

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792035

研究課題名(和文)象牙芽細胞における歯内治療薬の作用と応用：侵害刺激受容と修復象牙質形成の機能関連

研究課題名(英文) Effects and application of endodontics chemicals: Function of between received oxious stimulus and reactive dentin formaing.

研究代表者

佐藤 正樹 (Sato, Masaki)

東京歯科大学・歯学部・助手

研究者番号：80598855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ユーギノールは、象牙芽細胞の細胞内カルシウムイオン濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)を一過性に、かつ濃度依存的に増加した。この応答は細胞外Ca<sup>2+</sup>の除去によって消失した。さらにTRPV1 channelの阻害剤が一過性の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の増加を抑制した。また、一過性の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の増加の後のユーギノールの持続性投与は、TRPV1チャネルを介したCa<sup>2+</sup>流入の感度を一時的に高める(感作)が、その後の感度を減少させる効果(脱感作)を誘導した。ユーギノールは象牙芽細胞に発現するTRPV1チャネルを感作/減感作することで、鎮痛効果を得ていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Eugenol has been used since ancient times as a local anesthetic for toothaches. Despite its long history of use, relatively little is known about its physiological effects. In the present study, we investigated the effects of eugenol on intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) in mouse odontoblasts. Application of eugenol increased [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transiently in a concentration-dependent manner. Removal of extracellular Ca<sup>2+</sup> abolished this effect, indicating that eugenol activated Ca<sup>2+</sup> entry. Capsazepine, an antagonist of TRPV1 channels, inhibited the increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Additionally, after a transient increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, continuous administration of eugenol induced sensitizing and subsequent desensitizing effects on Ca<sup>2+</sup> entry via TRPV1 channels. Therefore, eugenol modulates the sensitization/desensitization of TRPV1 channel activation in odontoblasts, which may mediate the analgesic effects of eugenol on dentinal sensitivity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯内治療薬 象牙芽細胞 TRPチャネル

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) 研究の学術的背景

歴史的背景: ユーヅノールはクローブ (*Syzygium aromaticum*)、ローリエ (*Laurus nobilis*)、シナモン (*Cinnamomum verum*)、バナナ (*Musa spp*) 等に含有される無色から淡黄色の油状液体である。ユーヅノールは含有する植物から想像する通り、刺激のある快い芳香が特徴であり、一般的には香辛料やエッセンシャルオイルとして用いられる。ユーヅノールはう蝕の初期治療薬として千年以上使用され続けられている最古の治療薬であり、日本のみならず世界各地で利用され、大航海時代では胡椒よりも高値で取引されていた (千葉ら, 2007)。ユーヅノールは市販薬では、今治水 (こんじすい) の有効成分として歯痛鎮痛剤に用いられ、明治 20 年代には既にベストセラーになっていた (東京都家庭薬工業協同組合 HP より)。

歯内治療薬: 歯内療法薬とは歯の硬組織疾患に継発する、歯髄、根尖歯周組織などの疾患を予防・治療する薬物で、その目的は歯の機能的維持と健康な歯の保存である。歯内療法の歴史は長く、その作用として以下の効果が期待される。1)う蝕により象牙細管中に侵入した細菌を殺滅するための消毒作用。2)窩洞形成時に熱刺激や機械的刺激などが象牙質細管を伝わって、疼痛・歯髄に対する影響、炎症症状もしくはその前段階の症状を誘発することがある。このような炎症状態になった歯髄の病的状態の炎症を鎮静させ、健全な歯髄に回復させるための歯髄鎮静作用。そして 3) 健康な歯牙の保存のために象牙芽細胞に作用し、修復象牙質形成を促進または助長する等の効果が挙げられる。これらの作用を持つ治療薬はその分子構造にフェノール骨格を持つものが多く、フェノール製剤と呼ば

れ、同様の薬剤としてカンフル、モディファイドフェノール、パラモノクロロフェノールカンファ、グアヤコールそしてユーヅノール等がある。中でもユーヅノールは紀元前から鎮痛・鎮静剤として使用されており、現代では酸化亜鉛ユーヅノールとして仮封・直接・間接覆髄剤として広く使用されている。その作用の一例としてプロスタグランジン合成酵素を阻害する抗炎症作用が示されている。一方、ユーヅノールを含むフェノール製剤は親油性を示すものが多く、作用機序には不明な点が多くあるが、安定した効果から暗黙的に使用され続けている。

侵害受容器: 健康な組織を傷害、もしくはその危険性を持つ刺激は侵害刺激と呼ばれ、その侵害刺激が組織に加わったことで生じる痛みを侵害受容性疼痛と呼ぶ。侵害受容器は侵害刺激を電気信号に変える変換機である。解剖学的に侵害受容器は、口腔領域では三叉神経節細胞の末梢終末の髄鞘が消失した自由神経終末である。侵害受容器に侵害刺激が加わると、起動電位が生じる。起動電位による脱分極が閾膜電位を越えると活動電位が発生し、神経を伝導する。このような外界の環境変化を察知し、 $\text{Na}^+$ を含む陽イオンに対する透過性を増加させる侵害受容体チャネルを Transient Receptor Potential (TRP) チャネルという。TRP チャネルは現在では遺伝子解析によりヒトで 27 種類が同定され、ユーヅノールが TRP チャネルのサブタイプである TRPV1 に作用することが報告されている (Xu et al., 2006)。最近の研究では、三叉神経節細胞 (富永, 2010) と象牙芽細胞 (Okumura et al., 2006) に TRPV1 の発現が報告されている。加えて TRPV1 の agonist であるカプサイシンがフェノール骨格を持つことから、歯髄最外層に位置し、象牙細管に突起を持つ象牙芽細胞が侵害受容細胞である可能性を示す報告もある (Shibukawa et al., 2010)。

象牙芽細胞に対する作用: 本申請に先行し、

マウス由来象牙芽細胞系細胞 (mouse odontoblast lineage cells, mOLCs) の培養細胞を用いて、象牙芽細胞に対するユージノールの作用はカルシウムイメージング法を用いて検討した。ユージノールの単回投与は濃度依存的に mOLCs の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を増加した。また細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加は、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  を取り除くことで有意に抑制されたことから、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の流入が原因であることが示された。さらに TRPV1 の選択的 antagonist の投与により、ユージノールによる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加が顕著に抑制されたことから、ユージノールが TRPV1 を活性化して細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  を取り込んでいることが示された。ユージノールが TRPV1 を活性化することで生じる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加は、侵害受容性疼痛の再現だと考えられ、ユージノールによる鎮静・鎮痛作用は示されていない。そこでユージノールの繰り返し投与による象牙芽細胞の応答を検討した。高濃度ユージノール (10 mM) の繰り返し投与は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加を有意に感作・脱感作した。象牙芽細胞は象牙質形成細胞である。一般的にユージノールは歯髄鎮静療法に用いられるが、第三象牙質形成能は低いとされ、間接歯髄覆罩法には用いられない。一方 TRPV1 の活性化によって増加した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換機構によって石灰化前線に汲み出されることで、象牙質刺激誘発性の象牙質形成が生じるであろう事を報告している (Tsumura et al., 2010)。ユージノールの繰り返し投与による TRPV1 の感作と脱感作は、ユージノールが一過性の象牙質形成を誘発するが、その後の持続的象牙質形成に寄与しない可能性が示唆された。一方、象牙芽細胞が象牙質痛覚の感覚受容細胞であるとする報告もある (Shibukawa et al., 2010)。窩底象牙質へのユージノールの適応は一過性疼痛とその後の鎮痛作用を生じる。ユージノールの繰り返し投与による TRPV1 の感作と脱感作は、ユージノールの鎮痛作用による可能性

が示唆された。

## 2. 研究の目的

歯内治療薬は歯髄、歯周組織などの疾患を予防・治療し、鎮静・鎮痛、歯の機能維持と保存を目的とする薬剤の総称である。代表的な歯内治療薬であるユージノールは、有史以来暗黙的に使用され続けてきたが、近年象牙芽細胞に発現する侵害受容 (transient receptor potential: TRP) channel への作用が示された。我々は象牙質形成に関与する膜輸送体と TRP channels の細胞内カルシウムシグナル伝達系、ユージノールによる TRP channels の感作・脱感作と応答の時間的変化を示す研究結果を得ている。先行研究結果をもとに、歯髄痛の鎮静・鎮痛、歯牙修復・保存に関する詳細な作用濃度・作用部位・作用機序を、実験動物とヒト由来の象牙芽細胞を用いて解明する。

## 3. 研究の方法

歯髄モデルとして継代培養されたマウス由来象牙芽細胞系細胞 (mouse odontoblast lineage cells, mOLCs) を用いた。ユージノールに対する OLC の応答は光生理学的実験 (カルシウムイメージング法) を行い、1) チャネルゲーティングに対するユージノールの濃度依存性、2) TRP チャネルの agonist/antagonist を用いた細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の活性化機構への影響を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 培養象牙芽細胞に対するユージノールの作用は濃度依存的であり、薬剤効果 50% を示す数値は 1.1 mM であった。

(2) 一方、ユージノールは 100  $\mu\text{M}$  以下でも、わずかな  $\text{Ca}^{2+}$  流入応答が見られた。これは、細胞内にユージノールが残留した可能性が示唆されたが、詳細は未検討である。

(3) 以上の応答は、細胞外液中に 2.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  が存在する場合において観察された。一方、細胞外液から  $\text{Ca}^{2+}$  を除去すると、これらの応答はみられなかった。

(4) ユージノールは培養象牙芽細胞に発現

するイオンチャネル型受容体を活性化し、細胞内にCa<sup>2+</sup>を流入させることが分かったので、ユージオールと分子骨格（フェノール骨格）を有するTRPV1チャネルに着目した。TRPV1阻害剤であるカプサゼピンは、ユージオールによる細胞内Ca<sup>2+</sup>の増加を有意に抑制した。（5）ユージオールはう蝕窩洞部に適用する際、酸化亜鉛ユージオールとして充填する。そのため、象牙芽細胞に対するユージオールの投与は、連続または長期投与が、臨床的な適用に近いと考えた。

（5-1）象牙芽細胞に対するユージオールの作用を3回の連続投与で検討した。1 mMは3回の応答に有意な差はみられなかった。5 mMでは2回目の応答が大きくなり、3回目の応答が有意に減少した。10 mMは2回目の応答が有意に増加し、3回目の応答は顕著に減少した。

（5-2）象牙芽細胞に対して得られるユージオールの一過性Ca<sup>2+</sup>応答の後、Ca<sup>2+</sup>レベルが投与前の状態に戻った状態で投与を続けた。そこで200 mOsm/Lの低浸透圧刺激を加えると、その応答は有意に減少した。

以上の結果は、ユージオールがTRPV1チャネルを感作・脱感作することで鎮痛作用を得ることを示し、ユージオールの長期投与はTRPV1チャネルを脱感作することで、低浸透圧刺激に対する応答を抑制することが示された。一方、ユージオールによる象牙芽細胞内Ca<sup>2+</sup>の増加を示す応答には、一過性の早い応答を示す成分と、ゆっくりとした遅い成分が5 mM, 10 mMの高濃度投与で見られた。これはユージオールがTRPV1以外（代謝調節型受容体など）にも作用している可能性を示唆しており、さらなる精査が必要と考え、追加実験を継続して実施している。

## 5. 主な発表論文等

（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9件）

Soya, M., Sato, M., Sobhan, U., Tsumura, M., Ichinohe, T., Tazaki, M., and Shibukawa, Y. (2014). Plasma membrane stretch activates transient receptor potential vanilloid and ankyrin channels in Merkel cells from hamster buccal mucosa. *Cell Calcium* 55, 208–218.

Tsumura, M., Sobhan, U., Sato, M., Shimada, M., Nishiyama, A., Kawaguchi, A., Soya, M., Kuroda, H., Tazaki, M., and Shibukawa, Y. (2013). Functional Expression of TRPM8 and TRPA1 Channels in Rat Odontoblasts. *PLoS One* 8, e82233.

Sobhan, U., Sato, M., Shinomiya, T., Okubo, M., Tsumura, M., Muramatsu, T., Kawaguchi, M., Tazaki, M., and Shibukawa, Y. (2013). Immunolocalization and distribution of functional temperature-sensitive TRP channels in salivary glands. *Cell Tissue Res.* 354, 507–519.

Sato, M., Sobhan, U., Tsumura, M., Kuroda, H., Soya, M., Masamura, A., Nishiyama, A., Katakura, A., Ichinohe, T., Tazaki, M., et al. (2013). Hypotonic-induced stretching of plasma membrane activates transient receptor potential vanilloid channels and sodium-calcium exchangers in mouse odontoblasts. *J. Endod.* 39, 779–787.

Kuroda, H., Sobhan, U., Sato, M., Tsumura, M., Ichinohe, T., Tazaki, M., and Shibukawa, Y. (2013). Sodium-calcium exchangers in rat trigeminal ganglion neurons. *Mol. Pain* 9, 22.

Tsumura, M., Sobhan, U., Muramatsu, T., Sato, M., Ichikawa, H., Sahara, Y., Tazaki, M., and Shibukawa, Y. (2012). TRPV1-mediated calcium signal couples with cannabinoid receptors and sodium-calcium exchangers in rat odontoblasts. *Cell Calcium* 52, 124–136.

Tazaki, M., Ichikawa M., Tsumura M., Sato M., Sobhan U., Endoh T., Shibukawa Y. (2012). Bradykinin up-regulates voltage-dependent sodium channels in human odontoblast. *Med.*

Biol. 156, 404–409.

高橋史子、津村麻記、Sobhan Ubaidus、佐藤正樹、田崎雅和、澁川義幸 (2013) 象牙芽細胞における transient receptor potential melastatin subfamily member 8 チャネルの発現と検索. 医学と生物 157 (6): 985-990.

陽田みゆき、津村麻記、佐藤正樹、Sobhan Ubaidus、大多和由美、山下秀一郎、田崎雅和、澁川義幸 (2013) グアヤコールは象牙芽細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  流入を活性化する. 歯科学報 113 (6) 597-602

[学会発表] (計 15 件)

佐藤正樹、津村麻記、Sobhan Ubaidus、児玉紗耶香、陽田みゆき、西山明宏、望月浩幸、小倉一宏、田崎雅和、澁川義幸 (2013) マウス由来象牙芽細胞における細胞膜伸展受容 TRP チャネルと  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger の機能関連 (口頭発表) 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会、岡山 (9 月 21-22 日) P117

津村麻記、佐藤正樹、Sobhan Ubaidus、児玉紗耶香、陽田みゆき、西山明宏、田崎雅和、澁川義幸 (2013) 象牙芽細胞におけるアルカリ感受性の検討 (ポスター発表) 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会、岡山 (9 月 21-22 日) P152

陽田みゆき、津村麻記、佐藤正樹、Sobhan Ubaidus、田崎雅和、澁川義幸 (2013) Guaiacol は象牙芽細胞の TRPV3 チャネルに作用する (ポスター発表) 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会、岡山 (9 月 21-22 日) P192

Soya M., Kuroda H., Kawaguchi A., Sato M., Sobhan U., Tazaki M., Ichinohe T., Shibukawa Y. (2013) Expression of TRP channels in isolated single Merkel cells from hamster oral mucosa. (Poster) 37th Congress of IUPS, UK, Birmingham (21-26 July)

Shibukawa Y., Sato M., Tsumura M., Kuroda H., Sobhan U., Tazaki M. (2013) Odontoblast as sensory receptor cell: TRP channels, pannexin 1 and P2X<sub>3</sub> receptor coupling

mediate sensory transduction in dentin. (Oral) 11th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation (TMD2013), France, La Londe Les Maures (26-31 May)

Sato M., Tsumura M., Sobhan U., Tazaki M., Shibukawa Y. (2013) Expression of TRPM8 and TRPA1 channels in rat odontoblasts. (Poster) 11th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation (TMD2013), France, La Londe Les Maures (26-31 May)

津村麻記、Sobhan Ubaidus、佐藤正樹、西山明宏、田崎雅和、澁川義幸 (2012) 象牙芽細胞における TRPM8 チャネルと TRPA1 チャネルの発現検索 oral presentation, 第 54 回歯科基礎医学会, 2012 年 9 月 15 日, 郡山市

Kuroda H., Kawaguchi A., Soya M., Sato M., Sobhan U., Tsumura M., Tazaki M., Ichinohe T. and Shibukawa Y. (2012) Sodium-Calcium Exchangers in Rat Trigeminal Ganglion Neurons. poster presentation, 第 6 回トランスポーター研究会九州部会, 2012 年 9 月 1 日, 福岡市

津村麻記、Sobhan Ubaidus、佐藤正樹、西山明宏、田崎雅和、澁川義幸 (2012) 象牙芽細胞における TRPV1 チャネル・CB1 受容体・ $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換体の機能関連 poster presentation, 第 6 回トランスポーター研究会九州部会, 2012 年 9 月 1 日, 福岡市

佐藤正樹、津村麻記、Sobhan Ubaidus、黒田英孝、田崎雅和、澁川義幸 (2012) マウス象牙芽細胞系細胞における細胞膜伸展刺激受容 TRP channels と NCX の機能関連 poster presentation, 第 6 回トランスポーター研究会九州部会, 2012 年 9 月 1 日, 福岡市

Sato M., Tsumura M., Sobhan U., Kuroda H., Soya M., Masamura A., Tazaki M., Ichinohe T., Shibukawa Y. (2012) 象牙芽細胞系細胞における機械刺激受容と三叉神経節細胞共培養系における伝達機構 Oral presentation, 11<sup>th</sup> Kushiro

Neuroscience Workshop, Kushiro, Hokkaido, Japan. (July 6-7, 2012)

Nishiyama A., Sato M., Shibukawa Y., Tazaki M, Katakura A.. (2012) 象牙芽細胞におけるグルタミン酸受容体の発現

Oral presentation, 11<sup>th</sup> Kushiro Neuroscience Workshop, Kushiro, Hokkaido, Japan. (July 6-7, 2012)

M. Sato, U. Sobhan, M. Tsumura, H. Ichikawa, M. Tazaki, T. Muramatsu, Y. Shibukawa. (2011) Activation of TRP channels by osmotic stimulation and Ca<sup>2+</sup> extrusion by Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchangers in mouse odontoblast lineage cells. (Poster) 6<sup>th</sup> International Conference on Sodium Calcium Exchanger, Naples, Italy. (1-5 October)

Shibukawa Y., Tsumura M., Sato M., Sobhan U., Muramatsu T., Matsuda T., Baba A., Tazaki M. (2011) NCX expression in enamel/dentin-forming cells. Poster presentation (26), 6th International Conference on Sodium Calcium Exchanger 2011, Lacco Ameno, Ischia Island, Naples, Italy. (October 1-5, 2011)

Tsumura M., Shibukawa Y., Muramatsu T., Sobhan U., Sato M., Ichikawa H., Tazaki T. (2011) Functional coupling between TRPV1, CB1 and NCXs in rat odontoblasts. Poster presentation (33), 6th International Conference on Sodium Calcium Exchanger 2011, Lacco Ameno, Ischia Island, Naples, Italy. (October 1-5, 2011)

〔図書〕(計2件)

佐藤正樹、陽田みゆき、津村麻記、Sobhan Ubaidus、田崎雅和 (2012) 歯科医学の古きをたずねて新しきを知る 第2回: 歯内療法薬剤の作用機序 日本歯科評論 843 (73) : 149-151

澁川義幸、市川秀樹、Sobhan Ubaidus、津村麻記、佐藤正樹、田崎雅和 (2012) 歯髄・象牙質感覚の基礎と臨床 日本歯科医師会雑誌 65 (2) : 21-30

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

佐藤正樹 (SATO MASAKI)

東京歯科大学・生理学講座・助手

研究者番号: 80598855

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし