

学 位 論 文

NR4A1 に着目した薬物性歯肉増殖症のメカニズムの解明

岡 信 愛

広島大学大学院医歯薬保健学研究科医歯薬学専攻

(主指導教員：栗原 英見教授)

平成 28 年度

謝 辞

本研究のご指導および御高覧を賜りました、本学応用生命科学部門歯周病態学研究室 栗原 英見教授に対し、謹んで感謝の意を表します。また、研究の遂行ならびに本論文作製において、御指導、御鞭撻を頂きました本学 入船 正浩教授、香西 克之教授に深厚なる謝辞を表します。さらに、本研究の遂行、および本論文の作製を終始御指導ならびに御高覧を賜りました本学応用生命科学部門歯周病態学研究室 松田 真司博士に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行上および本論文作製上、御助言と御鞭撻ならびに御協力頂きました本学応用生命科学部門歯周病態学研究室の皆様には厚く御礼申し上げます。

最後に、勉学、研究の機会を与えると共に、日頃から私を支えてくれた両親の哲也、ゆかりに心から感謝いたします。

2017年1月

広島大学大学院医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻
歯周病態学研究室
岡信 愛

本論文の要旨は以下の学会において発表した。

第 57 回秋季日本歯周病学会学術大会

(2014 年 10 月 神戸)

The 62nd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research

(2014 年 12 月 大阪)

第 142 回日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会

(2015 年 6 月 福岡)

第 58 回秋季日本歯周病学会学術大会

(2015 年 9 月 浜松)

6th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry

(2015 年 10 月 広島)

第 99 回広島大学歯学会

(2015 年 11 月 広島)

第 49 回広島大学歯学会総会

(2016 年 7 月 広島)

第 58 回歯科基礎医学会学術大会

(2016 年 8 月 札幌)

第 59 回秋季歯周病学会学術大会

(2016 年 10 月 新潟)

目次

| | | |
|-----|-----------------------------|----------------------------------|
| 第1章 | 序章 | 6 |
| 第2章 | 薬物性歯肉増殖症モデルマウスの作製 | |
| 第1節 | 概要 | 9 |
| 第2節 | 材料と方法 | 9 |
| | 第1項 | 絹糸結紮歯周炎マウスの作製法と薬剤の投与方法 |
| | 第2項 | 組織標本作製法 |
| | 第3項 | ヘマトキシリン・エオジン染色 |
| | 第4項 | 歯肉増殖症の肉眼的評価 |
| | 第5項 | 抗菌薬の調整と投与方法 |
| 第3節 | 結果 | 10 |
| | 第1項 | 薬剤投与による歯肉増殖の評価 |
| | 第2項 | CsA 投与群の歯肉の組織学的所見 |
| | 第3項 | 絹糸の太さが歯肉増殖に及ぼす影響 |
| | 第4項 | 抗菌薬投与が歯肉増殖に及ぼす影響 |
| | 第5項 | 薬剤投与中止が歯肉増殖に及ぼす影響 |
| 第4節 | 考察 | 12 |
| 第3章 | カルシニューリン阻害作用と薬物性歯肉増殖症の関与の検討 | |
| 第1節 | 概要 | 14 |
| 第2節 | 材料と方法 | 14 |
| | 第1項 | 薬剤の調整と投与方法 |
| | 第2項 | 組織標本作製法 |
| | 第3項 | ヘマトキシリン・エオジン染色 |
| | 第4項 | 歯肉増殖症の肉眼的評価 |
| 第3節 | 結果 | 15 |
| | 第1項 | 上顎第二臼歯周囲歯肉の咬合面観の肉眼所見 |
| | 第2項 | Gingival Overgrowth Degree による評価 |
| | 第3項 | 組織学的所見 |
| 第4節 | 考察 | 16 |

| | | |
|-----|--|----|
| 第4章 | 疾患モデルマウスを使用した薬物性歯肉増殖症の病態解明 | |
| 第1節 | 概 要 | 17 |
| 第2節 | 材料と方法 | 17 |
| | 第1項 歯肉組織調整法 | |
| | 第2項 RT-PCR 法 | |
| | 第3項 組織標本作製法 | |
| | 第4項 免疫組織化学染色 | |
| | 第5項 蛍光免疫染色法 | |
| | 第6項 アザン染色 | |
| | 第7項 Cyclosporone B の調整と投与方法 | |
| | 第8項 歯肉増殖症の肉眼的評価 | |
| 第3節 | 結 果 | 19 |
| | 第1項 絹糸結紮の影響 | |
| | 第2項 Cyclosporine A 投与による歯肉組織中の TGF- β 標的分子の mRNA 発現の変化 | |
| | 1. Cyclosporine A 投与開始 4 週間後の所見 | |
| | 2. Cyclosporine A 投与開始 1 週間後の所見 | |
| | 第3項 Cyclosporone B 投与による歯肉の増殖と NR4A1 の関与の検討 | |
| 第4節 | 考 察 | 20 |
| 第5章 | 総 括 | 23 |
| 第6章 | 参考文献 | 25 |

第1章 序 章

薬物性歯肉増殖症（増殖症）はヒダントイン系抗てんかん薬の Phenytoin、ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬の Nifedipine、免疫抑制薬の Cyclosporine A (CsA)を服用している患者に副作用として起こる歯肉の過形成である [1, 2]。増殖症の組織学的特徴は上皮脚の伸長およびコラーゲン線維の増生を伴う歯肉結合組織の肥厚である[3, 4]。増殖症は幅広い年齢層で発症し、口腔衛生管理が困難になることから齲蝕や歯周炎のリスク因子となる。また、歯肉腫脹は若年者の永久歯の萌出障害や歯の移動の原因となり、咀嚼機能の低下や審美障害をきたすことで患者の QOL を著しく低下させ、精神的、身体的な苦痛となる。

増殖症を引き起こす薬剤のうち、Phenytoin はヒダントイン系抗てんかん薬で大脳皮質の運動領域に作用し、神経細胞膜上の電位依存性ナトリウムチャンネルを遮断して、ナトリウムイオンの細胞内の流入を抑制することで神経細胞膜を安定化し抗痙攣作用を示す [5, 6]。Nifedipine はジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬で膜電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャンネルを介する細胞外 Ca^{2+} の血管平滑筋及び心筋細胞内への流入を特異的に遮断し、筋原繊維 ATPase の活性化を阻害することにより筋の機械的収縮を抑制する [7]。CsA は T 細胞に作用し、細胞質でシクロフィリンと複合体を形成することでカルモジュリンとカルシニューリンの結合を抑制する。カルシニューリンの阻害は nuclear factor of activated T cells (NFAT)の脱リン酸化に伴う核内への移行を阻害し、T 細胞の活性および分化にとって重要なインターロイキン 2 の転写を抑制する[8]。

高齢化や医療の高度化に伴い、上記薬剤を服用する患者は増加している。現在臨床で行われる増殖症の治療方法は、医師に照会し増殖症の原因と考えられる服用薬剤の変更、あるいは減薬を依頼する。同時に歯周基本治療を行うが、改善を認めない場合は歯肉切除術へ移行する。これらの治療法は対症療法であり、根本的な治療ではない。さらに服用薬剤の変更や減量は患者の全身状態の維持管理を困難にすることもあり、増殖症治療のための変薬や減薬が行えない

場合は多い。また、歯肉切除術を行っても増殖症が再発するケースは少なくない[9-11]。そのため、変薬や歯肉切除を必要としない、新規治療法の開発が期待されている。

増殖症のメカニズムが解明できれば、歯肉切除や服用薬剤の変更を必要としない特定の分子を標的とした治療薬の開発や、増殖症が発症する可能性が高い患者の予測、さらに全身疾患に対する服用薬剤の選択において歯科医師から医師に提案することが可能となり、医科歯科の連携推進にもつながる。増殖症のメカニズム解明のためには、ヒトの臨床所見に近い疾患動物モデルの確立が不可欠である。これまでにビーグル犬、ラビット、ラットの増殖症モデルは報告があるが [12-14]、マウスを用いた増殖症モデルの報告は少ない。マウスは全ゲノム塩基配列が明らかにされており、さらにヒトの遺伝子と相同性が高く、遺伝子機能解析ツールをはじめ、多くの解析に応用可能である。またマウスはライフサイクルが他の実験動物と比較して短く繁殖も容易であり、さまざまな実験に幅広く応用可能であることから、増殖症動物モデルを作製するにあたり有用である。

臨床的見地から、増殖症は歯肉辺縁にのみ発症し、口蓋など歯周組織から離れた部位では発症しない。また、プラークコントロールの改善が増殖症の改善にとって有効であることが知られている[15]。さらに抜歯により歯肉肥厚が改善することからも、歯周組織の細菌感染、あるいはそれに伴う炎症が増殖症の発症に関与していることが予想される。そこで本研究で用いる増殖症マウスモデル作製にあたり最初にマウスに歯周炎を惹起させる必要があると考えた。

オーファン核内受容体 NR4A1 は、その機能抑制が特発性肺線維症、全身性強皮症、肝硬変、慢性腎不全など、様々な線維症マウスモデルの発症に関与していることが明らかとなった [16]。NR4A1 は生体内リガンドが同定されていない核内受容体で、その機能は多様で幅広い。線維芽細胞中の NR4A1 は TGF- β の刺激で転写が活性化され、Transforming growth factor- β (TGF- β) シグナルの負のフィードバック機構を促進することによってコラーゲンの過剰産生を抑制し、組織の恒常性維持に貢献している。線維症の環境下では線維芽細胞中の

NR4A1 の機能不全が、TGF- β シグナルの負のフィードバック機構を破綻させることでコラーゲンの過剰産生が維持される。

増殖症は歯肉結合組織の肥厚、コラーゲン線維の蓄積を特徴とすることから線維症と同様のメカニズムで発症している可能性がある。すなわち、通常の慢性歯周炎においては炎症性サイトカインである TGF- β が産生され、歯肉結合組織中の NR4A1 の発現が上昇し、NR4A1 によって TGF- β シグナルの負のフィードバック機構を介して組織の恒常性が維持されているが、増殖症を誘導する薬剤が NR4A1 の機能を抑制することでその負のフィードバック機構が破綻し、コラーゲンの産生が抑制できず、増殖症が発症していると仮説を立てた。

本研究では増殖症マウスモデルを確立し、そのモデルを用いて NR4A1 の増殖症発症への関与を明らかにすることを目的とした。

第2章 薬物性歯肉増殖症モデルマウスの作製

第1節 概要

薬物性歯肉増殖症のメカニズムを解明するために、マウスの増殖症モデルの開発を目指した。これまでにマウスの歯周炎モデルとして絹糸結紮歯周炎モデルマウスが存在する[17]。本章では絹糸結紮歯周炎モデルマウスに各種薬剤を投与することによって、臨床所見に類似した増殖症が発症すると仮説を立てた。

第2節 材料と方法

第1項 絹糸結紮歯周炎マウスの作製法と薬剤の投与方法

実験にはマウス C57BL/6j (6~8 週齢) (日本クレア、東京) を用いた。動物実験は広島大学自然科学研究支援開発センター生命化学研究支援分野・ライフサイエンス教育研究支援部動物実験施設の実験指針に基づいて行った。以下の各処置はネンブタールの腹腔内注射による全身麻酔下で無痛的に行った。

絹糸結紮歯周炎モデルマウスは Abe らの方法に従って作製した[17]。上顎両側第二臼歯に 5-0 絹糸 (アルフレッサ ファーマ、大阪) または 7-0 絹糸 (アルフレッサ ファーマ) を結紮し、口蓋側に結び目を設けた。1 週間後、CsA 50 mg/kg/day (東京化成、東京)、Phenytoin 150 mg/kg/day (和光純薬、大阪)、Nifedipine 250 mg/kg/day (和光純薬、大阪) をエタノールおよびポリオキシエチレン(10)ヒマシ油 (和光純薬) を用いて溶解し、滅菌 PBS で希釈したものを腹腔内投与した。投与期間は増殖症発症の確認では 4 週間、タイムコースの実験では 1、2、3、4 週間投与した。薬剤投与中止の影響の検討は 4 週間投与した後、2 週間投与を中止した群、投与を継続し計 6 週間投与した群を設けた。陰性対照にはエタノールおよびポリオキシエチレン(10)ヒマシ油を滅菌 PBS で希釈したものを投与した。

第2項 組織標本作製法

薬剤投与終了後にネンブタール (大日本住友製薬、大阪) を腹腔内注射し、マウスを全身麻酔下に置き、頸椎脱臼にて安楽死させた。頭部を切断後、上顎歯肉と上顎骨および歯を一塊として摘出した。組織は 10%パラホルムアルデヒドに 24 時間浸漬し、その後 10%EDTA で 14 日間脱灰した。脱灰後、通法に従いパラフィンに包埋した。光学顕微鏡標本は頬口蓋側的に歯軸に平行に厚さ 5

μm のパラフィン切片を作製した。

第3項 ヘマトキシリン・エオジン染色

パラフィン切片はキシレンによる脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を行い、光学顕微鏡 (ECLIPSE E600W、日本光学、東京) で観察し、同時にデジタル画像をコンピュータ (DS-L3、NIKON、東京) に取り込んだ。

第4項 歯肉増殖症の肉眼的評価

増殖症の程度はマウスの第二臼歯周囲の頬側歯肉幅径で評価した。咬合面観で写真撮影を行い、Imagej (NIH) を用いて頬側歯肉幅を計測し、個体間で変動の少ない第二臼歯の近遠心的幅径に対する頬側歯肉幅の百分率 (%) を Gingival Overgrowth Degree (GOD) とした (図 1)。

第5項 抗菌薬の調整と投与方法

抗菌薬は Ampicillin sodium salt 1 g/L (SIGMA ALDRICH、ミズーリ州)、Metronidazole 1 g/L (SIGMA ALDRICH)、Neomycin trisulfate salt 1 g/L (SIGMA ALDRICH)、Vancomycin hydrochloride 0.5 g/L (SIGMA ALDRICH) を滅菌精製水に溶解し、飲用水として全実験期間中に投与した[18]。実験スケジュールとして絹糸結紮から 1 週間後から CsA 50 mg/kg/day を 4 週間毎日マウスに腹腔内投与した。

第3節 結果

第1項 薬剤投与による歯肉増殖の評価

肉眼的所見において、無刺激群、絹糸結紮群および CsA 単独投与群と比較し、絹糸結紮後に CsA を投与した群において第二臼歯周囲歯肉の顕著な歯肉増殖を認めた(図 2 a-d)。また、第二臼歯頬側および口蓋側の歯肉は歯冠の一部を被覆し、さらに歯の移動と思われる所見も認めた (図 2 d)。GOD は絹糸結紮群と比較して絹糸結紮後 CsA を投与した群で有意な上昇した (図 3 a)。CsA 投与開始時を 0 週とした 1 週間ごとの GOD を比較すると、絹糸結紮 3 週間後から 0 週の群と比較して有意差を認めた (図 3 b)。

Phenytoin および Nifedipine を投与した群では、絹糸結紮のみの群と比較し

明らかな歯肉増殖、歯の移動は認めなかった (図 2 c, e, f)。

第 2 項 CsA 投与群の歯肉の組織学的所見

無刺激群と比較し、CsA のみを投与した群では歯周組織に明らかな変化を認めなかった (図 4 a, b)。絹糸結紮群では結紮絹糸周囲の歯肉結合組織の破壊、炎症性細胞浸潤、また軽度の歯肉腫脹が認められた (図 4 c)。絹糸結紮後 CsA を投与した群はその他の群と比較し顕著な第二臼歯周囲の頬側歯肉の増殖と、多量の細胞外基質を含む歯肉結合組織の増大を認めた (図 4 d)。また、上皮の著しい肥厚は認めなかった (図 4 a-d)。強拡大像では歯肉結合組織中に明らかな線維芽細胞数の増加は観察されなかったが、密な線維束が観察された (図 4 e, f)。

第 3 項 絹糸の太さが歯肉増殖に及ぼす影響

7-0 絹糸結紮群 (図 5 a, b)、5-0 絹糸結紮群 (図 5 c, d) 共に CsA を投与することで絹糸結紮群と比較して第二臼歯周囲の明らかな歯肉の肥厚を認めた。しかし 5-0 絹糸結紮後 CsA を投与した群では 7-0 絹糸結紮後 CsA を投与した群と比較し第二臼歯周囲の頬側歯肉および口蓋側歯肉に高度の肥厚を認め、著明な歯の移動が観察された。GOD は 7-0 絹糸結紮後 CsA を投与した群 (図 5 b) と比較し 5-0 絹糸結紮後 CsA を投与した群 (図 5 d) で有意に高かった (図 5 e)。

第 4 項 抗菌薬投与が歯肉増殖に及ぼす影響

抗菌薬投与群は抗菌薬非投与群と比較して、肉眼的観察において明らかに歯肉肥厚を抑制させ、GOD を有意に低下させた (図 6 a, b, e)。組織学的観察において、抗菌薬投与群は歯肉結合組織の増大を抗菌薬非投与群と比較し顕著に抑制させた (図 6 c, d)。

第 5 項 薬剤投与中止が歯肉増殖に及ぼす影響

絹糸結紮後解析時まで CsA の投与を継続した群では結紮絹糸周囲歯肉に高度な肥厚を認めたが、休薬期間を設けた群では歯肉肥厚の程度は明らかに軽減していた (図 7 a-c)。GOD は、CsA 投与を継続した群は絹糸結紮群と比較し有意な上昇を認めたが、休薬期間を設けた群は絹糸結紮群と同程度まで GOD が低下した (図 7 g)。組織学的観察において、解析まで CsA の投与を継続した群で歯肉結合組織の増大が観察されたが、CsA の休薬期間を設けた群では歯肉結合組

織の明らかな増大は認めなかった (図 7 d-f)。

第 4 節 考 察

本実験で絹糸結紮歯周炎マウスモデルに Phenytoin、Nifedipine、CsA を投与し、増殖症の発症を評価したところ、Phenytoin、Nifedipine では明らかな第二臼歯周囲の頬側歯肉の肥厚は認められなかったが、CsA 投与群では顕著な歯肉の肥厚を認めた。Phenytoin、Nifedipine については、今後動物種やマウスの系統の変更、あるいは薬剤の投与方法を変更して増殖症が発症する可能性をさらに検討する必要がある。

CsA を服用する患者にとって服用薬剤の変更や減薬は臓器移植時の拒絶反応等の問題から困難な場合が多く、また、歯肉切除術といった外科処置も制限される。CsA を服用する患者は近年の臓器移植手術の増加に加え、関節リウマチやベーチェット病、再生不良性貧血などの自己免疫疾患も CsA の適応症となったことで増加している[19]。したがって今後増加が予想される CsA 誘導性増殖症患者を、安全かつ根本的に治療、あるいは予防する方法の開発は急務である。本実験で確立した CsA 誘導性増殖症マウスモデルは新規治療法の開発に有用であると考えられる。

第 1 項の結果において絹糸結紮群および CsA 単独投与群では無刺激群と比較し明らかな変化を認めないが、絹糸結紮後 CsA を腹腔内投与することで、有意な歯肉肥厚を認めた。また、結紮絹糸の太さは GOD に影響を与えた。抗菌薬投与開始 1 週後のマウスの口腔内を滅菌綿棒で擦過し、好気培養検査および嫌気培養検査 (血液寒天培地、37°C、24 時間培養) を行うとコロニーはほとんど検出されなかった。抗菌薬非投与群と比較すると 24 時間後のコロニー数は有意に減少していた (結果非表示)。全実験期間中に抗菌薬投与をおこなうと、解析時の GOD は有意に低下した。これらのことから、増殖症の発症段階において細菌感染あるいはそれに伴う炎症が関与している可能性が示唆された。これまでに、CsA は Phenytoin、Nifedipine と比較して歯肉組織中の炎症が強いという報告がある [20]。これは本実験の結果から、特に CsA 誘導性増殖症モデルに絹糸結紮による細菌感染の誘導が必須であることと一致している。さらに、増殖症発症後、CsA の投与を中止することで肉眼的所見、GOD、組織学的所見において歯肉肥厚の程度は明らかに抑制された。このことから、増殖症を維持させるためには CsA の継続投与が重要であることが示唆される。

以上のことから、本研究で作製した CsA 誘導性増殖症モデルマウスは、実際の臨床所見に近い高度な歯肉肥厚を示し、増殖症のメカニズム解明に有用な動物モデルであると考えられる。

第3章 カルシニューリン阻害作用と薬物性歯肉増殖症の関与の検討

第1節 概要

CsA と FK506 は免疫抑制薬のうちカルシニューリン阻害薬に分類され、臓器移植時の拒絶反応予防に用いられる [21, 22].

これらの薬剤はカルシニューリンの活性を抑制することで nuclear factor of activated T cells (NFAT)の脱リン酸化および核内への移行を阻害し、T細胞の活性および分化にとって重要なインターロイキン 2 (IL-2)の転写を抑制する [23]。CsA は副作用として細胞外基質の蓄積を主体とした歯肉増殖を示す [24-27]。

これまでに、腎臓においてカルシニューリンをノックアウトさせたマウスで細胞外マトリックスの構成成分であるフィブロネクチンと TGF- β の発現が上昇するという報告がある [28]。そこで、CsA のカルシニューリン阻害作用、もしくは免疫抑制作用が増殖症発症に関与しているか検討するため、同じカルシニューリン阻害作用を持つ FK506 と、カルシニューリン阻害薬と異なり核酸合成阻害作用を有し、T細胞の増殖を抑制することで免疫抑制効果を示す免疫抑制薬 Mizoribine を用いて歯肉増殖について検討した。

第2節 材料と方法

第1項 薬剤の調整と投与方法

免疫抑制薬として CsA と FK506 (東京化成)、および Mizoribine (和光純薬) を使用した。

実験には第2章と同様、上顎両側第二臼歯を使用した。5-0 絹糸を結紮し、口蓋側に結び目を設けた。1週間後、CsA 50 mg/kg/day (CsA 投与群)、FK506 30 mg/kg/day (FK506 投与群)、Mizoribine 30 mg/kg/day (Mizoribine 投与群) をエタノールおよびポリオキシエチレン(10)ヒマシ油を用いて溶解し、滅菌 PBS で希釈したものを注射液とし、4週間毎日腹腔内に投与した。陰性対照群にはエタノールおよびポリオキシエチレン(10)ヒマシ油を滅菌 PBS で希釈したものを投与した。

第2項 組織標本作製法

実験開始5週間後のマウスの上顎歯肉と上顎骨および歯をパラフィン包埋し、切片を作製した。(第2章、第2節参照)

第3項 ヘマトキシリン・エオジン染色

パラフィン切片はキシレンによる脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)を行った。(第2章、第2節参照)

第4項 歯肉増殖症の肉眼的評価

組織の定量はGingival Overgrowth Degree (GOD)で評価した。(第2章、第2節参照)

第3節 結果

第1項 上顎第二臼歯周囲歯肉の咬合面観の肉眼所見

絹糸結紮群と比較し、CsA投与群(50 mg/kg/day)、FK506投与群(30 mg/kg/day)で上顎第二臼歯周囲頬側歯肉の顕著な肥厚を認めた(図8 a, b)。両者とも肥厚した歯肉は第二臼歯の歯冠の一部を被覆し、歯の移動を認めた。Mizoribine投与群では対照の絹糸結紮群と比較し明らかな変化を認めなかった(図8 c)。

第2項 Gingival Overgrowth Degreeによる評価

絹糸結紮群と比較し、CsA投与群、FK506投与群で有意なGODの上昇を認めたが、Mizoribine投与群では有意な変化を認めなかった(図8 d)。

第3項 組織学的所見

上顎第二臼歯周囲のHE染色像において、CsA投与群(図9 a)およびFK506投与群(図9 b)で著明な歯肉組織の過形成と、多量の細胞外基質を含む歯肉結合組織の増大を認めた。上皮には明らかな肥厚を認めなかった。絹糸周囲歯肉の炎症性細胞浸潤は軽度であった。Mizoribine投与群(図9 c)においても同部位の炎症性細胞浸潤は軽度であったが、明らかな歯肉結合組織の増大は認めなかった。

第4節 考 察

絹糸結紮後カルシニューリン阻害薬である CsA と FK506 を投与した群において歯肉が増殖し、Mizoribine 投与群では歯肉は増殖しなかった。組織学的観察で CsA 投与群及び FK506 投与群は同様に歯肉結合組織の増大を認めたが Mizoribine 投与群では明らかな変化は認めなかった。歯肉結合組織中の炎症性細胞浸潤は Mizoribine 投与群でも CsA 投与群、FK506 投与群と同様に絹糸結紮のみの群と比較し軽度であったことから、免疫抑制作用は歯周組織に影響を与えていることが示唆される。すなわち、歯周組織に対する免疫抑制作用ではなく、カルシニューリン阻害作用が歯肉の増殖に関与していることが示唆された。本実験において、FK506 群で CsA 投与群と同様の顕著な歯肉の肥厚を認めた。しかし過去にヒトおよび動物実験ともに、FK506 投与によって増殖症が発症したという報告は少ない[29-33]。本実験で歯肉の増殖を誘導するために使用した FK506 30 mg/kg/day の濃度は、マウスに免疫抑制効果を示す濃度と比較して極めて高濃度であり、このことは臨床において FK506 の副作用として増殖症の報告が少ないことと整合している[34, 35]。カルシニューリンは細胞質でカルモジュリンと結合することで nuclear factor of activated T cells (NFAT) をはじめ種々の基質の脱リン酸化に伴う核内移行を促進するフォスファターゼである。本章の実験結果は CsA、あるいは FK506 は歯肉結合組織、特に歯肉線維芽細胞のカルシニューリンを阻害し、それ以降のシグナルを制御することが増殖症の発症に関与していることを示唆する。過去の報告では CsA あるいは FK506 の投与によって腎臓において線維化に関与するコラーゲン、フィブロネクチン、MMP2、MMP9、TIMP2、TIMP9 の発現が上昇することが示めされている [36]。本章の実験結果から、カルシニューリン阻害作用が上記のタンパク発現の制御に関与している可能性がある。

第4章 疾患モデルマウスを使用した CsA による歯肉増殖誘導メカニズムの解明

第1節 概要

NR4A1 は生体内リガンドが同定されていないオーファン核内受容体であり、TGF- β の標的遺伝子として種々の遺伝子の転写を活性させることが知られている [37, 38]。一方で NR4A1 は TGF- β シグナルの負のフィードバック機構を制御することでコラーゲンの過剰産生を抑制し、組織の恒常性維持に貢献している [16]。線維症では線維芽細胞中の NR4A1 の発現が減少しており、TGF- β シグナルの負のフィードバック機構が破綻することでコラーゲンの過剰産生が持続し、線維症が発症することが報告されている [16]。

そこで、カルシニューリン阻害薬である CsA が NR4A1 の転写を抑制することで、TGF- β の負のフィードバック機構を破綻させ、コラーゲンの過剰産生を維持し歯肉を増殖させると仮説を立てて、実験を行った。

第2節 材料と方法

第1項 歯肉組織調整法

実験には第2章と同様に上顎両側第二臼歯を使用した。5-0 絹糸を結紮し、口蓋側に結び目を設けた。1週間後、CsA 50 mg/kg/day をエタノールおよびポリオキシエチレン(10)ヒマシ油を用いて溶解し、滅菌 PBS で希釈したものを注射液とし、4週間毎日腹腔内に投与した。陰性対照群としてエタノールおよびポリオキシエチレン(10)ヒマシ油を滅菌 PBS で希釈したものを投与した。実験開始から 1、2、5週間後の組織を回収し、口蓋側の歯肉を上顎骨から剥離した。組織は RNAlater™ (SIGMA) 中で保存した。

第2項 RT-PCR 法

組織中の総 RNA は RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (50) (QIAGEN、オランダ) を用いて抽出した。総 RNA 抽出後、ReverTra Ace - α -® (東洋紡、大阪)、T100 サーマルサイクラー (BIORAD、カリフォルニア州) を用いて逆転写し、cDNA を精製した。cDNA 精製後、Quick Taq® HS DyeMix (東洋紡、大阪)、T100

サーマルサイクラー (BIORAD) を用いて PCR を行った。精製した PCR 産物を、エチジウムブロマイド 0.5 μ g/ml を添加した 1.5 %アガロースゲルで電気泳動した。電気泳動後、ChemiDoc™ XRS+ with Image Lab™ Software (BIORAD) でバンドを撮影、定量した。

PCRに使用したプライマーはSigma aldrich から購入したものをを用いた (表 1)。

第 3 項 組織標本作製法

実験開始 1、2 および 5 週間後のマウスの上顎歯肉と上顎骨および歯をパラフィン包埋し、切片を作製した (第 2 章、第 2 節参照)。

第 4 項 免疫組織化学染色

パラフィン切片を脱パラフィン後、蒸留水で洗浄した後、マイクロウェーブ法で抗原の賦活化を行い (500 w、5 分間、ER-120、TOSHIBA、東京)、さらに 3 %過酸化水素水処理で内因性ペルオキシダーゼを賦活化した。PBS (0.05M, pH7.6) に Tween20 を添加したもの (PBS-T) を洗浄液に使用した。一次抗体として Anti-mouse Anti-TGF- β (1, 2, 3) (R & D systems、ミネソタ州) を用いた。実験方法は VECTASTAIN ABC システム、Mouse on Mouse (M.O.M) Immunodetection Kit (Vector Laboratories、カリフォルニア州) の手順書に従った。洗浄液で 10 分間洗浄後、発色は 3, 3'-ジアミノベンジジン (DAB, DAKO、東京) を用いた。発色後、ヘマトキシリンで対比染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。陰性対照群は一次抗体を作用せず染色を行った。

第 5 項 蛍光免疫染色法

パラフィン切片を脱パラフィン後、蒸留水で洗浄した後、マイクロウェーブ法で抗原の不活化を行った (500 w、5 分間)。ブロッキングにはウサギ血清を使用した。PBS-T を洗浄液に使用した。一次抗体として Anti-Smad2 (phospho S255) antibody [EPR2856(N)] (Rabbit monoclonal to Smad2、Abcam、東京)、Anti-NUR77 antibody (Rabbit polyclonal to NUR77、Abcam) をそれぞれ 4°C にて 8 時間反応させた。洗浄液で 10 分間洗浄した後、遮光下で二次抗体として Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488、Abcam) を 4°C で 2 時間反応させた。核の染色のために Cellstain^R DAPI solution (同仁化学研究所、熊本) を 20 分間反応させ、蛍光顕微鏡 (Zeiss LSM 510 laser scanning confocal

microscope、Zeiss Microimaging, Inc.、ドイツ) 下で観察した。蛍光染色の蛍光強度の評価は Imagej を用いて定量した。

第6項 アザン染色

パラフィン切片を脱パラフィン後、蒸留水で洗浄した後、室温でアゾカルミン G (ナカライテスク、京都) で 30 分間媒染した。アニリンエタノールと 1 % 酢酸エタノールで洗浄した後、5 % リンタングステン酸 (ナカライテスク) 水溶液で 60 分間浸漬した。さらにアニリンブルー・オレンジ G (ナカライテスク) 混合液に切片を浸漬して染色し、光学顕微鏡下で観察した。アザン染色の青色の染色強度の評価は Imagej を用いて定量した。

第7項 Cytosporone B の調整と投与方法

Cytosporone B (10 mg/kg、SIGMA) をエタノールおよびコーンオイル (和光純薬) を用いて溶解し、滅菌 PBS を用いて希釈したものを実験開始時から 2 週間 48 時間間隔で腹腔内投与した。

第8項 歯肉増殖症の肉眼的評価

歯肉肥厚の程度は GOD で評価した (第2章、第2節参照)。

第3節 結果

第1項 絹糸結紮の影響

1 週間の絹糸結紮は歯肉結合組織中の *Tgfb*、*Col1*、*Pai1*、*Nr4a1* の mRNA 発現を無刺激群と比較して有意に上昇させた (図 10 a, b、図 13 a-c)。

絹糸結紮群の歯肉結合組織中の TGF- β の発現は、免疫組織化学で細胞外基質中に認められ、その発現は無刺激群と比較して明らかな増加を認めた (図 11 a, b)。

また、絹糸結紮群において歯肉結合組織中の Smad2 のリン酸化は、無刺激群と比較して有意に促進した (図 12 a, b)。

第2項 Cyclosporine A 投与による歯肉組織中の TGF- β 標的分子の mRNA 発現の変化

1. Cyclosporine A 投与開始 4 週間後の所見

絹糸結紮 1 週間後から CsA を 4 週間投与した群では絹糸結紮のみの群と比較し *Col1* で有意な発現の上昇、*Pai1* で上昇傾向を認めた (図 14 b, c) が、*Nr4a1* は明らかな変化を認めなかった (図 14 a)。またアザン染色では無刺激群、絹糸結紮群と比較し、絹糸結紮後 CsA を投与した群で有意なコラーゲンの蓄積を認めた (図 15 a-d)。

2. Cyclosporine A 投与開始 1 週間後の所見

CsA 投与による NR4A1 の発現への影響を検討するため、絹糸結紮 1 週間後から CsA を 1 週間投与した組織について mRNA 発現とタンパク発現を解析した。*Nr4a1* の mRNA 発現は無刺激群と比較し絹糸結紮群で有意に上昇したが、CsA 投与群では発現は上昇しなかった (図 16 a, b)。蛍光免疫染色で第二臼歯周囲の歯肉を観察すると、歯肉結合組織中の NR4A1 は絹糸結紮群では細胞質、核内ともに強い発現を認めたが、CsA 投与群では発現の有意な減少と核内への移行の抑制が観察された (図 17 a, b)。

第 3 項 Cytosporone B 投与による歯肉増殖と NR4A1 の関与の検討

マウスに 2 週間 48 時間間隔で Cytosporone B (10 mg/kg) を腹腔内投与すると、CsA による *Nr4a1* の mRNA 発現の減少は抑制された (図 18)。Cytosporone B (10 mg/kg) 投与群では、CsA による第二臼歯周囲歯肉の顕著な肥厚は認めなかった (図 19 b)。また GOD は Cytosporone B 投与群で有意に抑制された (図 19 c)。

第 4 節 考 察

NR4A1 は細胞への刺激に対し速やかに応答する最初期遺伝子として知られている (Cell Signaling Technology PhosphoSitePlus から引用)。最初期遺伝子とは、シグナルが細胞内へ伝わると、既に細胞内に存在する因子のみを用いて速やかに、かつ一過性に転写が引き起こされる遺伝子群の総称である。過去の報告では最初期遺伝子の転写開始機構として、電位依存性カルシウムイオンチャネルを介して細胞外から流入したカルシウムイオンがカルシウム・カルモジュリン依存性キナーゼ経路を活性化させ、カルシウム依存性フォスファターゼ

であるカルシニューリンの脱リン酸化活性によるものが示唆されている [39, 40]。

本実験で、マウスの歯周組織に絹糸結紮による炎症を惹起させると TGF- β の mRNA 発現の上昇と歯肉結合組織中のタンパク発現の上昇を認めた。これまでに歯周組織に炎症が起きると炎症周囲の上皮細胞、線維芽細胞、血小板あるいは免疫担当細胞が TGF- β を産生することが知られている [41]。このことから、本研究で作製した CsA 誘導性増殖症マウスモデルにおいて、絹糸結紮で誘導または活性化された上記の細胞が TGF- β を産生している可能性がある。また、歯肉結合組織中の Smad2 のリン酸化は上昇していた。このことは、炎症によって発現が上昇した TGF- β が細胞内にシグナルを入力したことを意味する。さらに、絹糸結紮 2 週間まで TGF- β の標的遺伝子である *Pai1*, *Col1* そして *Nr4a1* の mRNA 発現が無刺激群と比較して一過性に上昇するが、5 週間では無刺激群と同程度まで減少していた。過去の報告では一過性に発現が上昇した NR4A1 は TGF- β の負のフィードバック機構を促進し、活性化した TGF- β シグナルを抑制して組織の恒常性を維持する [16]。絹糸結紮歯周炎モデルマウスの歯肉組織でも、一過性に上昇した *Nr4a1* が TGF- β の負のフィードバック機構を促進することで *Col1* や *Pai1* といった遺伝子発現を制御していることが示唆される。

絹糸結紮 1 週間後に CsA をマウスに腹腔内投与すると、投与 4 週間目（増殖症発症後）では、TGF- β 標的遺伝子である *Col1*, *Pai1* の発現上昇を維持し、歯肉結合組織中のコラーゲンの蓄積を促進した。一方で NR4A1 の発現は無刺激群、絹糸結紮群と比較して変化は認められなかった。また、増殖症発症前段階である CsA 投与開始 1 週間後の歯肉組織中の *Nr4a1* の mRNA 発現は、CsA 投与群では絹糸結紮群と比較して抑制されていた。タンパクレベルでも、組織学的観察でマウスの歯肉結合組織中で NR4A1 の発現量に同様の傾向を認めた。すなわち、CsA が絹糸結紮による *Nr4a1* の mRNA の発現上昇を抑制することで、TGF- β の負のフィードバック機構が破綻し、以降の TGF- β シグナルが過剰となり、歯肉結合組織中のコラーゲンの過剰な蓄積が生じて増殖症が発症することが示唆された。さらに、CsA 投与は歯肉結合組織中の NR4A1 の核内への移行を抑制していた。NR4A1 が機能するためには NR4A1 が核内へ移行する必要がある。過去の報告によれば、NR4A1 の機能抑制は HDAC を介したエピジェネティックなサイレンシング、または Akt を介した NR4A1 のリン酸化が関与している [16, 42, 43]。本増殖症モデルにおいても CsA が NR4A1 のリン酸化を

促進し、核内への移行を抑制することで NR4A1 の機能を制御している可能性もある。

Cytosporone B は NR4A1 のアゴニストであり NR4A1 のリガンド結合ドメインに結合することで自身の mRNA 発現も上昇させる[44]。さらに Cytosporone B は過去に肺線維症モデルマウスや全身性強皮症マウスにおいて線維化を抑制する効果が示唆されている [16]。本研究でマウスに 2 週間 48 時間間隔で Cytosporone B を腹腔内投与すると、予想されたように歯肉結合組織中の *Nr4a1* の mRNA 発現は CsA 投与群と比較して上昇した。さらに、CsA 誘導性増殖症モデルマウスに Cytosporone B を投与すると GOD は有意に抑制された。このことから、本実験で確立した CsA 誘導性増殖症モデルの発症早期に歯肉組織中の NR4A1 発現を抑制することが増殖症の発症において重要であることが示唆された。Cytosporone B は糖新生やがん細胞のアポトーシスに影響を与えるなど、全身への影響が重篤であることから[45-47]、増殖症の治療薬として使用することは現時点で適切ではない。本研究で明らかになったメカニズムを踏まえ、今後既に臨床応用されている薬剤から、NR4A1 の発現を上昇させる薬剤を探索することでより理想的な増殖症治療薬の開発が可能となると考えられる。

本研究から得られた結果からさらに詳細なメカニズムが解明されれば、CsA だけでなく Phenytoin や Nifedipine が誘導する増殖症のメカニズム解明につながると思われる。Nifedipine が NFAT の核内移行を抑制することや、*Nr4a1* の転写を抑制することが知られている[48, 49]。したがって、本研究と同様のメカニズムで他の薬剤でも増殖症が発症している可能性がある。さらに臨床的には増殖症を発症しやすい患者の予測や患者の遺伝的背景に応じた投薬内容の決定について治療前に医科歯科の連携を行うことが可能となり、安全性が高く患者にとって負担の少ない医療の提供に貢献できると考える。

第5章 総括

薬物性歯肉増殖症の分子メカニズム解明のために、1. 増殖症マウスモデルの作製、2. カルシニューリン阻害作用が増殖症の発症に与える影響の解析、3. CsA 誘導性増殖症マウスモデルを用いた NR4A1 に着目した増殖症のメカニズム解明の実験を行った結果を以下にまとめる。

1. 増殖症マウスモデルの作製

- 1) 絹糸結紮マウスモデルに CsA を 4 週間毎日腹腔内投与することで、絹糸周囲に顕著な歯肉肥厚を認めた。
- 2) Phenytoin および Nifedipine 投与では増殖症は発症しなかった。
- 3) 組織学的所見において、絹糸周囲の歯肉結合組織中のコラーゲン線維の蓄積を伴う歯肉の増殖を認めた。
- 4) 絹糸の太さが増殖症の程度に影響を与えた。
- 5) 抗菌薬を投与して歯周炎を抑制すると、増殖症の程度も抑制された。
- 6) CsA の投与を中止すると、増殖症の程度は改善した。

2. カルシニューリン阻害作用が増殖症の発症に与える影響の解析

- 1) FK506 投与で増殖症は発症し、Mizoribine では増殖症は発症しなかった。
- 2) 組織学的所見で、FK506 投与マウスで CsA 誘導性増殖症モデルマウスと同様の所見を認めた。

3. CsA 誘導性増殖症マウスモデルを用いた NR4A1 に着目した増殖症のメカニズム解明

- 1) 絹糸結紮 1 週間後の歯肉組織中の TGF- β は無刺激群と比較し mRNA 発現、タンパク発現ともに統計学的に有意に増加した。またその標的遺伝子の *Nr4a1*, *Pai1*, *Col1* は無刺激群と比較し統計学的に有意に増加した。
- 2) 絹糸結紮 1 週間後の Smad2 のリン酸化は無刺激群と比較し統計学的に有意に増加した。

- 3) 絹糸結紮後 4 週間 CsA を投与した組織では絹糸結紮のみの群と比較し *Pai1* および *Col1* の mRNA 発現が統計学的に有意な上昇を維持した。
- 4) 絹糸結紮後 1 週間 CsA を投与した組織では絹糸結紮のみの群と比較し *Nr4a1* の mRNA 発現が統計学的に有意に抑制された。また、歯肉結合組織中の NR4A1 のタンパク発現は絹糸結紮群と比較し統計学的有意に抑制され、さらに核内への移行が抑制された。
- 5) 絹糸結紮時から Cytosporone-B を腹腔内投与すると、歯肉組織中の *Nr4a1* の mRNA 発現は上昇した。また、Cytosporone B は CsA 投与開始 4 週後の GOD を統計学的に有意に抑制させた。

本研究の結果から、歯周炎存在下で CsA を投与することによって増殖症が発症する CsA 誘導性増殖症モデルマウスを確立した。このマウスモデルを用いて CsA のカルシニューリン阻害作用が歯肉増殖症の発症において重要であることを示した。さらに、CsA が歯肉組織中の NR4A1 の発現を抑制し TGF- β のネガティブフィードバック機構を破綻させ、コラーゲンの過剰産生を維持させ、歯肉増殖症を発症させていることを示唆した。

参考文献

- [1] P.C. Trackman, A. Kantarci, Connective tissue metabolism and gingival overgrowth, *Crit Rev Oral Biol Med* 15(3) (2004) 165-75.
- [2] P.C. Trackman, A. Kantarci, Molecular and clinical aspects of drug-induced gingival overgrowth, *J Dent Res* 94(4) (2015) 540-6.
- [3] R.A. Seymour, J.M. Thomason, J.S. Ellis, The pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth, *J Clin Periodontol* 23(3 Pt 1) (1996) 165-75.
- [4] D.W. Thomas, R.G. Newcombe, G.R. Osborne, Risk factors in the development of cyclosporine-induced gingival overgrowth, *Transplantation* 69(4) (2000) 522-6.
- [5] S.R. KOREY, Effect of dilantin and mesantoin on the giant axon of the squid, *Proc Soc Exp Biol Med* 76(2) (1951) 297-9.
- [6] D.W. ESPLIN, Effects of diphenylhydantoin on synaptic transmission in cat spinal cord and stellate ganglion, *J Pharmacol Exp Ther* 120(3) (1957) 301-23.
- [7] A. Fleckenstein, H. Tritthart, H.J. Döring, K.Y. Byon, [BAY a 1040--a highly potent Ca ++ -antagonistic inhibitor of electro-mechanical coupling processes in mammalian myocardium], *Arzneimittelforschung* 22(1) (1972) 22-33.
- [8] M. Samaniego, B.N. Becker, A. Djamali, Drug insight: maintenance immunosuppression in kidney transplant recipients, *Nat Clin Pract Nephrol* 2(12) (2006) 688-99.
- [9] G. Bader, S. Lejeune, M. Messner, Reduction of cyclosporine-induced gingival overgrowth following a change to tacrolimus. A case history involving a liver transplant patient, *J Periodontol* 69(6) (1998) 729-32.
- [10] A. Khocht, L.C. Schneider, Periodontal management of gingival overgrowth in the heart transplant patient: a case report, *J Periodontol* 68(11) (1997) 1140-6.
- [11] H.E. Pernu, L.M. Pernu, M.L. Knuutila, Effect of periodontal treatment on gingival overgrowth among cyclosporine A-treated renal transplant

- recipients, *J Periodontol* 64(11) (1993) 1098-100.
- [12] H. Ishida, T. Kondoh, M. Kataoka, S. Nishikawa, T. Nakagawa, I. Morisaki, J. Kido, T. Oka, T. Nagata, Factors influencing nifedipine-induced gingival overgrowth in rats, *J Periodontol* 66(5) (1995) 345-50.
- [13] S.M. Jean, P. Sharma, D. Taylor, D. Mook, Cyclosporine-induced gingival overgrowth in New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), *Comp Med* 59(4) (2009) 357-62.
- [14] H.S. Nam, J.F. McAnulty, H.H. Kwak, B.I. Yoon, C. Hyun, W.H. Kim, H.M. Woo, Gingival overgrowth in dogs associated with clinically relevant cyclosporine blood levels: observations in a canine renal transplantation model, *Vet Surg* 37(3) (2008) 247-53.
- [15] G.L. Pilatti, J.E. Sampaio, The influence of chlorhexidine on the severity of cyclosporin A-induced gingival overgrowth, *J Periodontol* 68(9) (1997) 900-4.
- [16] K. Palumbo-Zerr, P. Zerr, A. Distler, J. Fliehr, R. Mancuso, J. Huang, D. Mielenz, M. Tomcik, B.G. Fürnrohr, C. Scholtysek, C. Dees, C. Beyer, G. Krönke, D. Metzger, O. Distler, G. Schett, J.H. Distler, Orphan nuclear receptor NR4A1 regulates transforming growth factor- β signaling and fibrosis, *Nat Med* 21(2) (2015) 150-8.
- [17] T. Abe, G. Hajishengallis, Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice, *J Immunol Methods* 394(1-2) (2013) 49-54.
- [18] S. Rakoff-Nahoum, J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, R. Medzhitov, Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis, *Cell* 118(2) (2004) 229-41.
- [19] G. Wright, R.R. Welbury, M.T. Hosey, Cyclosporin-induced gingival overgrowth in children, *Int J Paediatr Dent* 15(6) (2005) 403-11.
- [20] P.C. Trackman, A. Kantarci, Molecular and clinical aspects of drug-induced gingival overgrowth, *J Dent Res* 94(4) (2015) 540-6.
- [21] E.M. Shevach, The effects of cyclosporin A on the immune system, *Annu Rev Immunol* 3 (1985) 397-423.
- [22] S.L. Schreiber, G.R. Crabtree, The mechanism of action of cyclosporin A and FK506, *Immunol Today* 13(4) (1992) 136-42.

- [23] M. Samaniego, B.N. Becker, A. Djamali, Drug insight: maintenance immunosuppression in kidney transplant recipients, *Nat Clin Pract Nephrol* 2(12) (2006) 688-99.
- [24] E.M. Rateitschak-Pluss, A. Hefti, K.H. Rateitschak, [Gingival hyperplasia from cyclosporin A medication], *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 93(1) (1983) 57-65.
- [25] G.P. Wysocki, H.A. Gretzinger, A. Laupacis, R.A. Ulan, C.R. Stiller, Fibrous hyperplasia of the gingiva: a side effect of cyclosporin A therapy, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 55(3) (1983) 274-8.
- [26] G.L. Deliliers, F. Santoro, N. Polli, E. Bruno, L. Fumagalli, E. Risciotti, Light and electron microscopic study of cyclosporin A-induced gingival hyperplasia, *J Periodontol* 57(12) (1986) 771-5.
- [27] M. Kataoka, Y. Shimizu, K. Kunikiyo, Y. Asahara, K. Yamashita, M. Ninomiya, I. Morisaki, Y. Ohsaki, J.I. Kido, T. Nagata, Cyclosporin A decreases the degradation of type I collagen in rat gingival overgrowth, *J Cell Physiol* 182(3) (2000) 351-8.
- [28] J.L. Gooch, B.R. Roberts, S.L. Cobbs, J.A. Tumlin, Loss of the alpha-isoform of calcineurin is sufficient to induce nephrotoxicity and altered expression of transforming growth factor-beta, *Transplantation* 83(4) (2007) 439-47.
- [29] F. de Oliveira Costa, S. Diniz Ferreira, L.O. de Miranda Cota, J.E. da Costa, M.A. Aguiar, Prevalence, severity, and risk variables associated with gingival overgrowth in renal transplant subjects treated under tacrolimus or cyclosporin regimens, *J Periodontol* 77(6) (2006) 969-75.
- [30] J.S. Ellis, R.A. Seymour, J.J. Taylor, J.M. Thomason, Prevalence of gingival overgrowth in transplant patients immunosuppressed with tacrolimus, *J Clin Periodontol* 31(2) (2004) 126-31.
- [31] J.A. James, S. Boomer, A.P. Maxwell, P.S. Hull, C.D. Short, B.A. Campbell, R.W. Johnson, C.R. Irwin, J.J. Marley, H. Spratt, G.J. Linden, Reduction in gingival overgrowth associated with conversion from cyclosporin A to tacrolimus, *J Clin Periodontol* 27(2) (2000) 144-8.
- [32] C.A. Nassar, P.O. Nassar, D.C. Andia, M.R. Guimarães, L.C. Spolidorio, The effects of up to 240 days of tacrolimus therapy on the gingival tissues of

- rats--a morphological evaluation, *Oral Dis* 14(1) (2008) 67-72.
- [33] A. Prabhu, D.S. Mehta, A morphologic comparison of gingival changes influenced by cyclosporin and tacrolimus in rats: an experimental study, *J Periodontol* 77(2) (2006) 265-70.
- [34] J.A. James, S. Jamal, P.S. Hull, T.V. Macfarlane, B.A. Campbell, R.W. Johnson, C.D. Short, Tacrolimus is not associated with gingival overgrowth in renal transplant patients, *J Clin Periodontol* 28(9) (2001) 848-52.
- [35] L.C. Spolidorio, M. Holzhausen, D.M. Spolidorio, C.A. Nassar, P.O. Nassar, M.N. Muscará, Cyclosporin but not tacrolimus significantly increases salivary cytokine contents in rats, *J Periodontol* 76(9) (2005) 1520-5.
- [36] A. Khanna, M. Plummer, C. Bromberek, B. Bresnahan, S. Hariharan, Expression of TGF-beta and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity, *Kidney Int* 62(6) (2002) 2257-63.
- [37] M. Wu, D.S. Melichian, E. Chang, M. Warner-Blankenship, A.K. Ghosh, J. Varga, Rosiglitazone abrogates bleomycin-induced scleroderma and blocks profibrotic responses through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, *Am J Pathol* 174(2) (2009) 519-33.
- [38] F. Zhou, Y. Drabsch, T.J. Dekker, A.G. de Vinuesa, Y. Li, L.J. Hawinkels, K.A. Sheppard, M.J. Goumans, R.B. Luwor, C.J. de Vries, W.E. Mesker, R.A. Tollenaar, P. Devilee, C.X. Lu, H. Zhu, L. Zhang, P.T. Dijke, Nuclear receptor NR4A1 promotes breast cancer invasion and metastasis by activating TGF- β signalling, *Nat Commun* 5 (2014) 3388.
- [39] H.B. Machado, L.J. Vician, H.R. Herschman, The MAPK pathway is required for depolarization-induced "promiscuous" immediate-early gene expression but not for depolarization-restricted immediate-early gene expression in neurons, *J Neurosci Res* 86(3) (2008) 593-602.
- [40] B.Y. Lam, W. Zhang, N. Enticknap, E. Haggis, M.Z. Cader, S. Chawla, Inverse regulation of plasticity-related immediate early genes by calcineurin in hippocampal neurons, *J Biol Chem* 284(18) (2009) 12562-71.
- [41] G. Matarese, G. Isola, G.P. Anastasi, A. Favaloro, D. Milardi, G. Vermiglio, G. Vita, G. Cordasco, G. Cutroneo, Immunohistochemical analysis

of TGF- β 1 and VEGF in gingival and periodontal tissues: a role of these biomarkers in the pathogenesis of scleroderma and periodontal disease, *Int J Mol Med* 30(3) (2012) 502-8.

[42] H.Z. Chen, Q.F. Liu, L. Li, W.J. Wang, L.M. Yao, M. Yang, B. Liu, W. Chen, Y.Y. Zhan, M.Q. Zhang, J.C. Cai, Z.H. Zheng, S.C. Lin, B.A. Li, Q. Wu, The orphan receptor TR3 suppresses intestinal tumorigenesis in mice by downregulating Wnt signalling, *Gut* 61(5) (2012) 714-24.

[43] J. Chen, W. Fiskus, K. Eaton, P. Fernandez, Y. Wang, R. Rao, P. Lee, R. Joshi, Y. Yang, R. Kolhe, R. Balusu, P. Chappa, K. Natarajan, A. Jillella, P. Atadja, K.N. Bhalla, Cotreatment with BCL-2 antagonist sensitizes cutaneous T-cell lymphoma to lethal action of HDAC7-Nur77-based mechanism, *Blood* 113(17) (2009) 4038-48.

[44] Y. Zhan, X. Du, H. Chen, J. Liu, B. Zhao, D. Huang, G. Li, Q. Xu, M. Zhang, B.C. Weimer, D. Chen, Z. Cheng, L. Zhang, Q. Li, S. Li, Z. Zheng, S. Song, Y. Huang, Z. Ye, W. Su, S.C. Lin, Y. Shen, Q. Wu, Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77, *Nat Chem Biol* 4(9) (2008) 548-56.

[45] M.A. Maxwell, M.E. Cleasby, A. Harding, A. Stark, G.J. Cooney, G.E. Muscat, Nur77 regulates lipolysis in skeletal muscle cells. Evidence for cross-talk between the beta-adrenergic and an orphan nuclear hormone receptor pathway, *J Biol Chem* 280(13) (2005) 12573-84.

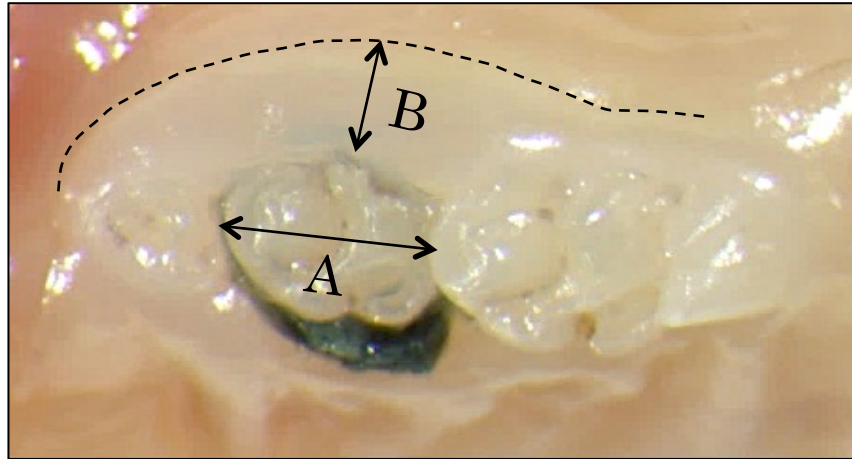
[46] L. Pei, H. Waki, B. Vaitheesvaran, D.C. Wilpitz, I.J. Kurland, P. Tontonoz, NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism, *Nat Med* 12(9) (2006) 1048-55.

[47] S.O. Lee, M. Abdelrahim, K. Yoon, S. Chintharlapalli, S. Papineni, K. Kim, H. Wang, S. Safe, Inactivation of the orphan nuclear receptor TR3/Nur77 inhibits pancreatic cancer cell and tumor growth, *Cancer Res* 70(17) (2010) 6824-36.

[48] H. Gao, F. Wang, W. Wang, C.A. Makarewich, H. Zhang, H. Kubo, R.M. Berretta, L.A. Barr, J.D. Molkenin, S.R. Houser, Ca(2+) influx through L-type Ca(2+) channels and transient receptor potential channels activates pathological hypertrophy signaling, *J Mol Cell Cardiol* 53(5) (2012) 657-67.

[49] D. Kovalovsky, D. Refojo, A.C. Liberman, D. Hochbaum, M.P. Pereda,

O.A. Coso, G.K. Stalla, F. Holsboer, E. Arzt, Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways, *Mol Endocrinol* 16(7) (2002) 1638-51.



$$\text{Gingival Overgrowth Degree (GOD)} = \frac{\text{頬側歯肉幅 (B)}}{\text{上顎第二臼歯の近遠心的副径 (A)}} \times 100$$

図 1. 歯肉組織の定量法

増殖症の程度は頬側歯肉幅の個体間で変動の少ない上顎第二臼歯の近遠心的幅径に対するパーセントを、Gingival Overgrowth Degree (GOD) とした (n=8)。計測には Imagej を用いた。

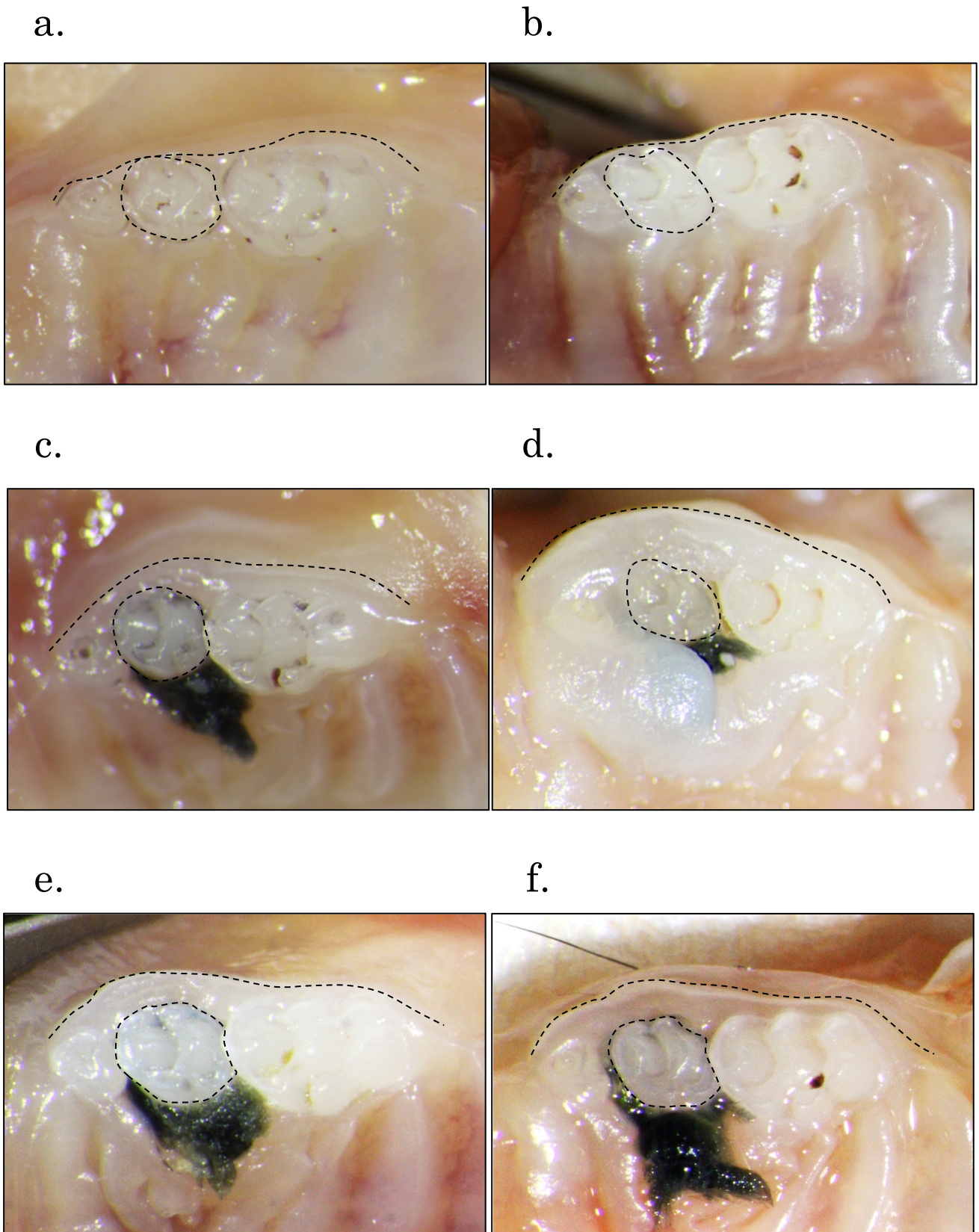


図 2. 薬剤投与による歯肉増殖の評価（上顎第二臼歯の咬合面観）

無刺激群 (a)、CsA 単独投与群 (b) 及び絹糸結紮群 (c) と比較し、絹糸結紮後に CsA を投与した群 (d) において第二臼歯周囲歯肉の顕著な増殖を認めた。Phenytoin (e) 及び Nifedipine (f) を投与した群では、絹糸結紮群と比較し明らかな歯肉増殖を認めなかった。(n=8)

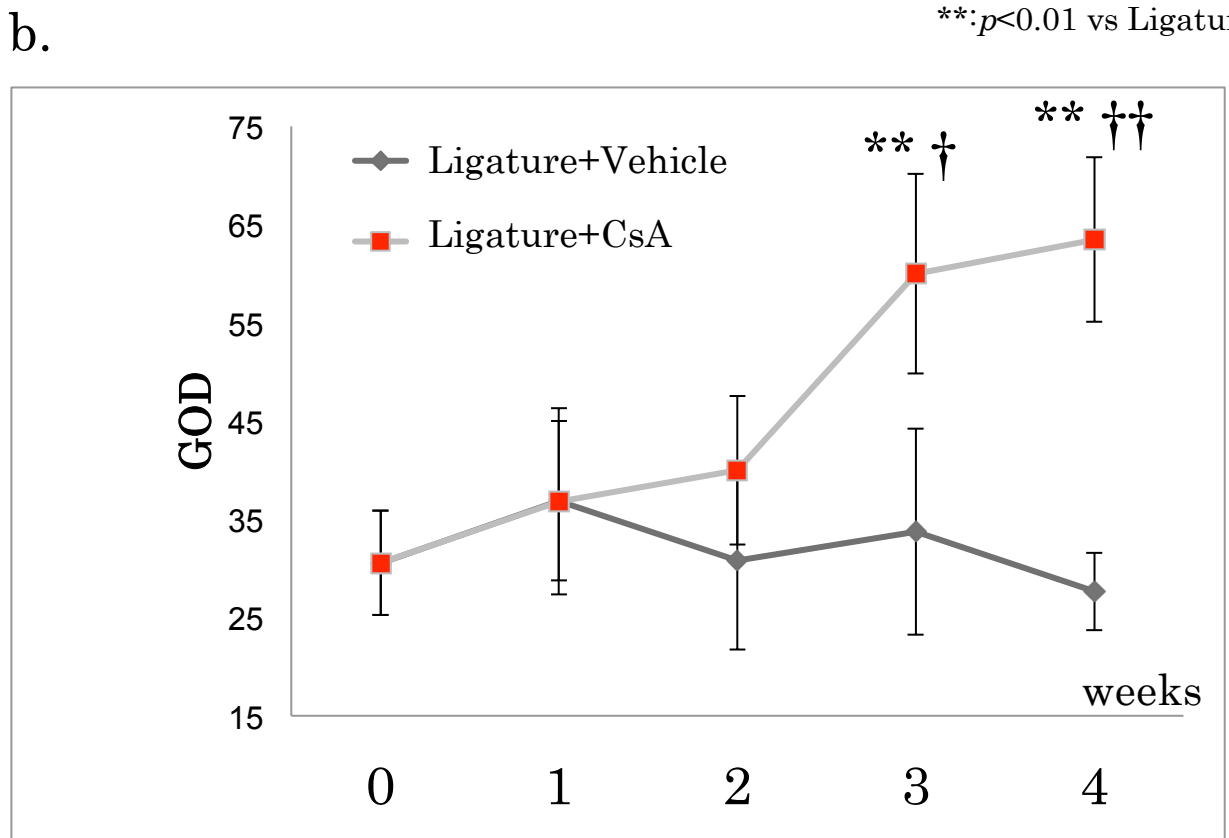
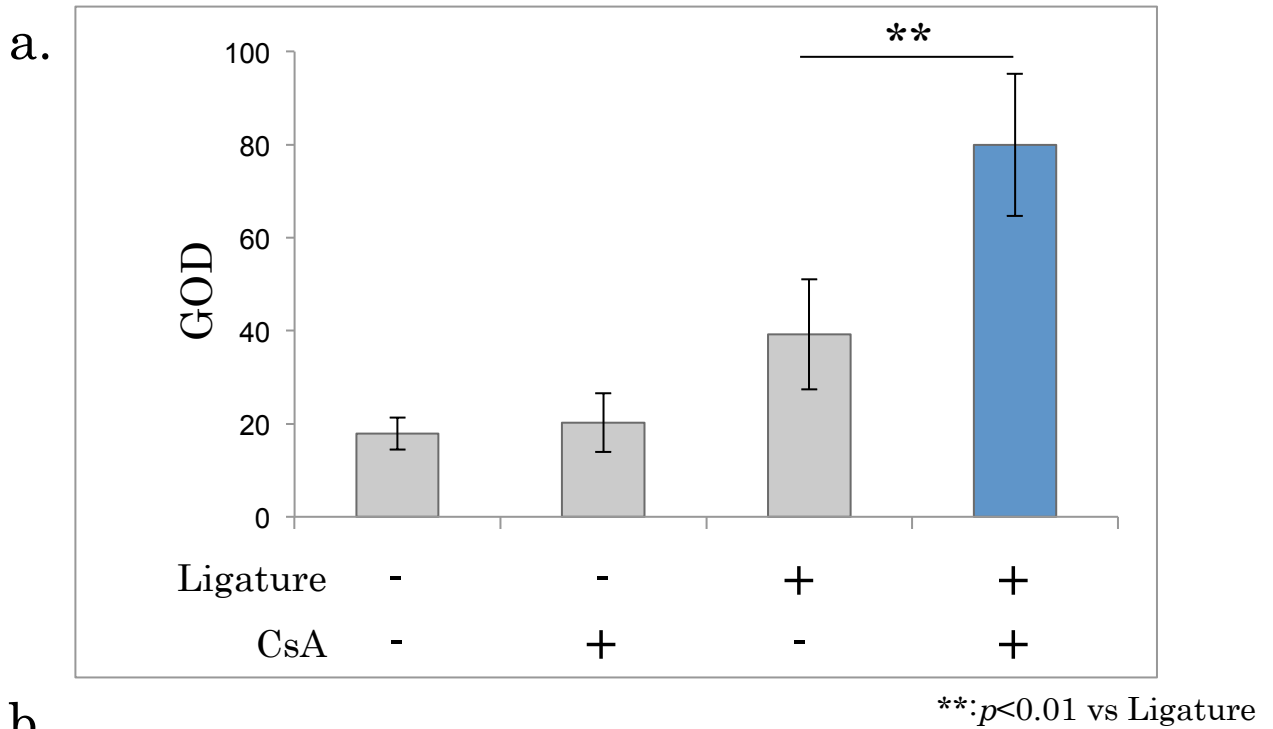


図 3. GOD による増殖症の評価

a. 図 2 a-e GOD は絹糸結紮群と比較して絹糸結紮後 CsA を投与した群で有意に上昇した。(Student's t-test **: $p < 0.01$) (n=8)

b. CsA 投与開始時を 0 週とした 1 週毎のタイムコースを示す。CsA 投与開始時を 0 週とした 1 週間ごとの GOD を比較すると、絹糸結紮 3 週間後から 0 週の群と比較して有意差を認めた。(多重比較検定 **: $p < 0.01$) (n=8)

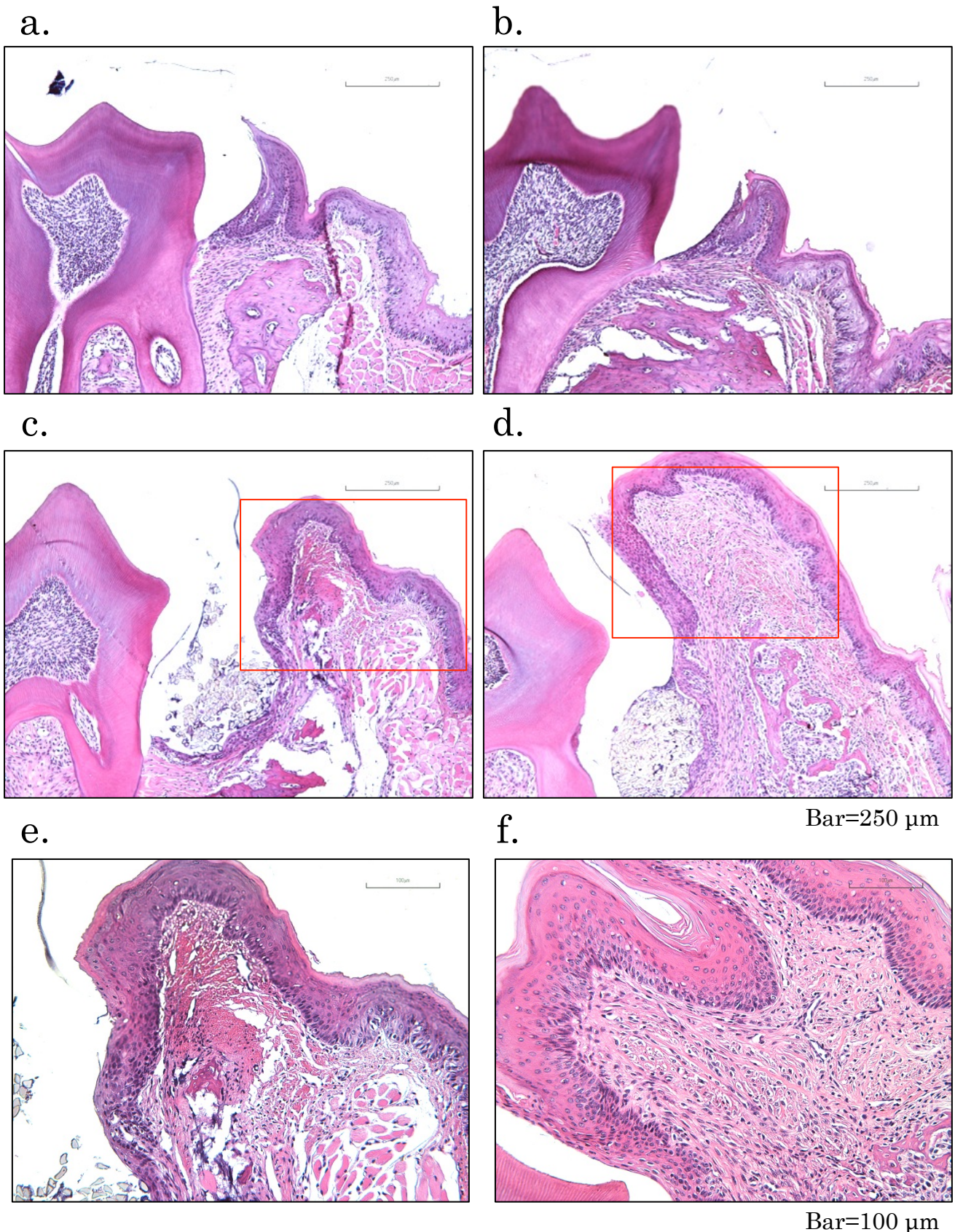
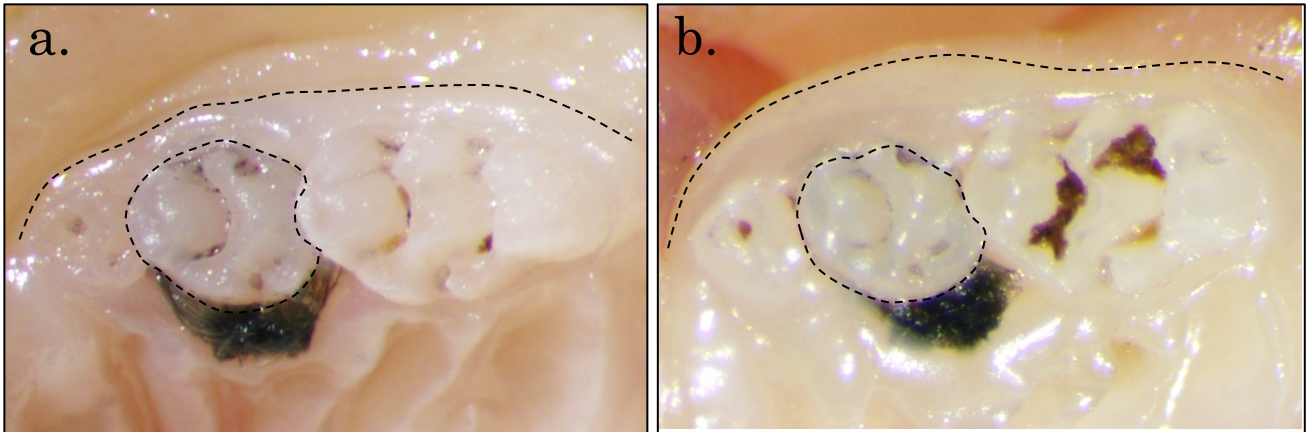


図 4. CsA 投与群の歯肉の組織学的所見 (HE 染色、前頭断)

a. 無刺激群 b. CsA 単独投与群 c. 絹糸結紮群 d. 絹糸結紮後 CsA を投与した群
a-d は 100 倍。e は c の強拡大像 (200 倍)。f は d の強拡大像 (200 倍)。

絹糸結紮後 CsA を投与することによってその他の群 (a-e) と比較し顕著な第二臼歯周囲の頬側歯肉の過形成と、多量の細胞外基質を含む歯肉結合組織の増大を認めた。(n=8)

7-0 絹糸結紮群



5-0 絹糸結紮群

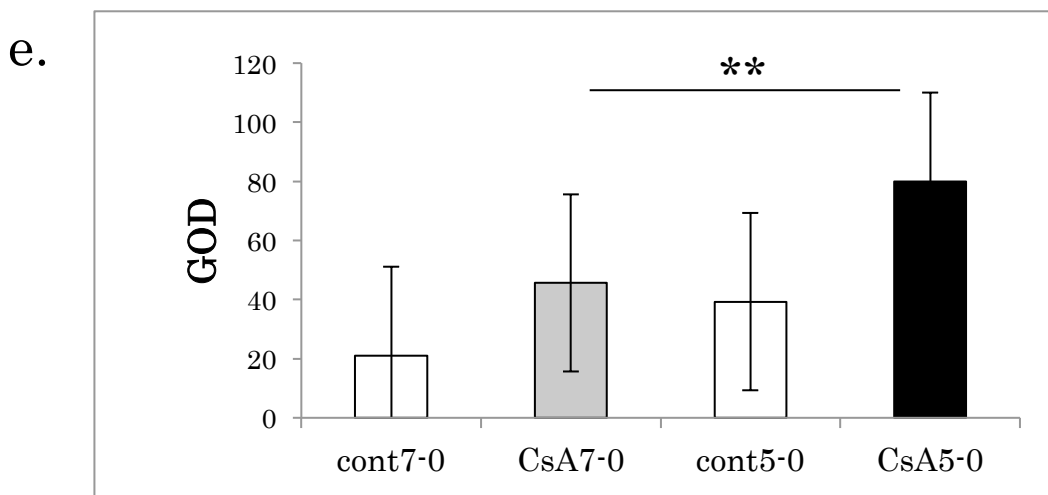
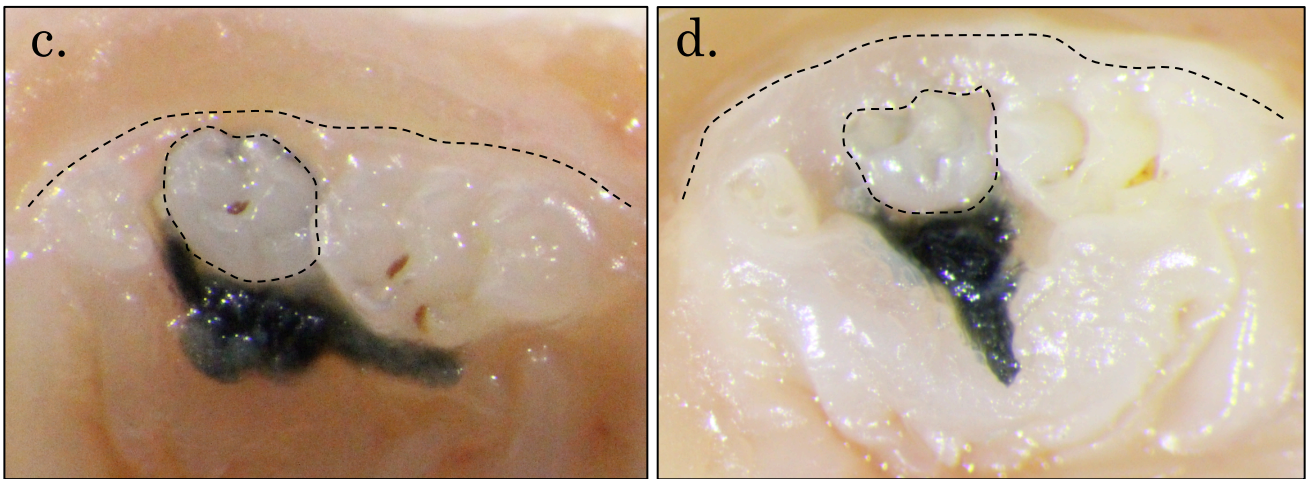


図 5. 絹糸の太さが歯肉増殖に及ぼす影響

**: $p < 0.01$ vs CsA 7-0

a と b は 7-0 絹糸結紮。c と d は 5-0 絹糸結紮。b と d は絹糸結紮後 CsA を投与した。絹糸結紮後 CsA を投与することでその他の群と比較し顕著な第二臼歯周囲の頰側の歯肉増殖を認めた。GOD は 7-0 絹糸結紮後 CsA を投与した群 (b) と比較し 5-0 絹糸結紮後 CsA を投与した群 (d) で有意に高かった (e)。 (Student's t-test **: $p < 0.01$) (n=8)

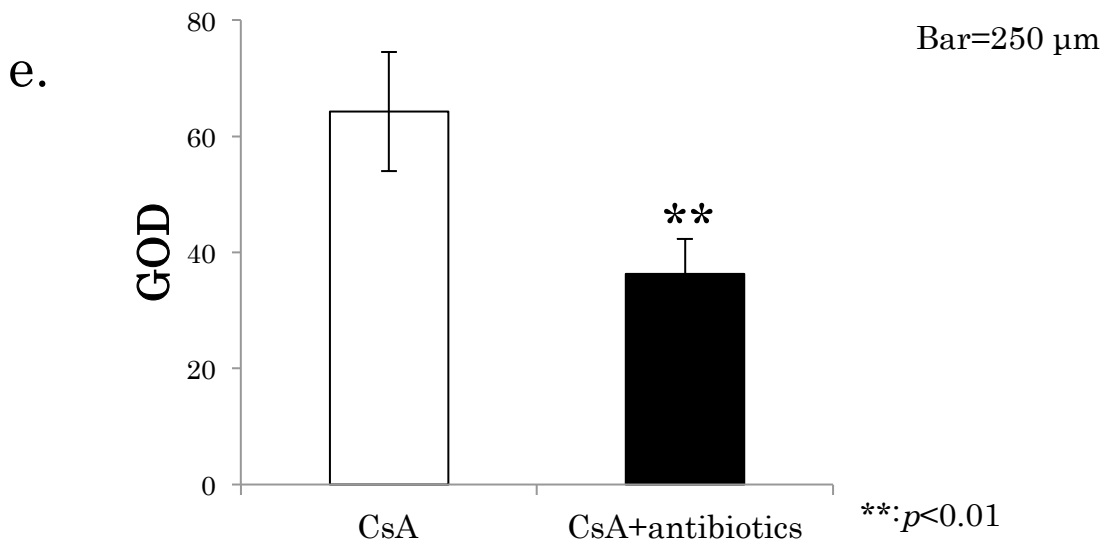
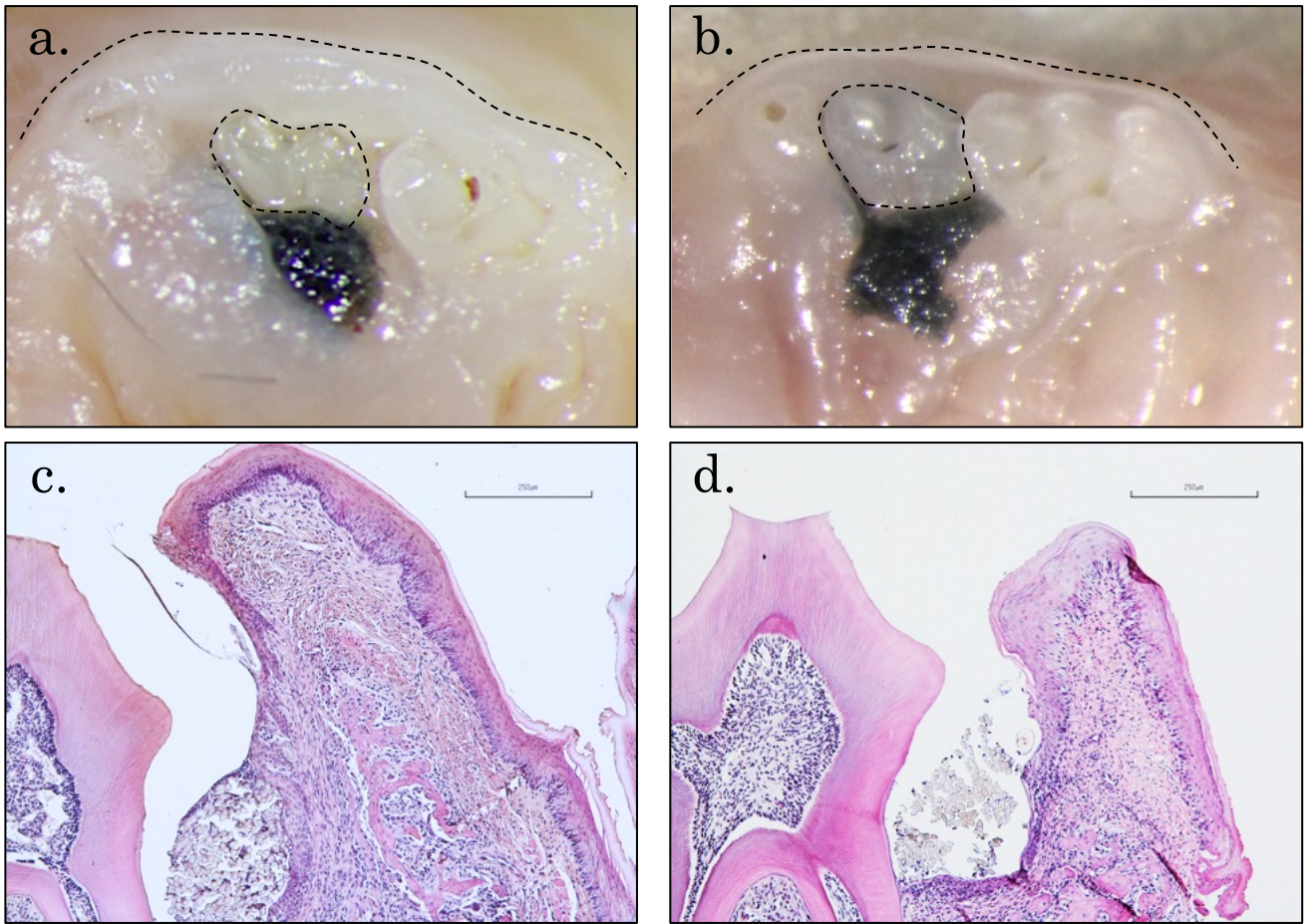


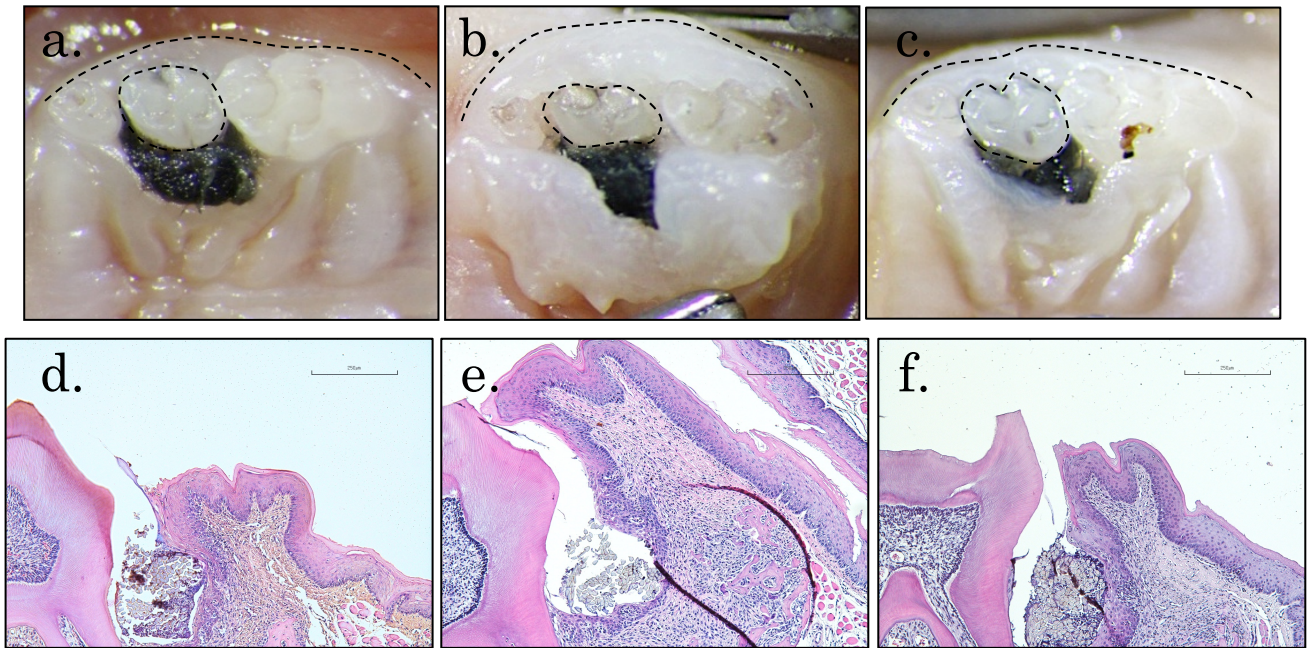
図 6. 抗菌薬投与が歯肉増殖に及ぼす影響

a. 絹糸結紮後に CsA を投与 b. 抗菌薬投与下で絹糸結紮後 CsA を投与

c と d は a と b のそれぞれの組織像 (HE 染色、100 倍)。

抗菌薬非投与群 (a) と比較して、抗菌薬投与群 (b) は肉眼的観察において明らかに歯肉肥厚を抑制させ、GOD を有意に低下させた (e)。組織学的観察において、抗菌薬投与群 (d) は歯肉結合組織の増大を抗菌薬非投与群 (c) と比較し顕著に抑制させた。

(Student's t-test **: $p < 0.01$) (n=8)



Bar=250 μm

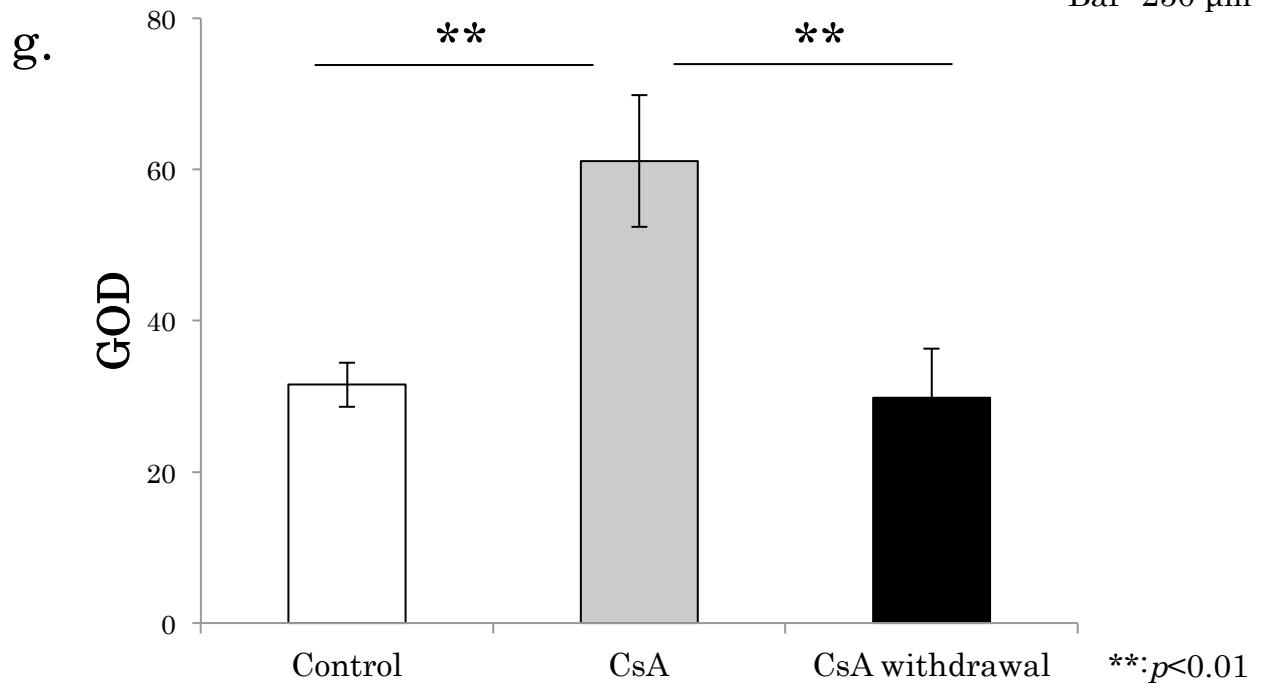


図 7. 薬剤投与中止が歯肉増殖に及ぼす影響

a. 絹糸結紮群 b. 絹糸結紮後解析まで CsA の投与を継続した群 c. 休薬期間を設けた群 d-f はそれぞれの組織像 (HE 染色、100 倍)。

絹糸結紮後解析時まで CsA の投与を継続した群 (b) では結紮絹糸周囲歯肉に高度な肥厚を認めたが、休薬期間を設けた群 (c) では歯肉肥厚の程度は明らかに軽減していた。

GOD は、CsA 投与を継続した群は絹糸結紮群と比較し有意な上昇を認めたが、休薬期間を設けた群は絹糸結紮群と同程度まで GOD が低下した (g)。組織学的観察において、解析まで CsA の投与を継続した群で歯肉結合組織の増大が観察されたが、CsA の休薬期間を設けた群では歯肉結合組織の明らかな増大は認めなかった (d-f)。

(多重比較検定 **: $p < 0.01$) (n=8)

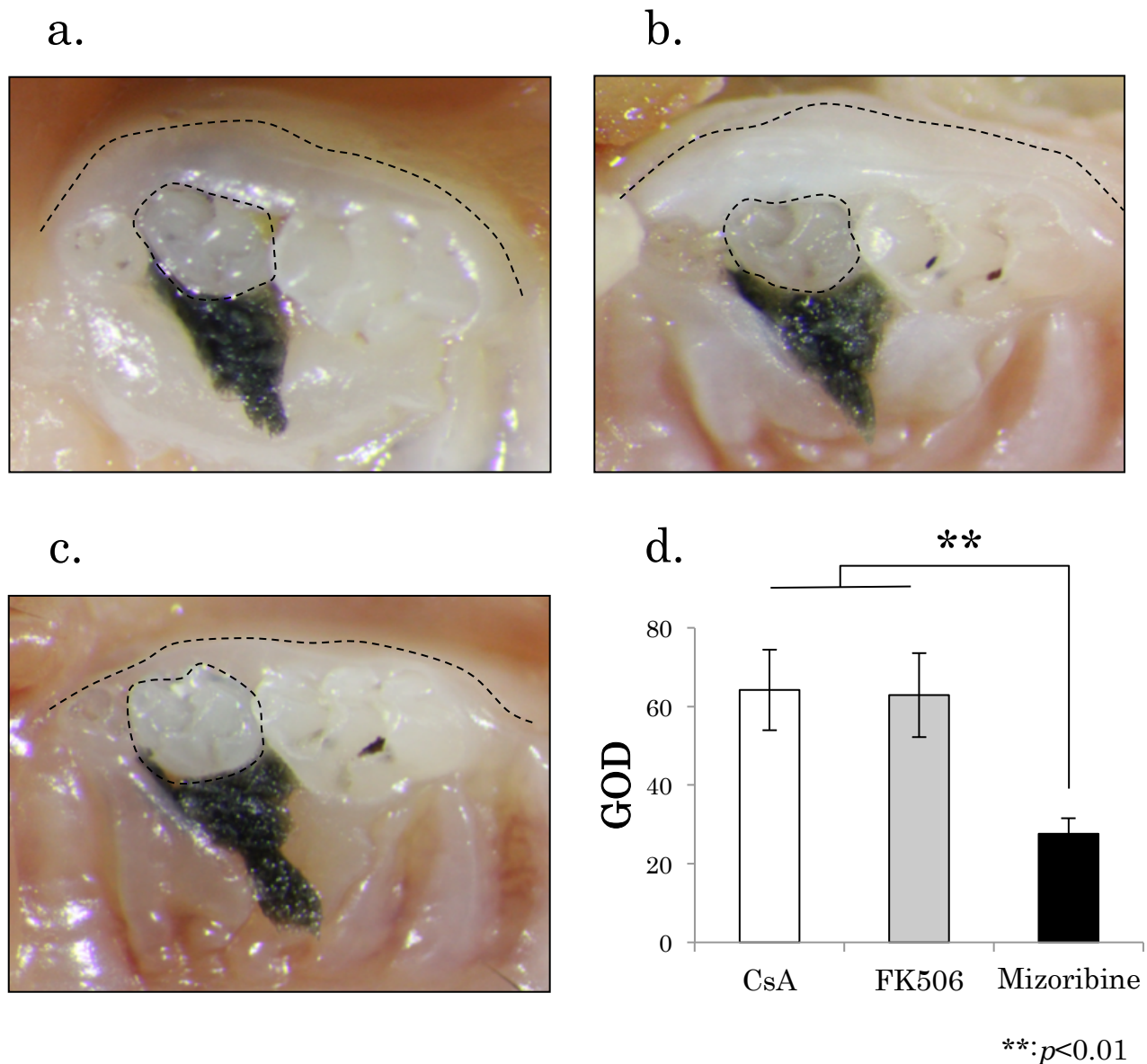


図 8. カルシニューリン阻害薬が歯肉増殖に及ぼす影響の検討 (肉眼的所見)

a. 絹糸結紮後 CsA を投与した群 b. 絹糸結紮後 FK506 を投与した群 c. 絹糸結紮後 Mizoribine を投与した群

絹糸結紮群と比較し、CsA 投与群 (a)、FK506 投与群 (b) で上顎第二臼歯周囲頬側の歯肉増殖を認めた。両者とも増殖した歯肉は第二臼歯の歯冠の一部を被覆した。Mizoribine 投与群 (c) では対照群の絹糸結紮群と比較し明らかな変化を認めなかった。

GOD は CsA 投与群、FK506 投与群と比較し Mizoribine 投与群で有意に低下した (d)。(多重比較検定 **: $p < 0.01$) (n=8)

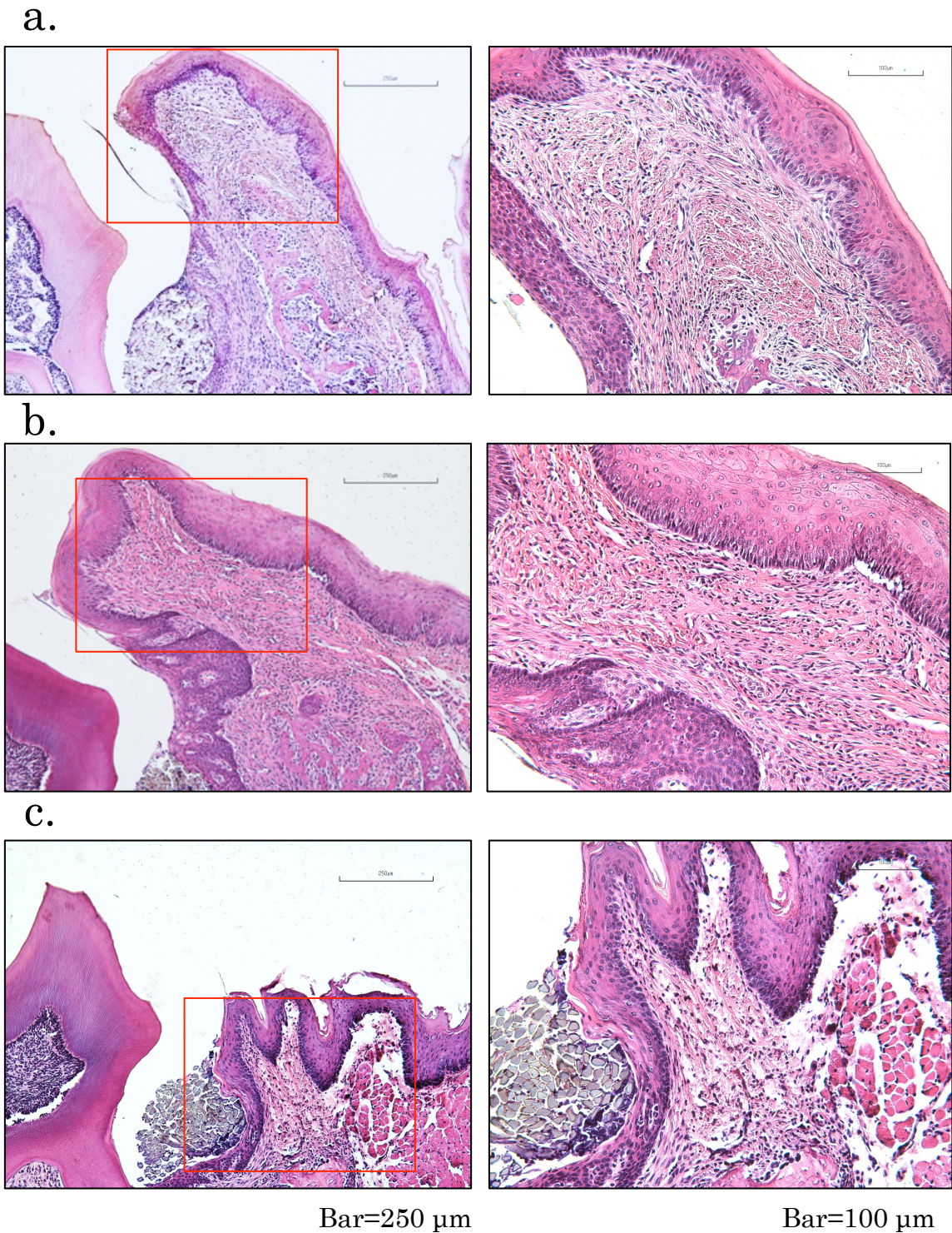


図 9. カルシニューリン阻害薬が増殖症に及ぼす影響の検討（組織学的所見）

a. 絹糸結紮後 CsA を投与した群 b. 絹糸結紮後 FK506 を投与した群 c. 絹糸結紮後 Mizoribine を投与した群。左は 100 倍、右は強拡大像（200 倍）。

上顎第二臼歯周囲の HE 染色像において、CsA 投与群 (a) および FK506 投与群 (b) で著明な歯肉の過形成と、多量の細胞外基質を含む歯肉結合組織の増大を認めた。上皮は明らかな肥厚を認めなかった。強拡大像で絹糸周囲歯肉の炎症性細胞浸潤は軽度であった。Mizoribine 投与群 (c) においても同部位の炎症性細胞浸潤は軽度であったが、明らかな歯肉結合組織の増大は認めなかった。(n=8)

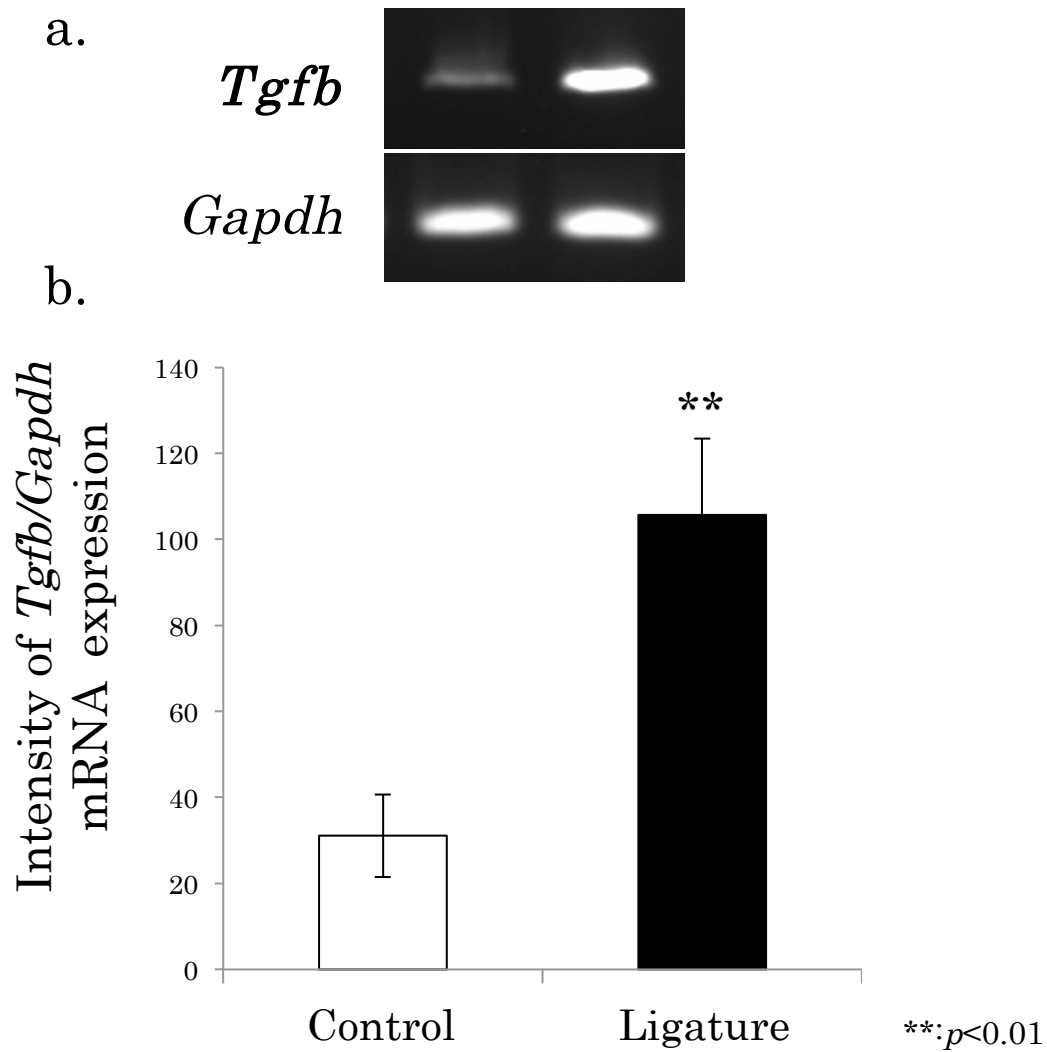


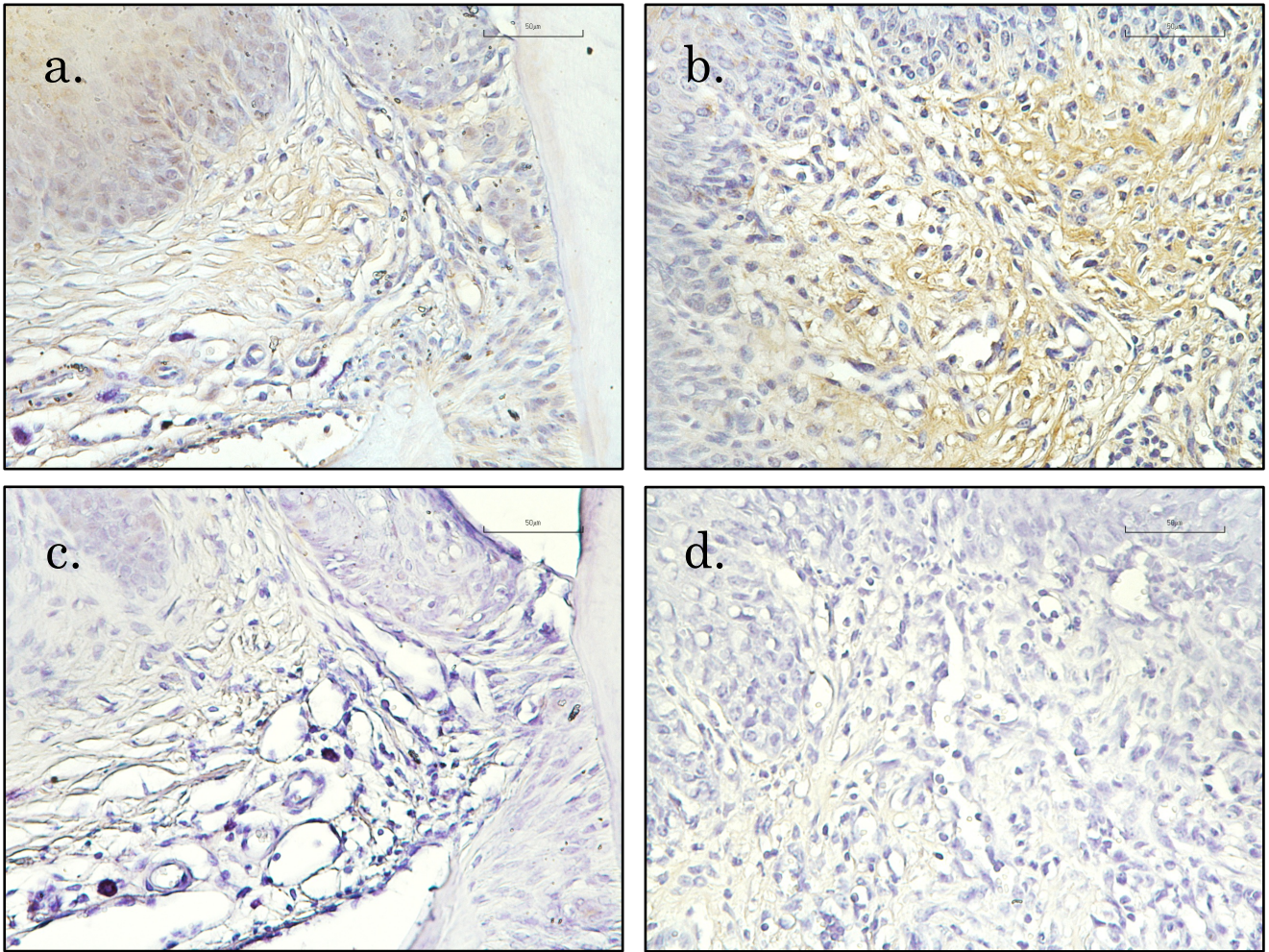
図 10. 絹糸結紮の影響 (*Tgfb* の mRNA 発現)

a. *Tgfb* の mRNA 発現をバンドで示す。

b. a. で得た結果を定量化し、グラフにした結果を示す。

1 週間の絹糸結紮は歯肉結合組織中の *Tgfb* の mRNA 発現を無刺激群と比較して有意に上昇させた (a, b)。

(Student's t-test **: $p < 0.01$) (n=4)



Bar=50 μm

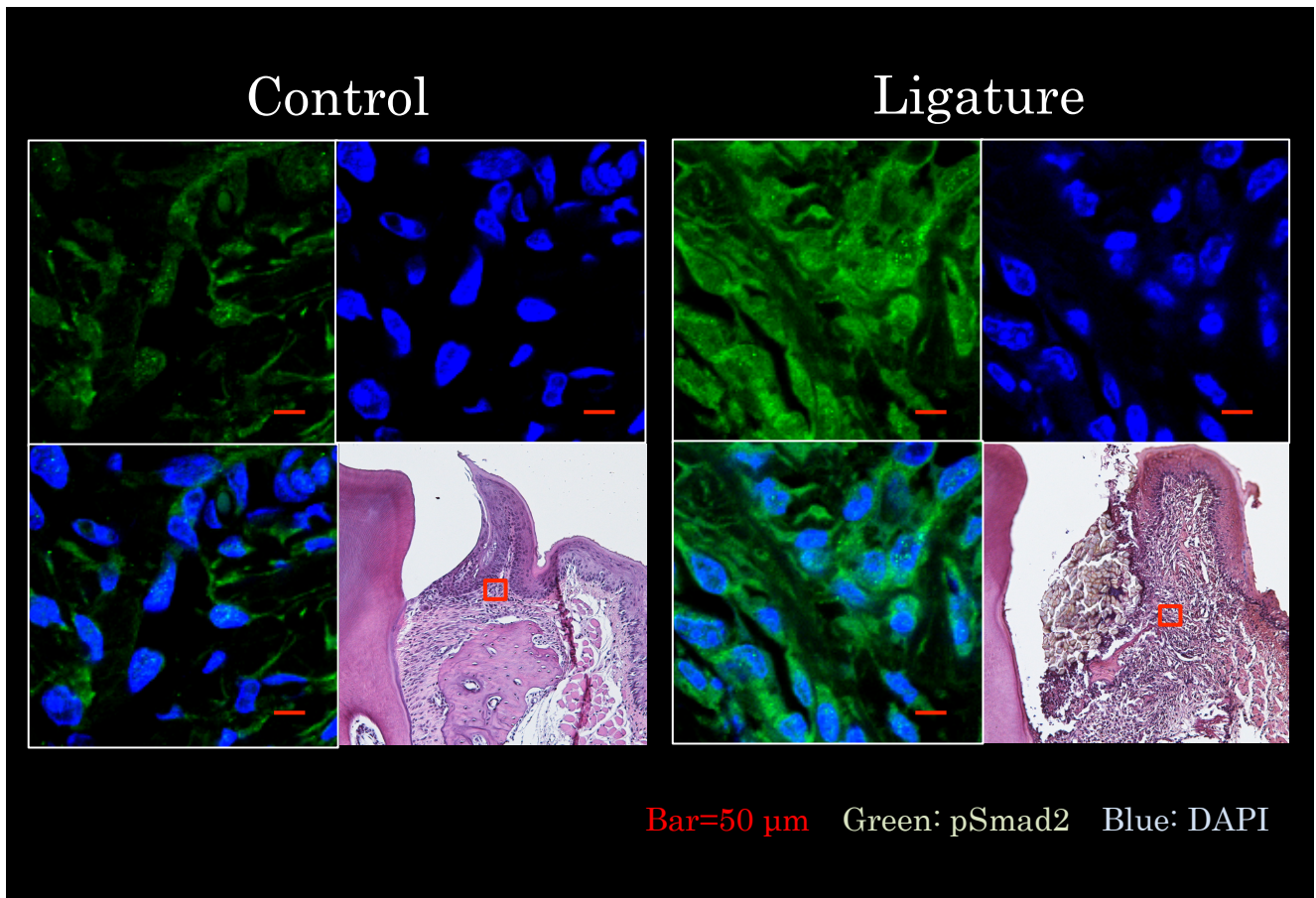
図 11. 絹糸結紮の影響 (TGF- β の発現)

a. 無刺激群の TGF- β の発現 b. 絹糸結紮群の TGF- β の発現

c と d はそれぞれ一次抗体を作用させていない a と b の陰性対照群 (400 倍)。

絹糸結紮群 (b) の歯肉結合組織中の TGF- β の発現は免疫組織化学で細胞外基質中に認められ、その発現は無刺激群 (a) と比較して明らかな増加を認めた。(n=8)

a.



b.

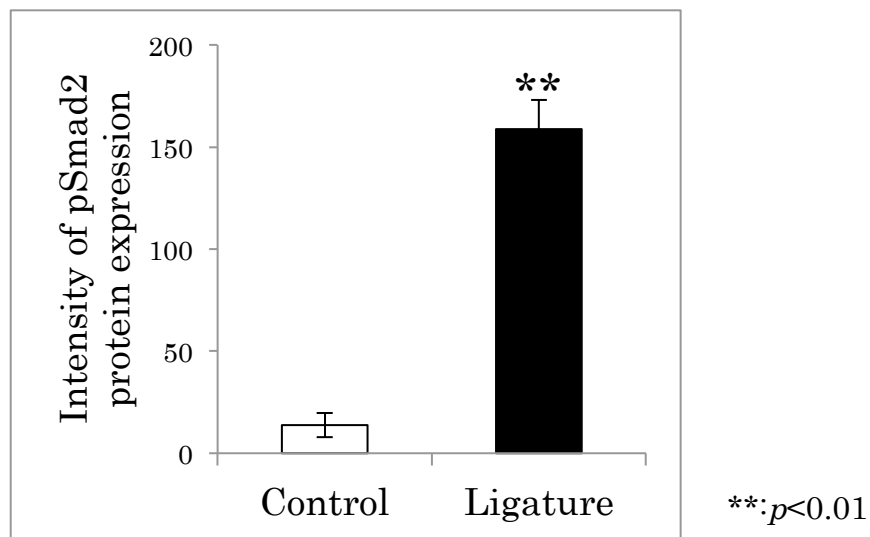


図 12. 絹糸結紮の影響 (pSmad2 の発現)

a. 無刺激群と絹糸結紮群の pSmad2 の発現 b. a で得た蛍光強度を定量化しグラフを作成した。

絹糸結紮群において歯肉結合組織中の Smad2 のリン酸化は、無刺激群と比較して有意な発現上昇を認めた。(Student's t-test **: $p<0.01$) (n=8)

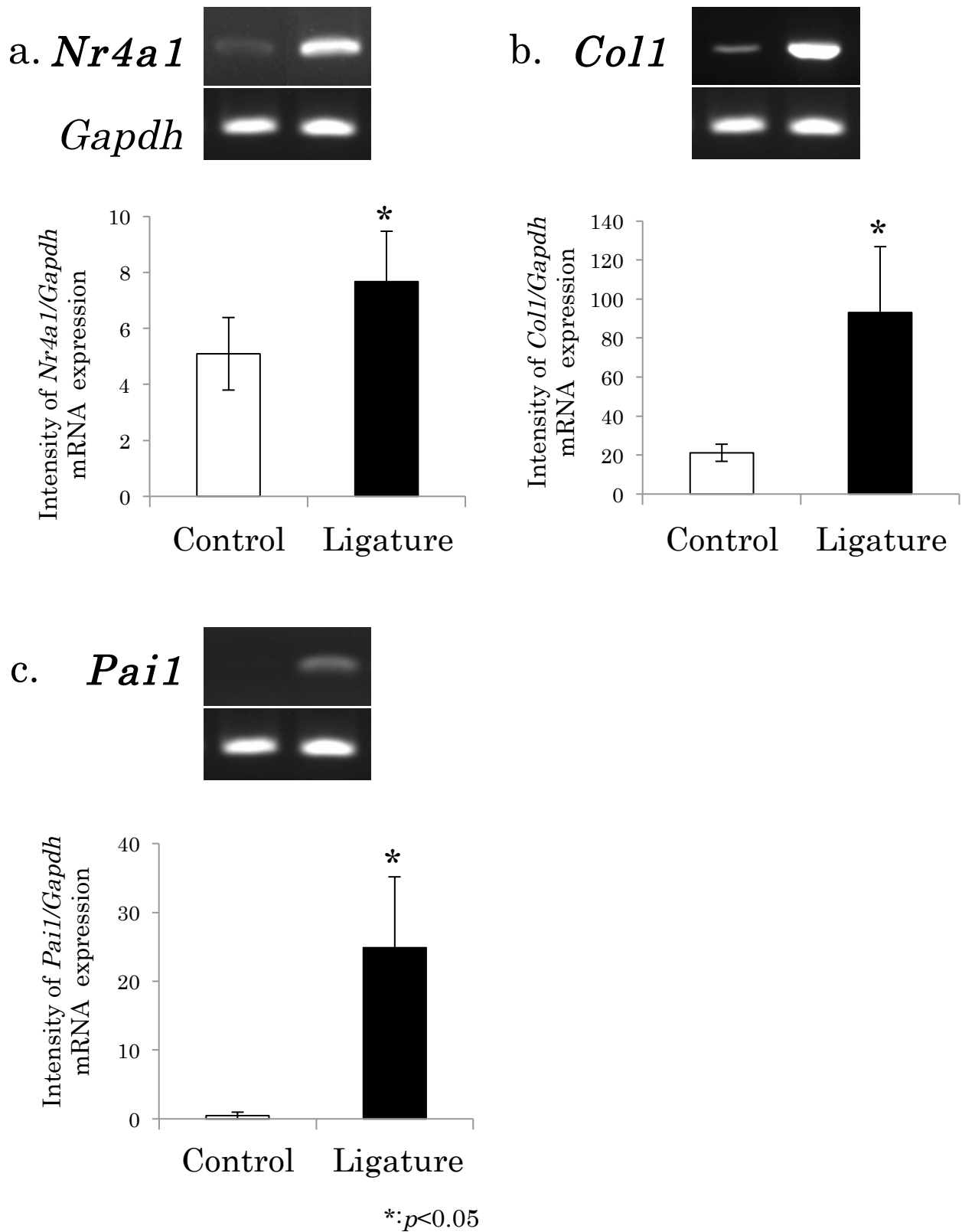


図 13. 絹糸結紮の影響 (*Nr4a1*、*Coll1*、*Pai1* の mRNA 発現)

a. *Nr4a1* の mRNA 発現 b. *Coll1* の mRNA 発現 c. *Pai1* の mRNA 発現

1 週間の絹糸結紮は歯肉結合組織中の *Nr4a1*、*Coll1*、*Pai1* の mRNA 発現を無刺激群と比較して有意に上昇させた (a-c)。

(Student's t-test *: $p < 0.05$) (n=4)

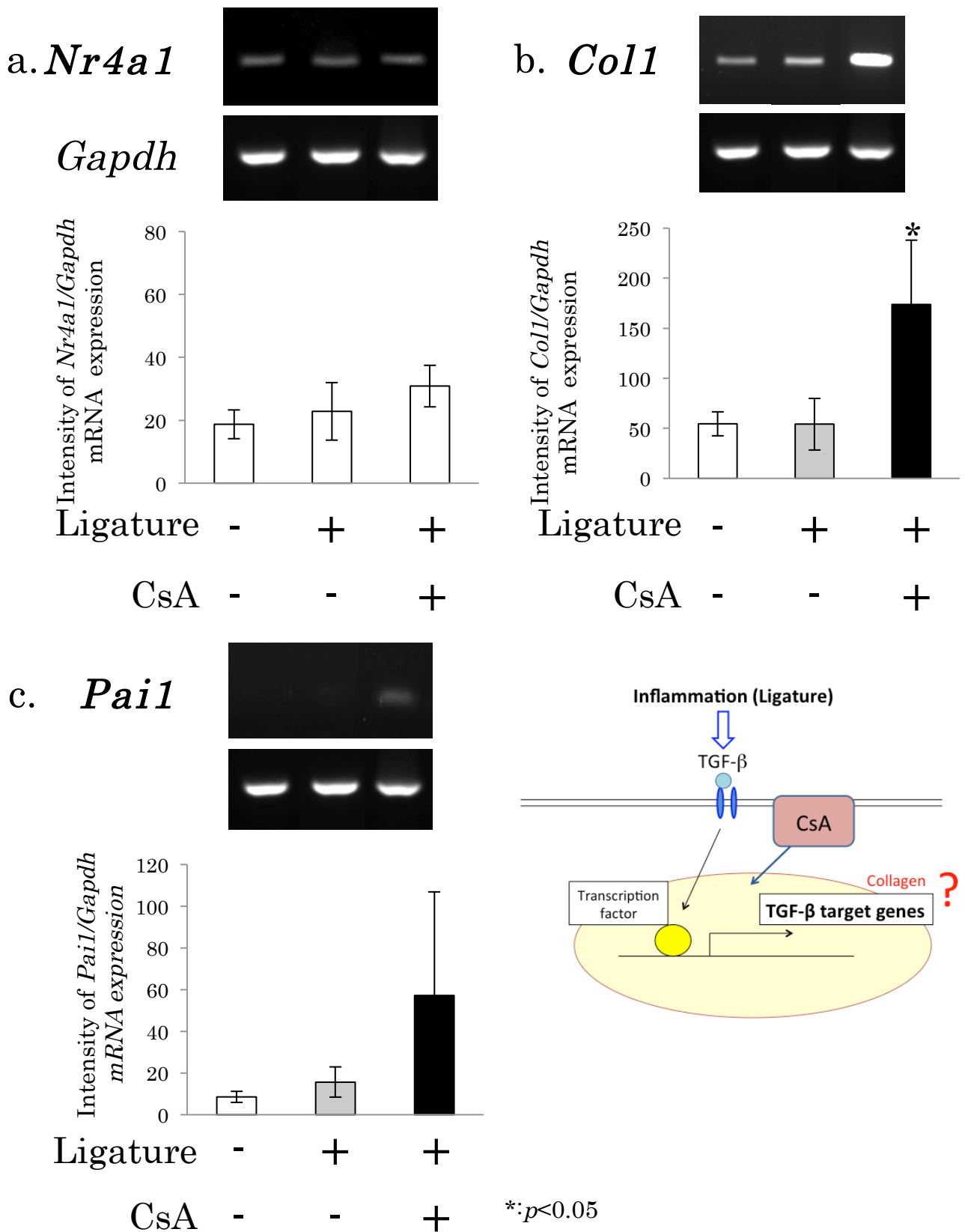


図 14. Cyclosporine A 投与開始 4 週間後の所見 (*Nr4a1*、*Col1*、*Pai1* の mRNA 発現)

a. *Nr4a1* の mRNA 発現 b. *Col1* の mRNA 発現 c. *Pai1* の mRNA 発現

絹糸結紮後 CsA を 4 週間投与した群では絹糸結紮のみの群と比較し *Col1* (b) で有意な発現の上昇、*Pai1* (c) で上昇傾向を認めたが、*Nr4a1* (a) は明らかな変化を認めなかった。

(多重比較検定 *: $p < 0.05$) (n=4)

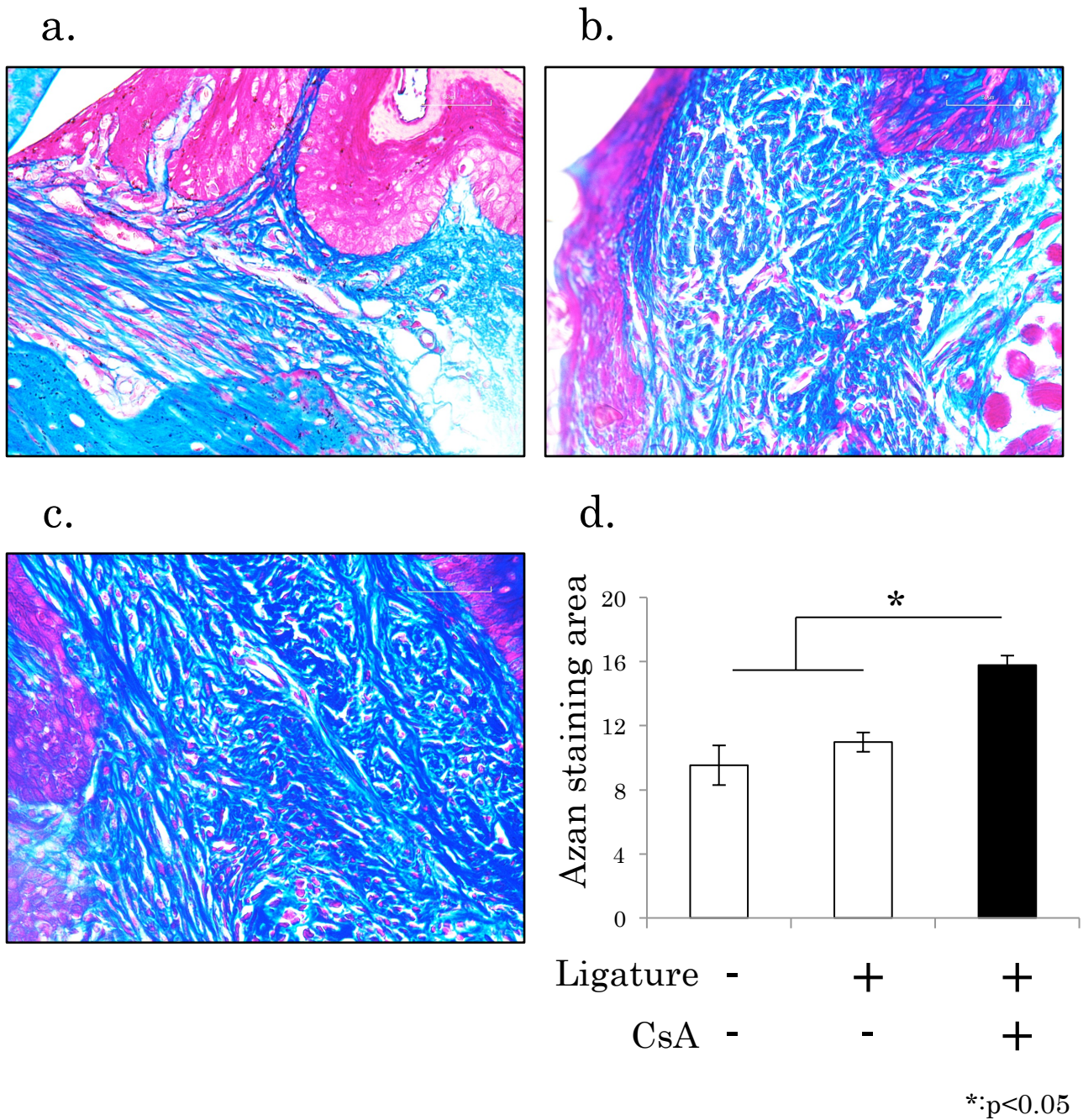


図 15. アザン染色によるコラーゲン蓄積の評価

a. 無刺激群 b. 絹糸結紮群 c. 絹糸結紮ご CsA を 4 週間投与した群

d. 青色の染色強度を Imagej で定量しグラフにした結果を示す。

無刺激群 (a)、絹糸結紮群 (b) と比較し、絹糸結紮後 CsA を投与した群 (c) で有意なコラーゲンの蓄積を認めた。

(多重比較検定 *:p<0.05) (n=8)

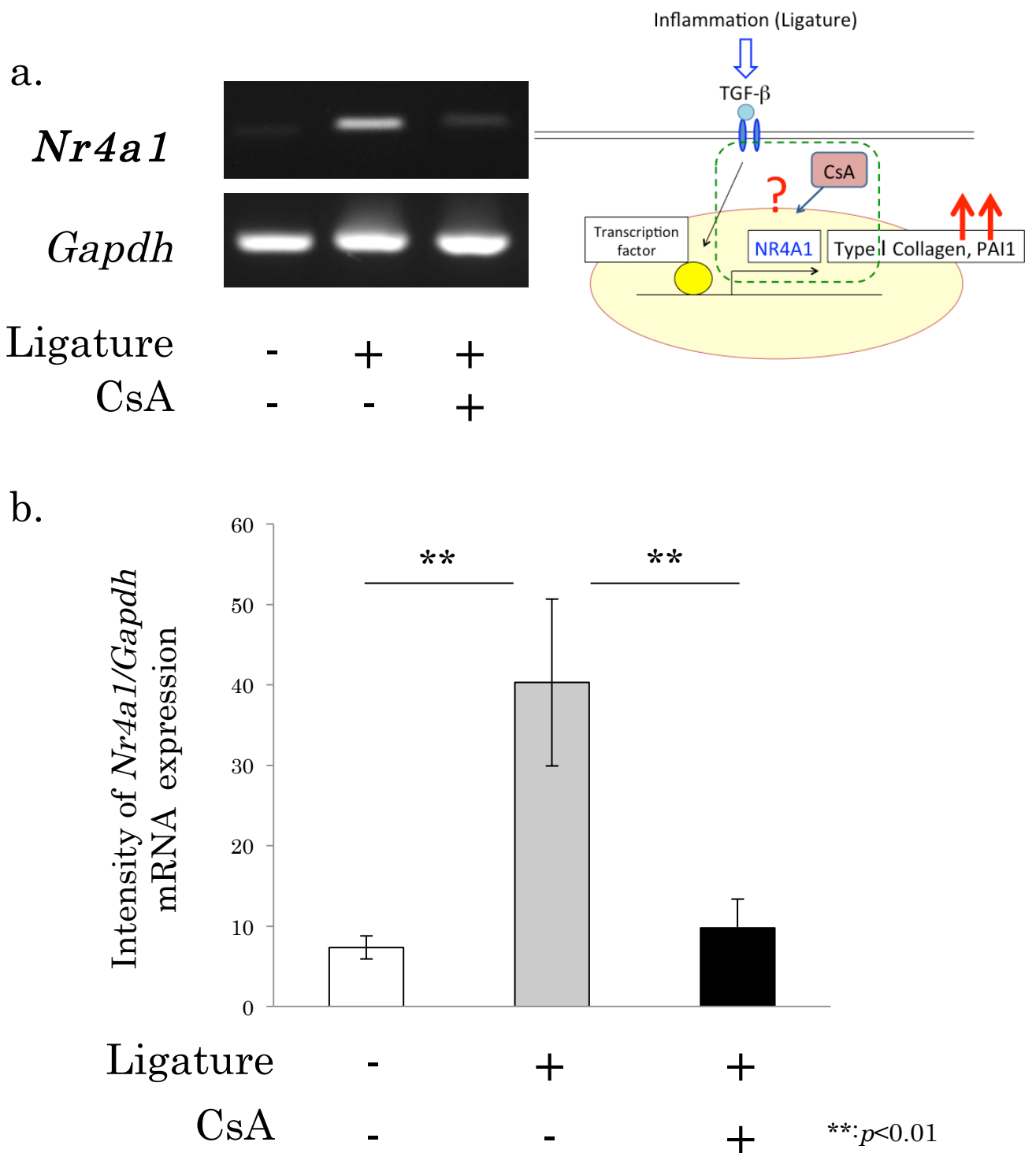


図 16. Cyclosporine A 投与開始 1 週間後の所見

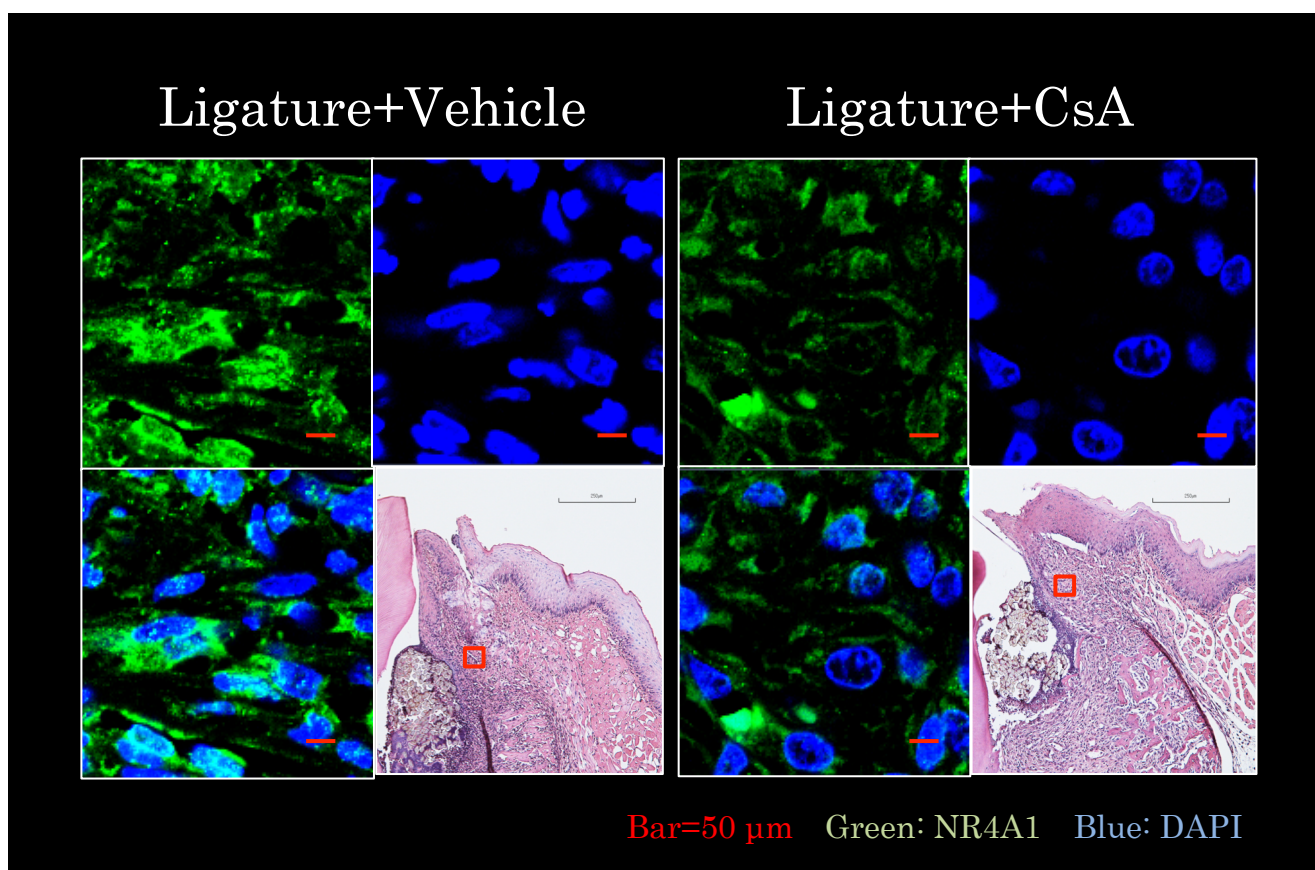
a. *Nr4a1* の mRNA 発現をバンドで示す。

b. a で得た結果を定量化し、グラフにした結果を示す。

Nr4a1 の mRNA 発現は無刺激群と比較し絹糸結紮群で有意に上昇したが、CsA 投与群では発現上昇を認めなかった (a, b)

(多重比較検定 **: $p < 0.01$) (n=4)

a.



b.

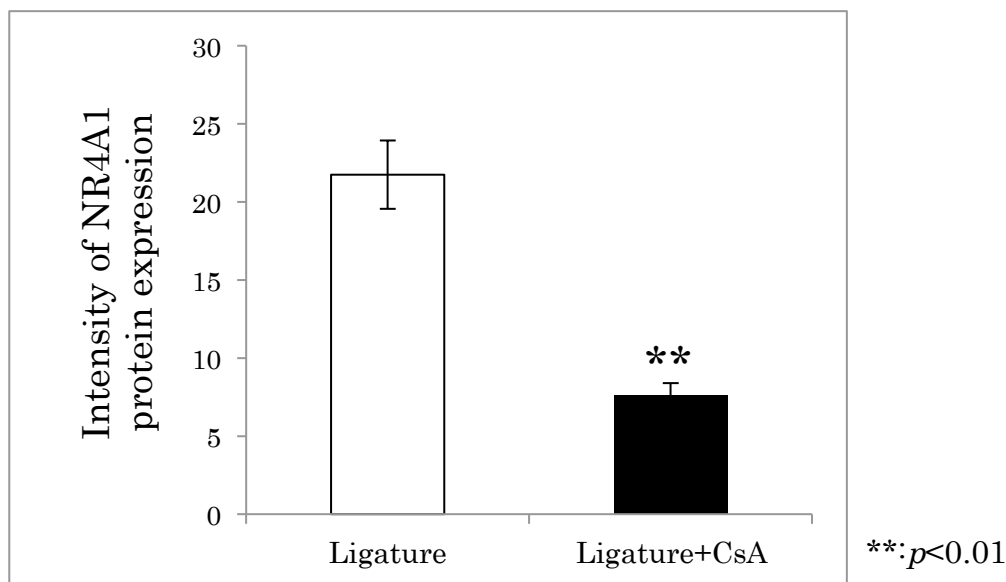


図 17. CsA 投与による NR4A1 の発現への影響

a. 絹糸結紮群と絹糸結紮後 CsA を投与した群の NR4A1 の発現 b. a で得た蛍光強度を定量化しグラフを作成した。

蛍光免疫染色で第二臼歯周囲の歯肉を観察すると、歯肉結合組織中の NR4A1 は絹糸結紮群では細胞質、核内ともに強い発現を認めたが、CsA 投与群では発現の有意な減少と核内への移行の抑制が観察された (a, b)。 (Student's t-test **: $p < 0.01$) (n=8)

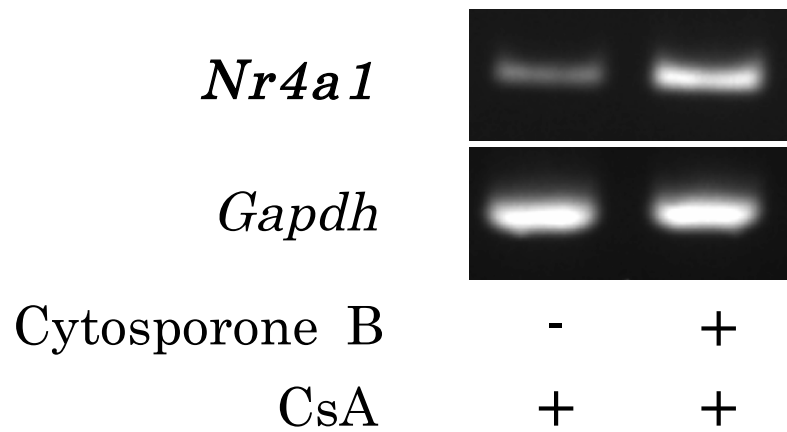
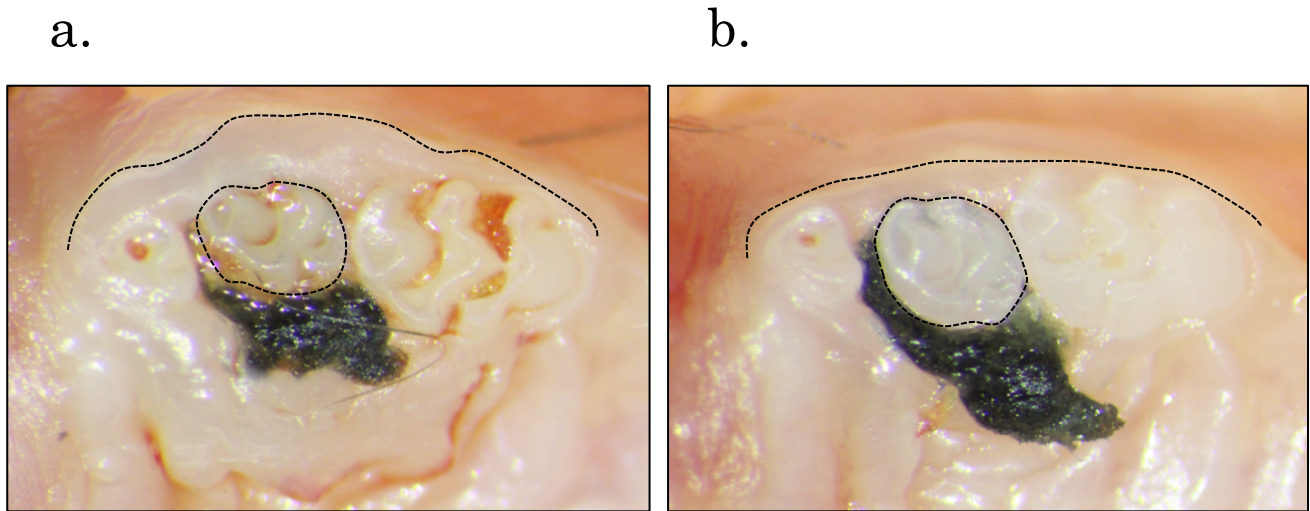
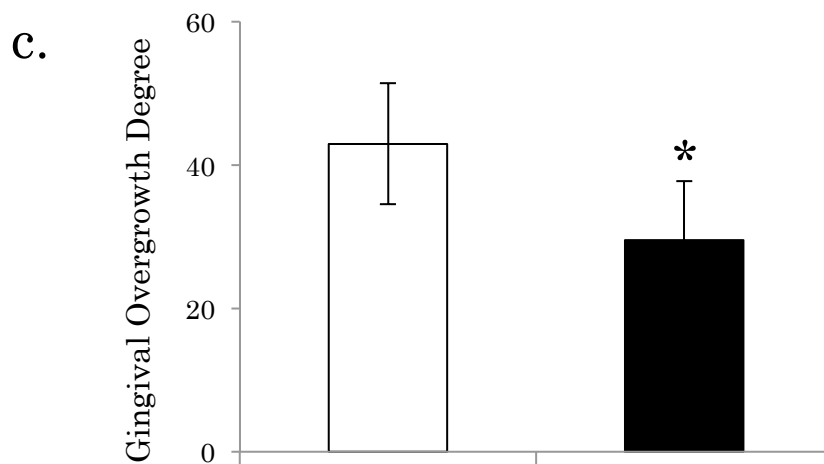


図 18. Cytosporone B 投与による歯肉増殖と NR4A1 の関与の検討

マウスに 2 週間 48 時間間隔で Cytosporone B (10 mg/kg) を腹腔内投与すると、歯肉組織中の CsA による *Nr4a1* の mRNA 発現の減少は抑制された。(n=4)



| | | |
|---------------|---|---|
| Cytosporone B | - | + |
| Ligature | + | + |
| CsA | + | + |



| | | | |
|---------------|---|---|----------|
| Cytosporone B | - | + | |
| Ligature | + | + | |
| CsA | + | + | *:p<0.05 |

図 19. Cytosporone B 投与による歯肉増殖と NR4A1 の関与の検討

a. 絹糸結紮後 CsA を投与した群 b. Cytosporone B 投与下で絹糸結紮後 CsA を投与した群

Cytosporone B (10 mg/kg) 投与群では、CsA による第二臼歯周囲歯肉の顕著な肥厚は認めなかった (b)。また GOD は Cytosporone B 投与群で有意に抑制された (c)。

(Student's t-test *:p<0.05) (n=8)

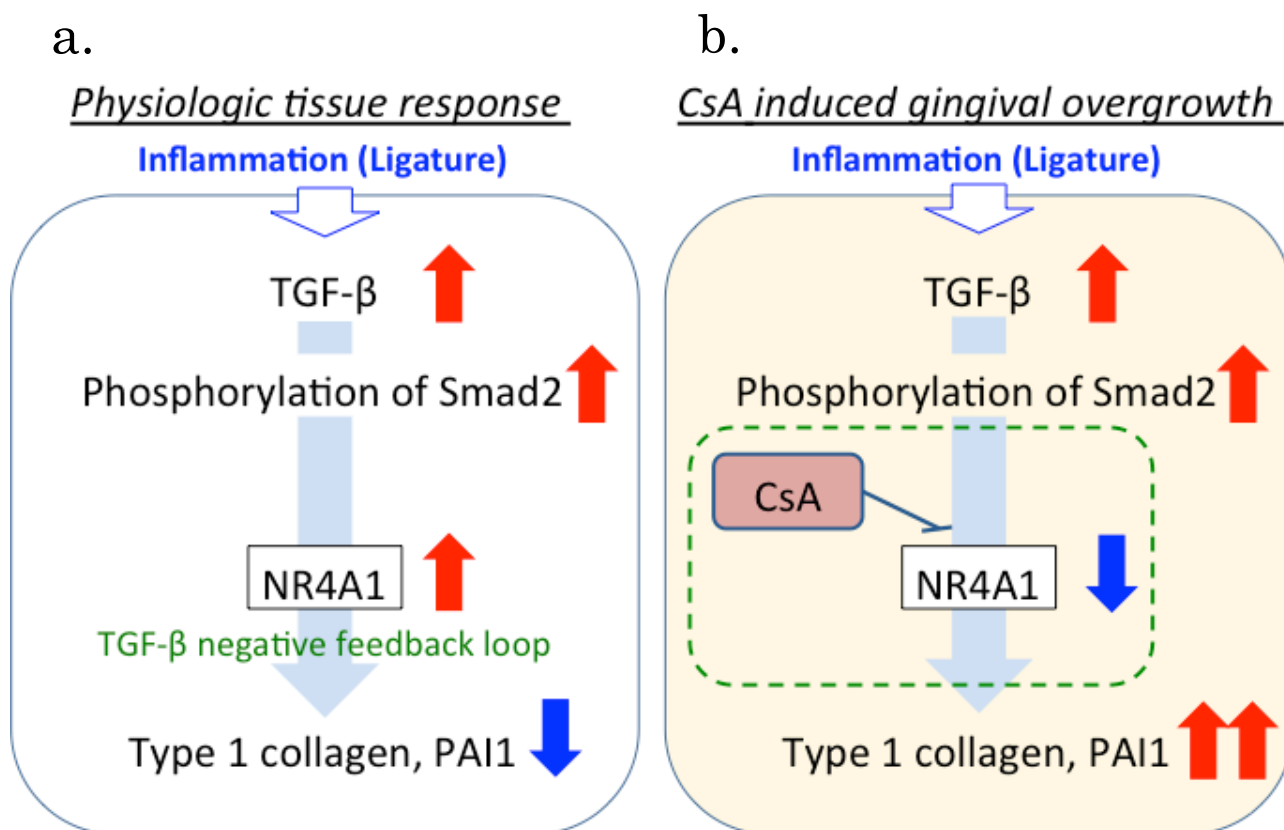


図 20.

- a. 絹糸結紮時の生理的な組織反応における TGF- β シグナルの概念図
b. CsA 誘導性増殖症における TGF- β シグナルの概念図

表 1. Sense primers and antisense primers for RT-PCR

| | | |
|--------------|---------|---------------------------|
| <i>Gapdh</i> | Forward | CCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG |
| | Reverse | TGTTGCTGTAGCCGTATTCATTGT |
| <i>Tgfb</i> | Forward | GACCGCAACAACGCCATCTAT |
| | Reverse | CGAAAGCCCTGTATTCCGTCTC |
| <i>Col1</i> | Forward | CCGAGGTATGCTTGATCTGTATCTG |
| | Reverse | TAGGACATCTGGGAAGCAAAGTTTC |
| <i>Pai1</i> | Forward | CTGAACTCATCAGACAATGG |
| | Reverse | CAGTCTCCAGAGAGAACTTAG |
| <i>Nr4a1</i> | Forward | TGTTGCTAGAGTCTGCCTTCCT |
| | Reverse | GAGCCCGTGTCGATCAGTGA |