

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592779

研究課題名(和文)薬物性歯肉肥厚の発症機序の解明 - Ets 遺伝子の発現機構と役割 -

研究課題名(英文)Mechanism of gingival overgrowth caused by medication - Expression and role of ets transcription factor -

研究代表者

松本 裕子 (Matsumoto, Hiroko)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：50221594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯肉線維芽細胞でIL-1 はERK, p38 MAPKとHSP27のリン酸化およびEts-1の発現を促進した。また、線維芽細胞における細胞周期G1期停止の抑制はフェニトインによるCdkとRbのリン酸化の増加とp21とp27の減少によることが認められた。Ets-1のリン酸化はcyclinによって制御されていることから、歯肉増殖にIL-1 によるEts-1とESE-3の発現が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：IL-1a increased phosphorylations of ERK, p38 MAPK, and HSP27, and expression of Ets-1 in human gingival fibroblasts. The inhibition of G1 cell cycle arrest in human gingival fibroblasts may result from an increase in phosphorylated Cdk2 and Rb proteins and decreased levels of p21 and p27 proteins by phenytoin. Because the phosphorylation of Ets-1 is controlled by cyclin, it is suggested that expressions of Ets-1 and ESE-3 by IL-1a is associated with gingival overgrowth.

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：歯肉肥厚 細胞増殖 細胞周期 ets-1 フェニトイン

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、ニフェジピン感受性患者から得られた歯肉線維芽細胞が非感受性患者から得られたものよりニフェジピンに対する感受性(細胞増殖, DNA合成, コラーゲン合成)が高いこと, ニフェジピンにより PLD の系が活性化され, DAG により PKC の活性化が見られること, および PKC の下流の小蛋白のリン酸化見られることを明らかにしている。また, ニフェジピンは歯肉線維芽細胞で PDE の活性を阻害し, アゴニスト刺激による cAMP および cGMP の増加を示した。さらに, ニフェジピン感受性歯肉線維芽細胞は非感受性細胞よりもヒスタミンに対する感受性が高く, ヒスタミンにより誘導された  $[Ca^{2+}]_i$  はイソプロレナリンにより低下し, その低下はニフェジピン感受性歯肉線維芽細胞の方が非感受性細胞よりも強くみられる傾向にあった。

一方, IL-1 とニフェジピンがニフェジピン感受性歯肉線維芽細胞で非感受性細胞より細胞増殖能, DNA 合成能を亢進すること, IL-1 により細胞内 bFGF が大きく増加することを報告している。さらに, bFGF はニフェジピン感受性歯肉線維芽細胞が非感受性細胞より細胞周期に入る割合を高くすること, bFGF や IGF-1 を作用させると, ニフェジピン感受性歯肉線維芽細胞でより高い細胞増殖能, 細胞周期回転が認められ, RB のリン酸化 (Ser780 および Ser807/811) が顕著に見られ,  $G_0/G_1$  から S 相への進行の初期段階でニフェジピン感受性歯肉線維芽細胞は細胞増殖因子の影響を受けやすく, 細胞周期に入りやすいことを報告している。

さらに, 口腔扁平上皮癌由来上皮様細胞で ESE 遺伝子の発現が認められた。中でも ESE-3 は IL-1 や IL-1 の刺激や PKC の活性化により増加し, MEK1/2 経路を介して発現することが認められている。

## 2. 研究の目的

高齢化社会の到来を迎え, これまでも増して歯周疾患を有する患者の増加が見込まれる。我々は薬物性歯肉肥厚の発症機序の解明を目的として, 薬物感受性歯肉由来線維芽細胞を用いて, その細胞特性や増殖因子および炎症性因子に対する細胞応答, さらには細胞周期や細胞周期制御因子について検討してきた。細胞周期や細胞内情報伝達系における口腔内細胞の特性を明らかにし, 細胞増殖や炎症との関係を検討することは, 薬物性歯肉肥厚の発症機序の解明と新規薬物療法の可能性につながると期待される。

Ets 遺伝子は生物の発生, 細胞の増殖, 分化, アポトーシスなどの様々な生命現象に関

与していることが確認されているが, サイトカインや MMP を活性化することが知られており, 炎症にも深く関与すると思われる。しかしながら, 口腔内組織における報告は非常に少ない。本研究ではヒト歯肉線維芽細胞において Ets 遺伝子がどのように炎症や細胞増殖に関与しているかについて検討すると共に, 薬物性歯肉肥厚を発症すると言われているフェニトインとアムロジピンの細胞周期や細胞増殖に対する影響について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) IL-1 によりリン酸化する MAPK の検索

ヒト歯肉線維芽細胞に IL-1 (0.5 ng/ml) を作用させ, Human Phospho-MAPK Array Kit を用いて MAPK のリン酸化について検討した。

### (2) IL-1 による Ets 遺伝子の発現

ヒト歯肉線維芽細胞に IL-1 (5 ng/ml) を作用させ, Ets 遺伝子の発現を Western blotting 法を用いて検討した。

### (3) フェニトインの細胞周期 $G_1$ 相停止に対する抑制作用

ヒト歯肉線維芽細胞を無血清にて培養し,  $G_1$  相停止状態にすると共にフェニトイン (0.25  $\mu$ M) を作用させ, フローサイトメトリ法を用いて細胞周期の移行を測定した。また, Vi-CELL<sup>®</sup> Reagent Pak と Vi-CELL<sup>™</sup> XR Cell Viability Analyser を用いて生細胞数を測定し, 細胞増殖能を検討した。さらに, 細胞周期およびアポトーシス制御蛋白質の発現を Western blotting 法を用いて検討した。

### (4) TNF- $\alpha$ 誘導アポトーシスに対するアムロジピンの抑制作用

ヒト歯肉線維芽細胞にアムロジピン (1-10  $\mu$ M) と TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) を単独または併用して作用させ, Vi-CELL<sup>®</sup> Reagent Pak と Vi-CELL<sup>™</sup> XR Cell Viability Analyser を用いて生細胞数を測定し, 細胞増殖能を検討した。また, フローサイトメトリ法を用いて細胞周期の移行を, APOPercentage<sup>™</sup> Apoptosis Assay Kit を用いてアポトーシス細胞の割合を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) IL-1 によりリン酸化する MAPK の検索

ヒト歯肉線維芽細胞において, 様々な MAPK のリン酸化についてプロファイリングした。IL-1 は ERK1, ERK2, p38 MAPK, p38 MAPK, および HSP27 のリン酸化を促進した (図 1)。

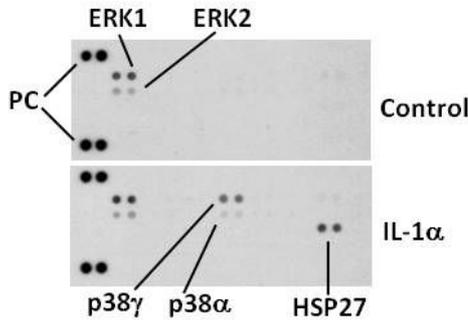


図1 IL-1 によるMAPKのリン酸化

(2) IL-1 によるEts遺伝子の発現

ヒト歯肉線維芽細胞にIL-1 を作用させ、Ets遺伝子の発現を検討した。細胞に5 ng/ml IL-1 を6時間作用させると顕著なEst-1の発現が認められた(図2)。

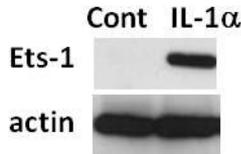


図2 IL-1 によるEts-1の発現

(3)フェニトインの細胞周期G<sub>1</sub>相停止に対する抑制作用

ヒト歯肉線維芽細胞を無血清にて培養し、G<sub>1</sub>相停止状態にすると共にフェニトインを作用させ、細胞周期の移行、細胞増殖能、細胞周期およびアポトーシス制御蛋白質の発現を検討した。

細胞を無血清で培養することにより細胞周期のG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>相に集まるが、フェニトインを作用することによりG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>相からS相へ移行し、細胞周期が回転した。また、細胞は10%血清存在下で培養する48時間で生細胞数は2倍になったが、無血清で培養した場合、生細胞数は増加しなかった。一方、フェニトインを作用することにより、生細胞数が20%増加した。

さらに、細胞を無血清で培養することにより、蛋白質 p21 Waf1/Cip1, p27 Kip1およびp57 Kip2の発現を亢進し、Cdk2, Cdk4およびRbのリン酸化を抑制する。フェニトインはこれらの蛋白質のなかでp21とp27の発現を低下させ、Cdk2とRb(Ser807/811)のリン酸化を増加させた(図3)。

蛋白質 p21 Waf1/Cip1, p27 Kip1はCdk2のリン酸化に対して抑制的に働くが、フェニトインはこれらの蛋白質の発現を低下させることによりCdk2のリン酸化が亢進し、それに伴ってRbのリン酸化も亢進される。その結果としてフェニトインは細胞周期G<sub>1</sub>期停止を抑制した(図4)。

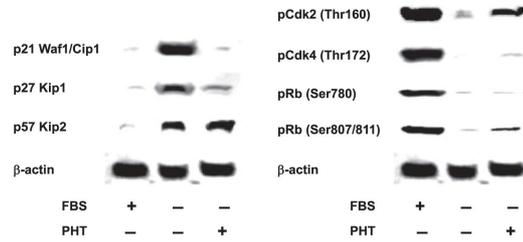


図3 フェニトインによる細胞周期およびアポトーシス制御蛋白質の発現 (FBS; 血清, PHT; フェニトイン)

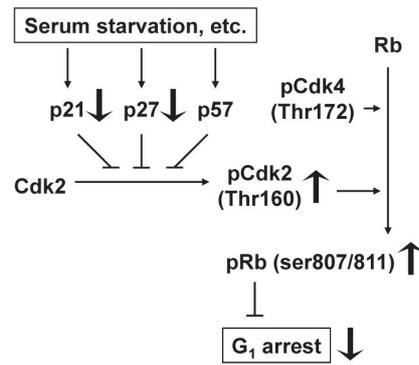


図4 フェニトインによる細胞周期およびアポトーシス制御蛋白質への影響

(4)TNF- 誘導アポトーシスに対するアムロジピンの抑制作用

TNF- 存在下でヒト歯肉線維芽細胞の細胞周期、アポトーシス、生細胞率および総細胞数に対するアムロジピンの影響を検討した。

細胞に TNF- を作用させると、アポトーシス (sub-G<sub>1</sub>相の増加) が誘発されるが、アムロジピンによりアポトーシス細胞が減少 (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>相の増加) した(図5)。

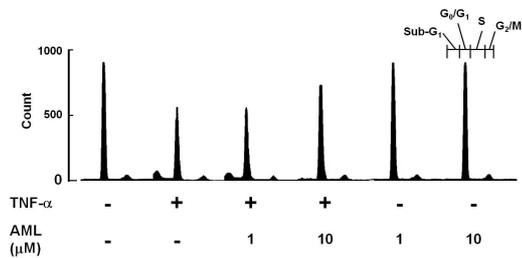


図5 TNF- 誘導アポトーシスに対するアムロジピンの細胞周期に対する影響 (AML; アムロジピン)

また、APOPercentage Dye で染色したアポトーシス細胞の割合も TNF- を作用させると増加し、アムロジピンにより減少した(図6)。

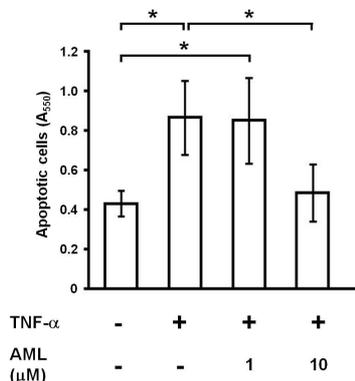


図6 TNF- $\alpha$ 誘導アポトーシスに対するアムロジピンのアポトーシス細胞に対する影響 (AML; アムロジピン)

同様に TNF- $\alpha$  は生細胞数を減少させるが、アムロジピンにより生細胞数の減少は抑制された。

以上の結果から、ヒト歯肉線維芽細胞において、IL-1 は ERK, p38 MAPK, HSP27 のリン酸化および Ets-1 の発現を促進した。炎症性因子によって刺激された上皮細胞は ESE-3 を介して IL-1 の産生亢進に関与し、放出された IL-1 はさらに上皮細胞を刺激すると共に、線維芽細胞に作用して細胞増殖を促進する可能性が示唆された。また、アムロジピンは線維芽細胞において TNF- $\alpha$  誘導アポトーシスを有意に抑制し、その結果生細胞数が上昇し、総細胞数が増加することが認められた。さらに、線維芽細胞における細胞周期 G1 期停止の抑制はフェニトインによる Cdk と Rb のリン酸化の増加と p21 と p27 の減少によることが認められた。Ets 遺伝子である Ets-1 のリン酸化は cyclin によって制御されていることから、薬物性歯肉肥厚に Ets 遺伝子 (Ets-1 と ESE-3) が関与していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Takeuchi R, Matsumoto H, Akimoto Y, Fujii A: Inhibition of G1, Cell Cycle Arrest in Human Gingival Fibroblasts Exposed to Phenytoin, *Fundam Clin Pharmacol*, 2012 Jul 21, doi: 10.1111/j.1472-8206.2012.01065.x., 査読あり。

Takeuchi R, Matsumoto H, Akimoto Y, Fujii A: The Inhibitory Action of Amlodipine for TNF- $\alpha$ -induced Apoptosis in Cultured Human Gingival Fibroblasts, *歯科薬物療法*, 31(2): 45-52, 2012, [https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jstot/31/2/\\_contents/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jstot/31/2/_contents/-char/ja)

/, 査読あり。

〔学会発表〕(計6件)

Takeuchi R, Ono M, Arikawa K, Akimoto Y, Fujii A, Matsumoto H: 18-alpha-glycyrrhetic acid suppresses G1/S-phase transition and induces apoptosis in gingival fibroblast isolated from a patient that presented with nifedipine-induced gingival overgrowth, 17th World Congress on Basic & Clinical Pharmacology, 2014/7/13, Cape Town International Convention Center (Cape Town).

Takeuchi R, Ono M, Akimoto Y, Fujii A, Matsumoto H: Effect of phenytoin on caspase activity in cultured human gingival fibroblasts, 第34回日本歯科薬物療法学会, 2014/6/21, 大阪歯科大学(大阪)。

Takeuchi R, Ono M, Akimoto Y, Fujii A, Matsumoto H: Tentative Pharmacotherapy for Nifedipine-induced Gingival Overgrowth using 18-glycyrrhetic Acid, 第33回日本歯科薬物療法学会, 2013/6/14, 東京医科歯科大学(東京)。

Takeuchi R, Matsumoto H, Akimoto Y, Fujii A: The Mechanism of Phenytoin-induced Gingival Overgrowth, 第32回日本歯科薬物療法学会, 2012/6/30, 大阪国際会議場(大阪)。

Takeuchi R, Matsumoto H, Akimoto Y, Fujii A: The Mechanism of Nifedipine-induced Gingival Overgrowth, 第53回歯科基礎医学会, 2011/10/2, 長良川国際会議場(岐阜)。

松本裕子, 竹内麗理, 小野真紀子, 秋元芳明, 藤井 彰: アムロジピンによる歯肉肥厚の発症機序, 第13回応用薬理シンポジウム, 2011/9/4, 日本大学薬学部(船橋)。

〔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〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 裕子 (MATSUMOTO, Hiroko)  
日本大学・松戸歯学部・専任講師  
研究者番号：50221594

### (2) 研究分担者

秋元 芳明 (AKIMOTO, Yoshiaki)  
日本大学・松戸歯学部・教授  
研究者番号：10147720

小野 眞紀子 (ONO, Makiko)  
日本大学・松戸歯学部・助手  
研究者番号：00267113

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

### (3) 連携研究者

なし