

# 論文内容要旨

## 薬物性歯肉増殖症の 新規治療法開発を目指した基礎研究

主指導教員：栗原 英見教授  
(医系科学研究科 歯周病態学)

副指導教員：入船 正浩教授  
(医系科学研究科 歯科麻酔学)

副指導教員：兼松 隆特任教授  
(医系科学研究科 細胞分子薬理学)

畑野 紗希

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 【目的】

薬物性歯肉増殖症（増殖症）はヒダントイン系抗けいれん薬、ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬、免疫抑制薬のシクロスポリン A (CsA) によって誘導される線維性の歯肉過形成を特徴とする歯周疾患である。

高齢者の疾患の多くは生活習慣に関係している。その中でも高血圧患者は非常に多く、カルシウム拮抗薬の服用患者は多い。糖尿病患者数は年々増加し、同時に腎不全に陥り腎移植を行う患者数も増加しており、免疫抑制薬の服用は不可欠である。更に近年、高齢者の交通事故が問題化しており、その背景にてんかんがある。高齢者のてんかん患者数は増加しており、抗てんかん薬の重要性は一層高まっている。現在、増殖症の治療法は主に薬剤の変更だが、免疫抑制薬や抗てんかん薬では不可能であり、カルシウム拮抗薬でも経過良好な場合は容易でない。薬剤変更の不要な新規治療法の開発が必要である。

これまで当研究室で、CsA 誘導性増殖症マウスモデルの確立に成功した。近年、線維性疾患は、TGF- $\beta$  シグナルを抑制するオーファン核内受容体 NR4A1 の機能不全の結果、コラーゲンの産生が亢進していることが明らかになった。このことを踏まえ、上記増殖症モデルを使用し、CsA が歯肉組織中の NR4A1 の発現を抑制していることを明らかにした。

そこで本研究では、増殖症の新規治療法開発のため、各薬剤と NR4A1 が増殖症に及ぼす影響について分子メカニズムを詳細に解明することを目的とした。

## 【材料と方法】

### 1. NR4A1 が歯肉過形成に及ぼす影響の検討

NR4A1 のノックアウト (KO) マウスと野生型マウスの上顎両側第二臼歯に 5-0 絹糸を結紮し歯周炎を誘導した。絹糸結紮 5 週間後に HE 染色と歯冠幅径に対する頰側歯肉幅を **Gingival Overgrowth Degree (GOD)** として評価した。

### 2. CsA 及び活性化 T 細胞核内因子 (NFAT) が NR4A1 の転写に及ぼす影響

(1) ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) に CsA (250, 500, 1,000 ng/ml) を投与し、その 1 時間後から TGF- $\beta$  (10 ng/ml) を 1 時間作用し NR4A1 と Type I collagen の mRNA 発現を real-time PCR で解析した。

#### (2) NR4A1 の転写に関与する NFAT ファミリーの検討

HGF に NFATc1 と NFATc3 の siRNA (10 nM) を 48 時間導入後 TGF- $\beta$  (10 ng/ml) を 1 時間作用し、NR4A1 の mRNA 発現を real-time PCR で解析した。

#### (3) CsA が NFATc3 の発現に及ぼす影響の検討

HGF に CsA (1,000 ng/ml) を 1 時間前投与した後 TGF- $\beta$  (10 ng/ml) を 30 分間作用し、核内での NFATc3 のタンパク発現をウエスタンブロッティング法で解析し、局在は蛍光免疫染色で観察した。

### 3. ニフェジピン (NIF) 及びフェニトイン (PHT) 誘導性増殖症モデルの作製

野生型マウスの上顎両側第二臼歯に 5-0 絹糸を結紮 1 週間後から NIF (250 mg/kg/day) また

は PHT (150 mg/kg/day) を 4 週間腹腔内に投与し、増殖症モデル作製を試みた。

#### 4. NIF、PHT が NR4A1 の転写に及ぼす影響の検討

HGF に NIF、PHT (100, 250, 500, 1,000 ng/ml) を 1 時間前投与した後 TGF- $\beta$  (10 ng/ml) を 1 時間作用し、NR4A1、Type I collagen の mRNA 発現を real-time PCR で解析した。また NIF、PHT が NFATc3 の局在に及ぼす影響について、蛍光免疫染色で観察した。

#### 【結果】

NR4A1 の KO マウスでは、野生型マウスと比較し顕著な歯肉の線維性肥厚と GOD の有意な上昇を認めた。

CsA の HGF への前投与が TGF- $\beta$  による NR4A1 の mRNA 発現の上昇を抑制し、Type I collagen の mRNA 発現は更に上昇させた。また NFATc3 の siRNA の導入で、TGF- $\beta$  で上昇した NR4A1 の mRNA 発現は抑制した。更に、TGF- $\beta$  による NFATc3 の核内移行が CsA によって抑制された。

マウスでは NIF、PHT の投与で歯肉の過形成を誘導出来なかった。一方、in vitro では TGF- $\beta$  による NR4A1 の mRNA 発現の上昇が NIF、PHT の前投与で抑制し、Type I collagen の mRNA 発現は更に上昇させた。NIF、PHT の前投与で TGF- $\beta$  による NFATc3 の核内移行は抑制された。

#### 【結論】

CsA、NIF、PHT はいずれも、TGF- $\beta$  による NFATc3 の核内移行を抑制することで、NR4A1 の発現上昇を抑制し、コラーゲンの発現上昇に関与すると考えられる。この結果は NR4A1 を標的とすることで CsA、NIF、PHT で発症した歯肉増殖症を、これらの薬剤の変更・変量することなく治療出来る可能性を示唆している。