

研究者：村井 雄司

(所属：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)

研究題目：Lamotrigine による上皮細胞機械的防御機構への関与

目的：

わが国におけるてんかん患者は推定 100 万人と言われており、治療法として抗てんかん薬の単剤療法、また単剤療法では十分な効果が得られない場合は多剤療法による治療が進められてきた。しかし多剤療法は単剤療法に比べ副作用や薬物相互作用などに強く影響を与えることが知られている。近年抗てんかん薬の単剤療法の要望から新規抗てんかん薬が承認されてきており、その中でさまざまな発作型に有効であり、小児てんかん患者に唯一使用可能な抗てんかん薬である Lamotrigine (ラミクタール[®]) が 2008 年に承認された。しかし Lamotrigine は、皮膚粘膜眼症候群、中毒性表皮壊死症および口腔粘膜における潰瘍形成など皮膚障害の副作用が認められる場合があり、その発生機序についてはいまだ不明である。

ヒトの角膜、皮膚および粘膜上皮には細胞間結合装置である Tight junction protein (TJ) が存在し、バリアー機能として外界からの刺激に対し防御機構として働いていることが知られている。また、潰瘍形成などにおいて、TJ が関与しているとの報告もある。

本研究は、Lamotrigine による上皮における細胞間結合装置である TJ である Claudin (CLDN) への関与について解析することを目的とした。

方法：

1. ヒト正常口腔粘膜上皮における TJ タンパクの発現の観察

切除した歯肉を 4%パラホルムアルデヒドで固定後パラフィン切片を作製し、抗 CLDN-1 抗体および抗 CLDN-4 抗体 (ともに Invitrogen) に反応させ、その後 Alexa Fluor[®] 488 goat anti-rabbit IgG および Alexa Fluor[®] 546 goat anti-mouse IgG (ともに Invitrogen) を遮光下にて反応させた。封入乾燥後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

2. 培養ヒト角化上皮細胞株における TJ タンパクの発現の観察

Lab-Tek[®] II Chamber Slide (Nalge Nunc) を用いて、ヒト角化上皮細胞株 (HaCaT) を 100%コンフレントになるまで培養し、その後角化上皮細胞の分化を促すために活性型ビタミン D3 (VD3) を 10 nM 濃度で添加し 24 時間培養を行った。Control には DMSO を用いた。等量のアセトンおよびメタノールで固定後、抗 CLDN-1 抗体および抗 CLDN-4 抗体を反応させ、Alexa Fluor[®] 488 goat anti-rabbit IgG を遮光下にて反応させた。封入乾燥後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察、撮影を行った。

3. Lamotrigine 添加時の培養ヒト角化上皮細胞株における TJ タンパク mRNA 発現量の定量的評価

HaCaT を 10% FBS 含有 DMEM にて 70%コンフレントになるまで培養した後、Lamotrigine を 50, 100nM 添加し、各濃度にて 0, 24, 48, 72 時間培養し、Trizol[®] Reagent (Invitrogen)

を用いて Total RNA を抽出した後、RT 処理し、cDNA を合成した。その後 Real-time RT-PCR にて CLDN-1 および CLDN-4 mRNA の定量的発現解析を行った。

4. Lamotrigine 添加時の培養ヒト角化上皮細胞株における経上皮電気抵抗値の測定

経上皮電気抵抗値 (TER) は細胞間における TJ のバリアー機能を簡便かつ最も感度よく検出する測定方法である。HaCaT を 10% FBS 含有 DMEM で 100%コンフレントになるまでセルカルチャーインサート (BD Falcon) にて培養した。その後、Lamotrigine を 50, 100mM 添加し、各濃度にて 0, 24, 48, 72 時間毎に TER を測定した。Control に DMSO を用いた。

5. 統計学的処理

統計学的処理は有意水準 5% で Tukey's HSD による多重比較を行った。統計解析には IBM SPSS Statistics (IBM) を使用した。

結果および考察：

ヒト正常口腔粘膜上皮における CLDN-1, CLDN-4 タンパクの発現および局在の観察をするために免疫蛍光染色を行った結果、CLDN-1 タンパクは有棘層および顆粒層細胞膜に (図 1-a)、また CLDN-4 タンパクは顆粒層細胞膜に (図 1-b)、それぞれ異なる細胞層での局在を認め、細胞間隙を線状に連続して発現していた。

HaCaT では CLDN-1 および CLDN-4 は細胞膜上に線状の陽性像を認め、CLDN-1 は control (VD3 非添加時) に比べ、VD3 添加後 24 時間培養時において、染色性の減弱が認められた (図 2-a,b)。また CLDN-4 タンパクでは control (VD3 非添加時) に比べ、VD3 添加後 24 時間培養時において、染色性の増強が認められた (図 2-c,d)。

Lamotrigine の濃度および時間変化における CLDN mRNA 発現量を定量的評価した結果、control に比べ CLDN-1 mRNA は全ての濃度の Lamotrigine 添加後 24 時間で (図 3-a)、100nM の Lamotrigine 添加後 48 時間で、1, 10, 100nM の Lamotrigine 添加後 72 時間で、有意な発現減少が認められた (data not shown)。また CLDN-4 mRNA は 100nM の Lamotrigine 添加後 24 時間で (図 3-b)、同様に 100nM の Lamotrigine 添加後 48, 72 時間で、有意な発現上昇が認められた (data not shown)。

TER 測定を行った結果、100nM の Lamotrigine 添加後 24 時間で TER がピークを迎えた。また 50 および 100nM の Lamotrigine 添加後 48 時間で有意な差が認められた (図 4)。

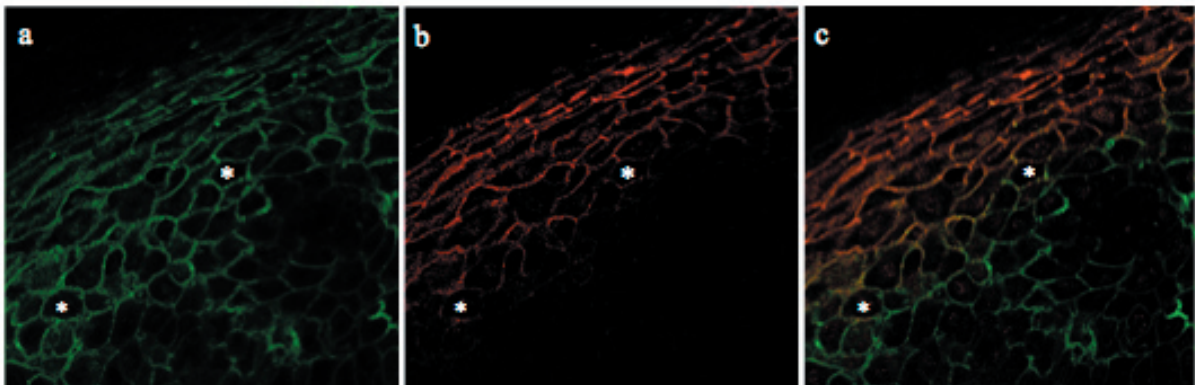


図1 ヒト正常口腔粘膜上皮における TJ タンパクの発現および局在
(a: CLDN-1, b: CLDN-4, c: Merge, Magnification: × 800)

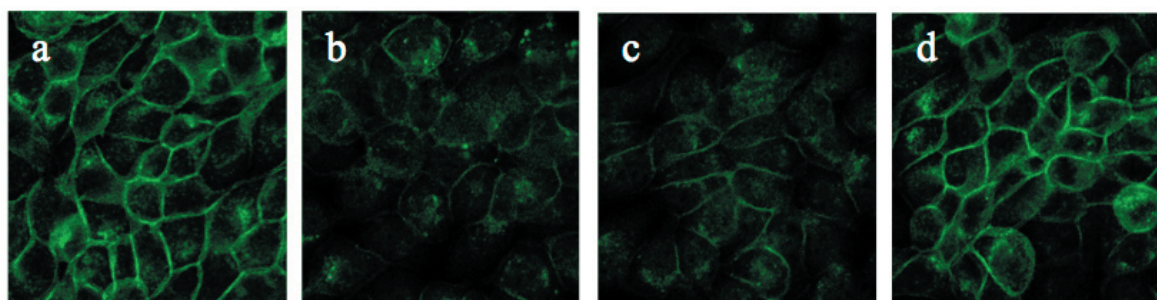


図2 VD3添加による培養角化上皮細胞株での TJ タンパクの発現変化
(a: CLDN-1;control, b: CLDN-1;VD3, c: CLDN-4;control, d: CLDN-4;VD3, Magnification: × 1200)

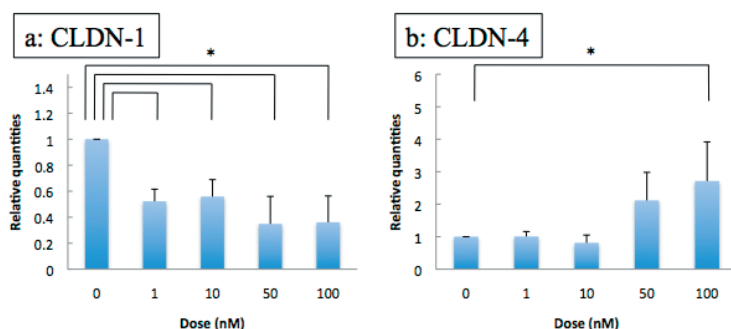


図3 TJ mRNA 発現量における Lamotrigine 添加後 24 時間における濃度差の相違
(a: CLDN-1, b: CLDN-4, * : p < 0.05)

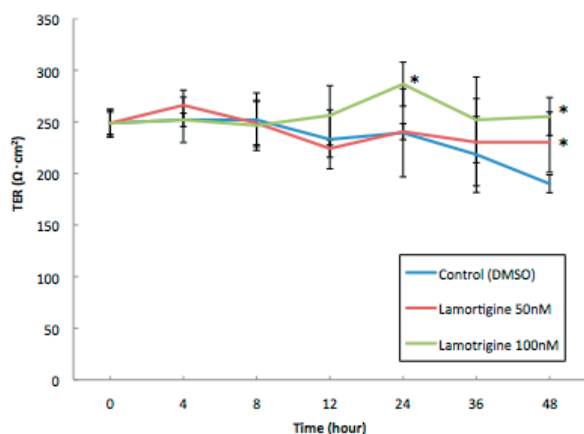


図4 Lamotrigine の濃度差と時間経過による TER の変化
(* : p < 0.05)

ヒト正常口腔粘膜上皮において CLDN-1 は有棘層細胞膜に、また CLDN-4 は顆粒層細胞膜にそれぞれ局在を認め、CLDN-1 から CLDN-4 へタンパク発現がスイッチしていることが確認された。培養角化上皮細胞株においても VD3 添加により CLDN-1 から CLDN-4 へタンパクの発現が変化し、CLDN が細胞の分化に関与していることが示唆された。

Lamotrigine の添加により遺伝子レベルおよびタンパクレベルにおいて、CLDN-1 の発現の減少および CLDN-4 の発現の上昇が認められたことから、上皮の分化誘導が引き起こされることが明らかになった。乾癬では CLDN-1 の発現低下が認められる報告があり、Lamotrigine により引き起こされる皮膚粘膜眼症候群や中毒性表皮壊死症などの皮膚障害において、上皮の過分化が要因のひとつとして考えられた。

成果発表：

ポスター発表：第 29 回一般社団法人日本障害者歯科学会総会および学術大会，2012. 9. 28-30