



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

氏名	か　藤　隆　大
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 50 μg/ml および fungizone 1 μg/ml 含有 DMEM にて、飽和湿度下、5% CO₂ 存在下、37°C 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、0~20 μg/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、ウエスタンプ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 を用いて経目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) $\alpha 2\beta 1$ 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、ウエスタンプロット法により行った。タンパク検出には抗 $\alpha 2$ および $\beta 1$ インテグリン抗体を用いた。

8) ERK1/2 リン酸化および $I\kappa B\cdot\alpha$ 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プ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 $I\kappa B\cdot\alpha$ 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つたが、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 $\alpha 2\beta 1$ 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 発現に関する ERK1/2 のリン酸化および $I\kappa B\cdot\alpha$ 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 $I\kappa B\cdot\alpha$ の分解抑制によると考えられる MMPs と $\alpha 2\beta 1$ 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 $\alpha 2\beta 1$ 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。