

論文内容要旨

Elucidation of the Role of NR4A1 in Drug Induced Gingival Overgrowth

(NR4A1 に着目した薬物性歯肉増殖症のメカニズム
の解明)

主指導教員：栗原 英見教授
(応用生命科学部門 歯周病態学)

副指導教員：入船 正浩教授
(統合健康科学部門 歯科麻酔学)

副指導教員：香西 克之教授
(統合健康科学部門 小児歯科学)

岡信 愛

(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（以下増殖症）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、免疫抑制薬等によって誘導される歯肉肥厚を特徴とした歯周疾患である。高齢化や医療の高度化によってこれらの薬剤を内服する患者は増加しており、それに伴い増殖症患者も増加すると予想される。現在増殖症の治療法は変薬、歯周基本治療または歯肉切除であるが、変薬が困難な場合や歯肉切除後の再発も稀ではない。増殖症の分子メカニズムの解明は上記の問題点解決だけでなく、薬剤投与前の増殖症発症の予知や、新規治療法開発につながる。そのためには、ヒトの臨床所見に似た再現性の高い増殖症の動物モデルの開発が必要である。臨床的見地から、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り、増殖症の発症に歯周組織の細菌感染が関与していることが予想される。そこで、細菌感染下で薬剤を投与することで増殖症を誘導できると考えた。

一方、近年、肺線維症や腎不全などの線維化疾患の発症においてオーファン核内受容体 NR4A1 の関与が明らかとなった。NR4A1 は TGF- β の標的遺伝子として転写が活性化されるが、生理的な反応において TGF- β シグナルを負に制御することでコラーゲンの過剰産生を抑制し、組織の恒常性の維持に貢献している。しかし線維症ではこの負の制御機構が破綻することで TGF- β シグナルが過剰となり、コラーゲンの蓄積が引き起こされる。

そこで本研究では増殖症の発症に NR4A1 が関与していると仮説を立て、増殖症マウスモデルを作製して、NR4A1 の増殖症への関与を解明することを目的とした。

材料と方法

マウスは C57BL/6、6-8 週齢を使用した。歯周炎は上顎両側第二臼歯に 5-0 絹糸を結紮して誘導した。絹糸結紮 1 週間後からカルシニューリン阻害剤 (CsA (50 mg/kg/day) または FK506 (30 mg/kg/day)) あるいは異なる機序を持つ免疫抑制薬ミゾリビン (MZR、30 mg/kg/day) を 4 週間腹腔内に投与した。増殖症は 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。細菌感染の増殖症に対する影響は、絹糸結紮と同時に全実験期間に複数種の抗菌薬を投与し GOD で評価した。さらに、CsA 4 週間投与後に CsA の投与を 2 週間中止して検討を行った。

増殖症の NR4A1 の役割を検討するために、増殖症群及び絹糸結紮群の歯肉組織中の *Tgfb*, *Nr4a1*, *Pai1*, *Col1* の mRNA 発現を RT-PCR で評価した。TGF- β 、pSmad2、NR4A1 の発現は免疫組織化学で評価した。さらに、NR4A1 のアゴニストの Cytosporone-B (Csn-B) をマウスに 2 週間腹腔内投与し (10 mg/kg/every other day)、GOD で増殖症発症の有無を評価した。

結果と考察

絹糸結紮 1 週後に CsA (50 mg/kg/day) を 4 週間腹腔内投与することで、顕著な歯肉肥厚と

GOD の有意な上昇を認めた。さらに抗菌薬前投与群では歯肉肥厚が抑制されたことから、細菌感染が増殖症発症に関与していることが示唆された。

CsA と FK506 は免疫抑制薬のうちカルシニューリン阻害薬 (CNI) に分類される。カルシニューリンは NFATc の脱リン酸化を促進し、標的遺伝子の転写を活性化する機能をもつため、CNI では標的遺伝子の転写が抑制される。組織学的観察で CNI 投与群の結合組織の肥厚、コラーゲン線維の増生と、GOD の有意な上昇を認めた。また MZR 投与群では GOD は変化しなかった。したがって、増殖症発症にカルシニューリン阻害作用が関与している可能性が示唆された。

また、CsA 投与中止によって増殖症が改善することから、CsA 濃度が血中に保持されることで増殖症の増悪が生じることが示唆された。

さらに絹糸結紮は *Tgfb*, *Nr4a1*, *Pai1*, と *Col1* の mRNA 発現と TGF- β のタンパク発現を上昇させた。CsA 投与は *Nr4a1* の mRNA とタンパクの発現を抑制したが、*Pai1* と *Col1* の mRNA 発現は絹糸結紮のみの群と比較し上昇傾向を維持した。さらに Csn-B 投与によって歯肉組織中の *Nr4a1* の mRNA 発現は上昇し、CsA 投与 4 週後の歯肉組織において GOD の上昇を有意に抑制した。このことは、増殖症の発症に NR4A1 が関与していることを示唆する。さらに CNI がもつ標的遺伝子の転写抑制作用が NR4A1 の転写制御にも関与していることが示唆された。

これらのことから、本研究は NR4A1 を標的とした新規治療法の開発や増殖症発症の予知に貢献できる基礎研究と考える。

結論

CsA は歯肉組織中の NR4A1 の発現を抑制し、コラーゲンの産生を恒常的に維持させることで、増殖症を発症させることが示唆された。