

令和元年6月13日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11129

研究課題名(和文)象牙芽細胞間伝達因子(ATP・グルタミン酸)を応用した新規象牙質形成促進薬剤開発

研究課題名(英文) The development of novel drug promoting dentin formation by odontoblast intercellular signal transduction factors (ATP/glutamate)

研究代表者

木村 麻記(Kimura, Maki)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90582346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：硬組織形成試験の結果から象牙芽細胞へのアルカリ刺激は石灰化を促進すること、象牙芽細胞に発現するTRPA1チャネルは生理的条件下、アルカリ条件下ともに石灰化に関与することが示された。細胞内遊離Ca²⁺濃度測定の結果から象牙芽細胞にCa²⁺ release-activated Ca²⁺チャネルを介するストア依存性Ca²⁺流入が発現していること、ストア依存性Ca²⁺流入はP2Y受容体、ムスカリン受容体活性化により誘発されること、その振幅はアルカリ刺激で増大することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、アルカリ刺激により象牙芽細胞に生じるCa²⁺シグナルとそのCa²⁺シグナルの結果放出された象牙芽細胞間連絡因子が近傍象牙芽細胞に誘発させるCa²⁺シグナルを明らかにした。この成果の学術的意義は、歯科臨床で多用される水酸化カルシウム製剤・MTAなどの高Ca含有アルカリ性製剤の象牙質形成促進作用メカニズムの一端を解明したことである。本研究成果の社会的意義はより象牙質形成速度の速い新規高Ca含有アルカリ性製剤の開発につながることである。

研究成果の概要(英文)：In the present research project, results obtained by mineralization assay are as follows: 1) Alkaline stimuli to the human odontoblasts increased their mineralization levels, 2) TRPA1 channels mediated mineralization mechanism under both extracellular physiologic and high pH conditions in the odontoblasts.

In the intracellular Ca²⁺ concentration measurements, we obtained following results: 1) Odontoblasts expressed store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) via an activation of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels, 2) Activation of P2Y or muscarinic cholinergic receptors induced SOCE in odontoblasts, 3) Alkaline stimuli increased the amplitude of SOCE in odontoblasts.

研究分野：口腔生理学

キーワード：象牙芽細胞 アルカリ 石灰化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 刺激に伴う象牙質形成機構と象牙芽細胞の役割

象牙質表面に外的刺激が加わると、その刺激は象牙芽細胞に存在する transient receptor potential (TRP) チャンネルにより感知され、その結果流入した Ca^{2+} が細胞内輸送経路を通して細胞外に排出されることで、象牙質形成が誘発される。一方、象牙芽細胞への機械刺激が分子センサーで感知されると、ATP・グルタミン酸が細胞外に放出され、近傍に存在する象牙芽細胞の細胞内 Ca^{2+} シグナルを活性化する。従って、象牙質刺激を受容した象牙芽細胞から放出された ATP・グルタミン酸は、「象牙芽細胞間 Ca^{2+} シグナルネットワーク」を構成すると考えられ、刺激に伴う象牙質形成が加速的に促進されると示唆される。

(2) 高 pH を示す歯内療法薬剤の象牙芽細胞への作用

反応象牙質形成を誘発する水酸化カルシウム製剤や mineral trioxide aggregate (MTA) は高 pH 性を示し、Ca を多く含有する。先行研究において、我々は高 pH/ Ca^{2+} 刺激による象牙質形成のメカニズムの一端を明らかにした。象牙芽細胞への高 pH/ Ca^{2+} 刺激は TRPA1 チャンネルとアルカリ感受性代謝調節型受容体を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加する。増加した細胞内 Ca^{2+} は細胞膜 Ca^{2+} 排出系により細胞外へ排出されることで、反応象牙質形成が駆動する可能性を示唆した。

2. 研究の目的

歯科臨床では第三象牙質形成を誘発する目的で水酸化カルシウム製剤・MTA が使用される。象牙芽細胞に高 pH 刺激を行うと、細胞外 Ca^{2+} 濃度依存的な細胞内 Ca^{2+} シグナルの増幅が見られる。一方、象牙細管内溶液移動などの刺激を受容した象牙芽細胞は ATP やグルタミン酸を細胞間伝達物質として放出し、刺激受容部位近傍に存在する一群の象牙芽細胞集団に Ca^{2+} シグナルネットワークを構成する。これらの事実から、象牙芽細胞に投与した細胞外 ATP/グルタミン酸が、高 Ca 含有アルカリ性製剤 (水酸化カルシウム製剤や MTA) による象牙質形成を増強する可能性が示唆される。そこで、本研究では反応性象牙質形成作用に対する ATP とグルタミン酸の薬理学的効果を検討し、新規歯内療法薬剤の開発を目指す。

3. 研究の方法

新生仔ラット切歯から得た象牙芽細胞マーカー陽性細胞に fura-2 を負荷し細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を計測した。ヒト培養象牙芽細胞 (HOB 細胞) を様々な条件で長期培養した後、alizarin red 染色、von Kossa 染色を行うことで硬組織形成レベルを評価した。

4. 研究成果

(1) アルカリ刺激の石灰化に対する影響

アルカリ条件下で HOB 細胞を 2~4 週間培養後 alizarin red 染色・von Kossa 染色を行うと生理的条件下 (pH7.4) で培養した群と比較し石灰化が促進した。TRPA1 チャンネルアンタゴニストを含む培養液中で 2~4 週間培養した HOB 細胞群ではアンタゴニストを投与しなかった群に比べ、生理的条件下、アルカリ条件下ともに石灰化が抑制された。これらの結果から、アルカリ刺激は石灰化を促進すること、TRPA1 チャンネルは生理的条件下、アルカリ条件下ともに石灰化を促進することが示された。

(2) ATP・ADP・グルタミン酸の石灰化に対する影響

象牙芽細胞間の連絡因子である ATP、ADP およびグルタミン酸を含む培養液で 3 週間培養した HOB 細胞群と ATP、ADP およびグルタミン酸を含まない培養液中で 3 週間培養した HOB 細胞群を準備し、alizarin red 染色・von Kossa 染色を行った。その結果、ATP、ADP グルタミン酸は石灰化を促進しなかった。

(3) Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) チャンネルの石灰化への関与

CRAC チャンネル抑制薬を含む培養液で 3 週間培養した HOB 細胞群と CRAC チャンネル抑制薬を含まない培養液中で 3 週間培養した HOB 細胞群を準備し、alizarin red 染色・von Kossa 染色を行った。その結果、CRAC チャンネル抑制薬は石灰化を抑制しなかった。

(4) Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) の発現と薬理学的特性の検討

他の細胞において、アルカリ刺激により SOCE が増加することが報告されていることから象牙芽細胞の SOCE の発現と薬理学的特性について検討した。 Ca^{2+} ストア膜上の Ca^{2+} -ATPase 阻害薬によりストア内の Ca^{2+} を枯渇させた後、細胞外に Ca^{2+} を投与すると細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加したことから象牙芽細胞に SOCE が発現していることが示された。ATP 受容体である P2Y 受容体アゴニスト、ムスカリン受容体アゴニストを投与し一過性の細胞内 Ca^{2+} 濃度増加が生じた後、細胞外に Ca^{2+} を投与すると細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加した。この結果から、P2Y 受容体とムスカリン受容体の活性化は SOCE を活性化することが示された。一方、代謝型グルタミン酸受容体アゴニストの投与では SOCE は生じなかった。 Ca^{2+} ストア膜上の Ca^{2+} -ATPase 阻害薬により生じた SOCE は CRAC チャンネル抑制薬の投与で有意に抑制された。SOCE の振幅はアルカリ刺激により増加した。これらの結果から象牙芽細胞における SOCE は CRAC チャンネル活性化により活性化され、アルカリ感

受性であることが示された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

Kimura M, Tazaki M, Shibukawa Y. (他 4 名 , 1,6,7 番目) High pH-sensitive store-operated Ca^{2+} entry mediated by Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels in rat odontoblasts. *Frontiers in Physiology*, 9:443, 2018. (査読有)

DOI: 10.3389/fphys.2018.00443

Sato M, Kimura M, Tazaki M, Shibukawa Y. (他 3 名 , 1,3,6,7 番目) Activation of mechanosensitive transient receptor potential/piezo channels in odontoblasts generates action potentials in cocultured isolectin B4-negative medium-sized trigeminal ganglion neurons. *Journal of Endodontics*, 44(6):984-991, 2018. (査読有)

DOI: 10.1016/j.joen.2018.02.020

Kimura M, Tazaki M, Shibukawa Y. (他 4 名 , 2,6,7 番目) Potassium Currents Activated by Depolarization in Odontoblasts. *Frontiers in Physiology*, 8:1078, 2017. (査読有)

DOI: 10.3389/fphys.2017.00003

Kimura M, Tazaki M, Shibukawa Y. (他 4 名 , 3,5,6 番目) Ionotropic P2X ATP receptor channels mediate purinergic signaling in mouse odontoblasts. *Frontiers in Physiology*, 8: Article 3, 2017. (査読有)

DOI: 10.3389/fphys.2017.00003

Sato M, Kimura M, Tazaki M, Shibukawa Y. (他 3 名 , 2,3,5,6 番目) Intercellular signal communication among odontoblasts and trigeminal ganglion neurons via glutamate. *Cell Calcium*, 60(5):341-355, 2016. (査読有)

DOI: 10.1016/j.ceca.2016.07.003

Kimura M, Sato M, Tazaki M, Shibukawa Y. (他 3 名 , 1,4,6,7 番目) High pH-sensitive TRPA1 activation in odontoblasts regulates mineralization. *Journal of Dental Research*, 95(9):1057-1064, 2016. (査読有)

DOI: 10.1177/0022034516644702

Sato M, Kimura M, Tazaki M, Shibukawa Y. (他 3 名 , 1,3,6,7 番目) Intercellular odontoblast communication via ATP mediated by pannexin-1 channel and phospholipase C-coupled receptor activation. *Frontiers in Physiology*. 6:326, 2015. (査読有)

DOI: 10.3389/fphys.2015.00326

Kimura M, Sato M, Shibukawa Y, Tazaki M. (他 9 名 , 3,4,12,13 番目) Depolarization-induced intracellular free calcium concentration increases show no desensitizing effect in rat odontoblasts. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, 56(2):131-134, 2015. (査読有)

DOI: 10.2209/tdcpublication

Shibukawa Y, Sato M, Kimura M, Tazaki M. (他 8 名 , 1,2,3,12 番目) Odontoblasts as sensory receptors: transient receptor potential channels, pannexin-1, and ionotropic ATP receptors mediate intercellular odontoblast-neuron signal transduction. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 467(4):843-863, 2015. (査読有)

DOI: 10.1007/s00424-014-1551-x

[学会発表] (計 63 件)

Maki Kimura, Intracellular cAMP induces Ca^{2+} influx in odontoblasts. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies congress (FAOPS), 第 96 回日本生理学会大会, 2019

木村麻記, 象牙芽細胞において Gs タンパク質共役型受容体活性化は細胞内 cAMP レベルを増加する. 第 60 回歯科基礎医学学会学術大会, 2018 年

Maki Kimura, Activation of Gs-protein-coupled receptors increases intracellular cAMP level in odontoblasts. 96th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, 2018

Kimura Maki, Odontoblasts express plasma membrane Ca^{2+} -ATPase 1 and 4. 第 95 回日本生理学会大会, 2018

木村麻記, 象牙芽細胞における高 pH 感受性 store-operated Ca^{2+} entry (SOCE). 第 59 回歯科基礎医学学会学術大会, 2017

Maki Kimura, Alkali- and ADP-sensitive store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) mediated by Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels in rat odontoblasts. 第 94 回日本生理学会大会, 2017

木村麻記, アルカリ感受性 TRP チャネルを介した反応性修復象牙質形成機構の解明. 東京歯科大学口腔科学研究センターワークショップ, 2017

木村麻記, 象牙芽細胞に発現する TRPA1 チャネルはアルカリ感受性を示し石灰化を促進する. 第 10 回三叉神経領域の感覚 - 統合機能研究会, 2017

松浦信孝 木村麻記 象牙芽細胞におけるNK2受容体の発現の検索. 第23回歯科医学会総会, 2016
木村麻記, 象牙芽細胞におけるアルカリ感受性 store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) 第58回 歯科基礎医学会学術大会, 2016
Maki Kimura, Store-operated Ca^{2+} entry in rat odontoblasts. International Association of Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016, 2016
Maki Kimura, High pH-sensitive TRPA1 channel activation acts as a key Ca^{2+} signaling that regulates dentin mineralization by odontoblasts. Association of Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016, 2016
Kimura M, High pH-sensitive TRPA1 channel activation in odontoblasts regulates dentin mineralization and calcification. 12th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, 2016
木村麻記, 象牙芽細胞におけるアルカリ感受性 TRPA1 チャンネル活性化は石灰化を促進する. 第301回東京歯科大学学会, 2016
Kimura M, Expression of store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) mediated by Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels in rat odontoblasts. 第93回日本生理学会大会, 2016
木村麻記, 象牙芽細胞における store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels) の発現. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 2015
Kimura M, Alkaline-sensitive intracellular Ca^{2+} signaling pathway in rat odontoblasts. JOINT RESEARCH PROJECT (JSPS) UNDER THE JAPAN-KOREA BASIC SCIENTIFIC COOPERATION PROGRAM FOR FY 2015, 2015

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 澁川 義幸

ローマ字氏名: SHIBUKAWA, yoshiyuki

所属研究機関名: 東京歯科大学

部局名: 歯学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 30276969

研究分担者氏名: 佐藤 正樹

ローマ字氏名: SATO, masaki

所属研究機関名: 東京歯科大学

部局名: 歯学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 80598855

研究分担者氏名: 田崎 雅和

ローマ字氏名: TAZAKI, masakazu

所属研究機関名: 東京歯科大学

部局名: 歯学部

職名: 名誉教授

研究者番号(8桁): 40155065

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 小島 佑貴

ローマ字氏名: KOJIMA, yuki

研究協力者氏名: 東川 明日香

ローマ字氏名：HIGASHIKAWA, asuka

研究協力者氏名：西山 明宏

ローマ字氏名：NISHIYAMA, akihiro

研究協力者氏名：塩崎 雄大

ローマ字氏名：SHIOZAKI, yuta

研究協力者氏名：佐藤 涼一

ローマ字氏名：SATOU, ryouichi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。