

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462791

研究課題名(和文)ATPによる象牙芽細胞からの神経伝達機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of neurotransmission mechanisms from odontoblasts by ATP

研究代表者

後藤 哲哉 (Goto, Tetsuya)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：70253458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯の痛みの伝達には象牙芽細胞が感覚受容細胞として機能しているが、本研究では象牙芽細胞から知覚神経へのシグナル伝達にvesicular nucleotide transporter (VNUT)を介したATPの放出が関与しているかどうかを調べた。結果として、ラットの象牙芽細胞にVNUT免疫陽性小胞が存在すること、象牙芽細胞の間にATPの受容体であるP2X受容体を含む神経終末が存在することが確認された。また、培養象牙芽細胞様細胞を使った実験でもVNUTを介したATPの放出が確認された。これらの結果は象牙芽細胞からのシグナル伝達にVNUTを介したATPが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study the exact signaling mechanism from odontoblasts to pulp nerves remains to be clarified. we focused on the vesicular nucleotide transporter (VNUT), a transporter of ATP into vesicles, and examined whether VNUT was involved in ATP release from odontoblasts. ATP release from cultured odontoblast like cells with heat stimulation was observed. VNUT was expressed in pulp tissue, and the distribution of VNUT-immunopositive vesicles was confirmed in odontoblasts. In odontoblasts, some VNUT-immunopositive vesicles were colocalized with membrane fusion proteins. Additionally P2X3, an ATP receptor, immunopositive axons were distributed between odontoblasts. The ATP release by thermal stimulation from odontoblast-like cells was inhibited by the addition of siRNA for VNUT. These findings suggest that cytosolic ATP is transported by VNUT and that the ATP in the vesicles is then released from odontoblasts to ATP receptors on axons.

研究分野：口腔組織学

キーワード：象牙芽細胞 アデノシン3リン酸 VNUT 温熱刺激

1. 研究開始当初の背景

象牙芽細胞は歯の象牙質を形成する働きとともに、歯に加えられた熱刺激や化学刺激を受容し、歯髄の知覚神経に痛みとして伝える感覚受容機としての役割を有する。象牙芽細胞から歯髄の知覚神経への伝達は動水力学説など幾つか説明されているが、未だに明確にはなっていない。

一方、神経への情報伝達物質として以前よりアデノシン3リン酸(ATP)が考えられていたが、象牙芽細胞からどのようなメカニズムで ATP が放出されるか分かってはいなかった。最近、細胞質から小胞内へ ATP を送る新たな小胞体トランスポーターとして、vesicular nucleotide transporter (VNUT)が発見され、ATP の小胞内輸送ならびに細胞からの放出に関わっていることが明らかとなった。従って、象牙芽細胞からの ATP の放出に VNUT が関わっていることが予想された。

2. 研究の目的

本研究では、ラットもしくは培養象牙芽細胞様細胞を用いて以下のことを調べることを目的とする。

(1)ATP の細胞外放出に関わる VNUT が象牙芽細胞に発現しているかどうか、また細胞外に放出されているかどうかを免疫組織学的に調べる。

(2)ATP の受容体である P2X 受容体が象牙芽細胞近くの神経終末に存在するかどうかを免疫組織学的に調べる。

(3)象牙芽細胞様細胞を用いて培養を行った時に熱刺激を加えて ATP の放出が増加するかどうか、また、siRNA を用いて VNUT の発現を抑えると ATP の放出が減少するかどうかを調べる。

3. 研究の方法

(1)VNUT の局在を調べるためにウサギポリクローナル抗 VNUT 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。7週齢ラットを 4%パラホルムアルデヒド固定液で灌流固定し、EDTA で脱灰後、クライオスタットにて凍結切片を作成した。抗体は抗 VNUT 抗体のほか、象牙芽細胞のマーカーである nestin、膜癒合タンパクである Snap25、神経線維のマーカーである neurofilament 200、ATP 受容体である P2X₃、のそれぞれに対する抗体を 1次抗体として用いた。2次抗体としては goat anti-mouse Ig G 568, goat anti-rabbit IgG 488, goat anti-guinea pig Ig G 546 を用い蛍光顕微鏡にて観察した。

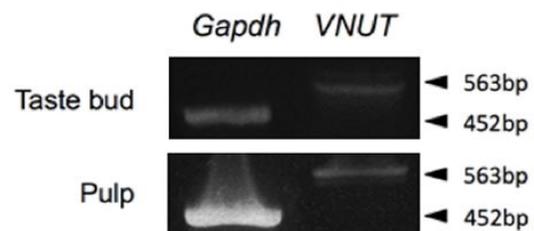
(2)VNUT の発現を調べるためにラット上顎第1臼歯と味蕾より RNA を抽出した。通法に従い、cDNA に逆転写後、VNUT のプライ

マーとコントロールとして GAPDH を使って RT-PCR 法にて VNUT の遺伝子発現を調べた。

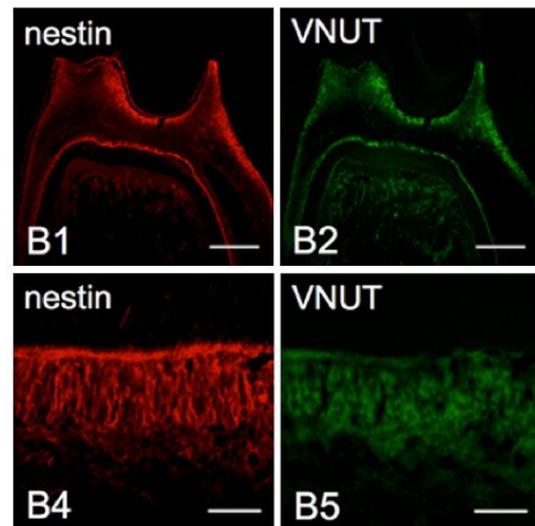
(3)象牙芽細胞様細胞(KN-3)を用いて 10%牛胎児結成を含む Eagle's alpha medium により培養を行った。培養細胞を 43℃にて45分間培養し細胞に温熱ストレスを加えた。その後、細胞の RNA を抽出回収し、cDNA に逆転写後、熱刺激ストレスタンパクである Hsp25、VNUT、GAPDH のそれぞれのプライマーを用い遺伝子発現を RT-PCR にて調べた。また、VNUT に対する siRNA を用いて、発現が抑えられるかどうかについて調べた。また、ATP の細胞からの放出については ATP assay キット(和光、大阪、Japan)を使って計測した。

4. 研究成果

(1)味蕾(Taste bud)と歯髄(Pulp)から得られた RNA を RT-PCR 分析した結果、コントロールの味蕾と同様歯髄の細胞にも VNUT の発現が認められた(下図)。

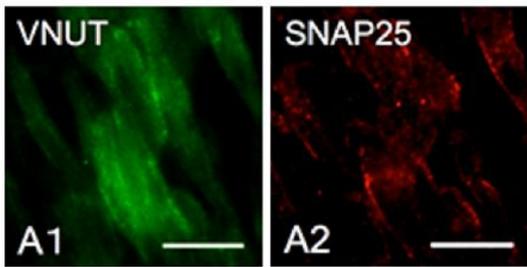


歯髄のどの細胞に VNUT が発現しているかを調べるために免疫蛍光染色を行ったところ nestin で染色される象牙芽細胞の存在部位に VNUT 陽性反応が強く認められた(下図)。

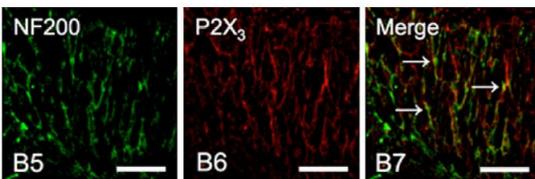


次に、VNUT が象牙芽細胞のどこに分布するか、さらには細胞膜と VNUT を含む小胞が細胞膜と癒合し細胞外に分泌するかを調べるために VNUT と SNAP25 との免疫二重染色を行った。その結果、象牙芽細胞の一部では VNUT が細胞

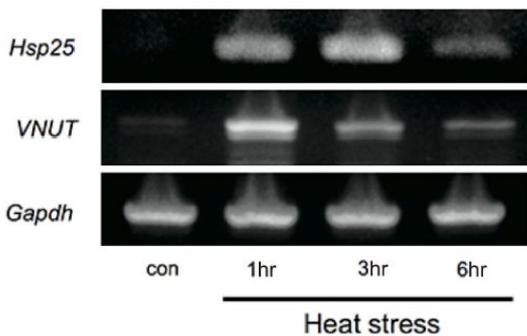
胞膜付近に移動し SNAP25 と共存している像が確認された（下図）。



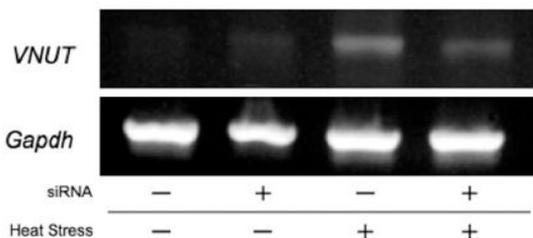
(2)次に象牙芽細胞付近の神経終末に ATP 受容体である P2X₃ 受容体が存在するかどうかを調べたところ、象牙芽細胞間の NF200 陽性神経線維に P2X₃ 受容体の共存が認められた（下図）。



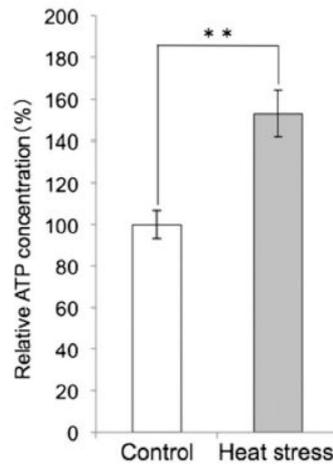
(3)培養象牙芽細胞様細胞 KN-3 を使い、熱刺激を加えたときの Hsp25 と VNUT の発現について RT-PCR 法にて調べた。熱刺激を加え、1、3、6 時間後について調べたところ、Hsp25 は 3 時間後に発現のピークが認められたが VNUT に関しては最初の 1 時間後が最も発現が高く、以後発現は減少した。



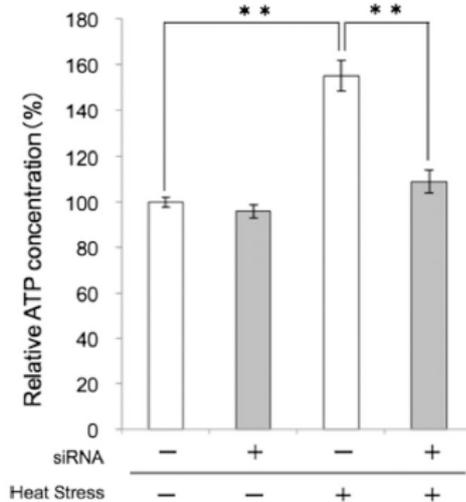
次に、培養細胞に熱刺激を加えさらに発現を siRNA で抑えたときの VNUT の発現を調べた結果、siRNA 添加により熱刺激で上昇した VNUT 発現は減少した。



培養象牙芽細胞様細胞 KN-3 に熱刺激を加えたときに、細胞からの ATP の分泌が上昇するかどうかを調べた結果、有意に ATP の分泌量の増加が認められた。



最後に、ATP の放出が siRNA によって抑制されるかどうかを調べたところ、siRNA の添加により有意に ATP の放出が抑制された。



これらの結果により、象牙芽細胞から ATP を放出するのに必要な VNUT が象牙芽細胞に発現しており、熱刺激等を受けたときに象牙芽細胞に VNUT が発現し象牙芽細胞から分泌され、近傍の ATP 受容体を含む神経終末に結合しシグナル伝達している可能性が示唆された。

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 3 件)

Goto T, Iwai H, Kuramoto E, Yamanaka A: Neuropeptides and ATP signaling in the trigeminal ganglion, Jpn Dent Sci Rev、査読あり、印刷中

Goto T, Oh SB, Takeda M, Shinoda M, Sato T, Gunjigake KK, Iwata K: Recent advances in the basic research on trigeminal ganglion. J Physiol Sci, 査読あり、Vo. 66, 2016, 381-386
DOI: 10.1007/s12576-016-0448-1

Ikeda E, Goto T, Gunjigake KK, Kuroishi KN, Ueda M, Kataoka S, Toyono T, Nakatomi M, Seta Y, Kitamura C, Nishihara T, Kawamoto T. Expression of vesicular nucleotide transporter in rat odontoblast. Acta Histochem Cytochem, 査読あり、Vol. 49, 2016, 21-28, 2016
DOI: 10.1267/ahc

〔学会発表〕(計 6 件)

後藤哲哉：ラット三叉神経節における神経細胞-マクロファージ様細胞のクロストークについて。第 10 回三叉神経領域の感覚-運動統合機能研究会、2016 年 11 月 21 日、佐久平プラザ 21 (長野県、佐久市)

岩井治樹、倉本恵梨子、山中淳之、後藤哲哉：ラット三叉神経節における VNUT を介した神経細胞、衛星細胞、およびミクログリア様細胞間の細胞外 ATP 情報伝達。第 58 回歯科基礎医学会。2016 年 8 月 24 日～26 日、札幌コンベンションセンター(北海道、札幌市)

Iwai H, Kuramoto E, Yamanaka A, Goto T: ATP mediates neuron-satellite glia-microglia signaling in the rat trigeminal ganglion. 94th general session & exhibition of the IADR, June 22-25, 2016, Seoul, Republic of Korea.

岩井治樹、倉本恵梨子、後藤哲哉：ラット三叉神経節神経細胞および衛星細胞における小胞型ヌクレオチドトランスポーターの発現と分布。第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会。2016 年 3 月 28, 29 日、ビッグパレットふくしま (福島県、郡山市)

池田恵理奈、後藤哲哉、郡司掛香織、黒石加代子、上田雅恵:ラット象牙芽細胞における小胞性ヌクレオチドトランスポーターの

発現と機能について、第 51 回日本口腔組織培養学会、2014 年 11 月 15 日、九州歯科大学講堂 (福岡県、北九州市)

池田恵理奈、後藤哲哉、郡司掛香織、片岡真司、黒石加代子、上田雅恵、野代悦生：ラット象牙芽細胞での疼痛伝達における小胞性ヌクレオチドトランスポーターの役割について、第 73 回日本矯正歯科学会大会、2014 年 10 月 20～22 日、幕張メッセ (千葉県、千葉市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://tgoto9.wixsite.com/gotolab-site>

New Publication

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 哲哉 (GOTO, Tetsuya)
鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授
研究者番号：70253458

(2) 研究分担者

片岡 真司 (KATAOKA, Shinji)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：80364149

(3) 研究分担者

山中 淳之 (YAMANAKA, Atsushi)
鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授
研究者番号：80343367