

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32650

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2019

課題番号：19K24104

研究課題名(和文)象牙芽細胞の感覚受容機能発現に関する発生学的研究

研究課題名(英文)The developmental studies on the differentiation into the odontoblasts as sensory receptor

研究代表者

田中 亜生 (Tanaka, Aoi)

東京歯科大学・歯学部・レジデント

研究者番号：80843573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：象牙芽細胞の感覚受容機能にはTRPチャンネルとpannexin 1 (PANX-1) チャンネルが重要な役割を担っていることが報告されている。本研究は、象牙芽細胞の感覚受容機能の獲得時期を明らかにすることを目的とした。生後0～12日齢のラットの下顎第一臼歯の前額切片を作製し、TRPチャンネル、PANX-1チャンネル、および神経線維の発現を検索した。象牙芽細胞の感覚受容機能に必要なTRPチャンネル、PANX-1チャンネル、および神経線維の全てが揃うのは生後12日齢であった。よって本研究より、ラットの象牙芽細胞の感覚受容機能は生後12日齢頃から発現することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究成果において、象牙芽細胞の感覚受容機能は歯根が形成され始めた時に発現することが示唆されている。よって、歯は口腔内に萌出する前から、疼痛を受容できる機能を兼ね備えている可能性がある。小児歯科において、萌出直後の歯は歯質が未成熟であるうえに、清掃性が悪いいため齲蝕となる可能性が高く、低年齢で処置が必要となることがしばしば認められる。乳歯は永久歯に比べて神経線維が疎であることが知られているが、萌出直後から象牙芽細胞の感覚受容機能は確立されているため、処置中に歯痛が伴わないように浸潤麻酔が必要不可欠となる。

研究成果の概要(英文)：Odontoblasts act as dentin formation and sensory receptors. Recently, it was reported that transient receptor potential (TRP) channel and pannexin 1 (PANX-1) channel play important roles in odontoblast sensory reception. However, it is not known when odontoblasts begin to possess a sense reception function. The aim of this study was to clarify the development of odontoblasts as sense receptors. Sections of mandibular first molars from postnatal day (PN) 0 to PN12 Wistar rats were prepared to investigate expression of TRP channel and PANX-1 channel. We revealed that teeth at PN12 already expressed all of TRP channel, PANX-1 channel, and nerve fibers. The results of this study suggest that odontoblasts may acquire sensory receptor function after beginning to form root dentin, when TRP channel, PANX-1 channels, and nerve fibers are completely formed.

研究分野：小児歯科学

キーワード：象牙芽細胞 TRP channel PANX-1 channel 神経線維 免疫組織化学 RT-qPCR 歯痛

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯髄の機能として象牙質形成能、知覚の受容、マクロファージによる防御機能などが挙げられる。歯髄の知覚の受容には、自由神経終末説、象牙芽細胞受容器説、動水力学説、知覚受容体複合体説があり、現在のところ動水力学説がもっとも有力な説とされているが、歯髄の知覚受容のメカニズムは解明されていない。TRP チャンネルはショウジョウバエの目の細胞 (Hardie, 2011, *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 461(5), 493-498.) から発見された非選択性陽イオンチャンネルで、6つのサブファミリーに属する28種類が報告されている (Uchida, 2017, *Journal of Physiological Sciences*, 67(5), 549-560.; Minke, 2002, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 514, 601-622.; Nilius&Voets, 2005, *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 451(1), 1-10.)。TRP チャンネルはさまざまな生理学的な機能をもち、温度、光、圧力などの物理・機械的な刺激のほか、トウガラシ (カプサイシン) などの化学的な刺激の感知に関与することが報告されている (Clapham, 2003, *Nature*, 426, 517-524.; Caterina, 1997, *Nature*, 389(6653), 816-824.)。PANX-1 は細胞膜上に大型の筒孔チャンネルとして存在し、細胞内カルシウム濃度の変化による膜脱分極中に開き (Chekeni, 2010, *Nature*, 467(7317), 863-867.; MacVicar, 2010, *Trends in Neurosciences*, 33(2), 93-102.)、ATP のような小さなシグナル分子を細胞外に放出することが報告されている。細胞外に放出された ATP は神経線維の P2X<sub>3</sub> レセプター、P2Y<sub>1</sub> レセプターや P2Y<sub>12</sub> レセプターを活性化し、感覚ニューロンに活動電位を発生させる (Kawaguchi, 2015, *Neuroscience Research*, 98, 17-27.; Shibukawa, 2015, *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 467(4), 843-863.)。象牙芽細胞は TRPA1 チャンネルと TRPV4 チャンネルをもつことが知られている (Egbuniwe, 2014, *Journal of Dental Research*, 93(9), 911-917.)。成熟した象牙芽細胞に侵害刺激が加えられると、象牙芽細胞の TRPA1 チャンネルと TRPV4 チャンネルが感知して細胞内の Ca<sup>2+</sup> イオン濃度が増加する。次いで、PANX-1 チャンネルが開き ATP が放出される。その後、放出された ATP が象牙芽細胞直下に存在する神経線維の P2X<sub>3</sub> レセプターと結合して神経線維が興奮し、刺激が中枢に伝わることによって、疼痛を発現することが報告されている (Shibukawa, 2015, *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 467(4), 843-863.)。これらの所見は、成熟した象牙芽細胞が象牙質形成能をもつと同時に、感覚受容機能も有し、歯髄の機能である象牙質形成能と感覚受容の両方に働くことを示している。象牙芽細胞の象牙質形成能については *in vitro* や *in vivo* の歯の発生に関する研究 (Tsuji-gawa, 2013, *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 42(10), 799-806.) によりその開始時期が明らかになっているが、象牙芽細胞の感覚受容機能については、その分化過程のどの段階で獲得されるのかが不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、象牙芽細胞の感覚受容機能の獲得時期を解明することを目的とする。現在に至るまで、TRP チャンネルおよび PANX-1 チャンネルを介した象牙芽細胞の感覚受容機能についての研究は *in vitro* のみであった。象牙芽細胞での TRP チャンネルの局在に関する研究も *in vitro*、または *in vivo* であっても成熟した象牙芽細胞における研究であった。本研究で、象牙芽細胞の分化過程を追いながら TRP チャンネル、PANX-1 チャンネル、および神経線維の発現時期と局在を明らかにすることができれば、歯髄の知覚受容の解明を前進させると考えている。これらにより、学術的にはもちろんのこと、歯科において最も多い主訴の1つである歯痛についての研究であるので臨床学的にも意義が高いと考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物および試料対象

生後0、3、6、9、12日齢のウィスターの雄ラットの下顎第一臼歯を用いた。

#### (2) 形態学的観察、免疫組織化学染色

##### ①切片作成

生後0、3、6、9、12日齢のラットから下顎を取り出し、4%パラホルムアルデヒドにて24時間、4℃で浸漬固定した。その後10%EDTAにて3週間～4週間、4℃で脱灰した。脱灰が完了したのを確認し、PBSにて1日水洗した後、生後0、3、6日齢では段階的にエタノールにて脱水した。キシレンにてエタノールを置換させた後に、パラフィンにて包埋し、4マイクロメートルの前額断連続切片を作成した。生後9、12日齢では段階的にスクロースにて浸透させ、0. C. T コンパウンドにて凍結包埋し、40マイクロメートルの前額断連続切片を作成した。

##### ②染色

切片にH-E染色および免疫組織学染色を行った。免疫組織学染色はアビチンビオチンペルオキシダーゼ複合体法を用いた。非特異的反応の防止のために、切片を30分室温でブロッキングした後に、一次抗体を作用させた。一次抗体として、生後0、3、6日齢では抗DSP抗体、抗TRPA1抗体、抗TRPV4抗体、抗PANX1抗体を、生後9、12日齢では抗NF抗体を使用し、作用時間は4℃でオーバーナイトとした。オーバーナイト後、PBSにて水洗し、ABCキットにて二次抗体を1時間室温で作用させた。PBSにて水洗し、アビチンビオチン複合体を1時間室温で作用させた。PBSにて水洗し、DABにて約5分発色させた。PBSにて水洗し、核染色をヘマトキシリンによ

て行った。その後、通法に従い封入し、光学顕微鏡下で観察を行った。

### (3) RT-qPCR

生後0、3、6日齢のラットの下顎第一臼歯歯胚を摘出し、エナメル器と歯乳頭を機械的に分離させ、歯乳頭をRNA保存液(RNA later RNA Stabilization Reagent)に浸漬させた。RNeasy Micro Kit (QIAGEN)によってtotal RNAを抽出した後、Quanti Tect Reverse Transcription Kit (QIAGEN)を使用しcDNAを合成した。合成したcDNAをPremix Ex Taq (TaKaRa)を用いて行い、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Systemにて計測した。使用したプライマーとUniversal Probe Library(UPL)を表1に示す。ポジティブコントロールとしては、ラットの尻尾からMonoFas マウス・ラットテイルゲノムDNA抽出キットIX (GL Sciences)を用いDNAを抽出した。統計分析はSteel - Dwass法 (EZR version 1.37)を用い、 $\Delta\Delta CT$ 法にて解析を行った。

表 1

	Primer	sequence	UPL
TRPV4	Forward primer	CACAAGAAAGCCGATATGAGG	#49
	Reverse primer	GGGAGCACTTGAGAAGCAAC	
TRPA1	Forward primer	GGACCTCACTTCTCTTTTGGA	#94
	Reverse primer	TCCTTTTGAACCTGTCTTGG	
18S rRNA	Forward primer	GGTGATGGCCGTTCTTA	#22
	Reverse primer	AACTAGTTAGCATGCCGAGAGTC	

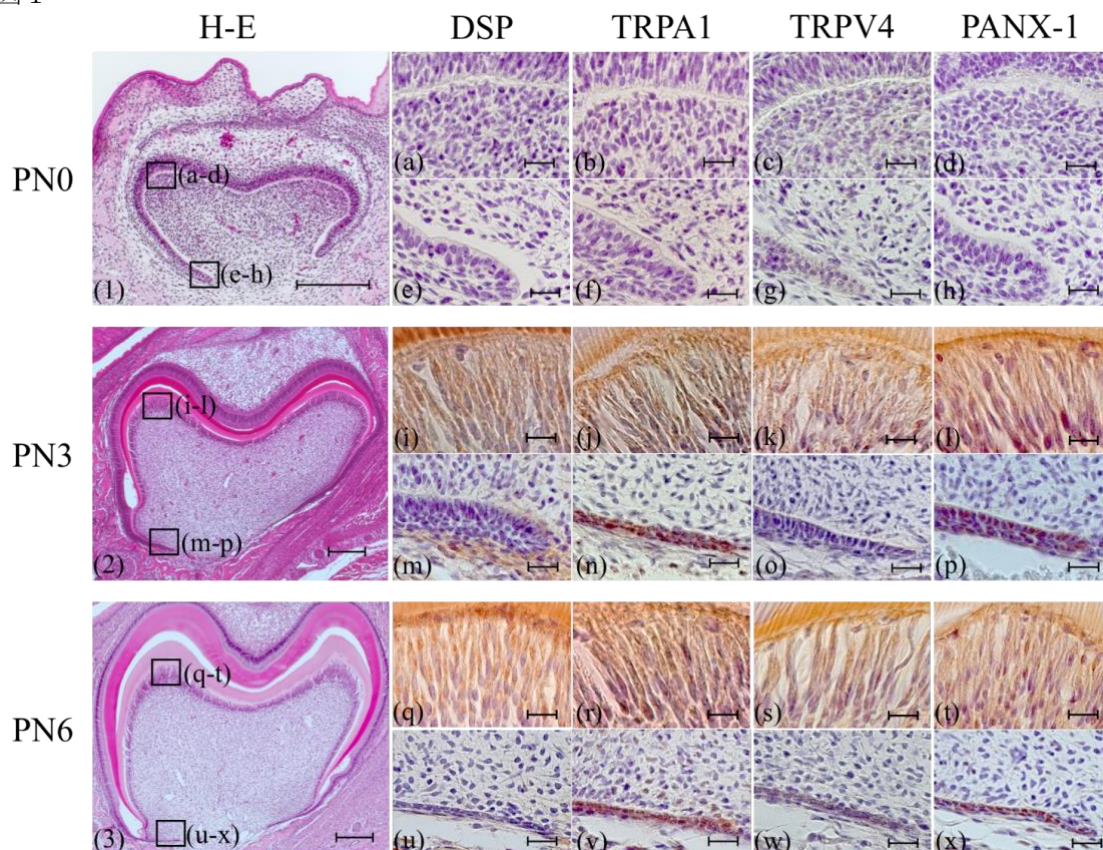
## 4. 研究成果

### (1) 結果

#### ①形態学的観察、免疫組織学染色

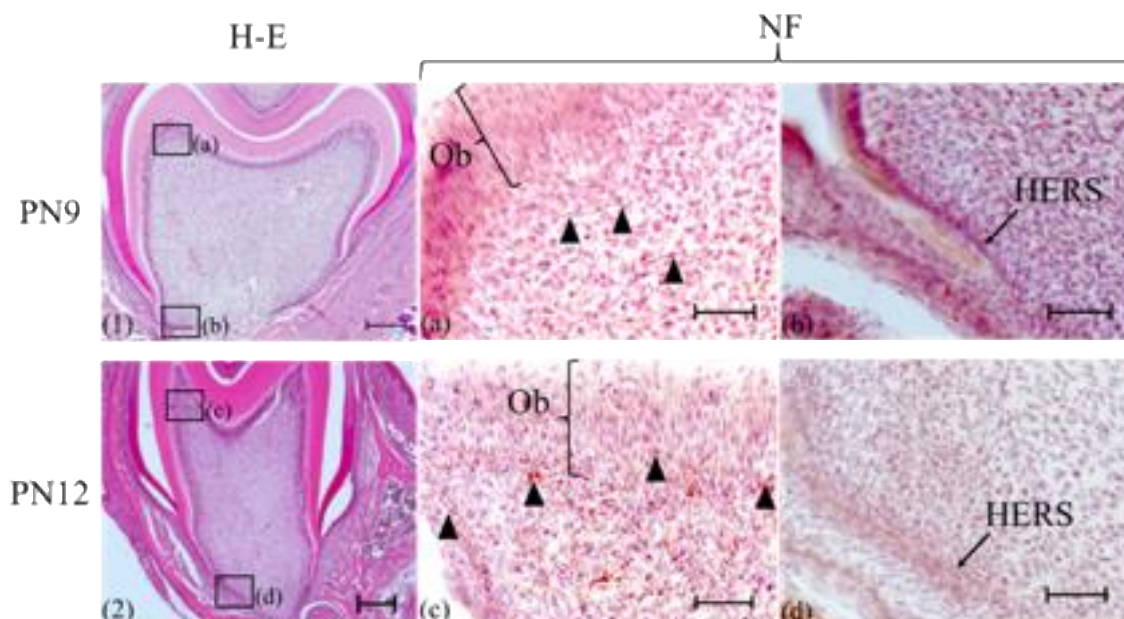
(a-x)は(1-3)の黒枠の部分拡大したものである(図1)。(a-d)、(i-l)、(q-t)は髄角部分の拡大像、(e-h)、(m-q)、(u-x)は歯頸部付近の拡大像である。まず、髄角部分の象牙芽細胞において、生後0日齢では象牙芽細胞が未熟なため、抗DSP抗体、抗TRPA1抗体、抗TRPV4抗体、抗PANX-1抗体に対する陽性反応は認められなかった。しかし、生後3日齢になると象牙芽細胞が成熟し、陽性反応は認められ、生後6日齢ではさらに強い陽性反応が観察された。歯頸部付近の象牙芽細胞は、どの日齢においても未分化または分化初期のため、陽性反応は認められなかった。

図 1



(a-d) は (1, 2) の黒枠の部分拡大したものである (図2)。(a, c) は髄角部分の拡大像、(b, d) は歯頸部付近の拡大像である。生後9、12日齢の髄角部分での抗NF抗体に対する陽性反応は、前述した抗DSP抗体、抗TRPA1抗体、抗TRPV4抗体、抗PANX-1抗体の陽性反応が観察された時期より遅れて認められた (a, cにおける矢頭)。また、生後12日齢では象牙芽細胞層に侵入するような神経線維が認められた。(cにおける矢頭)

図2

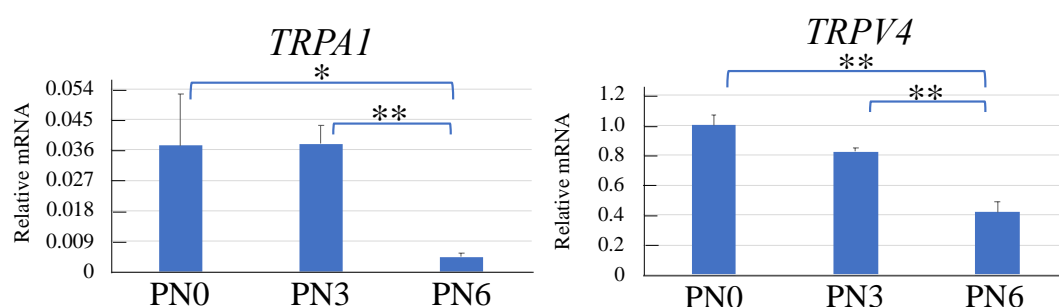


Ob : 象牙芽細胞層、HERS : Hertwig's の上皮鞘

## ② RT-qPCR

生後6日齢での *TRPA1* の発現量は、生後0日齢 ( $p < 0.05$ ) および生後3日齢 ( $p < 0.01$ ) での *TRPA1* の発現量と比べて有意に減少したが、生後0日齢と生後3日齢の間で *TRPA1* の発現量に有意差はなかった。生後6日齢での *TRPV4* の発現量は、生後0日齢 ( $p < 0.01$ ) および生後3日齢 ( $p < 0.01$ ) での *TRPV4* の発現量と比べて有意に減少したが、生後0日齢と生後3日齢の間で *TRPV4* の発現量に有意差はなかった (図3)。

図3



\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$

## (2) 考察および結論

感覚の伝導路の確立には、刺激を受容するための受容体、神経伝達物質を放出するための受容体、神経伝達物質によって刺激される神経線維が必要である。したがって我々は、象牙芽細胞の分化過程を追いながら *TRPA1* チャンネル、*TRPV4* チャンネル、*PANX-1* チャンネル、および神経線維の発現時期を検索した。結果として、未分化な象牙芽細胞において *TRPA1* チャンネル、*TRPV4* チャンネル、および *PANX-1* チャンネルは発現しなかったが、象牙質基質を分泌する成熟した象牙芽細胞においては発現した。一方で、歯根形成開始時期である生後12日齢において、象牙芽細胞層に侵入するような神経線維が発現した。

RT-qPCR では、*TRPA1* および *TRPV4* の mRNA はタンパク発現よりも早期に発現したが、徐々に減少していった。これらは未熟な象牙芽細胞に mRNA の発現量が多く、日齢を追うごとに歯胚に

対する未熟な象牙芽細胞の割合が少なくなっていくため、徐々に減少していったと考えられる。  
以上より、TRPA1 チャンネル、TRPV4 チャンネル、PANX-1 チャンネル、および神経線維の全てが発現するのは歯根形成開始時期であり、萌出前から感覚の伝導路が確立していることが示唆された。  
歯は萌出直後から細菌や機械的刺激など様々な刺激をうける。痛覚は生体防御反応として重要な役割を担っているため、歯も萌出前から痛覚の伝導路が確立しているのかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aoi Tanaka, Yoshiyuki Shibukawa, Masahito Yamamoto, Shinichi Abe, Hitoshi Yamamoto & Seikou Shintani	4. 巻 95(2)
2. 論文標題 Developmental studies on the acquisition of perception conducting pathways via TRP channels in rat molar odontoblasts using immunohistochemistry and RT-qPCR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 251-257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12565-019-00517-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中亜生、石川 昂、山本 仁、新谷誠康
2. 発表標題 象牙芽細胞の感覚受容機能に関する発生学的研究 ~免疫組織化学と定量化~
3. 学会等名 小児歯科学会第34回関東地方会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----