



Title	ヒト歯肉線維芽細胞の増殖と細胞死に対するニフェジピンの作用
Author(s)	藤森, 靖史
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41864
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	藤 森 靖 史
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 15352 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	ヒト歯肉線維芽細胞の増殖と細胞死に対するニフェジピンの作用
論文審査委員	(主査) 教授 上崎 善規 (副査) 教授 祖父江鎮雄 助教授 小川 裕三 助教授 島内 英俊

論文内容の要旨

【研究目的】

薬物誘発性歯肉肥大は抗てんかん薬であるフェニトインにより生じることが1939年に報告されたが、その後、免疫抑制剤のシクロスポリン、カルシウム拮抗薬のニフェジピンによっても同様の症状が誘発されるという報告がなされた。現在の高齢化社会においてカルシウム拮抗薬の服用者は抗てんかん薬や免疫抑制剤の服用者と比べてはるかに多く、その副作用である歯肉肥大は重要な問題となっている。カルシウム拮抗薬の中でニフェジピンは高血圧や狭心症に対する治療薬として広く使用されており、ニフェジピン誘発性歯肉肥大の有効な予防法と治療手段が望まれているが、その発症機序については未だ明らかにされていない。また、薬物誘発性歯肉肥大の重症度は歯周組織の炎症と密接な関係があることも報告されている。

本研究ではヒト歯肉線維芽細胞を用いて、その増殖能と細胞死に対するニフェジピンの作用について調べ、薬物誘発性歯肉肥大との関連について検討した。また、炎症性細胞であるマクロファージを用いて、lipopolysaccharide (LPS) 刺激時における細胞障害に対するニフェジピンの影響についても検討した。

【研究方法】

1. 細胞培養および薬物処置：口腔外科的処置時に得られた正常ヒト歯肉試料よりアウトグロースさせたヒト歯肉線維芽細胞を10%牛胎児血清 (FCS) 含有 DMEM を用いて培養した。細胞がいわゆるコンフルエント状態に達した後、培養液中に薬物を添加し1週間培養をおこなった。マウス由来マクロファージ様細胞 RAW264 (RIKEN Cell Bank: 茨城) は、10% FCS 含有 DMEM を用いて培養した。LPS、NO 発生剤の N-ethyl-2-(1-ethyl-2-hydroxy-2-nitrosohydrazino)-ethanamine (NOC12)：およびペルオキシナイトライト発生剤の 3-morpholino-sydnonimine (SIN-1) は培養液中に添加し、24時間培養をおこなった。また、ヒト歯肉線維芽細胞と RAW264細胞とを1:1の比で播種したものを、10% FCS 含有 DMEM を用いて共培養をおこなった。

2. 細胞死の判定：細胞死の判定は培養細胞を0.05%トリプシン-EDTA 溶液を用いて採取し、0.5%トリパンブルーを用いた色素排除法によりおこなった。アポトーシスは、断片化した DNA を酵素免疫法により検出する ELISA キットを用いて判定した。

3. [³H]-チミジンの取り込み：培養細胞に、[³H]-チミジン (終濃度 1 μCi/ml) を加えて4時間インキュベートしたのち、PBS で洗浄し、1%トリクロロ酢酸溶液で処置した細胞を0.25N 水酸化ナトリウム溶液により溶解し、

その放射活性を測定した。

4. NOの測定：RAW264細胞に各薬物を作用させ、24時間培養後、培養上清中の亜硝酸イオンを Griess 法により測定した。

5. ウェスタンブロッティング：RAW264細胞より調製した細胞溶解液を、7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動後、膜にブロッティングし、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 抗体を用いて検出した。

【結果および考察】

【1】ヒト歯肉線維芽細胞をコンフルエント後さらに1週間培養をおこなうと、約30%の細胞にDNAの断片化を伴う細胞死が認められた。この細胞死は、ニフェジピン存在下で培養することにより抑制された。また、他のカルシウム拮抗薬（ニカルジピン、ジルチアゼム、ベラパミル）によっても同様に抑制された。 $[^3\text{H}]$ ーチミジンの取り込みは、無処置細胞に比べて、ニフェジピン処置した細胞では濃度依存的に低下していた。低カルシウム培養液で培養をおこなった細胞においては $[^3\text{H}]$ ーチミジンの取り込みは低下しており、高カルシウム培養液ではその取り込みは増加していた。

以上の結果からヒト歯肉線維芽細胞の増殖過程における細胞死に対してニフェジピンが保護的に作用していることが示された。また、その作用は増殖能の抑制と密接に関係しており、その機序には細胞内のカルシウム動態が関与している可能性が示唆された。

【2】RAW264細胞において、LPS刺激により濃度依存的にNOが産生され、細胞死が誘導された。このNO産生および細胞死はニフェジピンにより抑制された。NOC12およびSIN-1により濃度依存的に細胞死が誘導されたが、これらの細胞死に対してニフェジピンはまったく影響を与えなかった。他のカルシウム拮抗薬についても同様の実験をおこなったが、ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬であるニフェジピン、ニカルジピンの作用が最も大きかった。ウェスタンブロッティングによる解析から、RAW264細胞においてLPS刺激によるiNOSの誘導をニフェジピンは著明に抑制することが示された。

ヒト歯肉線維芽細胞にLPS刺激を行っても細胞死はみられなかったが、RAW264細胞との共培養系において、LPS刺激によりヒト歯肉線維芽細胞に細胞死が誘導された。この細胞死はニフェジピンにより抑制された。

以上の結果より、ニフェジピンはLPS刺激により誘導される細胞死をiNOSの誘導を阻害することにより抑制することが明らかになった。

【結論】

本研究の結果より、ヒト歯肉線維芽細胞の増殖過程における細胞死に対してニフェジピンが保護作用を有することが示され、また、その機序に細胞内カルシウム動態が関与していることが示唆された。歯肉の正常な形態の維持にアポトーシスが関与していることが考えられ、カルシウム拮抗薬によるアポトーシス抑制作用が歯肉肥大の形成機序に関与している可能性が示唆された。また、LPS刺激によりマクロファージから産生されるNOにより誘発される歯肉線維芽細胞の細胞死をニフェジピンが抑制したことから、歯肉組織の炎症時における細胞障害に対してもニフェジピンが保護作用を有することが示唆された。炎症状態においては、正常な状態に比べてより多くの細胞死が誘発されると同時に増殖能も高まっていることが考えられ、LPS刺激による細胞死に対するニフェジピンの抑制作用が炎症による歯肉肥大の増悪に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究はヒト歯肉線維芽細胞の増殖能および細胞死に対するニフェジピンの作用を明らかにする目的で、培養ヒト歯肉線維芽細胞を用いて薬理的、生化学的検討を行ったものである。

その結果、ヒト歯肉線維芽細胞の増殖過程における細胞死をニフェジピンは抑制した。この作用は増殖能の抑制と関係しており、その機序に細胞内カルシウム動態が関与していることが明らかとなった。またマクロファージ様RAW264細胞において、LPS刺激による細胞死に対してニフェジピンは抑制作用を有しており、その機序は誘導型NO合成酵素の誘導を阻害することによるものであることが示された。さらに、ヒト歯肉線維芽細胞とRAW264細胞

胞との共培養系においても、LPS 刺激によるヒト歯肉線維芽細胞の細胞死に対してニフェジピンは抑制作用を示すことが明らかになった。

本論文はニフェジピン誘発性歯肉肥大の発症機序および薬物誘発性歯肉肥大と炎症との関連を解明する上で、重要かつ新たな知見を示したものであり、博士（歯学）の学位に値するものと認める。