

学位論文の内容要約

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

畑野 紗希

広島大学大学院医歯薬保健学研究所
博士課程 医歯薬学専攻

2019 年度

主指導教員：栗原 英見 教授
(医系科学研究科 歯周病態学)

【目的】

現在日本は超高齢社会であり、多くの高齢者が生活習慣病に罹患している。生活習慣病の中でも特に高血圧の患者は多く、nifedipine (NIF) などのカルシウム拮抗薬を服用している患者は多い。また、生活習慣病の糖尿病の合併症である糖尿病性腎症が進行すると腎不全に至る。現在、腎不全の治療法は透析もしくは腎移植であるが、腎移植は透析と比較すると治療費や治療期間の負担も軽いことから、有用な方法である。腎移植後の拒絶反応の予防には、cyclosporine A (CsA) をはじめとした免疫抑制薬の服用は不可欠である。更に近年、てんかん患者の交通事故が社会問題となっている。現在、高齢者のてんかん患者数は増加しており、phenytoin (PHT) をはじめとした抗てんかん薬の重要性は一層高まっている。

薬物性歯肉増殖症（増殖症）は NIF、PHT、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。これら 3 種の薬剤は幅広い年齢層で使用されており、使用用途、作用機序も全く異なるが、口腔内では増殖症という共通した副作用を示す。

現在、増殖症の治療法は主に薬剤の変更や減量だが、免疫抑制薬や抗てんかん薬の変更は移植臓器の拒絶やてんかん発作の再発のため困難であり、カルシウム拮抗薬も降圧作用が良好な場合、変更は容易ではない。したがって、薬剤変更に頼らない新規の増殖症治療法の開発が求められており、そのためには増殖症の詳細なメカニズム解明は必須である。

オーファン核内受容体 NR4A1 (nuclear receptor subfamily 4 group A member 1) は、生体内リガンドが同定されていない核内受容体で、全身の多くの組織で発現し、様々な機能を持つ。正常な創傷治癒過程では、transforming growth factor- β (TGF- β) の刺激で NR4A1 の発現が上昇し、TGF- β シグナルを抑制する negative feedback 機構が働く。しかし、突発性肺線維症や全身性強皮症などの線維性疾患では、NR4A1 の機能障害に陥り、コラーゲンの発現が亢進することで線維化が進行する。当研究室では、CsA によって誘導される増殖症マウスモデルの確立に成功し、そのモデルの歯肉中では NR4A1 の mRNA 発現が抑制されていることを見出した。しかし、CsA がどのように NR4A1 の発現を抑制するかは不明

のままである。そして、CsA の免疫抑制作用は、T 細胞の転写因子である活性化 T 細胞核内因子 NFAT (Nuclear factor of activated T cells) の脱リン酸化抑制によって発揮されることから、増殖症の NR4A1 の発現抑制にも NFAT が関与している可能性がある。また、CsA だけでなく NIF、PHT 誘導性増殖症のメカニズム解明も必要である。

本研究では、増殖症の新規治療法開発のため NR4A1 と NFAT に着目をし、各薬剤とこれらの因子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^{-/-}マウスを用いたNR4A1の歯肉増殖への関与

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。

2. CsA、NIF、PHT 誘導性歯肉増殖症の分子メカニズム

CsA及び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)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。

【結果と考察】

1. NR4A1ノックアウトマウスを用いたNR4A1の歯肉増殖への関与

- ・ NR4A1ノックアウトマウスに絹糸結紮を行い、その5週間後には絹糸周囲に顕著な歯肉肥厚を認めた。
- ・ 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。

2. CsA、NIF、PHT 誘導性歯肉増殖症の分子メカニズム

- ・ TGF- β を1、24時間単独作用するとNR4A1、I型コラーゲンのmRNA発現が有意に上昇したが、CsA、NIF、PHTの1時間前投与で、NR4A1のmRNA発現は有意に抑制した。一方I型コラーゲンのmRNA発現は更に有意に上昇した。
- ・ TGF- β を1時間単独作用し上昇したNR4A1のmRNA発現に対し、NFATc1 siRNAを導入してもその発現に有意差は認めなかった。一方、NFATc3 siRNAを導入すると、NR4A1のmRNA発現は有意に抑制した。
- ・ TGF- β を30分間単独作用するとNFATc3は核内に多く発現していたが、CsA、NIF、PHTの1時間前投与でNFATc3は細胞質に多く発現していた。

【結論】

歯肉線維芽細胞において、CsA、NIF、PHTがNFATc3の核内移行を抑制しNR4A1の発現も抑制することで、結果としてI型コラーゲンの発現が亢進することが示された。将来NR4A1をターゲットとすることで、全ての薬剤で発症する増殖症に対応可能な新規治療法の開発に繋がると考える。