ヒト培養歯肉線維芽細胞の電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル

米田 栄吉 目黒 史子 平田千賀子 堀内 博

東北大学歯学部歯科保存学第一講座

(2000 年 1 月 8 日受理)

Voltage-dependent L-type Ca^{2+} Channel in Cultured Human Gingival Fibroblasts

Eikichi Maita, Ayako Meguro, Chikako Hirata and Hiroshi Horiuchi

Department of Endodontics and Periodontics, Tohoku University School of Dentistry

Accepted for publication 8 January 2000

Voltage-dependent Ca^{2+} channels regulate the entry of extracellular Ca^{2+} into cytoplasm, and play a key role in the regulation of important intracellular events, such as control of proliferation. To investigate the regulation mechanisms of intracellular Ca^{2+} in the gingival fibroblast, a non-excitable cell, we tested whether gingival fibroblasts possess voltage-dependent Ca^{2+} channels. Fibroblasts from normal human gingiva were cultured for 3 to 8 passages, and two techniques were used to detect voltage-dependent calcium channels: patch clamp techniques in whole-cell mode in the single cell, and the intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) monitoring technique in Fura 2-AM-loaded cells.

Transient inward currents reached a peak at 23 ms, started to generate at a membrane potential of -40 mV, and reached maximum current values at $+10$ mV in a voltage-dependent manner. Currents were inhibited dose-dependently by Cd^{2+} , which is a nonspecific calcium channel inhibitor, and nifedipine, which is an L-type calcium channel inhibitor. Both KCl, which depolarizes membrane potential, and Bay K 8644, which is an L-type calcium channel agonist, evoked a transient $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase in a dose-dependent manner. This transient increase disappeared when calcium was removed from the external solution, and was also inhibited by nifedipine. These results indicate that Ca^{2+} current is generated through Ca^{2+} channels opened by depolarizing the cell membrane, and that extracellular Ca^{2+} entry into cytoplasm is also caused through the activated L-type Ca^{2+} channel using Bay K 8644 as the ligand. It is concluded that human gingival fibroblasts possess L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels to regulate intracellular Ca^{2+} concentration. J. Jpn. Soc. Periodontol., 42: 13~22, 2000.

Key words: whole-cell patch clamp, intracellular calcium concentration, human gingival fibroblast, voltage-dependent calcium channel

要旨: 電位依存性 Ca^{2+} チャネルは細胞外の Ca^{2+} の原形質内流入を調節し、細胞増殖などの重要な細胞内機能を調節している。非興奮性細胞の一つである歯肉線維芽細胞の Ca^{2+} 調節機構を調べるために、我々は歯肉線維芽細胞に電位依存性 Ca^{2+} チャネルが存在するかどうかを検討した。ヒト健常歯肉より、線維芽細胞を 3~8 代、継代培養し、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの検出に用いた。本研究では単一細胞のホールセルモードによるパッチクランプ法およびカルシウム蛍光色素である Fura 2-AM を負荷した細胞で細胞内カルシウム濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) をモニターする方法とを用いた。

膜電位 -40 mV から 23 ms でピークに達する一過性の内向きの電流が発生し始め、電位依存性に $+10$ mV で最大電流値に達した。この電流は非特異的カルシウムチャネル阻害剤である Cd^{2+} と L 型のカルシウムチャネルの阻害剤であるニフェジピンにより濃度依存的に抑制された。細胞を脱分極させる KCl と L 型 Ca^{2+} チャネルのアゴニストである Bay K 8644 により、濃度依存的に一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇がみられた。この一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は細胞外液の Ca^{2+} を除くと消失し、また、ニフェジピンによっても抑制された。これらの結果は

Ca^{2+} 電流が細胞膜を脱分極させることによって開いた Ca^{2+} チャネルを通して発生し、また細胞外 Ca^{2+} の原形質内流入は Bay K 8644 によって活性化した L 型 Ca^{2+} チャネルを通して起こることを示す。結論として歯肉線維芽細胞には細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節する L 型の電位依存性 Ca^{2+} チャネルが存在することが確認された。

索引用語：ホールセルパッチクランプ法、細胞内カルシウム濃度、ヒト歯肉線維芽細胞、電位依存性カルシウムチャネル

緒 言

細胞内セカンドメッセンジャーとして重要な役割を演じている Ca^{2+} は、一般に細胞内濃度が細胞外の約 $1/10^4$ で、 10^{-7}M 以下に保たれており、細胞の増殖・分化やその他の細胞機能を発揮するのに先立ち、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の上昇が認められる¹⁾。細胞内の Ca^{2+} 濃度を高めるためには細胞膜の Ca^{2+} チャネルが開いて細胞外から流入する経路と細胞内の小胞体のストアから Ca^{2+} が放出される系がある²⁾。従来から、 Ca^{2+} チャネルを保有するのはニューロンなどの興奮性膜を有する細胞のみであり、興奮性膜を持たない線維芽細胞などは膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルを欠如していると考えられてきた³⁾。しかし、最近では非興奮性の種々の細胞にも電位依存性の Ca^{2+} チャネルが存在することが報告されている。骨髄腫細胞⁴⁾、B-リンパ球⁵⁾、T-リンパ球⁶⁾、平滑筋細胞^{7,8)} などにはすでにその存在が認められており、線維芽細胞では、マウス Swiss 3 T 3 線維芽細胞⁹⁾、ヒト皮膚線維芽細胞¹⁰⁾、ヒト肺線維芽細胞¹¹⁾、ヒト腎線維芽細胞¹²⁾ などの非興奮性細胞で Ca^{2+} チャネルが見出されている。歯肉線維芽細胞にも電位依存性の Ca^{2+} チャネルが存在するか否かを検索し、また、その意義を知ることは興味深いところである。歯根および歯周組織を保護している歯肉は微生物などの外来刺激を受けると炎症を惹起し、さらにそれが深部組織へと波及し、歯周組織破壊を起こす最初の場合である。歯肉組織を構成する線維芽細胞はコラーゲンなどの細胞外基質やコラゲナーゼを産生し、必要に応じて細胞外に分泌する機能を有している。また、傷害性刺激を受けると、種々のサイトカインを遊離するなどの機能も有している¹³⁾。歯周病の一つである薬物性歯肉増殖症は服用した薬物が引き金となり、発症するものであるが、その発症の機序は未だ明らかにされていない。原因となる薬物の直接的または間接的な刺激によって歯肉線維芽細胞にどのような情報伝達系の変化が生じているかを解明できれば発症機序の解明の一端となるであろう。これまで歯肉線維芽細胞では Ca^{2+} 情報伝達系に関する研究報告はなく、歯肉炎の発症や細胞増殖症や細胞機能発現における情報伝達系路を明らかにすることは重要であ

る。本研究において、我々は歯肉線維芽細胞の情報伝達機構を解明するために、パッチクランプ法および細胞内 Ca^{2+} シグナルをモニターすることにより、細胞膜上に Ca^{2+} チャネルの存在の有無を検証した。その結果、ヒトの健常歯肉から培養した線維芽細胞には電位依存性の L 型 Ca^{2+} チャネルが確認されたので、報告する。

材料および方法

1. 細胞培養

東北大学歯学部附属病院を訪れた外来患者より、埋伏歯の抜去時に炎症の認められない健常歯肉を採取した。滅菌ダルベッコの PBS (-) (日本製薬、東京) 中で採取した歯肉を無菌的に細切した。10% ウシ胎児血清および重炭酸ナトリウム L-グルタミンを 0.3 mg/ml になるように加えたダルベッコのイーグル培地 (DMEM, 日本製薬、東京) を入れた 50 ml の組織培養フラスコ中で 37°C 、5% CO_2 の条件下で一次培養を行った。Outgrowth した細胞がコンフルエントに達したところで、0.38% EDTA 加 0.25% trypsin (Gibco BRL, N.Y.) で細胞を剝離し、洗浄後、同培地でフラスコ培養を行った。3~8 代、継代培養した線維芽細胞を実験に供した。

2. パッチクランプ法

ホールセル記録法: Hematokurit 用ガラス毛細管 (Drummond Sci. Co., PA) をパッチブラー (Narishige Scientific Instruments Lab., Tokyo) で 2 段引きし、直径 $1\text{--}2\text{ }\mu\text{m}$ としたものを電極ピペットとして用いた。先端部をシリコンコーティング (SILPOTTM 184 W/C, ダウコーニングアジア、東京) し、さらに加熱・研磨し、 $5\text{--}10\text{ M}\Omega$ の抵抗を有するピペットを用いた。

細胞膜電位の固定および発生電流の記録は Axon P clampTM (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA), データの解析は ClampexTM, ver. 6.03 (Axon) を用いた。保持電位は -80 mV とし、 10 mV 、 200 ms 、 $+60\text{ mV}$ までのステップパルスに対する発生電流を patch-clamp amplifier (AXOPATCH 2000 A, Axon Instruments) で記録した。

3~8 代, 継代培養した細胞を 0.38% EDTA 加 0.25% trypsin で剥離し, 細胞浮遊液として, パッチクランプ用チャンバー内に播種した。500 μl のチャンバー内を細胞外液 (130 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 5 NaOH, 11 Glucose, 5 CaCl_2 (各 mM), 0.1 M HCl で pH 7.4 に調整) で常時灌流した。ピペット内液は 130 CsCl, 10 HEPES, 1 MgCl_2 , 10 EGTA 5 ATP (各 mM), 0.1 M NaOH で pH 7.4 に調整して用いた。薬物は細胞外の灌流液に添加して適用した。実験操作は全て恒温室 (25°C) で行った。

3. 細胞内 Ca^{2+} シグナルの測定

3~8 代, 継代培養した細胞を 0.38% EDTA 加 0.25% trypsin (Gibco BRL, N.Y.) で剥離し, 細胞浮遊液とし, 細切したカバースリップ上に播種し, 2 日間培養した。細胞の付着しているカバースリップをシャーレから取り出し, 前述した細胞外液に Ca^{2+} 感受性蛍光色素である Fura 2-AM (Research Biochemicals International, Natick, MA) の 5 μM , cremophor (Nakalai Tesque Inc., Kyoto) 2 μM , ウシ胎児血清 5 $\mu\text{l}/1\text{ ml}$ を加えて攪拌し, 細胞上に滴下し, 5% CO_2 , 37°C, 60 分間インキュベートした。

細胞内 Ca^{2+} 濃度測定は細胞内 Ca^{2+} 濃度画像解析システム ARGUS 50/CA (浜松ホトニクス株, 浜松) にて測定した。灌流液で余剰の Ca^{2+} 蛍光色素を洗浄

し, 倒立顕微鏡 (NIKON DIAPHOT 3000) のステージ上に装着した 500 μl 灌流チャンバー内にセットし, 2-3 ml/min の流量で灌流した。キセノンランプ (Xenon power supply XPS-100) で発生した励起光は 1 秒間隔で 340 nm と 380 nm のフィルターを切り換え, 顕微鏡の対物レンズを通し, ビデオカメラ (C 2400), イメージプロセッサからデータ解析装置 (C 4468) で測定した。細胞内 Ca^{2+} 濃度は 340/380 nm の ratio 値で表した。

4. 統計分析

平均値の差の検定には Student's *t*-test を用いた。

結 果

1. パッチクランプ法による電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの検討

1) 電位依存性のチャンネル電流: -80 mV の保持電位から +40 mV まで 10 mV の刺激パルスシリーズで細胞膜を脱分極させたとき得られた電流を図 1 A 左に示した。-40 mV から 23 ms でピークに達する内向きの電流が発生し始めた。図 1 B は図 1 A 左の発生電流を各膜電位毎に示したものであり, 膜電位に従って発生電流は増大し, +10 mV で最大値に達したことを示し, すなわち, 電位依存性のチャンネル電流

図 1 A ヒト培養歯肉線維芽細胞のホールセル記録法による発生電流

左: 保持電位 (V_h) = -80 mV から +40 mV の 40 ms の刺激電位に対する発生電流の重ね合わせ

右: 左図と同じ条件で灌流液の CaCl_2 を 1 mM BaCl_2 で置換したときの発生電流

図 1 B 各電位毎の発生電流

図 1 A の重ね合わせ電流を -40 mV から $+30$ mV まで各電位毎に発生電流を pA で示した。

図 2 Cd^{2+} による内向きの発生電流の抑制

A: CdCl_2 0 mM (左), 0.5 mM (右) を細胞外液に加えて灌流したときの発生電流の重ね合わせ $V_h = -80$ mV から 40 mV の刺激に対する応答電流

B: 図 A から各膜電位でのピーク電流を電流-電位曲線 (I-V 曲線) で示した。

CdCl_2 0 mM (●---●), CdCl_2 0.5 mM (■---■)

が得られた。また, $+20$, $+30$, $+40$ mV では内向きの電流に続いて遅い外向き電流がみられた。これは Lee ら (1983)¹⁴⁾ によれば細胞内から K^+ の流出による電流であり, 灌流液の CaCl_2 を 1 mM の BaCl_2 で置き換えると Guggino ら (1987)¹⁵⁾ の報告のように抑制された (図 1 A 右)。

2) Cd^{2+} の影響: 電位依存性の電流に対し, 非特異的 Ca^{2+} チャネルの阻害剤である^{16,17)} Cd^{2+} 0.5 mM

を含有した細胞外液で灌流すると, 早い内向き電流成分はほぼ完全に抑制された (図 2 A 左右)。抑制された早い内向き電流成分は Ca^{2+} チャネルに依存しており, これに対して, K^+ による遅い外向き電流成分は Cd^{2+} により抑制されなかった。図 2 B は図 2 A の Cd^{2+} 0 mM と Cd^{2+} 0.5 mM による各膜電位でのピーク電流を電流-電位曲線 (I-V プロット) で示したものであり, Cd^{2+} で抑制される Ca^{2+} 電流であることが

図 3 ニフェジピンによる電位依存性の発生電流の抑制

A; a; ニフェジピン 0 μM b; ニフェジピン 17 μM c; ニフェジピン 43 μM の含有灌流液中での発生電流 (−80 mV ~ +40 mV の各電位における発生電流の重ね合わせ)

B; ニフェジピン 0 mM (●---●) とニフェジピン 4.3 μM (■—■) による各膜電位でのピーク電流の I-V 曲線

C; ニフェジピンによる濃度依存性の抑制グラフ

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's t -test)

示された。すなわち、細胞膜の脱分極により発生した内向き電流は Ca^{2+} チャネルを通して、 Ca^{2+} が細胞内に流入したことに起因している。

3) ニフェジピンの影響: L 型の Ca^{2+} チャネルの阻害剤であるニフェジピンを加えた細胞外液で灌流することにより、内向きの Ca^{2+} 電流は濃度依存性に抑

図4 Fura 2-AM 負荷した歯肉線維芽細胞の KCl による細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇

A: 7 個の細胞の KCl 35 mM での $[Ca^{2+}]_i$ の一過性上昇
ratio (340 nm/380 nm) は 2 波長測定による比であり, Ca^{2+} 濃度を示す。

B: KCl による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の濃度依存性
棒グラフはベースラインの ratio 値から各濃度の KCl 誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ のピーク ratio 値までの上昇値を示す。KCl 濃度により有意な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を示す

* $p < 0.05$ (Student's *t*-test)

制された (図 3)。図 3 の A は -80 mV から $+40$ mV までの膜電位に対する発生した Ca^{2+} 電流を重ね合わせたもので, ニフェジピン $17 \mu\text{M}$ および $43 \mu\text{M}$ により濃度依存的に抑制された。同様に, 図 3 の B はニフェジピン $0 \mu\text{M}$ と $4.3 \mu\text{M}$ における電位-電流曲線 (I-V プロット) で抑制を示した。図 3 の C はニフェジピン濃度と 0 mV での発生電流のピーク値との関係を示したグラフであり, やはり, ニフェジピンにより抑制されることを示したものである。このことは歯肉線維芽細胞が脱分極によって発生する電流は L 型の Ca^{2+} チャンネル由来であることが示された。

2. 細胞内 Ca^{2+} シグナル ($[Ca^{2+}]_i$) による電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの検討

1) K^+ 誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ シグナル

図 4 A は $35 \mu\text{M}$ の KCl に対する 7 個の細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変化であり, 一過性の上昇を示した。図 4 B は KCl 濃度と ratio の上昇との関係を示したもので, KCl の 18 - $140 \mu\text{M}$ までの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は有意な濃度依存性を示した ($p <$

0.05)。これらのことは細胞外液の K^+ により細胞膜が脱分極を起こした結果, $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が高まったことを示す。この $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は細胞外液の Ca^{2+} を等モルの Mg^{2+} で置き換えることによって抑制された (図 5 A)。すなわち, $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は細胞外液の Ca^{2+} が流入したことを示している。さらに図 5 B で示したように $[Ca^{2+}]_i$ シグナルは 0.3 - $3 \mu\text{M}$ のニフェジピンによって濃度依存性に抑制された ($p < 0.05$)。

2) Bay K 8644 による $[Ca^{2+}]_i$ シグナル

Bay K 8644 は L 型 Ca^{2+} チャンネルのアゴニストであり¹⁸⁾, L 型 Ca^{2+} チャンネル電流を増強し¹⁹⁾, 単独でも $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を起こすことが知られている²⁰⁾。図 6 A に示したように Bay K 8644 誘発性の一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がみられ, 38 - $300 \mu\text{M}$ まで濃度依存性を示した (図 6 B)。また, KCl と同様に細胞外液の Ca^{2+} を除くと $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は抑制された (図 6 C)。このことは Bay K 8644 による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は L 型のカルシウムチャンネルが開き, 細胞外液の Ca^{2+} が細胞

図 5 KCl 誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に対する灌流液中の Ca^{2+} およびニフェジピンの影響

A 左; 5 mM の Ca^{2+} 灌流液中での 7 個の細胞の KCl 135 mM に対する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ シグナル
 右; Ca^{2+} を等濃度の Mg^{2+} で置き換えた Ca^{2+} (-) 灌流液 (↓) での $[\text{Ca}^{2+}]_i$ シグナルの消失

B KCl 誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ シグナルのニフェジピンによる濃度依存性抑制 (n=7)

* $p < 0.05$ (Student's *t*-test)

内に流入したことを示している。

考 察

電気生理学的な膜電位固定法および細胞内 Ca^{2+} 濃度をモニタリングする両方法によってヒト培養歯肉線維芽細胞膜に L 型の Ca^{2+} チャンネルが存在すること、およびそれは電位依存性であることを見出した。すなわち、細胞膜の脱分極により活性化する内向き電流が存在すること、 Cd^{2+} やニフェジピンにより発生電流が抑制されること、 Ba^{2+} に置換できること、 Ca^{2+} シグナルが細胞外 Ca^{2+} に依存していること、 K^{+} により細胞膜が脱分極し、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、それはニフェジピンで抑制されること、Bay K 8644 でも細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することから導き出された結論である。Bay K 8644 単独では Ca^{2+} の流入を起こさないとされているが^{20,21)}、本研究に用いた歯肉線維芽細胞では 300 μM の高濃度まで濃度依存性に細胞

内 Ca^{2+} の上昇を起こしたことは、歯肉線維芽細胞は L 型カルシウムチャンネルが特異的に多い可能性を示唆しているかも知れない。

細胞内で情報伝達の重要なメッセンジャーである Ca^{2+} は細胞膜や細胞内小器官のチャンネルによって調節されている。本研究により、ヒト培養歯肉線維芽細胞にも電位依存性の L 型 Ca^{2+} チャンネルが確認された。 Ca^{2+} チャンネルには T 型、L 型、N 型の 3 種類のタイプが見出されており²²⁾、T と L 型は骨格筋、心筋、内分泌細胞、線維芽細胞などで、N 型は神経細胞のみに存在が確認されている²²⁾。本実験の結果から、歯肉線維芽細胞の Ca^{2+} チャンネルは L 型であることが確認された。非興奮性細胞の Ca^{2+} チャンネルの意義を検討した報告は多数みられる。Andrews & Abernethy (1993)²³⁾ は NIH 3T3 線維芽細胞で RNA の合成がニフェジピンにより抑制されることから、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを経由して Ca^{2+} が流入することが細胞外マトリックスの合成に関与していると推測

図6 Bay K 8644 誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ シグナル

A: Bay K 8644 a; 75 mM と b; 150 mM に対する $[Ca^{2+}]_i$ シグナル (n=7)

B: Bay K 8644 による $[Ca^{2+}]_i$ シグナルの濃度依存性

* $p < 0.05$ (Student's *t*-test)

棒グラフは Bay K 8644 各濃度におけるベースラインから ratio のピーク値までの上昇値を示す。

C: 灌流液中の Ca^{2+} 5 mM と Ca^{2+} 0 mM の灌流液での Bay K 8644 150 mM のカルシウムシグナル

している。Lambert ら²⁴⁾はヒト皮膚線維芽細胞の細胞膜を脱分極することによってコラーゲナーゼの mRNA は増加し、コラーゲンの mRNA が減少することをみている。Loza ら (1995)²⁵⁾はパッチクランプ法で骨芽細胞が Epidermal Growth Factor (EGF) で膜の脱分極を引き起こされること、また、EGF による細胞増殖はニフェジピンにより抑制されたことを報告している。すなわち、EGF は電位依存性の Ca^{2+} チャンネルを開き、外からの Ca^{2+} 流入により細胞増殖が起こると推測している。同様に Hughes (1995)²⁶⁾は Platelet derived growth factor (PDGF) も電位依存性の Ca^{2+} チャンネルを通して、血管平滑筋を収縮し、また $[Ca^{2+}]_i$ を上昇することを報告している。やはり Storm ら (1992)⁸⁾は血管平滑筋細胞は L 型の Ca^{2+} チャンネルを有し、また、Wong & Klassen (1993)²⁷⁾は $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は平滑筋の収縮や血圧の上昇に関与しているとしている。Wijetunge ら (1995)⁷⁾は PDGF は血管平滑筋細胞の電位依存性

Ca^{2+} 電流を増加させ、細胞分裂を起こさせる可能性を指摘している。しかし、膵の腺房細胞からアミラーゼを分泌するには $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が必要であるが、電位依存性の Ca^{2+} チャンネルを通した Ca^{2+} 流入は関係ないとの報告もあり²⁰⁾、 Ca^{2+} チャンネルを通した Ca^{2+} の細胞内流入の生物学的意義は細胞の種類によって異なり、未だ検索の端緒についたにすぎない。今回は歯肉線維芽細胞の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの存在を見出したところであり、その意義については今後の検討課題である。佐々木ら²⁸⁾は抗痙攣剤であるフェニトイン服用により歯肉増殖症を起こしている患者では非服用者より basic fibroblast growth factor (bFGF) の血中濃度が3倍も増加していたことを報告しているが、bFGF をも含めた成長因子と Ca^{2+} チャンネルとの関係を検討することは歯肉増殖症の機序を解明する上で興味のあるところである。Ullrich A. and Schlessinger (1990)²⁹⁾は EGF や bFGF がレセプターに結合すると、チロシンキナーゼを活性化する

ことによって[Ca²⁺]_iの上昇が起こるとしており、歯肉線維芽細胞についてもリガンドレセプター結合による情報伝達様式を検討しなければならない。また、Dongariら(1996)¹³⁾はヒト歯肉線維芽細胞は歯周病原性細菌の刺激により、炎症性サイトカインを分泌し、歯周炎を惹起するとしている。Ca²⁺チャンネルがサイトカインの分泌に関与している可能性が考えられ、このような細胞機能の発現や細胞増殖細胞内Ca²⁺シグナルの伝達機構の解明は今後の課題である。

謝 辞

本研究に必要な研究機器を提供して頂き、また本実験に対して適切なアドバイスを頂きました東北大学医学部生体情報学講座の八尾 寛教授に深く感謝の意を表します。

本論文の要旨は1996年10月5日第39回秋期日本歯周病学会学術大会、および1996年12月6日第30回東北大学歯学会において発表した。

文 献

- 1) Miller, R.J. : Multiple calcium channels and neuronal function. *Science*, 235 : 46-52, 1987.
- 2) Munaron, L., Distasi, C., Carabelli, V., Baccino, F. M., Bonelli, G. and Lovisolo, D. : Sustained calcium influx activated by basic fibroblast growth factor in Balb-c 3 T 3 fibroblasts. *J. Physiol.*, 484 : 557-566, 1995.
- 3) 竹村春夫, 大鹿英世 : 非興奮性細胞における受容体作動性カルシウム流入の活性化機構. *日薬理誌*, 97 : 319-327, 1991.
- 4) Fukushima, Y. and Hagiwara, S. : Voltage-gated Ca²⁺channel in mouse myeloma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 : 2240-2242, 1983.
- 5) Fukushima, Y., Hagiwara, S. and Saxton, R.E. : Variation of calcium current during the cell growth cycle in mouse hybridoma lines secreting immunoglobulins. *J. Physiol.*, 355 : 313-321, 1984.
- 6) Dupuis, G., Heroux, J. and Payet, M.D. : Characterization of Ca²⁺ and K⁺ currents in the human jurkat T cell line effects of phytohemagglutinin. *J. Physiol.*, 412 : 135-154, 1989.
- 7) Wijetunge, S. and Hughes, A.D. : Effect of platelet-derived growth factor on voltage-operated calcium channels in rabbit isolated ear artery cells. *Br. J. Pharmacol.*, 115 : 534-538, 1995.
- 8) Storm, D.S., Stuenkel, E.L. and Webb, R.C. : Calcium channel activation in arterioles from genetically hypertensive rats. *Hypertension*, 20 : 380-388, 1992.
- 9) Peres, A., Zippel, R., Sturani, E. and Mostaciuolo, G. : A voltage-dependent calcium current in mouse Swiss 3 T 3 fibroblasts. *Pflugers Arch.*, 411 : 554-557, 1988.
- 10) Pallotta, T. and Peres, A. : Membrane conductance oscillations induced by serum in quiescent human skin fibroblasts. *J. Physiol.*, 416 : 589-599, 1989.
- 11) Soldatov, N.M. : Genomic structure of human L-type Ca²⁺channel. *Genomics*, 22 : 77-87, 1994.
- 12) de Roos, A.D., Willems, P.H., Peters, P.H. van Zoelen, E.J. and Theuvenet, A.P. : Synchronized calcium spiking resulting from spontaneous calcium action potentials in monolayers of NRK fibroblasts. *Cell Calcium*, 22 : 195-207, 1997.
- 13) Dongari-Bagtzoglou, A.I. and Ebersole, J.L. : Production of inflammatory mediators and cytokines by human gingival fibroblasts following bacterial challenge. *J. Periodont. Res.* 31 : 90-98, 1996.
- 14) Lee, K.S. and Tsien, R.W. : Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D 600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature*, 302 : 790-794, 1983.
- 15) Guggino, S.E., Guggino, W.B., Green, N. and Sacktor, B. : Blocking agents of Ca²⁺-activated K⁺ channels in cultured medullary thick ascending limb cells. *Am. J. Physiol.*, 252 : 128-137, 1987.
- 16) Loechner, K.J., Kream, R.M. and Dunlap, K. : Calcium currents in a pituitary cell line (AtT-20) : Differential roles in stimulus-secretion coupling. *Endocrinology* 137 : 1429-1437, 1996.
- 17) Juberg, D.R., Stuenkel, E.L. and Loch-Caruso, R. : Dde chlorinated insecticide 1, 1-dichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane (p, p'-DDD) increases intracellular calcium in rat myometrial smooth muscle cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 135 : 147-155, 1995.
- 18) Schramm, M., Thomas, G., Towart, R. and Franckowiak, G. : Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca²⁺ channels. *Nature (Lond.)*, 303 : 535-537, 1983.
- 19) Nowycky, M.C., Fox, A.F. and Tsien, R.W. : Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature (Lond.)*, 316 : 440-443, 1985.
- 20) Bertrand, V., Bastie, M.J., Vaysse, N. and Pradayrol, L. : Different implications of Ca²⁺_i and Ca²⁺_e in CCK/gastrin-induced amylase secretion in AR 4-2 J cells. *Pancreas*, 11 : 230-235, 1995.

- 21) Grazzini, E., Durroux, T., Payet, MD., Bilodeau, L., Gallo-Payet, N., and Guillon, G. : Membrane-delimited G protein-mediated coupling between V1a vasopressin receptor and dihydropyridine binding sites in rat glomerulosa cells. *Mol. Pharmacol.*, 50 : 1273-1283, 1996.
- 22) 森島 繁, 森 泰生, 井本敬二 : 電位依存性カチオンチャンネルと神経・筋・心疾患, 岡田泰伸, 清野進, チャンネルとトランスポータ : その働きと病気, メジカルビュー社, 東京, 1997, 17-53.
- 23) Andrawis, N.S. and Abernethy, D.R. : Effect of calcium antagonists on RNA synthesis of NIH 3T3 cells. *Am. J. Med. Sci.*, 306 : 137-140, 1993.
- 24) Lambert, C.A., Lefebvre, P.Y., Nusgens, B.V. and Lapiere, C.M. : Modulation of expression of endogenous collagenase and collagen genes by electroporation : possible involvement of Ca^{2+} and protein kinase C. *Biochem. J.*, 290 : 135-138, 1993.
- 25) Loza, J., Carpio, L., Lawless, G., Marzec, N. and Dziak, R. : Role of extracellular calcium influx in EGF-induced osteoblastic cell proliferation. *Bone*, 16 : 341-347, 1995.
- 26) Hughes, A.D. : Increase in tone and intracellular Ca^{2+} in rabbit isolated ear artery by platelet derived growth factor. *Br. J. Pharmacol.*, 114 : 138-142, 1995.
- 27) Wong, A.Y. and Klassen, G.A. : A model of calcium regulation in smooth muscle cell. *Cell Calcium*, 14 : 227-243, 1993.
- 28) Sasaki, T. and Maita, E. : Increased bFGF level in the serum of patients with phenytoin-induced gingival overgrowth. *J. Clin. Periodontol.*, 25 : 42-47, 1998.
- 29) Ullrich, A. and Schlessinger, J. : Signal transduction by receptor with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61 : 203-212, 1990.

連絡先 :

東北大学歯学部歯科保存学第一講座

〒980-8575 仙台市青葉区星陵町 4-1