

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	畑野 紗希
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
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			
論文審査担当者			
主査	教授 太田 耕司	印	
審査委員	教授 岡田 芳幸		
審査委員	教授 河口 浩之		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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。これまでに申請者の所属研究室では，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-β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解明することを目的とした。</p> <p>実験方法として，NR4A1が歯肉過形成に及ぼす影響を検討するため，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頬側歯肉幅をGingival Overgrowth Degree（GOD）として評価した。そして，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を評価するため，ヒト歯肉線維芽細胞（HGF）にCsA（100, 250, 500, 1,000 ng/ml）を投与し，その1時間後からTGF-β（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。次に，HGFにNFATc1とNFATc3の siRNA（10 nM）</p>			

を48時間導入後TGF- β (10 ng/ml) を1時間作用し、NR4A1のmRNA発現をreal-time PCRで解析した。更に、HGFにCsA (1,000 ng/ml) を1時間前投与した後TGF- β (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。

また、NIF, PHT誘導性増殖症のメカニズム解明のため、NIF, PHTがNR4A1の転写に及ぼす影響を検討した。HGFにNIF, PHT (100, 250, 500, 1,000 ng/ml) を1時間投与した後TGF- β (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。そして、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。

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- β 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- β で上昇したNR4A1のmRNA発現は抑制した。更に、TGF- β によるNFATc3の核内移行がCsAによって抑制された。In vitroにおいてTGF- β 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- β によるNFATc3の核内移行は抑制された。

以上の結果から、本論文はCsA, NIF, PHTのいずれの薬剤も、TGF- β 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。本論文の研究成果は、薬物性歯肉増殖症の新規治療法開発への可能性について新知見を与え、今後の治療の発展に寄与するものとする。

よって審査委員会委員全員は、本論文が畑野紗希に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものとした。