The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	抗てんかん薬フェニトインのヒト歯肉線維芽細胞のコラーゲン代謝に与える影響
Author(s)	加藤, 隆大
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45166
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【54】

氏　　名	加　藤　隆　大（かとう　たかひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　18625　号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学　位　論　文　名	**抗てんかん薬フェニトインのヒト歯肉線維芽細胞のコラーゲン代謝に与える影響**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　森崎市治郎 （副査） 教　授　上崎　善規　　助教授　永田　英樹　　講　師　北村　正博

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

抗てんかん薬フェニトイン（PHT）の服用者では高頻度に歯肉肥大が誘発されることが知られている。この歯肉肥大はコラーゲンを含む多量の細胞外マトリックスタンパクの歯周組織への蓄積によるものと推測されているが、その詳細については未だ十分な検討がなされていない。本研究では、歯肉線維芽細胞（HGF）のコラーゲン代謝へのPHTの作用機序を明らかとする目的で、HGFのコラーゲン産生、コラーゲン分解に関わるmatrix metalloproteases（MMPs）とMMPsインヒビターであるtissue inhibitor of metalloproteases（TIMPs）の発現、そしてコラーゲン貪食に及ぼすPHTの影響について検討を加えた。

【材料と方法】

1）HGFは外科的処置時に得られた8才男子の正常歯肉試料から10%牛胎仔血清（FCS）、gentamycin 50μg/mlおよびfungizone 1μg/ml含有DMEMにて、飽和湿度下、5% CO_2 存在下、37℃の条件で分離培養した。PHTは、HGFがコンフルエントに達した後、0〜20μg/mlの濃度でDMEM培地に添加した。

2）細胞増殖はPHT存在下で培養したHGF数を経日的に計測した。HGFが産生した可溶性コラーゲンは、ペプシン含有0.5 M酢酸に溶解し定量した。

3）コンフルエントHGFのMMPsおよびTIMPs mRNA発現はRT-PCR法によりスクリーニングを行った。

4）IおよびⅢ型コラーゲン、MMPs、TIMPsそしてα2β1インテグリンmRNA発現に及ぼすPHTの影響は、HGFにPHTを添加し2、4および8時間培養後、回収試料よりmRNAを調整した。RT-PCR法によるcDNA合成の後、SYBR GREENを用いたreal-time PCRにより定量を行った。

5）MMP-1、2、3およびTIMP-1タンパクの検出は、ウエスタンブロット法により行った。PHT刺激5、15日後のHGF培養上清を、10% SDS-PAGEに展開し、PVDF膜に転写後、抗MMP-1、2、3およびTIMP-1抗体にて反応バンドを検出した。

6）HGFのコラーゲン貪食へのPHTの影響は、PHT存在下で培養したHGFを用いて経日的な定量解析を行った。すなわち、コラーゲンコートした蛍光ビーズをFCS（−）培地に添加し、HGFと3時間反応させた後、ビーズを貪

食したHGFの割合をフローサイトメトリー法により解析した。

7）α2β1インテグリン発現の評価は、PHT刺激後5、15日後のHGFタンパク画分を用いて、ウエスタンブロット法により行った。タンパク検出には抗α2およびβ1インテグリン抗体を用いた。

8）ERK1/2リン酸化およびIκB-α分解の評価は、PHT刺激後15、30、60分のHGF回収試料を用いてウエスタンブロット法により行った。タンパク検出には抗phospho-p44/42 MAP kinase抗体、抗p44/42 MAP kinase抗体、抗IκB-α抗体および抗NF-κB抗体を用いた。

9）有意差検定にはSheffe's F testを用いた。

【結果】

1）PHT刺激によるHGFの増殖促進は認められなかったが、コラーゲン産生はPHT濃度依存的に促進された。一方、IおよびⅢ型コラーゲンmRNA発現はPHT濃度依存的に抑制された。

2）MMP-1、2、3およびTIMP-2、3のmRNA発現は、PHT濃度依存的に抑制された。一方、TIMP-1 mRNAの発現は顕著に促進された。タンパクレベルにおいてもPHT濃度依存的にMMP-1、2、3は減少し、TIMP-1は増加した。

3）PHT刺激によりHGFのα2β1インテグリンのmRNAおよびタンパク発現量は濃度依存的に抑制されると共に、コラーゲン貪食能も減少した。

4）MMPs、TIMPsおよびインテグリンmRNA発現に関与するERK1/2のリン酸化およびIκB-αの分解はPHT添加後15、30分で濃度依存的に抑制された。

【考察および結論】

PHT誘発性歯肉肥大の成因と考えられるHGFコラーゲンタンパクの蓄積機序について、*in vitro*実験系で検討を加えた。その結果、PHT添加によりもたらされるHGFのERK1/2リン酸化の抑制、およびIκB-αの分解抑制によると考えられるMMPsとα2β1インテグリンの発現抑制が認められ、さらにTIMP-1の増加に伴いMMPsの活性が阻害され、同時にα2β1インテグリンの発現抑制によるHGFのコラーゲン貪食能の低下を来たし、コラーゲン分解が低下することが示唆された。これらの作用によりPHT服用者においては、歯周組織に細胞間質コラーゲンの蓄積を生じ、歯肉肥大が誘発される可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト歯肉線維芽細胞のコラーゲン代謝に及ぼす抗てんかん薬フェニトインの作用を*in vitro*実験系で検討したものである。

その結果、フェニトイン誘発性の肥大歯肉組織におけるコラーゲンの蓄積は、フェニトインがヒト歯肉線維芽細胞のコラーゲン合成能を亢進させることによるのではなく、ヒト歯肉線維芽細胞のERK1/2またはNF-κBを介したシグナル伝達系を阻害することにより、コラーゲン分解が細胞内外で抑制される結果生じることが示された。

本論文は、フェニトイン誘発性歯肉肥大におけるコラーゲンの蓄積機序について、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。