

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2015

課題番号：23792178

研究課題名(和文) 歯髄象牙芽細胞複合体における痛覚の発生メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of outbreak mechanism of the pain on dentin-pulp complex.

研究代表者

達山 祥子 (Tatsuyama, Shoko)

鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：70347095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：今回われわれはヒト歯髄細胞およびマウスの象牙芽細胞において、温度感受性イオンチャネル TRPM8が発現していることを遺伝子レベル、タンパクレベルで確認した。また、象牙質歯髄複合体モデルとしてラットの切歯の薄切切片を用いて、象牙芽細胞にTRPM8が発現していることを明らかにした。このことから象牙芽細胞が感覚受容体として機能し近接する末梢神経に痛覚を伝えることにより、象牙質知覚過敏症に関わっている可能性を示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we confirmed the expression of the transient receptor potential melastatin-8 (TRPM8) in human dental pulp cells and in mouse odontoblasts. Using rat dental pulp slice culture as a dentin-pulp complex models we further revealed TRPM8 expression in rat odontoblasts. Our results indicated that odontoblasts could directly respond to noxious stimuli, example as cold condition, and transduce the signal to the nearby nerves, accordingly odontoblasts may be involved in dentin hypersensitivity.

研究分野：医歯薬学

キーワード：TRPM8 象牙芽細胞 温度感受性受容体

## 1. 研究開始当初の背景

「歯痛」とは、歯科の臨床において最も多い患者の訴えのひとつであり、それを和らげることが歯科治療の大きな役割である。一般に「歯がしみる」と表現されるような痛みは大きく分けて二つの原因が考えられる。一つは、いわゆる虫歯による歯髄炎の場合であり、カリエスによる実質欠損を伴う。よって、適切なカリエスの治療を施すことによりその痛みは取り除くことができる。そしてもう一つは、象牙質知覚過敏症といわれ温度や乾燥、擦過、浸透圧、化学物質などの刺激により鋭い痛みが生じるが、歯の欠損やカリエスなど他の病変では説明できないものである。象牙質知覚過敏症の発症のメカニズムは動水力学説(歯の根面の露出等により、象牙細管の入り口が開口し、外部刺激により象牙細管内溶液が動くことにより、歯髄や内層象牙質に存在する自由神経終末を機械的に刺激し、痛みを誘導する説)が現在もっとも広く受け入れられているが、この説だけでは十分に説明できない部分もまだ残っている。最近では、象牙芽細胞自身が感覚受容細胞としての機能を持ち、外部からの刺激を痛覚神経線維に伝えるという象牙芽細胞受容器説が徐々に研究されつつある。例えば、Shibukawa Yらは、パッチクランプ法という細胞膜のイオンチャンネルの機能を調べる実験を象牙芽細胞を用いて行い、電位依存性カリウムイオン電流を計測し象牙芽細胞が興奮性を有する細胞である可能性について報告している(Bull Tokyo Dent Coll.:1997 Aug;38 (3):177-85)。また、神経に存在し活動電位の伝播を促す電位依存性ナトリウムチャンネルが、象牙芽細胞にも存在していることも明らかとなり(Allard B *et al.*:J Biol Chem.:2006 Sep;29;281(39):29002-10)、象牙芽細胞が感覚受容細胞として機能し、周囲の自由神経終末に興奮を伝えている可能性を示唆している。

求心性の感覚神経には6つの温度感受性のイオンチャンネルがある(Calpham DE : Nature. 2003 Dec 4;426(6966):517-24)。それらのチャンネルは異なる温度帯を閾値としており、熱刺激を感知するものでは TRPV1(VR-1)、TRPV2(VR-2)、冷刺激を感知するもので

は TRPM8、TRPA1 があげられる。感覚神経が末梢において、温度変化による刺激を受けるとそれぞれのイオンチャンネルが開き、陽イオンの流入が起こることにより膜電位が生じ、脳へと伝わっていく。VR-1 はラットの象牙芽細胞において発現が認められ、VR-1 のアゴニストであるカプサイシンによりカルシウムイオンの流入が起こることが確認された(Okumura R *et al.*: Arch Histol Cytol. 2005 Dec;68(4):251-7)。よって、温度感受性イオンチャンネルが、歯における冷刺激や熱刺激の引き起こす痛み、知覚過敏症にも深く関わっている可能性は十分に考えられるが、まだ歯髄、象牙芽細胞における分野での研究はほとんどされていない。

我々はこれまでに、ヒト歯髄細胞において VR-1 の発現がみられること、カプサイシンにより炎症性サイトカインである インターロキン-6 (IL-6) の誘導が起こること、また、IL-6 の発現誘導は MAP キナーゼ p38 のリン酸化を介するということを明らかにした(J Endod. 2005 Sep;31(9):652-8)。このことから、歯髄組織において、熱刺激を受けると VR-1 の活性化が起こり、歯髄の炎症を増悪する可能性が示唆された。また、ヒト歯髄細胞における TRPM8 の発現も RT-PCR および Western blot 法、培養細胞の免疫染色により確認した。つまり、冷刺激に対する様々な歯髄反応においても TRPM8 がなんらかの関わりをもつ可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

以上のことから我々は、歯髄組織においても、また、歯髄組織の外層をなす象牙芽細胞においても、温度刺激により誘導される VR-1 および TRPM8 の活性化が、痛覚の発現や、それに伴う炎症に深く関わっていると予測する。歯髄細胞および象牙芽細胞における VR-1 と TRPM8 の機能をさらに分子生物学的解析することにより、温度と歯の痛覚の関係を明らかにすることができる。そして、それは象牙質知覚過敏症のメカニズムに新しい見解を見出すこととなる。

## 3. 研究の方法

ヒト歯髄細胞 (HPC) ・ マウス象牙芽細胞系細胞 (odontoblast-lineage cell

line:OLC)1) の培養

- ・ HPC は、矯正学的理由で抜歯した小白歯より歯髄を採取し、初代培養を行った。10% FBS 添加 a-MEM で培養し、実験には継代数 10 ~ 20 代までの細胞を用いた
- ・ OLC は、15% FBS を含む a-MEM で培養し、コンフルエントのものを実験に使用した。

(1) TRPM8 mRNA の発現

total RNA を抽出(AGPC 法)し、RT-PCR を行った。

PCR primers は以下のとおり。

human TRPM8(409bp)

sense: TGCCATCTCCTACGCTCTAT

Anti sense: GCCATTTCTGTCTTCCTTCC

human GAPDH(286 bp)

sense: CATCACCATCTTCCAGGAGC

anti sense: CATGAGTCCTTCCACGATACC

mouse TRPM8 (352 bp)

sense: GAAGAGGAAATTGAGAGCTGGA

anti sense: CTGTGAGGACTTCATTGGTGAG

mouse GAPDH (419 bp)

sense: ATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC

anti sense: GTCGACAATCTTGAGTGAGT

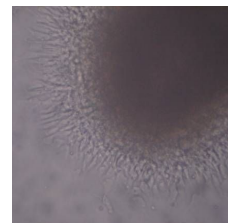
(2) TRPM8 タンパクの発現

- ・ 細胞を溶解し、タンパクを回収し、1 次抗体 : Rabbit polyclonal antibody TRPM8 (NOVUS 社) 2 次抗体 : Goat anti Rabbit HRP conjugate (Bio Lad 社) を使用して、ウェスタンブロット法を行った。

- ・ 細胞免疫染色においては、1 次抗体 : Rabbit polyclonal antibody TRPM8 (NOVUS 社) 2 次抗体 : Goat anti Rabbit HRP conjugate (Bio Lad 社) を用いて行い、DAPI 染色にて核の染色も行った。

(3) 歯髄組織外層の象牙芽細胞における TRPM8 の発現

- 生後 3 ~ 10 日のラット下顎切歯歯根部を含む下顎体を薄切し切歯歯髄の横断薄切標本を作製し、2)それを培養し歯髄組織外層の象牙芽細胞をアウトグロースさせる。



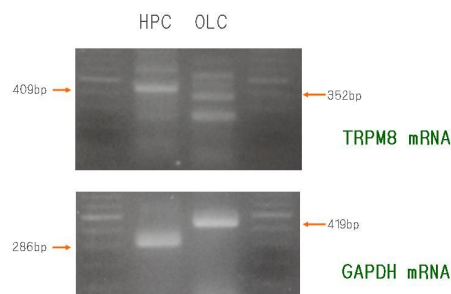
免疫染色法にて、TRPM8、Dentin Matrix Protein-1 (DMP-1)、Dentin sialoprotein (DSP) のタンパクの発現を確認した。

#### 4 . 研究成果

(1) RT-PCR の結果、HPC および OLC において TRPM8 mRNA の発現が認められた。

Fig.1

RT-PCR : TRPM8 mRNA expression in HPC and OLC



(2) ウェスタンブロット法の結果、HPC および OLC において TRPM8 の発現がタンパクレベルにて認められた。

Fig.2

Western blot : Detection of TRPM8 protein in HPC and OLC



(3) 細胞免疫染色の結果、HPC および OLC において TRPM8 の発現が認められた。

Fig.3

免疫細胞染色: HPC

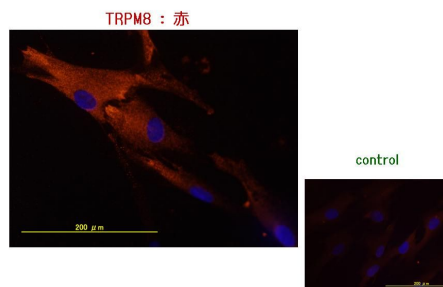
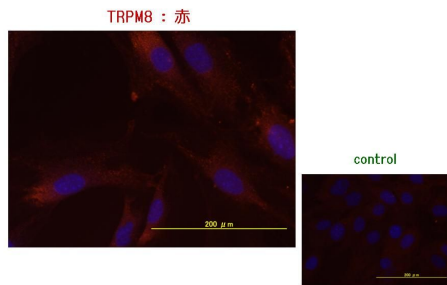


Fig.4 免疫細胞染色: OLC



(4) 歯髄組織外層の象牙芽細胞において、まず DMP-1、DSP および TRPM8 の発現が免疫染色法にて確認された。

Fig.5 免疫染色: ラット切歯歯髄横断標本培養

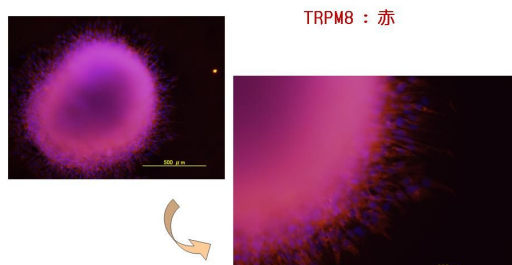


Fig.6 免疫染色: ラット切歯歯髄横断標本培養

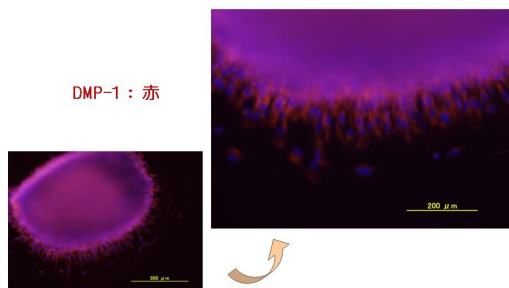
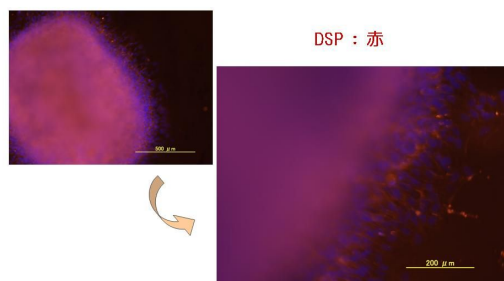


Fig.7 免疫染色: ラット切歯歯髄横断標本培養



以上の結果より、冷刺激感受性受容体である TRPM8 は、歯髄細胞および象牙芽細胞において発現しており、歯における冷刺激の引き起

こす痛み、知覚過敏症において何らかの役割を担っている可能性があると考えられる。また、われわれは、TRPM8 の機能についてさらなる検討を加えるために、擬似的な冷刺激メントールで歯髄細胞、象牙芽細胞を刺激し、熱などによる刺激で発現し細胞を保護すると言われているヒートショックプロテインの(HSP70、HSP27)の発現についても RT-PCR にて解析を行ったが、増強・抑制など発現に変化は見られなかった (data not shown)。今後は、TRPM8 の機能について、カルシウムイオン流動実験を行ったり、TRPM8 以外の温度感受性チャネル(TRPA1 や、TRPV4 など)についても解析を広げ、象牙芽細胞の温度感受性レセプターとしての機能について検討を加えていきたい。

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)  
 A natural therapeutic approach for the treatment of periodontitis by MK615. Morimoto-Yamashita Y, Kawakami Y, Tatsuyama S, Miyashita K, Emoto M, Kikuchi K, Kawahara K, Tokuda M. Med Hypotheses. 2015 Nov;85(5):618-21. doi: 10.1016/j.mehy.2015.07.028. Epub 2015 Aug 3. (査読有り)

Tokuda M, Tatsuyama S, Fujisawa M, Morimoto-Yamashita Y, Kawakami Y, Shibukawa Y, Torii M. : Dentin and pulp sense cold stimulus. Med Hypotheses. 2015 Jan 31 (査読有り)

Fujisawa M, Tokuda M, Morimoto-Yamashita Y, Tatsuyama S, Arany S, Sugiyama T, Kitamura C, Shibukawa Y, Torii M. : Hyperosmotic stress induces cell death in an odontoblast-lineage cell line. J Endod. 2012 Jul;38(7):931-5. (査読有り)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

達山 祥子 (TATSUYAMA SHOKO)  
 鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号: 70347095

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：