

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19177

研究課題名(和文) 神経伝達物質としてのグルタミン酸の三叉神経節細胞への影響は口腔感覚を制御するのか

研究課題名(英文) Glutamate as neuro transmitter will be capable to control oral sensation via trigeminal ganglion

研究代表者

西山 明宏 (NISHIYAMA, AKIHIRO)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80550128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：興奮性神経伝達物質であるGlutamateが歯牙の構成である象牙芽細胞間あるいは歯髄ニューロンとの細胞間連情報伝達物質として働いていることが我々の研究で明らかとなっている。この報告では、各細胞間でグルタミン酸をメディエーターとするCa²⁺シグナルネットワークが構築されることを示唆している。その一方で末梢性神経との連絡経路においてGlutamateとグルタミン酸受容体との細胞間連絡に関与している可能性があるが、その経路については不明であった。本研究ではこの経路の特定と生理学的に何を制御しているかを解明すること目的に進め、痛み刺激下に三叉神経節細胞に発現する各グルタミン酸受容体を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルタミン酸受容体は神経機能に深く関与しており、象牙質の構成細胞である象牙芽細胞-歯髄ニューロン間での情報伝達がglutamateにより制御されている可能性があり、今後の研究の進展が興味深いところである。本研究成果では三叉神経節細胞に対しての痛み刺激下で特定のグルタミン酸受容体を確定したことで、この受容体を分子標的とする新たな治療開発・創薬が期待され将来性から見ても発展のある研究と考えている。

研究成果の概要(英文)：It becomes clear in our study to work as between the odontoblast that Glutamate which is an excitatory neurotransmitter is the constitution of teeth or consecutive communication matter between the cell with the pulpal neuron. In this report, We suggest that the Ca²⁺ signal network which assumes glutamate acid a mediator between each cell is built. On the other hand, We might participate in the communication between the cell with Glutamate and the glutamate acid receptor in the communication course with the peripheral nerve, but was unidentified about the course. Advanced to do the elucidation purpose what you controlled with the identification of this course in this study physiologically and identified each glutamate acid receptor which developed in trigeminal ganglion neurons under the pain stimulation.

研究分野：神経生理学

キーワード：Glutamate Trigeminal ganglion odontoblast neuro transmitter TRP channel

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯はエナメル質、象牙質、セメント質で構成され、内部に三叉神経節（歯髄）ニューロンが分布する歯髄が存在する。象牙質には、象牙細管内容液で満たされる象牙細管が貫いて存在している。象牙細管の歯髄側内部には、自由神経終末と象牙芽細胞突起が進入している。象牙質への様々な刺激は象牙細管内液の静水圧変化を誘発し象牙芽細胞膜を変形させ transient receptor potential チャンネルを活性化する。その活性化が ATP 放出を誘発する事で歯髄ニューロンに ATP を介した神経伝達が生じ、象牙質痛が発生する（文献 1）。

一方、象牙芽細胞には、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸受容体発現も報告されており（文献 2） Glutamate が象牙芽細胞間あるいは歯髄ニューロンとの細胞間連情報伝達物質として働いていることも示唆された（文献 3）。

これらの報告は、象牙芽細胞間で、グルタミン酸をメディエーターとする Ca^{2+} シグナルネットワークが構築されることを示唆している。その一方で Glutamate がどのグルタミン酸受容体サブタイプが主に細胞間連絡に関与しているかは不明である。

2. 研究の目的

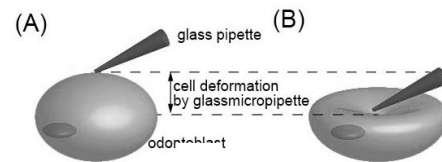
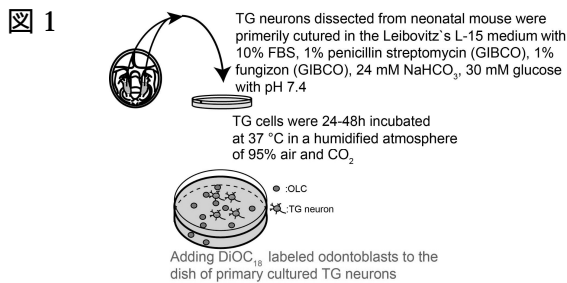
トの歯の象牙質が露出すると激しい歯痛が発生する（象牙質痛）。象牙質には、象牙細管内容液で満たされる象牙細管が貫いて存在し、象牙細管の歯髄側内部には、自由神経終末と象牙芽細胞突起が進入している。象牙質への様々な刺激は象牙細管内液の静水圧変化を誘発し象牙芽細胞膜上の膜タンパク質を活性化する。我々は、その活性が **神経伝達物質である ATP、Glutamate 放出** を誘発することを解明した。さらに ATP が歯髄ニューロンへ受容され、象牙質 神経間連絡により象牙質痛が発生することを報告した。一方で Glutamate を介した象牙芽細胞・歯髄ニューロンとの細胞間連絡も報告しているが、Glutamate の役割の詳細は不明である。**本研究は、グルタミン酸が歯痛変調にどのように関与していくのが生理機能学的に明らかにする事を目的とする。**

3. 研究の方法

1) 象牙芽細胞間連絡、象牙芽細胞・三叉神経節ニューロン間におけるグルタミン酸受容体のサブタイプの同定、機能発現の検討

マウス由来象牙芽細胞系細胞、マウス急性単離三神経節 (TG) 細胞から fura-2 を用いて細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 計測を行った。象牙芽細胞と TG 細胞の共培養系 (図 1) は、象牙芽細胞に蛍光トレーサー ($DiOC_18$) を取り込ませた後、TG 細胞が培養されているディッシュに播種する事で確立する。象牙質刺激に伴う細胞膜変形は、直接機械刺激を行う事で模倣する。細胞外液を充填した微小ガラス管を、標的細胞の直上 (図 2A) から垂直方向へ $7.5 \mu m$ ($2.2 \mu m/m$) 押すことで直接機械刺激とする (図 B)。標準細胞外液には Krebs 溶液を用いる。

【 1 研究目的、研究方法など（つづき）】



単一象牙芽細胞に膜変形刺激を加えると、刺激された象牙芽細胞のみならず (stimulated odontoblast)、周囲に存在する象牙芽細胞にも $[Ca^{2+}]_i$ 増加が観察された (neighboring odontoblasts) (図 3)。細胞外 Ca^{2+} 存在下で象牙芽細胞に各グルタミン酸受容体選択的アンタゴニスト (group 1 代謝調節型・NMDA 型受容体アンタゴニスト) を機械刺激直前に投与しその応答を記録する。刺激を加えた象牙芽細胞周囲の細胞の応答の増減を記録し発現のみならず生理学的機能しているグルタミン酸受容体を詮索する。

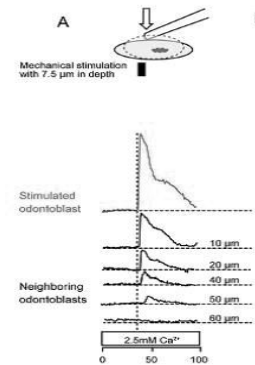


図 2

2) 侵害刺激環境下での象牙芽細胞におけるグルタミン酸受容体の応答変化について検討し、細胞環境によつての応答の相違を検討する。

同定した象牙芽細胞が有するグルタミン酸受容体サブタイプをターゲットにした mRNA 発現 (コントロール群) とディッシュ上に播種した象牙芽細胞に対しての侵害刺激を低浸透圧刺激により代用し (krebs 溶液: 310 osmo 150osmol) 24 時間培養した象牙芽細胞の各グルタミン酸受容体の mRNA 発現 (対照群) を比較する。

低浸透圧刺激で培養した象牙芽細胞に対して、その中の単一細胞に対して微小ガラス管にて侵害刺激を加え、刺激細胞から放出された glutamate を受容した刺激象牙芽細胞と刺激細胞周囲の象牙芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の増加を記録 (ATP 受容体アンタゴニストの前投薬)。また低浸透圧刺激下で単一細胞への刺激前に前投薬として mRNA で顕著に発現していたグルタミン酸受容体アンタゴニストを使用する。このことで $[Ca^{2+}]_i$ の増加の減少が見られるか比較する。

3) 象牙芽細胞-三叉神経節細胞ニューロンとの共培養を行い ATP、glutamate の細胞環境における放出の違いについて検討を行う。

低浸透圧刺激下で象牙芽細胞と急性単離した TG を共培養し、単一象牙芽細胞に対して微小ガラス管にて機械刺激を行う (コントロール群)。また ATP 受容体アンタゴニストを前投薬として用いて、その単一象牙芽細胞刺激を加えその刺激細胞、周囲細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の増加の減少を記録した群 (ATP 群)、各グルタミン酸受容体サブタイプアンタゴニストをカクテルとして単一象牙芽細胞刺激を加えてその刺激細胞、周囲細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の増加の減少を記録した群 (glutamate 群) 上記の両群 (ATP、Glutamate 群) を前投薬とし、象牙芽細胞単一象牙芽細胞刺激を加えてその刺激細胞、周囲細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の増加の減少を記録する。

【参考文献】

- (1) Shibukawa et al, Pflugers Arch - Eur J Physiol, 2015
- (2) Y.S. Kim et al, J. Endod, 2009
- (3) Nishiyama A et al, Cell Calcium, 2016

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

(4) Tsumura M et al., Plos one, 2014

4. 研究成果

興奮性神経伝達物質である Glutamate が歯牙の構成である象牙芽細胞間あるいは歯髄ニューロンとの細胞間連情報伝達物質として働いていることが我々の研究で明らかとなっている。この報告では、各細胞間でグルタミン酸をメディエーターとする Ca²⁺シグナルネットワークが構築されることを示唆している。その一方で末梢性神経との連絡経路において Glutamate とグルタミン酸受容体との細胞間連絡に関与している可能性があるが、その経路については不明であった。本研究ではこの経路の特定と生理学的に何を制御しているかを解明すること目的に進め、痛み刺激下に三叉神経節細胞に発現する各グルタミン酸受容体を特定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------