

研究者：蓑輪映里佳

(所属：北海道医療大学 口腔構造・機能発育学系 小児歯科学分野)

研究題目：歯肉線維芽細胞に対するフェニトイン (PHT) の作用—Ca²⁺応答と歯肉増殖に対する PHT の作用—

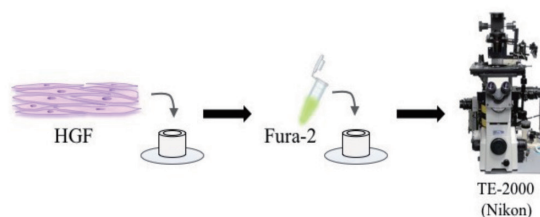
目的：

神経細胞の興奮性を抑制する薬剤の一つであるフェニトイン (PHT) は、神経細胞膜に存在する電位依存性 Na⁺チャネルを阻害して脱分極を抑制する薬物であり、抗てんかん薬として広く用いられている。PHT 服用者の約 50% が副作用として歯肉増殖症を発症することが知られており、薬物性歯肉増殖症 (Drug-induced gingival enlargement : DIGE) と呼ばれている。これはヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) の増殖や、コラーゲン代謝の不均衡などの要因が複合して生じるとされているがその原因の特定は明らかではない。

DIGE の治療と重症化予防において、歯肉の炎症など口腔内環境の影響が示唆される。炎症はオートコイドやサイトカインを含む様々な生理活性物質が作用し、細胞内メッセンジャーとして細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) を上昇させる。[Ca²⁺]_i の上昇は、細胞の増殖、分化、遊走、遺伝子発現など様々な細胞機能の調節に関連しており、Ca²⁺シグナリングと呼ばれている。しかし、DIGE と Ca²⁺シグナリングの相関は未だに明らかにされていない。PHT による歯肉増殖の発症には、これらの生理活性物質による Ca²⁺応答に対する PHT の関与が考えられ、PHT 単独の作用よりも、炎症性サイトカインや成長因子と PHT の相互作用が重要である可能性が示唆される。そこで本研究では、ライブセルイメージング法を用いて HGF における PHT による [Ca²⁺]_i 上昇のメカニズムを明らかにし、生理活性物質を介した Ca²⁺応答に対する PHT の作用を解明することを目的とする。

対象および方法：

実験には HGF (Cell Line Service) を用い、10% 牛胎児血清を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) で培養した。細胞をフィブロネクチンでコートした測定用チャンバーに播種し、CO₂ インキュベーターにて 2-5 日間培養した。Ca²⁺ 測定の前 1-2 時間前に 2 μM の Fura-2/



AM を含有した Hank's balanced salt solution with HEPES を用いて室温で 20 分間インキュベートし、細胞内に Fura-2 を導入した。[Ca²⁺]_i は倒立型顕微鏡 TE-2000 (Nikon) を用いたイメージングシステム AQUACOSMOS (Hamamatsu) で測定した。345 および 380 nm の励起光を照射し、EM-CCD カメラにて蛍光を記録した。それらの蛍光強度比を画像化し、HGF における [Ca²⁺]_i の動態のイメージング解析を行った。細胞内 Ca²⁺ 動態のライブイメージングは全て室温で行った。

解析では 3 回以上の実験で得られた全ての細胞の蛍光比の時系列信号の平均値と標準誤差 (n

=細胞数)を算出して、蛍光比の変化をグラフ化した。統計解析にはIBM SPSS® Statistics version26を用いて解析した。2群間の検定にはStudent's *t*-testを用い、*p* < 0.05を統計学的に有意差有りとした。

結果および考察：

(1) HGFにおけるPHT添加による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の作用機序の解明

HGFに100 μ MのPHTを作用させると88.2%の細胞で $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した。このPHTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応は細胞外液 Ca^{2+} 非存在下でも認められた。PHTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の仕組みを解明するため小胞体内 Ca^{2+} ポンプ阻害剤であるタプシガルギン(ThG)によって細胞内 Ca^{2+} ストアを枯渇させた状態におけるPHTの作用を調べた。2 μ MのThGによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇後、100 μ MのPHT添加によって $[Ca^{2+}]_i$ がさらに上昇したことから、PHTによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、細胞内 Ca^{2+} ストアへの Ca^{2+} 取り込みの抑制やストアからの Ca^{2+} 放出の促進は関与しないことが示された(図1)。

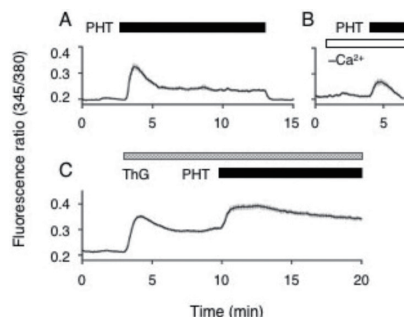


図1 HGFにおけるPHT添加による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の作用機序

- A : PHT添加により $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した。
- B : 細胞外液 Ca^{2+} 非存在下においてPHT添加により $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した。
- C : ThG処理後においてPHT添加により $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した。

(2) PHTによる Ca^{2+} 排出機構 Na^+/Ca^{2+} 交換体(NCX)の抑制

これらの結果から、PHTによるHGFの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、 Ca^{2+} 排出の抑制によるものである可能性が強く示唆された。細胞内 Ca^{2+} の主要な排出機構である Na^+/Ca^{2+} 交換体(NCX)の関与の可能性を調べるため、細胞外 Na^+ 非存在下でのPHTの作用を調べた。細胞外液の Na^+ 除去により、NCXの逆回転によって $[Ca^{2+}]_i$ が上昇することが知られており、この $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はPHTによって抑制された。よって、PHTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、細胞膜上のNCX抑制による Ca^{2+} 排出阻害によるものである可能性が考えられた。以上の結果から、PHTによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出や細胞外からの Ca^{2+} 流入ではなく、 Ca^{2+} 排出機構の抑制によって生じることが明らかとなった(図2)。

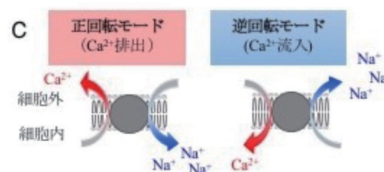
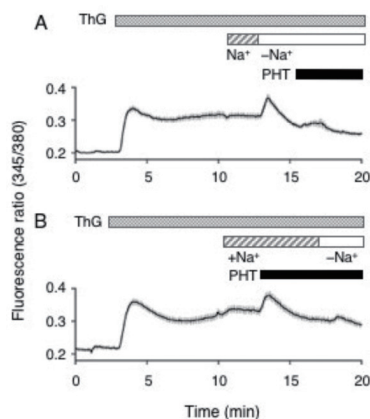


図2 PHTによる Ca^{2+} 排出機構 Na^+/Ca^{2+} 交換体(NCX)の抑制

- A : 細胞外液から Na^+ を除去するとNCXの逆回転によって $[Ca^{2+}]_i$ が上昇し、その後PHTを添加すると $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は認められなかった。
- B : 細胞外液 Ca^{2+} 存在下においてPHTを添加すると $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した。その後、PHT存在下で細胞外液から Na^+ を除去すると $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は認められなかった。
- C : NCXの正回転および逆回転モード。

(3) ATP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する PHT の増強作用

PHT の NCX 抑制による Ca^{2+} 排出阻害は、様々な刺激によって起こる Ca^{2+} 応答を増強する可能性が考えられたため、ATP による HGF の Ca^{2+} 応答に対する PHT の作用を調べた。

HGF を $1 \mu M$ の ATP で刺激すると、22.2%の細胞で小さな $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起こった。ATP 除去後 $1 \mu M$ の ATP で2回目の刺激を行うと、反応する細胞が15.5%に減少した。一方、 $100 \mu M$ の PHT 存在下で2回目の ATP 刺激をすると94.1%の細胞で $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した。これらを定量的に解析すると、2回目の ATP 刺激による Ca^{2+} 応答は、PHT 非存在下では1回目の23.8%であったのに対し、PHT 存在下では2.6倍に増大した。また、1回目の ATP 刺激に不応答であった細胞で、2回目の刺激に反応した細胞は全く無かったが、PHT 存在下で ATP 刺激をすると90.9%の細胞の $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した (図3、4)。

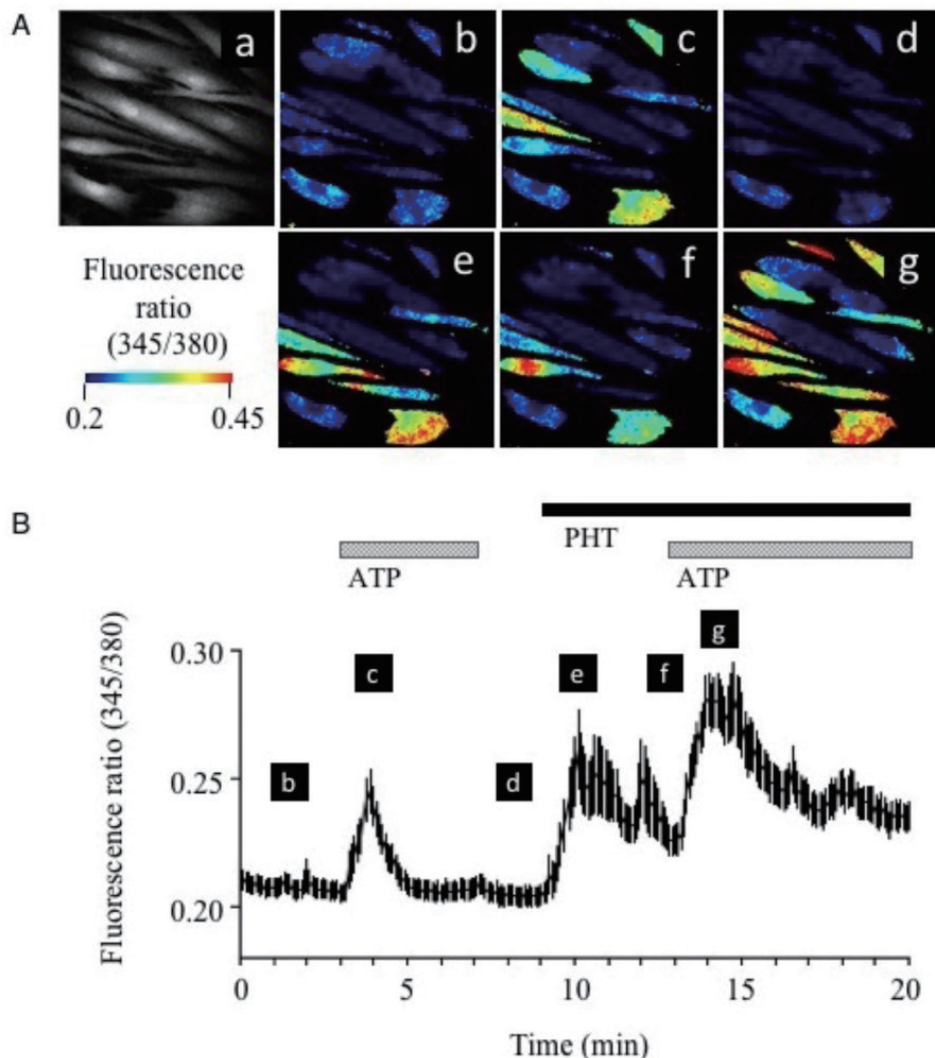


図3 低濃度 ATP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する PHT の増強作用

A : Fura-2 を取込ませた HGF の 380 nm の蛍光イメージ (a) と 345 nm/380 nm のレシオイメージ (b-g)。

B : 蛍光比 (平均 \pm 標準誤差) の経時変化。 $1 \mu M$ の ATP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を確認し HBSS-H で洗浄後 PHT を添加すると $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した。 PHT 存在下で $1 \mu M$ の ATP を添加すると、再び $[Ca^{2+}]_i$ の上昇反応を示した。

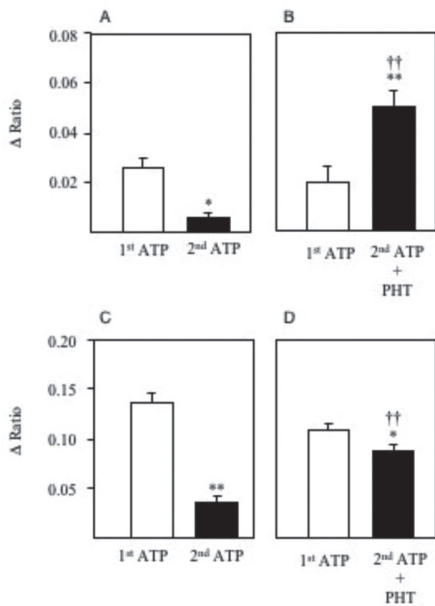


図4 ATPによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する PHT の増強作用

1 回目 (1ST) および 2 回目 (2nd) の ATP 刺激による ratio の変化 (Peak 値 - Base 値)。

A: PHT 非存在下では、1 回目の ATP 刺激と比較して 2 回目の ATP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応はした。

B: PHT 存在した (+PHT) で 2 回目の ATP 刺激をすると $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応は増強された (平均値 ± 標準誤差, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。A の 2 回目の反応は 1 回目の 23.8% であったのに対して、B の 2 回目の反応は 1 回目の 263% となった (^{††} $p < 0.01$)。

C: PHT 非存在下では、1 回目の ATP 刺激と比較して 2 回目の ATP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇反応は減弱した。

D: PHT 存在下 (+PHT) で 2 回目の ATP 刺激をすると $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応は 1 回目の ATP 刺激と比較して 81.1% を示した (平均値 ± 標準誤差, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。A の 2 回目の反応は 1 回目の 26.5% であったのに対して、B の 2 回目の反応は 1 回目の 81.1% となった (^{††} $p < 0.01$)。

HGF を 10 μ M の ATP で刺激すると 96.4% の細胞で $[Ca^{2+}]_i$ が上昇し、ATP 除去後 2 回目の ATP 刺激によって、78.5% の細胞で $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起こった。一方、100 μ M の PHT の存在下で 2 回目の ATP 刺激をすると、98.2% の細胞で $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した。これらを定量的に解析すると、2 回目の ATP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、PHT 非存在下では 1 回目の 26.5% であったのに対し、PHT 存在下では 81.1% であった。これらの結果から、PHT が ATP 刺激による Ca^{2+} 上昇を増強することが確認され、特に弱い ATP 刺激に対し不応答であった細胞においても、PHT 添加によって明らかな $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められた (図 4)。

結 論：

本研究により、PHT による HGF の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起こり、その作用機序として、PHT が細胞膜上の NCX を抑制し、 Ca^{2+} 排出阻害を引き起こすことが明らかとなった。また、PHT の Ca^{2+} 排出阻害作用により、ATP によって生じる生理的な Ca^{2+} 応答が増強された。

これらの結果から、生理的条件や軽度の炎症反応で生じる HGF における Ca^{2+} 応答が PHT によって増強されることで、歯肉増殖症に関連する遺伝子発現や増殖に影響を与え、歯肉増殖症の発症や増悪に関与していることが考えられた。

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

- ・ 蓑輪映里佳、岡田悠之介、佐藤夕紀、倉重圭史、谷村明彦、齊藤正人、生理的的刺激によるヒト歯肉線維芽細胞の Ca^{2+} 応答とフェニトインの作用、第 58 回日本小児歯科学会大会
- ・ 蓑輪映里佳、倉重圭史、根津顕弘、齊藤正人、谷村明彦、ヒト歯肉線維芽細胞の細胞内カルシウムイオン濃度調節機構に対するフェニトインの作用、第 62 回歯科基礎医学会学術大会
- ・ 現在英語論文の投稿準備中