

論 文 要 旨

【歯肉線維芽細胞に対するフェニトイン (PHT) の作用】

-生理活性物質を介する Ca^{2+} 応答に対する PHT の増強作用-

令和2年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

蓑輪 映里佳

【緒言】

てんかんは脳神経細胞の過剰な電氣的興奮によって起こる反復性発作を主徴とし、この電氣的興奮には細胞膜に存在するイオンチャンネルや受容体が関与する。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^+ チャン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。炎症はオータ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 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)を上昇させる。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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、 Ca^{2+} シグナリングと呼ばれている。しかし、DIGE と Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇のメカニズムを明らかにし、生理活性物質を介した Ca^{2+} 応答に対する PHT の作用を解明することを目的とする。

【材料および方法】

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、 CO_2 インキュベーターにて2-5日間培養した。 Ca^{2+} 測定の前1-2時間前に $2 \mu\text{M}$ 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。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の動態のイメージング解析を行った。細胞内 Ca^{2+} 動態のライブイメージングは全て室温で行った。

各環境下で得られた $n=3$ 以上のデータを比較検定し、平均値±標準誤差で算出を行った。

【結果および考察】

HGF に 100 μM の PHT を作用させると 88.2% の細胞で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇した。この PHT による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 μM の ThG による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇後、100 μM の PHT 添加によって $[\text{Ca}^{2+}]_i$ がさらに上昇したことから、PHT による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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。

これらの結果から、PHT による HGF の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇することが知られており、この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は PHT によって抑制された。よって、PHT による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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。

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 および Histamine による HGF の Ca^{2+} 応答に対する PHT の作用を調べた。

HGF を 1 μM の ATP で刺激すると、22.2% の細胞で小さな $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が起こった。ATP 除去後 1 μM 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 μM の PHT 存在下で 2 回目の ATP 刺激をすると 94.1% の細胞で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇した。

HGF を 10 μM の ATP で刺激すると 96.4% の細胞で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が起こった。一方、100 μM の PHT の存在下で 2 回目の ATP 刺激をすると、98.2% の細胞で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が認められた。

HGF を 3 μM の Histamine で刺激すると、53.7% の細胞で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が起こった。Histamine 除去後 3 μM の Histamine で 2 回目の刺激を行うと、1 回目と比較して反応

する細胞数に差は認められなかった。一方、100 μM の PHT 存在下で2回目の Histamine 刺激をすると 94.7%の細胞で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇した。これらを定量的に解析すると、2回目の Histamine 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、PHT 非存在下では1回目の 26.2%であったのに対し、PHT 存在下では 94.6%であった。また、1回目の Histamine 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 16.1%であったが、PHT 存在下における Histamine 刺激では 75.0%の細胞で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇した。

HGFを10 μM の Histamineで刺激すると 96.0%の細胞で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇し、Histamine 除去後、2回目の Histamine 刺激では、88.2%の細胞で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇した。一方、100 μM の PHT の存在下で2回目の Histamine 刺激をすると、85.7%の細胞で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇した。これらを定量的に解析すると、2回目の Histamine 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、PHT 非存在下では1回目の 50.3%であったのに対し、PHT 存在下では 51.2%であった。

これらの結果から、PHT が特に低濃度の ATP や Histamine の刺激による Ca^{2+} 応答を増強することが明らかとなった。ATP や Histamine の単独刺激では不応答であった細胞においても、PHT によって明らかに $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇し、G タンパク質共役型受容体を介して生じる弱い刺激や生理活性物質による Ca^{2+} 応答に対する PHT の増強作用が示された。

【結論】

本研究により、PHT による HGF の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 や Histamine によって生じる生理的な Ca^{2+} 応答が増強された。ATP や Histamine の単独刺激では不応答であった細胞も、PHT によって明らかに $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇し、G タンパク質共役型受容体を介して生じる弱い刺激や生理活性物質による Ca^{2+} 応答に対する PHT の増強作用が示された。

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。