

〔原著〕

ヒト歯肉線維芽細胞におけるCa<sup>2+</sup>/陽イオン交換体遺伝子の発現解析

蓑輪 映里佳<sup>1)\*</sup>, 金久保 千晶<sup>1)\*</sup>, 仙葉 慎吾<sup>2)</sup>, Rezon Yanuar<sup>2)</sup>, 倉重 圭史<sup>1)</sup>, 齊藤 正人<sup>1)</sup>, 谷村 明彦<sup>2)</sup>

1) 北海道医療大学歯学部 口腔構造・機能発育学系 小児歯科学分野

2) 北海道医療大学歯学部 口腔生物学系 薬理学分野

\*著者の蓑輪映里佳と金久保千晶は、本研究に等しく貢献した

## Expression analysis of Ca<sup>2+</sup>/cation antiporter genes in human gingival fibroblasts

Erika MINOWA<sup>1)\*</sup>, Chiaki KANAKUBO<sup>1)\*</sup>, Shingo SENBA<sup>2)</sup>, Rezon YANUAR<sup>2)</sup>, Yoshihito KURASHIGE<sup>1)</sup>,  
Masato SAITOH<sup>1)</sup>, Akihiko TANIMURA<sup>2)</sup>

1) Division of Pediatric Dentistry, Department of Growth and Development,  
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

2) Division of Pharmacology, Department of Oral biology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

\*Erika Minowa and Chiaki Kanakubo authors are contributed equally to this study.

**Key words** : Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers, K<sup>+</sup>-dependent Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers, Ca<sup>2+</sup>/cation exchangers, Human gingival fibroblast, Phenytoin

### Abstract

Gingival overgrowth induced by phenytoin is thought to be associated with Ca<sup>2+</sup> signaling. Our previous study revealed that phenytoin suppressed the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX) which was one of the Ca<sup>2+</sup> excretion mechanisms in human gingival fibroblasts (HGF), resulting in inhibition of Ca<sup>2+</sup> efflux and increasing intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) of HGF. However, the expression of the Ca<sup>2+</sup>/cation antiporter (CaCA) superfamily, including the NCX, in HGF is unknown. In the present study, therefore, the CaCA superfamily expressed in HGF was examined to determine the mechanism by which phenytoin increases [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. End-point PCR analysis showed clear expression of NCX1 in HGF, but not NCX2 or NCX3. Furthermore, weak expression of NCKX1 and NCKX3, the K<sup>+</sup>-dependent Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers, and NCLX, a mitochondrial NCX, was observed. Real-time quantitative PCR results were used to further investigate the relative expression levels of these CaCAs.

The relative expression levels of NCX1, NCKX1, and NCKX3 to housekeeping gene GAPDH expression were 2% ± SE 0.5%, 0.3% ± SE 0.05%, 0.4% ± SE 0.07% and 0.1% ± SE 0.05%, respectively. From these results, the members of the CaCA superfamily present in the plasma membrane of HGF were estimated to be NCX1, NCKX1, and NCKX3, which accounted for 76.2%, 17.7%, and 6.1% of the total, respectively. The expression of NCX2 and NCX3 was not confirmed, but the expression of NCLX was confirmed. These results suggest that NCX1 is the major component of the CaCA superfamily on the plasma membrane of HGFs. The present study suggests that phenytoin primarily suppresses NCX1, leading to an increase of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in HGF. NCLX, NCKX1, and NCKX3 are also thought to be suppressed by phenytoin and partially contribute to [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> dynamics in HGF.

### 緒 言

フェニトインは抗てんかん薬として広く使用されており、主に神経細胞膜の電位依存性Na<sup>+</sup>チャンネルを阻害す

ることで脱分極を抑制すると考えられている (Rogawski & Löscher, 2004)。フェニトインの副作用で、歯肉増殖がみられることがあり (Kimball, 1939)、服用者の約50%に発症するとされている (Kataoka et al., 2005)。同

様に、歯肉増殖は免疫抑制剤であるシクロスポリンAやカルシウム拮抗剤であるニフェジピンの副作用としても認められ (Kataoka et al., 2005), 薬剤性歯肉増殖症 (DIGO) と呼ばれている。しかし、その原因解明には至っていない (Brown & Arany, 2015; Sabarudin et al., 2022)。

DIGOの発症機序において、ヒト歯肉線維芽細胞 (Human Gingival Fibroblasts: HGF) を用いた研究から、DIGOの発症には細胞増殖の亢進やアポトーシスの抑制によるHGF数の増加 (Sano et al., 2004; Kantarci et al., 2007), コラーゲン合成促進やコラーゲン分解の抑制による結合組織の蓄積が関与することが示唆されている (Kataoka et al., 2005; Brown & Arany, 2015; Hassell, 1982; Kantor & Hassell, 1983)。

フェニトイン、シクロスポリンA、ニフェジピンの化学構造や固有の薬理作用はそれぞれ異なるが、これらの薬剤はいずれも細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) の動態に影響を及ぼし、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇がDIGOの引き金になると提唱されている (Hattori & Wang, 2008; Hattori et al., 2011; MODÉER et al., 1991; Hattori et al., 2013; Hattori et al., 2012; López-González et al., 2017; Pfeilschifter & Rüegg, 1987)。Ca<sup>2+</sup>は普遍的なセカンドメッセンジャーとして、多様な細胞機能の調節に関与する (Clapham, 1995)。細胞質のCa<sup>2+</sup>濃度は、様々な生理活性物質によって細胞が刺激を受けると細胞膜や細胞内Ca<sup>2+</sup>貯蔵部位 (Ca<sup>2+</sup>ストア) のCa<sup>2+</sup>チャネルが開口し、その濃度勾配を利用したCa<sup>2+</sup>ストアからのCa<sup>2+</sup>放出あるいはCa<sup>2+</sup>流入によって急激に上昇する (Leybaert & Sanderson, 2012)。

これらの細胞反応はCa<sup>2+</sup>シグナリングと呼ばれており、細胞運動、神経活動、分泌などの比較的早い反応を制御することが知られている (Wiegert & Bading, 2011)。さらにこれらのCa<sup>2+</sup>シグナルが増殖や遺伝子発現制御などに関連していることが明らかにされつつある (Cockcroft, 2006; Somlyo & Himpens, 1989; Tanimura et al., 1998; Yamashita et al., 2000)。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は静止状態において、Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体 (NCX) と細胞膜Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA) を介したCa<sup>2+</sup>の細胞外排出と、サルコ/小胞体Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) を介したCa<sup>2+</sup>ストアへの取り込みによって、約100 nMの低レベルに維持されている (Clapham, 2007)。HGFのような非興奮性細胞におけるCa<sup>2+</sup>シグナルは、G<sub>q/11</sub>タンパク質共役型受容体と受容体チロシンキナーゼとの相互作用による、イノシトール三リン酸 (IP<sub>3</sub>) 受容体を介した、細胞内貯蔵からのCa<sup>2+</sup>放出によって惹起される (Berridge, 2009; Clapham, 2007; Bagur & Hajnóczky, 2017)。これまでにヒスタミン、ブラジキニン、またはトリプシンによるGタンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) の活性化が、IP<sub>3</sub>依存的な細胞内貯蔵からのCa<sup>2+</sup>放出を介して、HGF細胞の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を活性化することが示されている (Ogata et al., 2003; Tanaka et al., 2004)。

フェニトインによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇のメカニズムについては未だに解明されていないものの、我々の先行研究によって、フェニトインがHGF細胞膜上のNCXsの阻害によって[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を上昇させる可能性が示唆された (Minowa et al., 2023)。Ca<sup>2+</sup>輸送性交換体のひとつであるNCXは、細胞内外のNa<sup>+</sup>濃度勾配を駆動力として、細胞

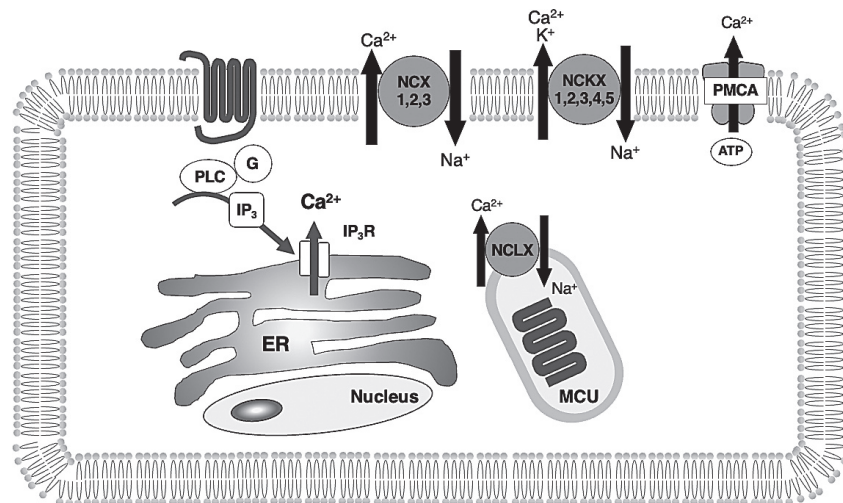


図1 細胞におけるCa<sup>2+</sup>排出機構

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は静止状態において、NCXやNCKX、およびPMCAを介したCa<sup>2+</sup>の細胞外排出と、SERCAを介した細胞内ストアへのCa<sup>2+</sup>の取り込みによって約100 nMの低レベルに維持されている。Ca<sup>2+</sup>輸送性交換体は、CaCA遺伝子のスーパーファミリーを構成しており、細胞膜上にはNCX1, 2, 3およびNCKX1, 2, 3, 4, 5が、ミトコンドリアにはNCLXが存在している。HGF等の非興奮性細胞では、細胞膜に存在するGPCRを介するCa<sup>2+</sup>シグナリングがよく知られている。GPCRが活性化すると、PLCがPIP<sub>2</sub>を切断して、IP<sub>3</sub>を生成する。このIP<sub>3</sub>が小胞体のIP<sub>3</sub>受容体と結合し、Ca<sup>2+</sup>が小胞体から放出する。

内のCa<sup>2+</sup>を細胞外へ汲み出すことで[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を低く保っている (Brini & Carafoli, 2011). 従って, NCXの抑制は, 細胞内Ca<sup>2+</sup>の細胞外への排出を抑制することによって[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇を引き起こす. またNCXは, 細胞外液のNa<sup>+</sup>除去によるNa<sup>+</sup>濃度勾配の逆転によって逆回転を起こし, 細胞外から細胞内へCa<sup>2+</sup>を流入させることが知られている (図1).

Ca<sup>2+</sup>輸送性交換体は, Ca<sup>2+</sup>/陽イオンアンチポーター (CaCA) 遺伝子のスーパーファミリーを構成しており, そのうち哺乳類ではNCX, K<sup>+</sup>依存性Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体 (NCKX), ミトコンドリアNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体 (NCLX) を含むCCXが発現している (Hassan & Lytton, 2020). またNCXにおいては, NCX1, 2, 3の3種類のメンバーが同定されており, NCX1は心臓, 脳, 腎臓, 血管をはじめとする種々臓器に普遍的に発現し, NCX2とNCX3は主に脳, 骨格筋に発現している (Iwamoto, 2004). NCXに加えて細胞膜上に存在するCa<sup>2+</sup>排出機構であるNCKXは5つの遺伝子からなるトランスポーターファミリーであり, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, およびK<sup>+</sup>を4:1:1.30の比率で輸送する (Hassan & Lytton, 2020). NCKXは, 主に神経細胞のCa<sup>2+</sup>輸送において重要な役を果たし, NCKX1の発現は主に桿体光受容体, NCKX2の発現は錐体光受容体を含むニューロンで発現する. NCKX3は脳の他に大動脈, 肺, 腸など平滑筋での発現が示唆され, NCKX4も脳および大動脈に豊富に存在する (Hassan & Lytton, 2020; Lytton et al., 2002). NCKX5は主に色素細胞で発現するとされるが (Williams et al., 2017), 他のNCKXファミリーメンバーとは異なりゴルジ体に関連する細胞内膜で発現しているとの報告がある (Ginger et al., 2008). さらにATP合成を司るミトコンドリアのNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>の交換体であるNCLXは, ミトコンドリアから細胞質内への主要なCa<sup>2+</sup>排出系を担っている (Hassan & Lytton, 2020) (図1). これらのCaCAスーパーファミリーは, 細胞内のCa<sup>2+</sup>ホメオスタシスやCa<sup>2+</sup>シグナル動態に大きく寄与しているとされているが, HGFにおいて発現するCaCAの種類やサブタイプは明らかにされていない.

本研究では, フェニトインによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇のメカニズムをより詳細に検討するために, HGFにおいて発現するCaCAスーパーファミリーのサブタイプを明らかにすることを目的とした.

## 材料および方法

### 1 細胞および培養

正常ヒト歯肉線維芽細胞 (Cell Line Service, Eppelheim, Germany), およびヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y,

German collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany) をそれぞれ60 mm Tissue Culture Dish (AGCテクノグラス, 静岡, 日本) に播種し, 2% Penicillin-Streptomycin (PS: Thermo Fisher scientific, Waltham, USA), 2 mM L-Glutamine (L-Glu: Thermo Fisher scientific, Waltham, USA), 10% fetal bovine serum (FBS: Biowest, Nuaille, France) 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose (DMEM: Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) を使用し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>にて培養し, 80%コンフルエントに達したものを使用した. ヒト胎児腎 (human embryonic kidney: HEK) 293 FT細胞 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を60 mm Tissue Culture Dishに播種し, 1% PS, 6 mM L-Glu, 0.1 mM MEM Non-Essential Amino Acids (NEAA: Thermo Fisher scientific, Waltham, USA), 1 mM MEM Sodium Pyruvate (Thermo Fisher scientific, Waltham, USA), 10% FBS含有DMEM high glucoseを使用し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>にて培養し, 80%コンフルエントに達したものを使用した. なお, SH-SY5YおよびHEK293 FTに関しては各プライマーの有効性を確認するために使用した.

### 2 プライマーの設計およびmRNA発現解析

RNeasy mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて total RNAを抽出後, ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR Master Mix (TOYOBO, 大阪, 日本) を用いてcDNAを作製した. 得られたcDNAをconventional PCRおよび電気泳動, ならびにSYBR Green法によるReal-time PCRにより解析した. 使用するプライマーはPrimer-BLASTを用いて設計した (表1).

エンドポイントPCRには, GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega, Madison, USA) を用いた. PCRはTaKaRa PCR Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Touch (タカラバイオ, 滋賀, 日本) を使用し, すべてのPCR条件は95°C 2minのプレヒーティング後に, 95°Cを20 sec, 60°Cを20 sec, 72°Cを20secの34サイクルを行い, 72°C 5min反応させた後, 4°Cまで冷却した. 増幅したDNAをエチジウムブロマイド含有1.5%アガロースゲル上で電気泳動し, UV照射して検出した.

次に, Real-time PCRはKAPA SYBR<sup>®</sup> FAST qPCRキット (ABI Prism qPCR) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) を使用し, Applied Biosystems StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) にてReal-Time qPCRにより, mRNAの発現解析を行った. また, 内的標準としてヒト GAPDHを使用した. Real-Time qPCRにて検出されたCt

表1 PCR解析に使用したプライマー

Target gene	Primer	Sequence (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)	Amplicon length (bp)
SLC8A1 (NCX1)	H_NCX1 Fwd	CGCACTTGGAAACATCAGTGC	60.11	193
	H_NCX1 Rev	GCCAGGGGACACTTGAACCT	60.18	
SLC8A2 (NCX2)	H_NCX2 Fwd	AGAGATGGGCAAGCCAGTTC	60.03	268
	H_NCX2 Rev	CACCTTCCAGAACACCGTCA	59.89	
SLC8A3 (NCX3)	H_NCX3 Fwd	TTCTGGAGGGACCAGTTC	60.1	73
	H_NCX3 Rev	CCCGGATTCATCTCATCCTC	59.72	
SLC8B1 (NCLX)	H_NCLX Fwd	GCTCACATTAGCCCCAGTT	60.03	172
	H_NCLX Rev	AGTGGCAGAAGATGCCTTCC	60.03	
SLC24A1 (NCKX1)	H_NCKX1 Fwd	CTTCCTTCTGCCATCGTGT	60.04	267 (177)
	H_NCKX1 Rev	ATGTCTCCCAGGCTTTTCG	60.04	
SLC24A2 (NCKX2)	H_NCKX2 Fwd	CTGAAACCCGCAAGCAAGTC	60.04	253
	H_NCKX2 Rev	AGATCAGGGATGGAGGTCCC	60.1	
SLC24A3 (NCKX3)	H_NCKX3 Fwd	GCAGGTGAACGACACTCTGA	59.97	176
	H_NCKX3 Rev	CAATGGCCAGCGCATAGAAC	59.97	
SLC24A4 (NCKX4)	H_NCKX4 Fwd	AGTATGGCAAGAACCCCGTG	60.04	206
	H_NCKX4 Rev	TTGAAGCGGCTTACTGCTCA	59.97	
SLC24A5 (NCKX5)	H_NCKX5 Fwd	ACCATCCTTGGATCTGCAATTT	58.28	297
	H_NCKX5 Rev	CATAGCTTTGGCAAGACAGGC	59.87	
Human GAPDH	H_gapdh Fwd	TTCGTCATGGGTGTGAACCA	67.6	287
	H_gapdh Rev	CCGTTCAGCTCAGGGATGAC	67.1	

値は、独立した4回の実験の平均と標準誤差で示した。ただし、Excel<sup>®</sup>統計2006（社会情報サービス、東京、日本）による検定で「外れ値」と判断されたデータは除外した。

## 結 果

### 1 Conventional PCRによるNCX1, 2, 3の遺伝子発現

HGF, SH-SY5Y, およびHEK293FTにおけるNCX1, NCX2, NCX3, GAPDHのmRNA発現を各ターゲット遺伝子の特異的プライマーを用いてconventional PCRにより増幅したサンプルを使用し電気泳動法により検出した（図2）。HGFでは、NCX1の発現を検出したものの、NCX2およびNCX3の発現は検出されなかった。そこで、これらのプライマーを用いてヒト神経芽細胞腫であるSH-SY5Y細胞に発現するNCXの種類を確認したところ、NCX1, 2, 3すべての発現が確認された。またHEK293FTでは、NCX1およびNCX2の発現が検出されたが、NCX3の発現は検出されなかった（図2）。

### 2 Conventional PCRによるNCLXおよびNCKX1, 2, 3, 4, 5の遺伝子発現

HGFにおけるNCX以外のCaCA発現を検討するために、conventional PCRにより、NCLX, NCKX1, NCKX2, NCKX3, NCKX4, NCKX5を検出した。HGFにおいては、NCLX, NCKX1に加えてごく僅かなNCKX3の発現が確認された。SH-SY5Yにおいては、NCLX, NCKX1の発現が検出された。HEK293FTにおいては、NCLXお

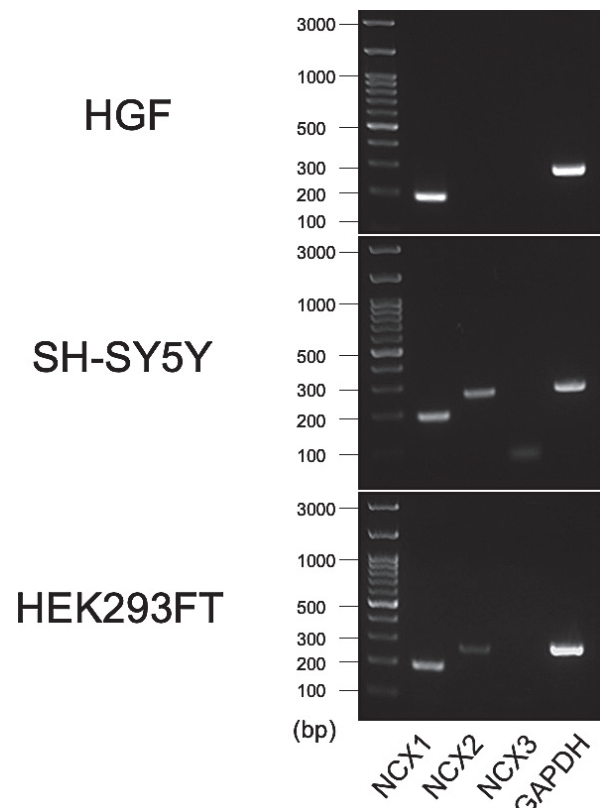


図2 Conventional PCRによるNCX1, 2, 3の遺伝子発現

HGF, SH-SY5Y, HEK293FTにおけるNCX1, NCX2, NCX3, GAPDHのmRNA発現を各ターゲット遺伝子の特異的プライマーを用いてconventional PCRにより増幅したサンプルを使用し電気泳動法により確認した。HGFでは、NCX1の発現を検出したものの、NCX2およびNCX3の発現は検出されなかった。SH-SY5Yに発現するNCXの種類を確認したところ、NCX1, 2, 3すべての発現が検出された。HEK293FTでは、NCX1およびNCX2の発現を検出したものの、NCX3の発現は検出されなかった。

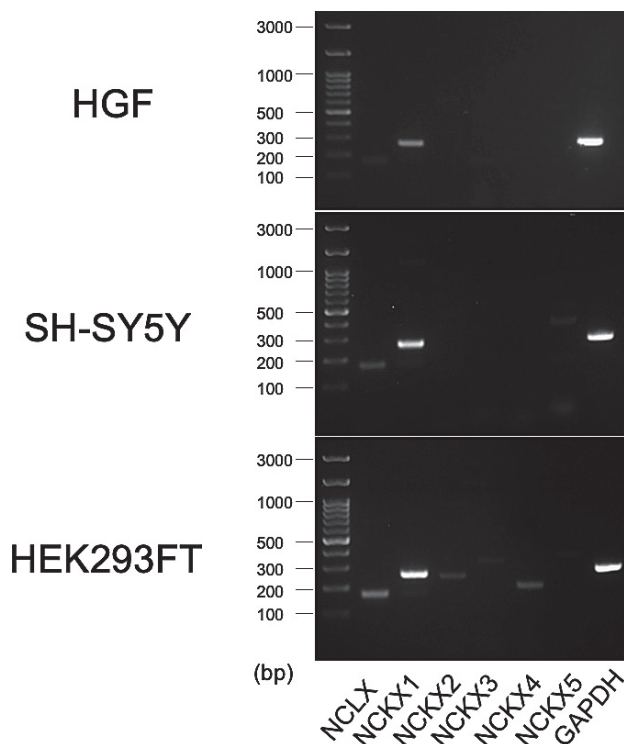


図3 Conventional PCRによるNCLXおよびNCKX1, 2, 3, 4, 5の遺伝子発現  
HGFにおいては、NCLX, NCKX1に加えて僅かなNCKX3の発現が確認された。SH-SY5Yにおいては、NCLX, NCKX1の発現が検出された。HEK293FTにおいては、NCLXおよびNCX1, 2, 4の発現が検出された。

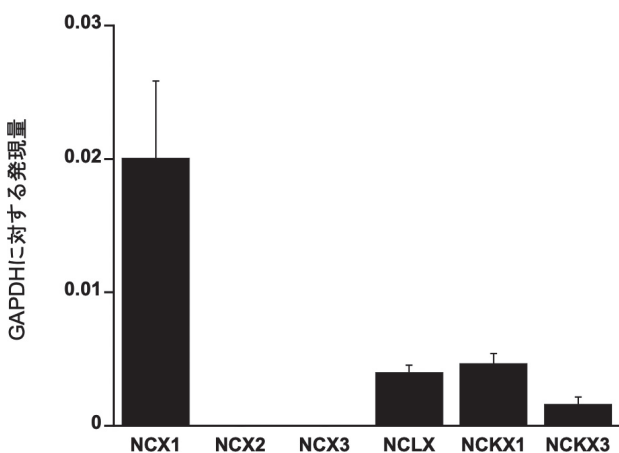


図4 HGFにおけるCaCAファミリーの遺伝子発現  
HGFにおいて、Conventional PCRによって検出されたNCX1, NCLX, NCKX1, NCKX3の相対的発現量をReal-time qPCRを使って解析した。NCX1, NCLX, NCKX1およびNCKX3の相対的発現量は、各々GAPDHの2% ± SE 0.5%, 0.3% ± SE 0.05%, 0.4% ± SE 0.07%および0.1% ± SE 0.05%であった。

およびNCKX1, 2, 4の発現が検出された(図3)。

### 3 HGFにおけるCaCAファミリーのmRNAの相対的発現量の比較

HGFにおいて、Conventional PCRによって検出された

NCX1, NCLX, NCKX1, NCKX3の相対的発現量をReal-time qPCRを使って解析した(図4)。GAPDH遺伝子のct値と、各CaCAのct値から求めたNCX1, NCLX, NCKX1およびNCKX3の相対的発現量(平均 ± S.E.)は、各々GAPDHの2.0 ± 0.5%, 0.3 ± 0.05%, 0.4 ± 0.07%, 0.1 ± 0.05%であった。またNCX2およびNCX3が発現していないことがreal-time qPCRにおいても確認された。この結果に基づいて細胞膜に発現するCaCAの相対的発現量を計算すると、NCX1が76.2%で最も多く、NCKX1とNCKX3は各々17.7%と6.1%であった。またPCRにおける増幅効率、それぞれNCX1が82.81%, NCLXが94.10%, NCKX1が86.52%, NCKX3が102.52%であった。

### 考 察

本研究より、HGFにおいてNCX1の発現が確認され、NCX2およびNCX3は発現していないことが明らかになった。同じプライマーを使ったPCRにおいて、SH-SY5YにおいてはNCX1, 2, 3が、HEK293FTにおいてはNCX1, 2の発現が検出されたことから、使用したプライマーに問題がないことが確認された。またHGFにおいてNCKX1およびNCKX3が発現することが初めて明らかとなった。同じプライマーを使ったPCRにおいて、SH-SY5YにおいてはNCKX1, 3が、HEK293FTにおいてはNCKX1, 2, 4の発現が検出されたことから、これらのプライマーには問題がないことが確認された。

GAPDH遺伝子のct値と、各CaCAのct値からこれらの遺伝子の相対的発現量を計算すると、細胞膜上に存在するCaCAファミリーの76.2%をNCX1が占め、NCKX1(17.7%)とNCKX3(6.1%)の発現量はNCX1と比較して少ないことが明らかになった。これらの値は異なるプライマーによるPCRの増幅効率を考慮していないため、厳密な発現比率を示しているわけではない。本研究で行ったPCRにおける増幅効率は、NCX1がNCKX1やNCKX3と比較して低かったことから、実際のNCX1の割合はより高い比率であると考えられた。NCX1は様々な臓器にユビキタスに発現するのに対し、NCX2およびNCX3は主に脳、骨格筋に発現しているとされる(Iwamoto, 2004)。これは、本研究で使用したすべての細胞においてNCX1の発現が認められた結果とも矛盾がない。従って、HGFの細胞膜においてNCX1がCa<sup>2+</sup>排出の主要な役割を担うと考えられる。フェニトイン誘発性の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇を調べた先行研究では、フェニトインによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇が、主にNCX阻害によるものであり、細胞内Ca<sup>2+</sup>排出におけるNCKXの関与がほとんど無いことが

示唆されている (Minowa et al., 2023). 本研究の結果は、この考えを強く支持するものである。

本研究では、HGFにおいてミトコンドリア内のCa<sup>2+</sup>を細胞質に排出する主要な経路を担っているNCLXの発現が明らかになった。細胞内小器官のなかで、カルシウムストアとして中心的な役割を担っているのは小胞体であるが、ミトコンドリアもCa<sup>2+</sup>の取り込みおよび排出機構を有している。ミトコンドリアへのCa<sup>2+</sup>の取り込みを主に担うのは内膜上に存在するミトコンドリアカルシウムユニポーターと呼ばれるCa<sup>2+</sup>チャネルである。MCUは[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇に依存して開口し、ミトコンドリアマトリックス内外の大きな電位差に従い、細胞質からミトコンドリア内にCa<sup>2+</sup>を流入させる (Baughman et al., 2011)。一方、NCLXはミトコンドリアから細胞質にCa<sup>2+</sup>を排出する仕組みとして働き (Palty et al., 2010)、このCa<sup>2+</sup>の取り込みと放出を通じて、Ca<sup>2+</sup>ウエーブやオシレーションの形成に寄与している (Ishii et al., 2006)。ミトコンドリアは小胞体と近接して局在するため、小胞体から放出されたCa<sup>2+</sup>がミトコンドリアに効率的に取り込まれる (Rizzuto et al., 1998)。 $[Ca^{2+}]_i$ は、小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出と取り込み、および細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入と排出のバランスによって均衡を保っていることから、NCLXがHGFにおける $[Ca^{2+}]_i$ の調節にも関わっていることが推測される。ミトコンドリアから細胞質へのCa<sup>2+</sup>放出に関与するNCLXの抑制は、 $[Ca^{2+}]_i$ の低下を起こすことが予想されるため、先行研究で示されたフェニトインによるHGFの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇にNCLXが関与する可能性は低いと考えられる。

本研究ではHGFにおけるNCKX5の発現は検出されなかった。同様にSH-SY5YやHEK293FTにおいてもNCKX5の発現は検出されなかった。NCKX5は主に色素細胞で発現すると報告されていることから (Williams et al., 2017)、本研究で用いた細胞においてNCKX5は発現していないと考えられるが、プライマーの有効性が低かった可能性は否定できない。NCKX5は、他のNCKXファミリーメンバーとは異なり細胞表面では発現せず、ゴルジ体に関連する細胞内膜で発現していると報告されていることから (Ginger et al., 2008)、フェニトインによるHGFの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に寄与する可能性は低いと考えられる。

本研究では、HGFにおいて細胞膜上に存在するCa<sup>2+</sup>排出機構として、NCX1、NCKX1、NCKX3の3種類のCaCAが発現していることが明らかとなった。その中で、NCX1が主要なCa<sup>2+</sup>排出機構と考えられた。しかし現時点では、NCXとNCKXの抑制におけるフェニトイン

の特異性やサブタイプの選択性は不明である。またDIGOなど病的な条件において、NCKXの発現比率が変化する可能性も考えられる。フェニトインの特異性およびサブタイプの選択性や、病態とNCXおよびNCKXの発現パターンの解析は、DIGOの発症メカニズムの解明に向けた今後の研究に重要と考えられる。

## 結 語

本研究により、HGFにおいてNCX1、NCLX、NCKX1、NCKX3が発現していることが明らかとなった。そのなかでも、細胞膜上のCa<sup>2+</sup>排出機構としてはNCX1が大部分を占めており、フェニトインによって生じる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はNCX1を阻害することに起因している可能性が示唆された。

## 謝 辞

本研究は、令和5年度科学研究費助成事業（若手研究）23K16190および、2020年北海道医療大学歯学会研究奨励金によって遂行されました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Bagur R, Hajnóczky G. Intracellular Ca<sup>2+</sup> sensing : its role in calcium homeostasis and signaling, *Mol cell* 66 (6), 780–788, 2017.
- 2) Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher–Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter, *Nature* 476(7360), 341–345, 2011.
- 3) Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signaling mechanisms, *Biochim Biophys Acta–Mol Cell Res* 1793(6), 933–940, 2009.
- 4) Brini M, Carafoli E. The plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(2), a004168, 2011.
- 5) Brown RS, Arany PR. Mechanism of drug–induced gingival overgrowth revisited : a unifying hypothesis. *Oral Dis*, 21(1), e51–61, 2015.
- 6) Clapham DE. Calcium signaling, *Cell* 80(2), 259–268, 1995.
- 7) Clapham DE. Calcium signaling, *Cell* 131(6), 1047–1058, 2007.

- 8) Cockcroft S. The latest phospholipase C, PLC $\eta$ , is implicated in neuronal function, *Trends Biochem Sci* 31 (1), 4–7, 2006.
- 9) Ginger RS, Askew SE, Ogborne RM, Wilson S, Ferdinando D, Dadd T, Smith AM, Kazi S, Szerencsei RT, Winkfein RJ. SLC24A5 encodes a trans-Golgi network protein with potassium-dependent sodium-calcium exchange activity that regulates human epidermal melanogenesis, *J Biol Chem* 283(9), 5486–5495, 2008.
- 10) Hassan MT, Lytton J. Potassium-dependent sodium-calcium exchanger (NCKX) isoforms and neuronal function, *Cell Calcium* 86, 102135, 2020.
- 11) Hassell TM. Evidence for production of an inactive collagenase by fibroblasts from phenytoin-enlarged human gingivae, *J. Oral Pathol.* 11(4), 310–317, 1982.
- 12) Hattori T, Ara T, Fujinami Y. Pharmacological evidences for the stimulation of calcium-sensing receptors by nifedipine in gingival fibroblasts. *J Pharmacol Pharmacother*, 2(1), 30–35, 2011.
- 13) Hattori T, Ara T, Fujinami Y. Pharmacological evidence for the involvement of calcium entry through TRPV1 channels in nifedipine-induced  $[Ca^{2+}]_i$  elevation in gingival fibroblasts, *Pharm. Pharmacol* 3(04), 427–432, 2012.
- 14) Hattori T, Nakano K, Kawakami T. Phenytoin-Induced Elevation of the intracellular calcium concentration by stimulation of calcium-sensing receptors in gingival fibroblasts, *Sci Res* 4–2, 261–265, 2013.
- 15) Hattori T, Wang P–L. Elevation of cytosolic calcium level triggers calcium antagonist-induced gingival overgrowth, *Eur J Pharmacol* 583(1), 37–39, 2008.
- 16) Ishii K, Hirose K, Iino M.  $Ca^{2+}$  shuttling between endoplasmic reticulum and mitochondria underlying  $Ca^{2+}$  oscillations, *EMBO rep* 7(4), 390–396, 2006.
- 17) Iwamoto T. Forefront of  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger studies : molecular pharmacology of  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange inhibitors, *J Pharmacol Sci* 96(1), 27–32, 2004.
- 18) Kantarci A, Augustín P, Firatli E, Sheff MC, Hasturk H, Graves Dana T, Trackman Philip C. Apoptosis in gingival overgrowth tissues, *J Dent Res* 86(9), 888–892, 2007.
- 19) Kantor ML, Hassell TM. Increased accumulation of sulfated glycosaminoglycans in cultures of human fibroblasts from phenytoin-induced gingival overgrowth, *J Dent Res* 62(3), 383–387, 1983.
- 20) Kataoka M, Kido J–I, Shinohara Y, Nagata T. Drug-induced gingival overgrowth—a review, *Biol Pharm Bull* 28(10), 1817–1821, 2005.
- 21) Kimball OP. The treatment of epilepsy with sodium diphenyl hydantoinate. *J Am Med Assoc* 112(13), 1244–1245, 1939.
- 22) Leybaert L, Sanderson Michael J. Intercellular  $Ca^{2+}$  waves : mechanisms and function, *Physiol Rev* 92(3), 1359–1392, 2012.
- 23) López-González MJ, Luis E, Fajardo O, Meseguer V, Gers-Barlag K, Niñerola S, Viana F. TRPA1 channels mediate human gingival fibroblast response to phenytoin, *J Dent Res* 96(7), 832–839, 2017.
- 24) Lytton J, Li X-F, Dong H, Kraev A.  $K^+$ -dependent  $Na^+/Ca^{2+}$  exchangers in the brain, *Ann NY Acad Sci* 976(1), 382–393, 2002.
- 25) Minowa E, Hayashi Y, Goh K, Ishida N, Kurashige Y, Nezu A, Saitoh M, Tanimura A. Enhancement of receptor-mediated calcium responses by phenytoin through the suppression of calcium excretion in human gingival fibroblasts, *J Periodontal Res* 58(2), 274–282, 2023.
- 26) Modéer T, Brunius G, Mendez C, Juntti–Berggren L, Berggren P–O. Influence of phenytoin on cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  level in human gingival fibroblasts, *Eur J Oral Sci* 99(4), 310–315, 1991.
- 27) Ogata Y, Nakao S, Shimizu E, Matsuda–Honjyo Y, Yamazaki M, Furuyama S, Sugiya H. Tyrosine phosphorylation is involved in  $Ca^{2+}$  entry in human gingival fibroblasts, *Cell Biol Int* 27(8), 689–693, 2003.
- 28) Palty R, Silverman WF, Hershinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, Nolte C, Fishman D, Shoshan–Barmatz V, Herrmann S. NCLX is an essential component of mitochondrial  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange, *Proc Natl Acad Sci USA* 107(1), 436–441, 2010.
- 29) Pfeilschifter J, Rüegg UT. Cyclosporin A augments angiotensin II-stimulated rise in intracellular free calcium in vascular smooth muscle cells, *Biochem J* 248(3), 883–887, 1987.
- 30) Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial  $Ca^{2+}$  responses, *Science* 280(5370), 1763–1766, 1998.
- 31) Rogawski MA, Löscher W. The neurobiology of an-

- antiepileptic drugs, *Nat Rev Neurosci* 5(7), 553–564, 2004.
- 32) Sabarudin MA, Taib H, Wan Mohamad WM. Refining the mechanism of drug–influenced gingival enlargement and its management. *Cureus*, 14(5), e25009, 2022.
- 33) Sano M, Ohuchi N, Inoue T, Tono K, Tachikawa T, Kizawa Y, Murakami H. Proliferative response to phenytoin and nifedipine in gingival fibroblasts cultured from humans with gingival fibromatosis, *Fundam Clin Pharmacol* 18(4), 465–470, 2004.
- 34) Shigekawa M, Iwamoto T. Cardiac Na<sup>+</sup>–Ca<sup>2+</sup> exchange : molecular and pharmacological aspects, *Circ Res* 88(9), 864–876, 2001.
- 35) Somlyo AP, Himpens B. Cell calcium and its regulation in smooth muscle, *FASEB J* 3(11), 2266–2276, 1989.
- 36) Tanaka N, Morita T, Nezu A, Tanimura A, Mizoguchi I, Tojyo Y. Signaling mechanisms involved in protease–activated receptor–1–mediated interleukin–6 production by human gingival fibroblasts, *J Pharmacol Exp Therap* 311(2), 778–786, 2004.
- 37) Tanimura A, Matsumoto Y, Tojyo Y. Polarized Ca<sup>2+</sup> release in saponin–permeabilized parotid acinar cells evoked by flash photolysis of ‘caged’ inositol 1, 4, 5–trisphosphate, *Biochem J* 332(3), 769–772, 1998.
- 38) Wiegert JS, Bading H. Activity–dependent calcium signaling and ERK–MAP kinases in neurons : a link to structural plasticity of the nucleus and gene transcription regulation, *Cell Calcium* 49(5), 296–305, 2011.
- 39) Williams RM, Winkfein RJ, Ginger RS, Green MR, Schnetkamp PP, Wheeler GN. A functional approach to understanding the role of NCKX5 in *Xenopus* pigmentation, *PLoS One* 12(7), e0180465, 2017.
- 40) Yamashita M, Katsumata M, Iwashima M, Kimura M, Shimizu C, Kamata T, Shin T, Seki N, Suzuki S, Taniguchi M. T cell receptor–induced calcineurin activation regulates T helper type 2 cell development by modifying the interleukin 4 receptor signaling complex, *J Exp Med* 191(11), 1869–1880, 2000.