

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861780

研究課題名(和文)薬物性歯肉増殖症の発症機序と新規薬物療法 アポトーシス制御遺伝子との関連

研究課題名(英文)Possible pharmacotherapy for drug-induced gingival overgrowth

## 研究代表者

竹内 麗理 (TAKEUCHI, Reiri)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：60419778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：薬物性歯肉増殖症は、医学の進歩の副作用として高齢社会の到来とともに、これまで以上に今後、患者数が増加すると予想されている疾患である。その治療法は外科的切除が一般的であり、患者の負担が大きい。本研究では、患者の負担が小さく簡便な治療法として、新規薬物療法の確立を試みた。歯肉増殖の原因の一つは、歯肉線維芽細胞の異常増殖と報告されている。本研究で、18-グリチルレチン酸は歯肉線維芽細胞において、Rbリン酸化抑制による細胞周期停止、ミトコンドリアからのチトクロームC放出抑制によるアポトーシス誘導により、細胞増殖を抑制することを発見した。以上の結果から、本疾患の薬物療法の可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：This investigation aimed to establish the basis of a pharmacotherapy for drug-induced gingival overgrowth. Gingival overgrowth has been attributed to the enhanced growth of gingival fibroblasts. In this study, we investigated the effects of 18-alpha-glycyrrhetic acid (GA) on growth, the cell cycle, and apoptosis and on the regulators of these processes in gingival fibroblasts isolated from the patients. GA significantly decreased cell numbers and significantly increased the percentage of cells in the sub-G1 and G0/G1 phases of the cell cycle and the number of apoptotic cells. Nuclear condensation and fragmentation of the cells into small apoptotic bodies appeared in the fibroblasts treated with GA. GA significantly decreased the protein levels of cyclins A and D1, CDKs 2 and 6, phosphorylated Rb (ser780 and ser807/811), Bcl-xL and Bcl-2 and increased the protein levels of p27, cytosolic cytochrome c, pro-caspase-3, and cleaved caspase-3 and the activities of caspases 3 and 9.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：薬物性歯肉増殖症 歯肉線維芽細胞 18-グリチルレチン酸 細胞増殖 アポトーシス 細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

日本では現在、治療効果の高い薬物が多数開発され、多くの疾患を治療可能となっており、その恩恵によって世界に類を見ない高齢社会が到来している。しかしながら、それと並行して、薬物の副作用という新たな問題が生じてきた。この一つに薬物性歯肉増殖症があり、フェニトインやニフェジピンなどの薬物が原因で発症する。

歯肉増殖症は、歯間乳頭や辺縁歯肉の付着歯肉部に生じる線維性の増殖を呈し、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、患者のQOLに問題を生じる。

現在、その治療法の殆どは外科的切除であり、患者および術者への負担が大きい。そこで、負担が小さい治療のために、新規薬物療法を開発することが必要である。

薬物性歯肉増殖症の原因は、炎症、コラーゲン代謝異常、細胞周期およびアポトーシス異常による歯肉線維芽細胞の過増殖などであり、薬物療法で、これらの原因を解消することが重要である。

## 2. 研究の目的

培養歯肉線維芽細胞の細胞周期およびアポトーシスに対する18-グリチルレチン酸の効果を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞

薬物性歯肉増殖症患者由来の歯肉線維芽細胞を初代培養し、対数増殖期に18-グリチルレチン酸で刺激後、後述の測定を行った。

### (2) 細胞数の測定

トリパンプルーで染色後、歯肉線維芽細胞数を血球計算盤にて測定した。

### (3) 細胞周期分布の解析

Propidium Iodide 染色後、Sub-G1 (アポトーシス) G0/G1 期、S 期、G2/M 期細胞の割合をフローサイトメトリー法にて測定した。

### (4) DNA 合成能の評価

BrdUにてDNA合成を行っている細胞を標識し、その割合をフローサイトメトリー法にて解析した。

### (5) アポトーシス細胞数の測定

アポトーシス細胞を標識後、相対的なアポトーシス細胞数をELISA法にて測定した。

### (6) アポトーシス細胞の形態学的観察

ヘキストにて細胞の核を染色し、アポトーシス細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

### (7) タンパク質発現解析

ウエスタンブロット法にて、細胞周期・アポトーシス制御タンパク質の発現量を解析した。

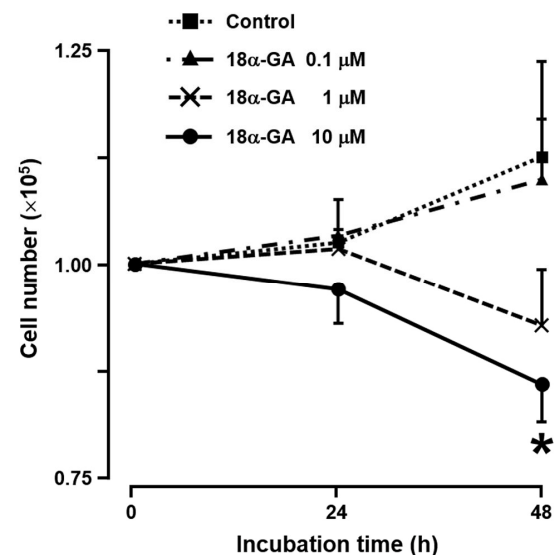
### (8) カスパーゼ活性の測定

ELISA法にて、カスパーゼの活性化能を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 歯肉線維芽細胞数

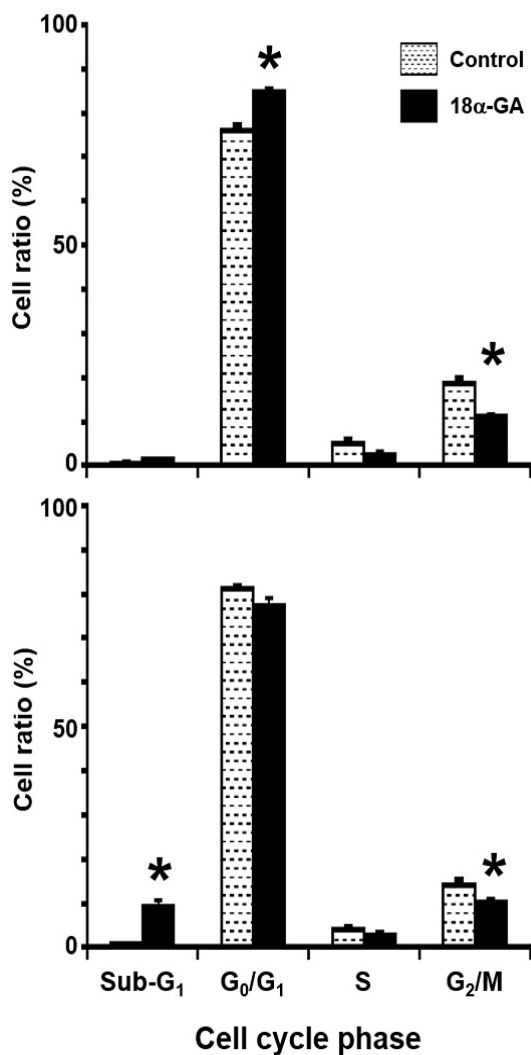
18-グリチルレチン酸は歯肉線維芽細胞数を減少させた。



Control: non-treatment group

### (2) 細胞周期分布

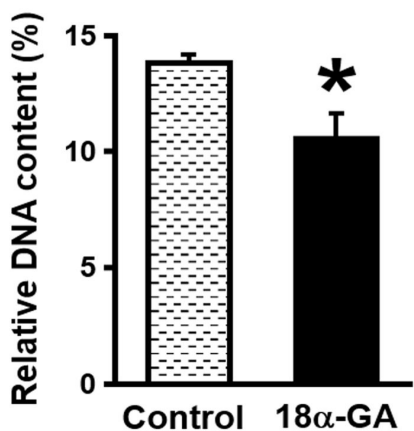
18-グリチルレチン酸は、24時間でG0/G1期細胞を増加しG2/M期細胞を減少させ(上段図)さらに48時間でSub-G1細胞を増加させた(下段図)。



Control: non-treatment group

### (3) DNA 合成能

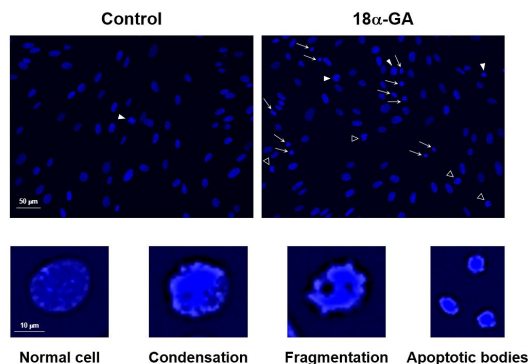
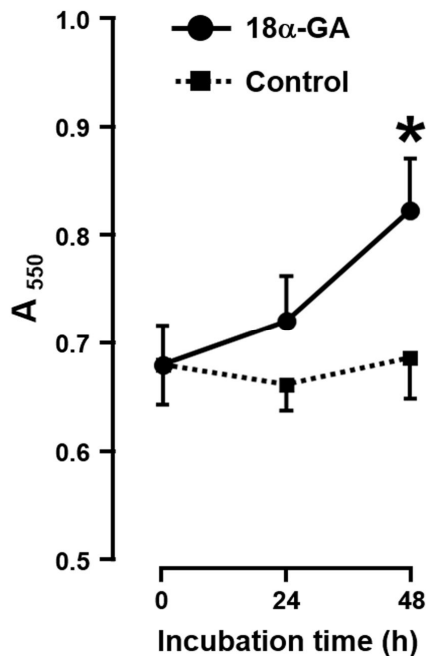
18-グリチルレチン酸存在下で、DNA 合成を行っている細胞数が減少した。



Control: non-treatment group

### (4) アポトーシス細胞の出現

18-グリチルレチン酸存在下で、アポトーシスを起こしている細胞数が増加した(上段図)。また下段図のように、アポトーシス細胞が観察された。

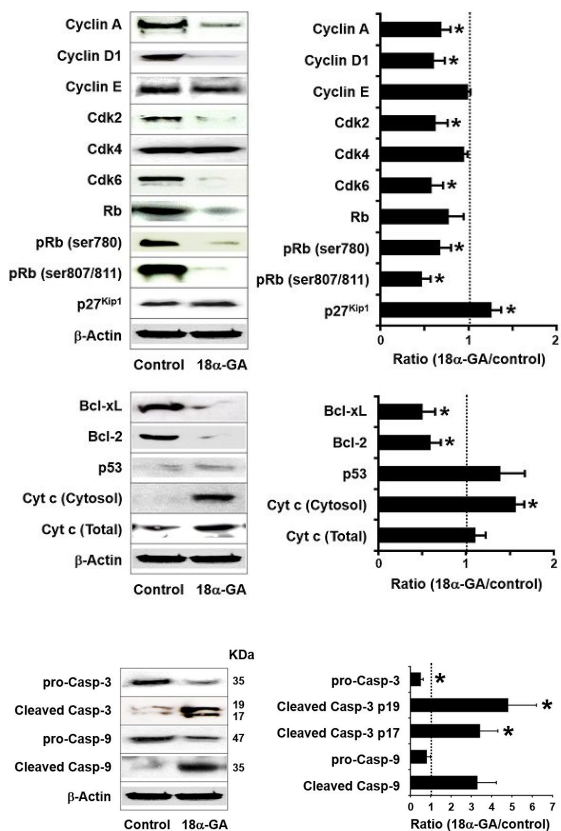


Control: non-treatment group, the arrows and closed and open triangles show the apoptotic cells.

### (5) 細胞周期・アポトーシス制御タンパク質の発現

18-グリチルレチン酸存在下で、細胞周期制御タンパク質 Cyclin A、Cyclin D1、Cdk2、Cdk6、phospho-ser780-Rb、phospho-ser807/811-Rb の発現が低下し、p27 の発現が亢進した(上段図)。また、アポトーシス制御タンパク質 Bcl-xL、Bcl-2、pro-Caspase 3 の発現が低下し、Cytosolic Cytochrome c、Cleaved Caspase 3 (p17、

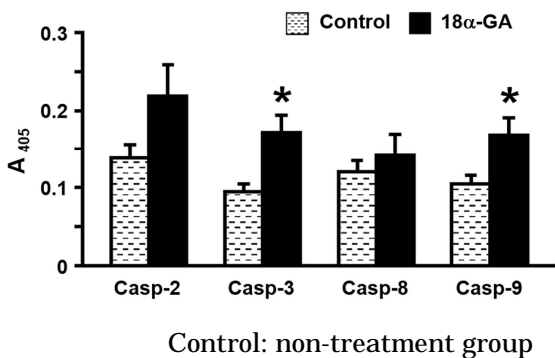
p19)の発現が亢進した(中下段図)。



Control: non-treatment group

(6) カスパーゼ活性

18-グリチルレチン酸存在下で、Caspase 3、Caspase 9 の活性化能が低下した。



Control: non-treatment group

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2件)

Reiri Takeuchi, Koichi Hiratsuka,

Kazumune Arikawa, Makiko Ono, Masamichi Komiya, Yoshiaki Akimoto, Akira Fujii, Hiroko Matsumoto, Possible pharmacotherapy for nifedipine-induced gingival overgrowth: 18-glycyrrhetic acid inhibits human gingival fibroblast growth, British Journal of Pharmacology, 査読有, Vol. 173, No. 5, 2016, pp. 913-924, DOI: 10.1111/bph.13410.

Reiri Takeuchi, Kazumune Arikawa, Toshikazu Uchiyama, Etsuko Aida, Michiko Takefuta, Koichi Nakakuki, Tadahiko Utsunomiya, Amlodipine inhibits the G1/S cell cycle transition induced by basic fibroblast growth factor in human gingival fibroblasts, Journal of Oral Tissue Engineering, 査読有, Vol. 11, No. 2, 2013, pp. 141-147, DOI: <http://doi.org/10.11223/jarde.11.141>.

[学会発表](計9件)

Reiri Takeuchi, Hiroko Matsumoto, Koichi Hiratsuka, Depressed apoptosis in cultured human gingival fibroblasts exposed to phenytoin, 第57回歯科基礎医学会学術大会, 2015.09.13, 朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター(新潟市, 新潟県)。

竹内麗理, 平塚浩一, 小野真紀子, 小宮正道, 秋元芳明, 松本裕子, 18-alpha-glycyrrhetic acid has pro-apoptotic effects in fibroblasts isolated from patients with gingival overgrowth, 第35回日本歯科薬物療法学会学術大会, 2015.06.20, 鶴見大学: 大学会館(横浜市, 神奈川県)。

Reiri Takeuchi, Koichi Hiratsuka, Kazumune Arikawa, Hiroko Matsumoto, Induction of apoptosis in nifedipine-reactive gingival fibroblasts using 18-glycyrrhetic acid, 93rd General Session & Exhibition of the IADR, 2015.03.14, Boston, Massachusetts, USA.

竹内麗理, 平塚浩一, 松本裕子, 培養ヒト歯肉線維芽細胞のカスパーゼ活性に対するフェニトインの影響, 第14回日本大学口腔科学会学術大会, 2014.09.07, 日本大学松戸歯学部(松戸

市，千葉県）。

Reiri Takeuchi, Makiko Ono, Kazumune Arikawa, Yoshiaki Akimoto, Akira Fujii, Hiroko Matsumoto, 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 OF BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY, 2014.07.17, Cape Town, South Africa.

竹内麗理, 小野真紀子, 秋元芳明, 藤井彰, 松本裕子, Effect of phenytoin on caspase activity in cultured human gingival fibroblasts, 第34回日本歯科薬物療法学会学術大会, 2014.06.22, 大阪歯科大学創立100周年記念館(大阪市, 大阪府)。

竹内麗理, 遠藤真美, The potentiality of 18-alpha-glycyrrhetic acid for treatment of nifedipine-induced gingival overgrowth, 第30回日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2013.10.13, 神戸国際展示場(神戸市, 兵庫県)。

竹内麗理, 牧村英樹, 和田守康, Comparison between IGF-I and bFGF on the growth of human gingival fibroblasts, 第11回日本再生歯科医学会学術大会・総会, 2013.08.31, 日本大学理工学部駿河台キャンパスCSTホール(千代田区, 東京都)。

竹内麗理, 小野真紀子, 秋元芳明, 藤井彰, 松本裕子, Tentative pharmacotherapy for nifedipine-induced gingival overgrowth using 18-alpha-glycyrrhetic acid, 第33回日本歯科薬物療法学会, 2013.06.16, 東京医科歯科大学M&Dタワー鈴木章夫記念講堂(文京区, 東京都)。

## 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・助教  
研究者番号：60419778