

氏名	山田比左
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博甲第 2173号
学位授与の日付	平成13年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	フェニトイン誘導性歯肉増殖症の発症メカニズムに関する研究
論文審査委員	教授 古田 裕昭 教授 滝川 正春 教授 村山 洋二

学位論文内容の要旨

【緒言】

抗てんかん薬フェニトイン (PHT) の副作用によって歯肉増殖を発症することが知られている。歯肉増殖の発症メカニズムに関しては、マクロファージが産生する増殖因子の過剰、歯肉線維芽細胞の増殖能の亢進、歯肉線維芽細胞の細胞外基質産生の促進など、様々な面から報告されている。しかしながら、それについて未だ明確にはされていない。この薬物性歯肉増殖症の病態の組織学的特徴は、肥大した歯肉組織には細胞外基質が著明に蓄積していることなので、歯肉線維芽細胞の結合組織の細胞外基質の代謝機構からのメカニズム解明が必要となる。線維芽細胞は細胞外基質を合成する一方、老朽化した細胞外基質を分解・貪食し、リソソーム酵素によりさらに分解する。すなわち、歯肉線維芽細胞のリソソーム酵素は、歯肉組織の基質代謝の一翼を担う重要な因子である。

そこで、本研究では、歯肉増殖症を発症している PHT 服用患者の血清 PHT 濃度を調べ、そして PHT がヒト歯肉線維芽細胞のリソソーム酵素の動態に及ぼす影響を調べる。その結果から、PHT 誘導性歯肉増殖症の発症メカニズムをリソソーム酵素による基質分解の面から考察する。

【材料および方法】

1. 被験対象

被験者は岡山大学歯学部附属病院第二保存科および積善病院歯科クリニックを受診した PHT 服用患者 20 名である。その内訳は PHT 性歯肉増殖症 10 名 (年齢 16~62 歳) 非歯肉増殖症 10 名 (年齢 19~78 歳) である。歯肉増殖症の診断は Angelopoulos らの分類に準じて行った。すなわち、歯冠を一部分覆う線維性の歯肉増殖所見が、前・臼歯部ともに見られるものを歯肉増殖症と診断した。

2. 血清 PHT 濃度の測定

患者血清総 PHT 濃度および遊離型 PHT 濃度の測定は Furuno らの記載に従って、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて行った。

3. 歯肉線維芽細胞

歯肉線維芽細胞は、第三大臼歯抜歯時に採取した健康なヒトの歯肉および PHT 性歯肉増殖症患者の肥大歯肉から分離・培養した紡錘状を呈する細胞とした。培養は、ウシ胎児血清を 10% の割合に含む DMEM を用い、5% 炭酸ガス存在下、37°C で行った。

4. PHT 刺激歯肉線維芽細胞におけるリソソーム酵素 mRNA の検出

リソソーム酵素 (カテプシン B, カテプシン D, カテプシン L, β -D-ガラクトシダーゼ, α -N-アセチルグルコサミニダーゼ) の mRNA の検出は、RT-PCR 法を用いて行った。

すなわち、1~3日間、PHT（大日本製薬）で刺激した細胞を TRIZOL[®]LS Reagent で可溶化して得た全 RNA 画分から、oligo-(dT)₁₂₋₁₈ プライマーを用いて mRNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した後、標的遺伝子を各々に特異的なプライマーを用いて増幅・検出した。

5. カテプシン (B+L) およびカテプシン B 活性の測定

カテプシン (B+L) 活性は、Barrett らの方法に従って測定した。すなわち、1~3日間、PHT で刺激した細胞の超音波破碎後の上清を反応基質 Z-Phe-Arg-MCA (MCA: 4-メチルクマリル-7-アミド) に作用させ、基質から遊離する 7-アミノ-4-メチルクマリル (AMC) の量を蛍光光度計を用いて励起波長 370 nm、蛍光波長 460 nm で測定し、酵素活性とした。活性型カテプシン B および L と不活性型カテプシン B および L を合わせた全カテプシン (B+L) 活性は、ペプシンによって部分消化したサンプルについて上述と同様の操作で測定した。尚、カテプシン B 活性は、反応基質として Z-Arg-Arg-MCA を用い上述の方法で測定した。各実験群における酵素活性の有意差は、Mann-Whitney U 検定 ($p < 0.05$) を用いて検定した。

6. 歯肉線維芽細胞におけるカテプシン B およびカテプシン L 蛋白の検出

線維芽細胞におけるカテプシン B およびカテプシン L 蛋白の検出は、各々に特異的な抗体を一次抗体とした間接細胞免疫染色法によって行った。尚、各実験群における蛋白量は発色の程度を NIH Image Vesion 1.61 (Macintosh, NIH) を用いて黒化度として表わし、その有意差は t 検定 ($p < 0.05$) を用いて検定した。

【結果】

1. PHT 服用患者における血清 PHT 濃度

PHT 服用患者の血清 PHT 濃度は、歯肉増殖群では $13.8 \pm 7.6 \mu\text{g/ml}$ 、非歯肉増殖群では $5.7 \pm 3.8 \mu\text{g/ml}$ であり、歯肉増殖群は非歯肉増殖群に比較して、有意に高かった。また、血清 PHT 濃度が $18 \mu\text{g/ml}$ 以上である患者 (5 名) では全員に歯肉増殖が見られた。

2. 歯肉線維芽細胞におけるリソソーム酵素 mRNA の発現

PHT で刺激した歯肉線維芽細胞では、培養 1, 2 日目でカテプシン L mRNA の発現を観察しなかった。これ以外の被験リソソーム酵素については、mRNA の発現を PHT 刺激の有無に関わらず観察した。

3. 歯肉線維芽細胞におけるカテプシン (B+L) およびカテプシン B 活性

PHT 刺激した歯肉線維芽細胞のカテプシン (B+L) 活性は、PHT 無刺激時のそれに比べ活性型および全活性ともに有意に (1 日目で 40% 程度) 低かった。一方、カテプシン B 活性は活性型および全活性ともに PHT 刺激の有無に関わらずほぼ一定であった。

4. 歯肉線維芽細胞におけるカテプシン B およびカテプシン L 蛋白の発現

PHT 性増殖歯肉由来線維芽細胞のカテプシン L 蛋白の発現は、健康歯肉由来細胞のそれに比べて有意に少なかった。他方、カテプシン B 蛋白の発現は健康歯肉由来細胞のそれに比較して有意な差はなかった。

【結論および考察】

本研究結果は、 $20 \mu\text{g/ml}$ PHT が存在する状態では、歯肉線維芽細胞のリソソーム酵素カテプシン L の発現が遺伝子の転写レベルで抑制された結果、活性が低下することを示した。すなわち、歯肉線維芽細胞のリソソーム酵素活性が低下すると、細胞の基質分解能が抑えられるため、細胞外基質が蓄積して歯肉増殖を発症すると考えられる。

なお、Taylor らは、先天的なリソソーム酵素の欠損によって発症するリソソーム病の一つである I-Cell 病患者では、歯肉が肥大化することを報告した。この事実は、リソソーム酵素の機能異常が歯肉増殖に関与するという本研究結果を支持するものである。

論文審査結果の要旨

薬物性歯肉増殖症の発症メカニズムは、歯肉線維芽細胞の増殖能あるいは基質産生能の亢進によって説明されてきた。しかし、細胞外基質の蓄積が歯肉増殖症の組織学的特徴とされているにもかかわらず、細胞外基質の代謝のレベルでは取り上げられることがなかった。歯肉線維芽細胞による基質代謝においてリソソーム酵素は重要な役割を果たすことから、本研究は、歯肉線維芽細胞のリソソーム酵素による基質分解能の面からフェニトイン性歯肉増殖症の発症メカニズムを捉えている。すなわち、①歯肉増殖症が発症する血清フェニトイン濃度を調べ、②その濃度でフェニトインがヒト歯肉線維芽細胞のリソソーム酵素の活性に及ぼす影響を、リソソーム酵素の mRNA 発現、酵素活性、酵素蛋白の発現について調べた。その結果は、①血清フェニトイン濃度が高いほど歯肉増殖症を発症すること、および②フェニトインは歯肉線維芽細胞の細胞内リソソーム酵素カテプシン L の発現を特異的に遺伝子の転写レベルで抑制し、カテプシン L 活性を結果的に抑制することを示すものであった。

これらの結果から、フェニトイン性歯肉増殖症は、フェニトインにより歯肉線維芽細胞のリソソーム酵素カテプシン L の活性が低下することによって、細胞の基質分解能が低下した結果発症する機序が示唆された。本研究は、フェニトイン性歯肉増殖症の発症メカニズムをこれまでの研究とは異なる観点から捉えることによって、これまで取り上げられなかった細胞外基質代謝の面から薬物性歯肉増殖症の発症メカニズムの解明に貢献するものと考えられる。

したがって、本申請論文は学位論文として価値があるものと認める。