

博士（歯学） 加藤晶久

学位論文題名

ヒト歯肉由来線維芽細胞におよぼす  
高濃度ニフェジピンの影響

学位論文内容の要旨

緒言

ニフェジピンによる歯肉増殖症では歯肉結合組織内のコラーゲンの増生が特徴として認められる。歯肉結合組織の主な細胞外基質は I 型コラーゲンであり、歯肉線維芽細胞によるコラーゲンの産生と分解が平衡関係を保つことで歯肉結合組織の恒常性は維持されているが、コラーゲンの増生はこの恒常性のバランスが崩壊した結果、生じると考えられている。コラーゲンの増生の原因として線維芽細胞数の増加、線維芽細胞によるコラーゲンの産生の亢進、細胞外分解の低下、および細胞内分解の低下などについて報告があるが、ニフェジピンの直接的あるいは間接的作用など詳細については不明な点が多く残されている。高血圧症の治療として、ニフェジピンを服用している患者におけるニフェジピンの最小有効血中濃度は 10~15ng/ml で、最大血漿中濃度は 100ng/ml とされており、これまでの多くの報告がこれらに近い濃度のニフェジピンを用いている。

しかし、歯肉溝滲出液中のニフェジピン濃度は血漿中濃度の最大 300 倍の濃度が認められており、高濃度のニフェジピンを用いて歯肉線維芽細胞への影響を検索した報告は現在まで行われていない。

そこで本実験では、歯肉増殖症の原因の 1 つとして高濃度ニフェジピンの関与を明らかにするため、高濃度ニフェジピンが培養ヒト歯肉線維芽細胞のコラーゲン代謝に直接的におよぼす影響を検索することを目的とした。

材料と方法

・実験に用いた細胞

北海道大学病院歯科診療センターを受診した一人の患者より十分なインフォームドコンセントを得た上で採取した正常歯肉組織を、リン酸緩衝液で数回洗浄後、組織を細片化して 0.1% コラゲナーゼ処理を行った。遠心洗浄を行った後、細胞を 10% FBS、ペニシリン-ストレプトマイシンを含む、D-MEM を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の気相下で、通法に従い培養を行った。初代培養により、歯肉組織からディッシュ上に遊離・増殖した線維芽細胞が confluence になる直前で 0.05% トリプシン/ EDTA 溶液処理を行って回収し、培養・継代を行った。本実験には 5~8 継代した細胞を使用した。

・ニフェジピンの調整

ニフェジピンを最終濃度 4500 (最小有効血中濃度の 300 倍)、1000 (最大血漿中濃度: C<sub>max</sub> の 10 倍)、100 (C<sub>max</sub>)、15 (最小有効血中濃度) ng/ml となるよう 100% エタノール中に溶解し、100 mm 径の培養ディッシュ中の培地に添加し、6、12、24、あるいは 48 時間培養を行った。コントロール群には実験群と同量のエタノールのみを添加したもの用いた。

・ニフェジピンの細胞増殖に及ぼす影響

96-well マイクロプレートに 1 wellあたり  $5 \times 10^4$  cells/100  $\mu$  l を播種し、各濃度のニフェジピンを添加して 12、24 および 48 時間培養を行った。培養期間終了後、Cell Counting Kit-8 を用いてメーカーの指示する方法に従い、マイクロプレートリーダーで各 well における 450 nm の吸光度を測定して生細胞数の測定を行った。

#### ・ニフェジピンが細胞形態に及ぼす影響

光学顕微鏡で confluence に到達する前の線維芽細胞の形態を観察した。

#### ・ニフェジピンの mRNA 発現におよぼす影響

培養期間終了後、TRIzol により抽出した Total RNA から ReverTra Ace を用いた逆転写反応によって cDNA を得た。I 型コラーゲン ( $\alpha$  1)、MMP-1、TIMP-1、 $\alpha$  2 インテグリン、 $\beta$  1 インテグリン、transforming growth factor (TGF) - $\beta$  1 およびグリセロアルデヒド-3 リン酸-デヒドロゲナーゼ (GAPDH) に特異的なプライマーと KOD Plus を用いた Polymerase chain reaction (PCR) 法により遺伝子断片を増幅した。本実験では 4 回のサンプリングを行い、それぞれ 1 回の RT-PCR 法を行った上で遺伝子発現の内部標準である、GAPDH 発現に対する各遺伝子の相対的発現量を求めた。

### 結果

#### 1. 細胞増殖

いずれの濃度でも細胞数は時間依存的に増加しており、12、24 および 48 時間後の全てにおいて、ニフェジピンによる細胞増殖に対する影響は認められなかった。

#### 2. 細胞形態

いずれのニフェジピン濃度においても、細胞は細長く扁平な形をしており、両端に長い細胞突起を出している。細胞の大きさにも違いは認められなかった。光学顕微鏡を用いての肉眼的観察においては、ニフェジピン濃度の違いによる歯肉線維芽細胞の形態に変化は認められなかった。

#### 3. mRNA 発現

PCR 反応の結果、歯肉線維芽細胞の GAPDH、I 型コラーゲン、MMP-1、TIMP-1、 $\alpha$  2 インテグリン、 $\beta$  1 インテグリンおよび TGF- $\beta$  1 mRNA 発現が認められた。今回の実験結果において、mRNA 発現に明らかな変化を認めたのは I 型コラーゲンのみであった。有意な I 型コラーゲン mRNA 発現亢進が培養 24 時間後では 4500 ng/ml の濃度に、48 時間後では 1000、4500 ng/ml の濃度に認められた。

MMP-1 mRNA 発現は 24 時間後にやや低下する傾向を示したが、明らかな変化は認められなかった。TIMP-1 mRNA 発現に有意差は認められず、その発現も培養期間を通じてほとんど変化は認められなかった。 $\alpha$  2 インテグリン mRNA 発現に有意差は認められなかったが、経時的に発現はわずかに低下する傾向が認められた。 $\beta$  1 インテグリン mRNA 発現に有意差は認められず、TIMP-1 と同様に培養期間を通じて mRNA 発現にほとんど変化は認められなかった。TGF- $\beta$  1 mRNA 発現に有意差は認められなかったが、経時的に発現がわずかに上昇する傾向が認められた。

### 考察

本実験の結果では高濃度ニフェジピンの歯肉線維芽細胞に対する影響について、mRNA 発現レベルではコラーゲンの分解抑制ではなくコラーゲンの產生亢進であることが示唆された。I 型コラーゲンの、mRNA 発現と合成の相関関係が示されており、本実験の結果はコラーゲン合成の亢進を示唆することが考えられる。

ニフェジピンによる歯肉増殖症のメカニズムについては多くの報告があるが、その結果は一致していない。その理由として薬剤濃度の違い、細胞の個体差、および培養条件などが考えられる。培養期間の違いにより、異なる結果が得られた、という報告や複数の患者由来の正常歯肉由来線維芽細胞を用いた実験の結果、個体差による反応性の違いが大きかったことを示す報告がある。これらのことか

ら本実験では低濃度のニフェジピンに対しての反応性が認められず、高い濃度にのみ反応が認められたが、この結果は全ての被験者の場合に期待できるのではなく同じ表現型を持つ場合にのみ生ずる可能性がある。

また、本研究では薬剤の直接的作用についての検索を行ったが、歯肉増殖症の発症にはプラークや歯石などの局所の炎症因子が、関与していることが考えられているため、今後はサイトカインやマクロファージなど他の細胞を介した間接的作用を解明する必要があると考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 川浪雅光

副査 教授 鈴木邦明

副査 教授 進藤正信

## 学位論文題名

### ヒト歯肉由来線維芽細胞における 高濃度ニフェジピンの影響

### 高濃度ニフェジピンの影響

審査は主査、副査全員が一同に会して口頭で行った。はじめに申請者に対し、本論文の要旨の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

ニフェジピンによる歯肉増殖症では歯肉結合組織内のコラーゲンの増生が特徴として認められる。歯肉結合組織の主な細胞外基質は I 型コラーゲンであり、コラーゲンの増生の原因として線維芽細胞数の増加、線維芽細胞によるコラーゲンの産生の亢進、細胞外分解の低下、および細胞内分解の低下などについて報告があるが、ニフェジピンの直接的あるいは間接的作用など詳細については不明な点が多く残されている。高血圧症の治療として、ニフェジピンを服用している患者におけるニフェジピンの最小有効血中濃度は 10～15ng/ml で、最大血漿中濃度は 100ng/ml とされており、これまでの多くの報告がこれらに近い濃度のニフェジピンを用いている。しかし、歯肉溝滲出液中のニフェジピン濃度は血漿中濃度の最大 300 倍の濃度が認められており、高濃度のニフェジピンを用いて歯肉線維芽細胞への影響を検索した報告は現在まで行われていない。そこで本実験では、歯肉増殖症の原因の1つとして高濃度ニフェジピンの関与を明らかにするため、高濃度ニフェジピンが培養ヒト歯肉線維芽細胞のコラーゲン代謝に直接的におよぼす影響を検索した。

実験には北海道大学病院歯科診療センターを受診した一人の患者より十分なインフォームドコンセントを得た上で採取した正常歯肉組織から通法に従い、得られた線維芽細胞を 5～8 繼代した細胞を使用した。ニフェジピンを最終濃度 4500、1000、100、15 および 0 ng/ml となるよう 100% エタノール中に溶解して 100 mm 径の培養ディッシュ中の培地に添加し、6、12、24、あるいは 48 時間後におけるニフェジピンの影響を検索した。ニフェジピンの細胞増殖に及ぼす影響については 96-well マイクロプレートに 1 well あたり  $5 \times 10^4$  cells/100μl を播種し、培養期間終了後、生細胞数の測定を行った。ニフェジピンが細胞形態に及ぼす影響については光学顕微鏡で confluence に到達する前の細胞の形態を観察した。ニフェジピンの mRNA 発現におよぼす影響については I 型コラーゲン(α1)、MMP-1、TIMP-1、α2 インテグリン、β1 インテグリン、TGF-β1 および GAPDH に特異的なプライマーと KOD Plus を用いた PCR 法により遺伝子断片を増幅した。本実験では4回のサンプリングを行い、それぞれ1回の RT-PCR 法を行った上で遺伝子発現の内部標準である GAPDH 発現に対する各遺伝子の相対的発現量を求めた。One-way ANOVA、Mann-Whitney U-test を用いて統計学的有意差検定を行い、p<0.05 を有意差ありとした。

各培養時間における生細胞数には優位差は認められず、ニフェジピンの細胞増殖に対する影響は認められなかった。細胞形態はいずれの濃度でも細胞は細長く扁平な形をしており、両端に長い細胞突起を出しておらず、大きさにも違いは認められなかった。mRNA 発現に対する影響では type I コラーゲン mRNA 発現は、24 時間後では 4500ng/ml の濃度で、48 時間後では、1000 および 4500ng/ml の濃度で、コントロールと比較して発現の有意な上昇を認めた。しかし、MMP-1、TIMP-1、TGF- $\beta$  1、 $\alpha$  2 インテグリンおよび  $\beta$  1 インテグリンの mRNA 発現には明らかな変化は認められなかった。

以上、高濃度ニフェジピンの歯肉線維芽細胞に対する影響について、mRNA 発現レベルでは、コラーゲンの分解抑制ではなく、コラーゲンの産生亢進であり、I 型コラーゲンの mRNA 発現と合成の相関関係が示されていることから、本実験の結果ニフェジピンによる歯肉増殖症の発症原因の一つとして、歯肉溝滲出液中の高濃度ニフェジピンによる歯肉線維芽細胞に対する作用が示唆された。

引き続き審査担当者と申請者の間で、論文内容及び関連事項について質疑応答がなされた。主な質問事項として、

- (1) ニフェジピンの代謝産物であるM1の作用について
- (2) TGF- $\beta$ 1 の MMP-1 発現抑制機構について
- (3) インテグリンによる細胞内分解経路について
- (4) 実験に使用した細胞の性質について
- (5) 増殖した歯肉内における血管形態について
- (6) responder および non-responder の違いについて

などであった。

これらの質問に対し、申請者は適切な説明によって回答し、本研究の内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野についても十分な理解と学識を有していることが確認された。本研究は高濃度ニフェジピンの歯肉線維芽細胞に対する影響は I 型コラーゲン mRNA 発現を高めることであり、これにより I 型コラーゲンの合成が増加することが歯肉増殖症を引き起こす原因の一つとなる可能性を示したことにより、臨床における薬剤性歯肉増殖症の解明に対して重要な指針を与えたことが高く評価された。本研究の内容は、歯科医学の発展に十分貢献するものであり、審査担当者全員は、学位申請者が博士(歯学)の学位を授与するのに値するものと認めた。