

Ana Maria Masae Suzuki 論文内容の要旨

## 主 論 文

Cyclosporin A and Phenytoin Modulate Inflammatory Responses.  
(サイクロスポリン A とフェニトインは炎症反応を修飾する。)

(Ana Maria Masae Suzuki、吉村 篤利、尾崎 幸生、金子 高士、原 宜興)

(Journal of Dental Research、掲載時期は未定)  
[ページ数未定]

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員：原 宜興 教授)

### 緒 言

免疫抑制剤サイクロスポリン A や抗てんかん薬フェニトイン服用の副作用として、歯肉増殖症が誘発されることが知られている。一般に、サイクロスポリン誘発性歯肉増殖症は歯肉の炎症を伴うことが多いのに対し、フェニトイン誘発性歯肉増殖症は線維性病変を形成する。本研究では、これらの薬剤が歯肉増殖症における炎症反応をどのように修飾するかを明らかにするために、プラーク中の細菌構成成分の LPS (lipid A) およびリポペプチドでヒト歯肉線維芽細胞を刺激し、その応答におけるサイクロスポリンとフェニトインの影響について解析した。

### 対象と方法

ヒト TLR2 または TLR4 を発現した Chinese hamster ovary (CHO) レポーター細胞および健常者から分離した 7 株の歯肉線維芽細胞を実験に使用した。それぞれの細胞を、サイクロスポリンまたはフェニトインの存在下および非存在下で、高純度 *E. coli* LPS、合成 lipid A (TLR4 リガンド) または合成リポペプチド Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (TLR2 リガンド) で刺激した。18 時間刺激後に、CHO レポーター細胞においては細胞内刺激伝達のレポーター分子である CD25 を、そしてヒト歯肉線維芽細胞においては接着分子 ICAM-1 (CD54) の発現量をフローサイトメトリー法で測定した。また刺激後のヒト歯肉線維芽細胞培養上清中の IL-6 および IL-8 量は、ELISA 法で、そしてヒト歯肉線維芽細胞の増殖は、MTT 法で測定した。

更に、*in vivo* におけるこれらの薬剤の影響についても検討した。各群 8 匹のマウスに 24 時間毎に 5 回、サイクロスポリン (40 mg/kg)、フェニトイン (40 mg/kg) または PBS を腹腔投与した。薬剤投与 2 時間後毎に、各群それぞれ 5 匹に 5  $\mu$ g の *E. coli*

LPS を、それぞれ 3 匹に PBS を下顎左側第 1 臼歯近心の歯肉にマイクロシリンジを用いて注入した。最終注入から 24 時間後にマウスを屠殺し、組織切片を作製した。CD54 の免疫染色と HE 染色を行い、注入部位の全線維芽細胞様細胞数と CD54 陽性線維芽細胞様細胞数を測定した。

## 結 果

CHO/CD14/TLR2 細胞はサイクロスポリンの刺激のみで活性化された。またサイクロスポリンは、高純度 *E. coli* LPS および Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> 刺激による CHO/CD14/TLR2 細胞の活性化を増強したが、フェニトインは細胞活性化を抑制した。さらに、サイクロスポリンは、Flag 付加ヒト TLR4 の過剰発現による CHO/CD14/TLR4 細胞の恒常的活性化を増強したのに対し、フェニトインはこれを抑制し、サイクロスポリンおよびフェニトインは、細胞内において直接作用していることが示された。

ヒト歯肉線維芽細胞は、サイクロスポリンのみの刺激では CD54 を発現しなかったが、サイクロスポリンは、lipid A および Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> 刺激による CD54 の発現を血清存在下および非存在下で増強した。一方、フェニトインは、血清存在下では lipid A および Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> 刺激による CD54 発現を抑制したが、血清非存在下では抑制しなかった。

サイクロスポリン投与マウス歯肉の線維芽細胞様細胞における CD54 陽性率は、フェニトイン投与マウス歯肉における CD54 陽性率よりも有意に高かった。

サイクロスポリンは、血清存在下および非存在下で Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> 刺激によるヒト歯肉線維芽細胞の IL-6 と IL-8 産生を亢進した。また lipid A 刺激による IL-8 産生を血清非存在下で亢進したが、血清存在下では有意な影響はみられず、IL-6 産生には血清存在下および非存在下で有意な影響を及ぼさなかった。

一方、フェニトインは、血清非存在下での IL-8 の産生を除き、lipid A および Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> 刺激による IL-6 と IL-8 産生を血清存在下および非存在下で抑制した。

MTT 試験では、サイクロスポリンとフェニトインはどちらも歯肉線維芽細胞の増殖を亢進し、フェニトインの作用は、すべての細胞機能に抑制的に働くのではないことが示された。

## 考 察

薬剤誘発性歯肉増殖症は結合組織の増大やコラーゲン線維の過剰産生など投与薬剤を超えた共通の特徴を有しているが、増殖歯肉組織の炎症反応は、投与された薬剤により異なることが報告されている。本研究の結果は、サイクロスポリンがヒト歯肉線維芽細胞の TLR を介する炎症反応を増強し、フェニトインは逆にこれを抑制することを示しており、このことがサイクロスポリンおよびフェニトイン投与患者における増殖歯肉の炎症反応の違いの一因となっていると考えられる。

しかしながら、ヒト歯肉線維芽細胞の炎症反応の強さは個人差が大きく、歯肉増殖症における炎症反応も、その影響を強く受けていると思われる。