパーゼ 9 の活性が、リポ多糖存在下で NIFn よりも有意に低下していた。カスパーゼ 8 の活性は NIFr と NIFn とともに、リポ多糖によって有意に増加した。

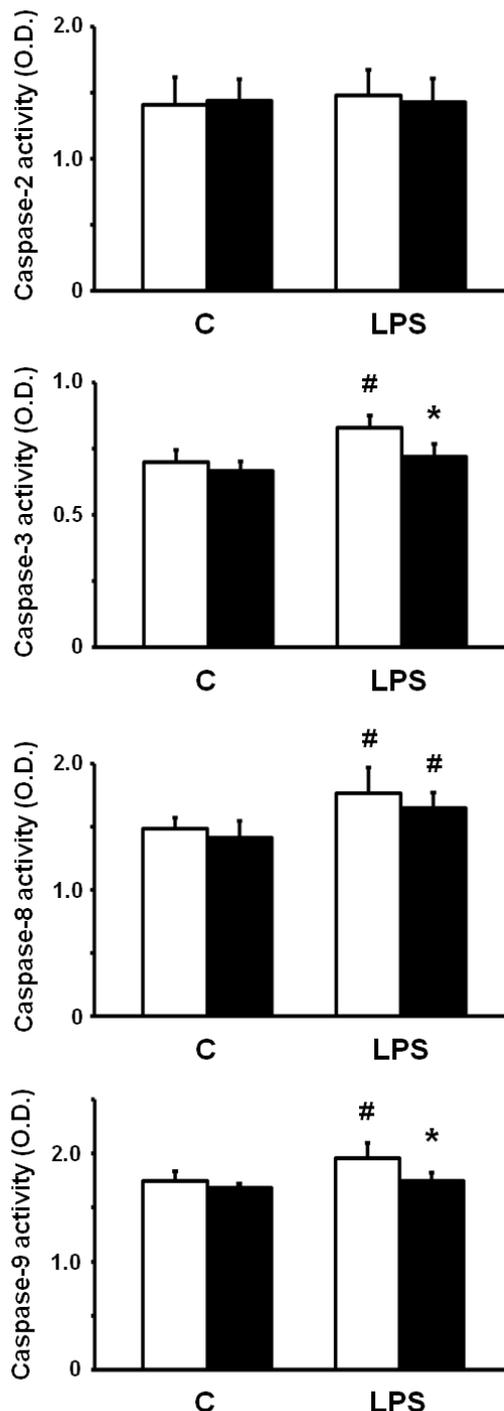


図 4 リポ多糖存在下における NIFr および NIFn のカスパーゼ活性  
 平均値 $\pm$ S.D. (N=4)、\* $P$ <0.05 (Bonferroni 補正 Student's t-test vs. NIFn)、<sup>#</sup> $P$ <0.05  
 (Bonferroni 補正 Student's t-test vs. 対  
 照群)。□: NIFn、■: NIFr、C: 対照群、LPS:  
 リポ多糖刺激群。

(5) NIFr のアポトーシス能低下の概要

NIFr において、Bax のタンパク発現が減弱していることにより、Cytochrome c、カスパーゼ 9、カスパーゼ 3 が減少し、結果としてアポトーシス能が低下している。

p53 は細胞の細胞質において Bax の発現を上方制御する。カスパーゼ 2 は Bax の立体構造転換とミトコンドリア膜外への移動を誘導する。これらに続いて、Cytochrome c がミトコンドリアから放出され、カスパーゼ 9 を活性化する。カスパーゼ 9 はカスパーゼ 3 を活性化し、結果、アポトーシスを引き起こす。

Bcl-2 および Bcl-xL は Cytochrome c の放出を阻害する。Bad、Bid、Bim は Bcl-2 および Bcl-xL を阻害しアポトーシスを誘導する。カスパーゼ 8 は Bid を分割し活性化する。

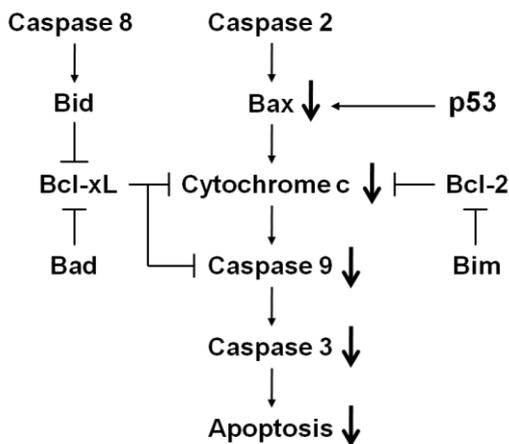


図5 NIFr のアポトーシス能低下の概要  
NIFn と比較した NIFr の特徴を矢印で示す。

(6) 今後の展望

本研究成果は、ニフェジピン歯肉増殖症の発症機序を示すものである。この成果から、歯肉増殖症の治療法または発症の抑制法を確立できる可能性がある。

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 竹内麗理、松本裕子、秋元芳明、藤井彰、Reduction in lipopolysaccharide-induced apoptosis of fibroblasts obtained from a patient with gingival overgrowth during nifedipine-treatment、Archives of Oral Biology、査読有、Vol. 56、2011 年、1073-1080。
- ② 竹内麗理、松本裕子、秋元芳明、藤井彰、

Effects of 18 $\alpha$ - and 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid on apoptosis and proliferation by phenytoin and cyclosporin A in human gingival fibroblasts、歯科薬物療法、査読有、Vol. 30、2011 年、1-6。

- ③ 小野真紀子、田中茂男、竹内麗理、松本裕子、岡田裕之、山本浩嗣、牧山康秀、平山晃康、坂巻達夫、藤井彰、秋元芳明、Prevalence of amlodipine-induced gingival overgrowth、International Journal of Oral-Medical Sciences、査読有、Vol. 9、2010 年、96-100。

[学会発表] (計 7 件)

- ① 竹内麗理、遠藤真美、The mechanism of phenytoin-induced gingival overgrowth、第 28 回日本障害者歯科学会総会および学術大会、2011 年 11 月 6 日、福岡国際会議場。
- ② 竹内麗理、松本裕子、秋元芳明、藤井彰、The mechanism of nifedipine-induced gingival overgrowth、第 53 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2011 年 10 月 2 日、長良川国際会議場。
- ③ 竹内麗理、松本裕子、秋元芳明、藤井彰、Inhibitory effect of amlodipine on TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in human gingival fibroblasts、第 31 回日本歯科薬物療法学会、2011 年 6 月 25 日、幕張メッセ国際会議場
- ④ 竹内麗理、松本裕子、秋元芳明、藤井彰、Reduction in lipopolysaccharide-induced apoptosis of fibroblasts obtained from a patient with gingival overgrowth during nifedipine-treatment、第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 22 日、パシフィコ横浜。
- ⑤ 竹内麗理、松本裕子、秋元芳明、藤井彰、The mechanism of gingival overgrowth as a side effect of nifedipine、16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology、2010 年 7 月 17 日、Copenhagen、Denmark。
- ⑥ 竹内麗理、松本裕子、秋元芳明、藤井彰、A possible role of cyclosporine A for gingival overgrowth、88th General Session and Exhibition of the IADR、2010 年 7 月 14 日、Barcelona、Spain。
- ⑦ 竹内麗理、松本裕子、秋元芳明、藤井彰、The effect of phenytoin on growth of cultured human gingival fibroblasts、第 30 回日本歯科薬物療法学会、2010 年 7 月 2 日、日本歯科大学九段ホール。

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 麗理 (TAKEUCHI REIRI)  
日本大学・松戸歯学部・助手（専任扱）  
研究者番号：60419778

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：