

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462894

研究課題名(和文) 歯内療法薬が象牙芽細胞に及ぼす影響と作用メカニズムの探求

研究課題名(英文) Effects of the analgesic drug for endodontic treatment on odontoblasts.

研究代表者

しま田 みゆき (Shimada, Miyuki)

東京歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：60297348

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)：歯内治療薬であるグアヤコールを感覚受容細胞である象牙芽細胞に作用させたところ、グアヤコールには象牙芽細胞のTRPV3チャンネルを介して細胞外から細胞内へCa²⁺を流入させる作用があった。しかしグアヤコールは象牙芽細胞に対する低浸透圧刺激誘発性の細胞内Ca²⁺濃度の増加を抑制せず、象牙質痛に対する鎮痛効果は低いと考えられた。グアヤコールはラットの三叉神経節ニューロンに対するブラジキニン誘発性あるいは直接機械刺激誘発性細胞内Ca²⁺流入を有意に抑制した。従ってグアヤコールの歯痛に対する鎮痛効果は直接歯髄に作用して発揮されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated effects of the guaiacol on odontoblasts which play an important role in nociceptive process via activation of transient receptor potential (TRP) channels during stimulation applied to the dentin surface. Guaiacol evoked Ca²⁺ influx from the extracellular medium via TRP vanilloid subfamily members-3 channels on the plasma membrane of odontoblasts, while the drug did not inhibit hypotonic-stimulation-induced Ca²⁺ entry in odontoblasts. These results implied that analgesic effect on odontoblast by guaiacol is unlikely in the dentinal pain. The bradykinin-induced and a direct mechanical stimulation-induced intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) increases in trigeminal ganglion (TG) neurons were significantly inhibited by guaiacol. We suggested that guaiacol develops excellent analgesic effect on the pulpitis by inhibiting mechanosensitive ionic channels in TG neurons.

研究分野：歯学

キーワード：歯内療法薬 TRP channel Odontoblast Guaiacol Trigeminal ganglion

1. 研究開始当初の背景

歯科臨床で歯痛発現の際に鎮痛・鎮静効果の高い薬剤が応用されるが、歯髄に存在する細胞に対してその薬剤がどのような機序で作用し効果を発揮するのかについては不明で、未知の部分が多いまま臨床応用されているのが現状である。

近年、象牙芽細胞が感覚受容細胞であることが明らかになり、侵害受容分子センサーとして TRP チャンネルが知られている。TRPV1 チャンネルはカプサイシンの受容体タンパク質であるが、歯内療法薬として用いられるフェノール系薬剤はカプサイシンと構造が類似した化合物であることからフェノール系薬剤が象牙芽細胞の TRP チャンネルに作用し鎮痛効果を発揮している可能性がある。そこで、フェノール系薬剤の1つであるグアヤコールを象牙芽細胞に投与し、感覚伝達の重要な指標の1つである細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変化を検討したところ、グアヤコールは TRPV1、TRPV2 および TRPV4 チャンネルではなく TRPV3 チャンネルに作用し、細胞外から Ca^{2+} を流入させる作用があることが明らかになった。

2. 研究の目的

歯髄に対するグアヤコールの鎮痛効果について、細胞レベルでの作用点あるいは作用機序を解明するために、象牙芽細胞や三叉神経節ニューロンに刺激を加えた際に生じる $[Ca^{2+}]_i$ 変化に対するグアヤコールの影響を検証する。

3. 研究の方法

(1) 研究資料

継代培養されたマウス由来の象牙芽細胞系細胞 (odontoblast lineage cells: OLCs) および新生仔ウィスターラット (7 日齢) より急性単離して得られた三叉神経節ニューロン (trigeminal ganglion neurons: TG) を酵素処理で細胞単離し、それぞれ培養液中で 2 日間培養した。

(2) 試薬の調製

グアヤコールはエタノールで 9 mM に希釈したものをストック溶液とし、それを標準細胞外液で 0.009~9 μ M に希釈して実験に使用した。TRPV3 チャンネルアンタゴニストは 100 μ M 2, 2-diphenyltetrahydrofuran (DPTHF) を用いた。

(3) 細胞に対する刺激

OLCs に対しては灌流によって浸透圧刺激を加えた。その際、標準細胞外液の NaCl をマンニトールで置換した等浸透圧溶液 (335 mOsm/L) と、グアヤコール添加あるいは非添加の低浸透圧溶液 (200 mOsm/L) を使用した。TG に対しては 10 nM ブラジキニンによる刺激または直接機械刺激を加えた。ブラジキニンはグアヤコール添加あるいは非添加の溶液

を調製し、灌流によって細胞を刺激した。機械刺激は TG 細胞を播種した 35 mm Dish の中に細胞外液のみあるいはグアヤコールを添加したものを用意し、直径 2~3 μ m のガラス製マイクロピペットを取り付けたマニピュレータで 30 秒間刺激した (図 1)。

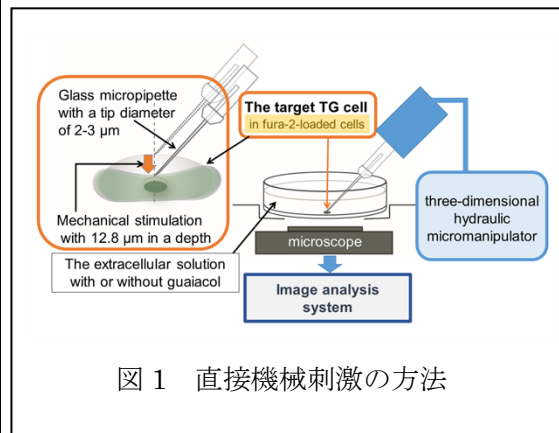


図1 直接機械刺激の方法

(4) $[Ca^{2+}]_i$ の測定

細胞に刺激を加えた際の $[Ca^{2+}]_i$ に対するグアヤコールの作用を検討するため、カルシウムイメージング法を用いた。OLCs あるいは TG に細胞内 Ca^{2+} 指示薬 (Fura-2) を負荷し、 $[Ca^{2+}]_i$ を 2 波長励起における蛍光強度比で記録した。

4. 研究成果

(1) OLCs に対するグアヤコールの作用

①細胞外 Ca^{2+} 存在下において 200 mOsm/L の低浸透圧溶液を投与すると $[Ca^{2+}]_i$ が増加した。この低浸透圧刺激誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加は連続投与 4 回目まで変化せず、脱感作しないことが示された。

②細胞外 Ca^{2+} 存在下において 200 mOsm/L の低浸透圧溶液と 0.9 μ M グアヤコールを同時投与すると $[Ca^{2+}]_i$ が増加した。この増加は低浸透圧溶液単独投与時に発現する $[Ca^{2+}]_i$ 増加と有意差がなかった。

③細胞外 Ca^{2+} 存在下において 200 mOsm/L の低浸透圧溶液と DPTHF を同時投与すると $[Ca^{2+}]_i$ が増加した。この増加は低浸透圧溶液単独投与時に発現する $[Ca^{2+}]_i$ 増加と有意差がなかった。

④従って、感覚受容細胞である象牙芽細胞の膜伸展を引き起こす低浸透圧刺激に対して TRPV3 チャンネルは作用せず、またグアヤコールが低浸透圧刺激誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加を抑制しないことから、グアヤコールの象牙質痛に対する鎮痛効果は低いと考えられた。

(2) TG に対するグアヤコールの作用

①細胞外 Ca^{2+} 存在下で TG に 10 nM ブラジキニンを投与すると $[Ca^{2+}]_i$ が増加した。その後、0.9 μ M グアヤコールをブラジキニンと同時投与すると、この $[Ca^{2+}]_i$ 増加は有意に減少した。再びブラジキニンを単独投与すると $[Ca^{2+}]_i$ が増加した。従ってグアヤコールには、

TG におけるブラジキニン誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加を抑制する作用があることが示唆された(図2)。

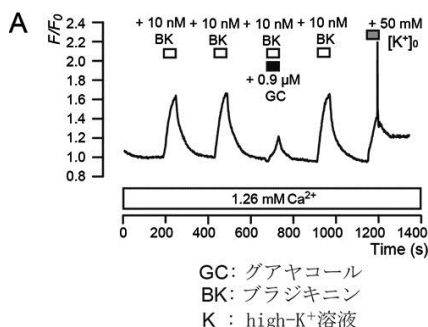


図2 TGニューロンにおけるグアヤコールのブラジキニン誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加の抑制

②細胞外 Ca^{2+} 存在下でTGに30秒間の機械刺激を加えると $[Ca^{2+}]_i$ が増加した。0.009 μ Mグアヤコールを添加した細胞外液中のTGに直接機械刺激を加えても機械刺激誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加は抑制されなかった。しかし、0.9 μ Mグアヤコール添加の細胞外液中のTGを直接機械刺激すると機械刺激誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加は有意に抑制された。グアヤコールによる機械刺激誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加抑制には濃度依存性があった(図3)。

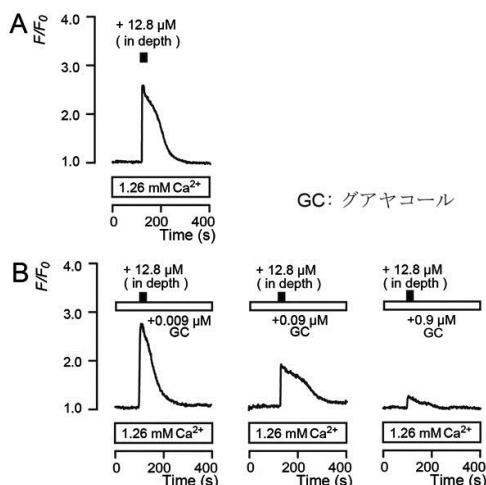


図3 TGニューロンにおけるグアヤコールの機械刺激誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加の抑制

A: コントロール B: 0.009, 0.09, 0.9 μ Mグアヤコールの投与

③TGニューロンにおいてブラジキニンや直接機械刺激によって誘発される $[Ca^{2+}]_i$ 増加はグアヤコールによって有意に抑制されたことから、グアヤコールは象牙芽細胞でなく

歯髄分布ニューロンに作用することで優れた鎮痛効果を発揮する薬剤であることが示唆された。

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10件)

- ① Kojima Y, Kimura M, Higashikawa A, Kono K, Ando M, Tazaki M, Shibukawa Y, Potassium currents activated by depolarization in odontoblasts. *Frontiers in Physiology*, 8:Article 1078, 2017. 査読有
DOI: 10.3389/fphys.2017.01078
- ② Shiozaki Y, Sato M, Kimura M, Sato T, Tazaki M, Shibukawa Y, Ionotropic P2X ATP Receptor Channels Mediate Purinergic Signaling in Mouse Odontoblasts. *Frontiers in Physiology*, 8: Article 3, 2017. 査読有
DOI: 10.3389/fphys.2017.00003.
- ③ Nishiyama A, Sato M, Kimura M, Katakura A, Tazaki M, Shibukawa Y, Intercellular signal communication among odontoblasts and trigeminal ganglion neurons via glutamate. *Cell Calcium*, 60(5):341-355, 2016, 査読有
DOI: 10.1016/j.ceca.2016.07.003
- ④ Kimura M, Sase T, Higashikawa A, Sato M, Sato T, Tazaki M, Shibukawa Y, High pH-Sensitive TRPA1 Activation in Odontoblasts Regulates Mineralization. *Journal of Dental Research*, 95(9):1057-1064, 2016, 査読有
DOI: 10.1177/0022034516644702
- ⑤ Sato M, Furuya T, Kimura M, Kojima Y, Tazaki M, Sato T, Shibukawa Y, Intercellular Odontoblast Communication via ATP Mediated by Pannexin-1 Channel and Phospholipase C-coupled Receptor Activation. *Frontiers in Physiology*, 6: Article 326, 2015. 査読有
DOI: 10.3389/fphys.2015.00326.
- ⑥ Kawaguchi A, Sato M, Kimura M, Ichinohe T, Tazaki M, Shibukawa Y, Expression and function of purinergic P2Y12 receptors in rat trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience Research*, 98:17-27, 2015, 査読有
DOI: 10.1016/j.neures.2015.04.008.
- ⑦ Higashikawa A, Kojima Y, Sato M, Kimura M, Ogura K, Mochizuki H, Sase T, Shinya A, Kobune K, Furuya T, Sato T, Shibukawa Y, Tazaki M, Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily Vanilloid Member

3 is not Involved in Plasma Membrane Stretch-induced Intracellular Calcium Signaling in Merkel Cells. *Bulletin of Tokyo Dental College*, 56(4):259-262, 2015, 査読有

DOI: 10.2209/tdcpublish.56.259.

- ⑧ Kawaguchi A, Sato M, Kimura M, Yamazaki T, Yamamoto H, Tazaki M, Ichinohe T, Shibukawa Y. Functional expression of bradykinin B1 and B2 receptors in neonatal rat trigeminal ganglion neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9:229, 2015, 査読有
DOI: 10.3389/fncel.2015.00229.
- ⑨ Kojima Y, Higashikawa A, Kimura M, Sato M, Mochizuki H, Ogura K, Sase T, Shinya A, Kobune K, Furuya T, Sato T, Shibukawa Y, Tazaki M, Depolarization-induced Intracellular Free Calcium Concentration Increases Show No Desensitizing Effect in Rat Odontoblasts. *Bulletin of Tokyo Dental College*, 56(2):131-134, 2015, 査読有
DOI: 10.2209/tdcpublish.56.131.
- ⑩ Shibukawa Y, Sato M, Kimura M, Sobhan U, Shimada M, Nishiyama A, Kawaguchi A, Soya M, Kuroda H, Katakura A, Ichinohe T, and Tazaki M, Odontoblasts as sensory receptors: transient receptor potential channels, pannexin-1, and ionotropic ATP receptors mediate intercellular odontoblast-neuron signal transduction. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 467(4):843-863, 2015, 査読有
DOI: 10.1007/s00424-014-1551-x

[学会発表] (計 22 件)

- ① 木村麻記(隼田みゆき、澁川義幸、他 12 名), Odontoblasts express plasma membrane Ca^{2+} -ATPase 1 and 4, 第 95 回日本生理学会大会, 2018
- ② 隼田みゆき (木村麻記、佐藤正樹、澁川義幸、他 3 名), 三叉神経節ニューロンに対するグアヤコールの鎮痛作用、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017
- ③ 木村麻記 (隼田みゆき、澁川義幸、他 6 名), 象牙芽細胞における高 pH 感受性 store-operated Ca^{2+} entry (SOCE)、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017
- ④ 木村麻記(佐藤正樹、隼田みゆき、澁川義幸、他 10 名), Alkali- and ADP-sensitive store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) mediated by Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels in rat odontoblasts, 第 94 回日本生理学会大会, 2017
- ⑤ 木村麻記 (佐藤正樹、隼田みゆき、澁川義幸、他 11 名), 象牙芽細胞に発現する

TRPA1 チャネルはアルカリ感受性を示し石灰化を促進する, 第 10 回三叉神経領域の感覚-統合機能研究会, 2016

- ⑥ 隼田みゆき (木村麻記、佐藤正樹、澁川義幸、他 3 名), Guaiacol は三叉神経節ニューロンに作用し鎮痛効果を発揮する, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016
- ⑦ 木村麻記(佐藤正樹、隼田みゆき、澁川義幸、他 6 名), 象牙芽細胞におけるアルカリ感受性 store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016
- ⑧ 佐藤正樹(木村麻記、隼田みゆき、澁川義幸、他 6 名), ラット TG ニューロンにおける象牙芽細胞機械刺激誘発性活動電位記録, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016
- ⑨ Shibukawa Y (Sato M, Kimura M, Shimada M, 他 10 名). Odontoblasts as sensory receptors: Transient receptor potential channels, pannexin-1 and ionotropic ATP receptors, mediate intracellular odontoblast-trigeminal ganglion neuron signal transduction. International Association of Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016
- ⑩ Sato M (Kimura M, Shimada M, Shibukawa Y, 他 9 名), ATP released from odontoblasts by mechanosensitive TRP and piezo channel activations generates P2X3-mediated action potentials in trigeminal ganglion neurons. International Association of Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016
- ⑪ Kimura M (Sato M, Shimada M, Shibukawa Y, 他 9 名), Store-operated Ca^{2+} entry in rat odontoblasts. International Association of Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016
- ⑫ Kimura M (Sato M, Shimada M, Shibukawa Y, 他 9 名), High pH-sensitive TRPA1 channel activation acts as a key Ca^{2+} signaling that regulates dentin mineralization by odontoblasts. International Association of Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016
- ⑬ Kimura M (Shibukawa Y, Sato M, Shimada M, 他 6 名), High pH-sensitive TRPA1 channel activation in odontoblasts regulates dentin mineralization and calcification. 12th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, 2016

- ⑭ 木村麻記(佐藤正樹、隴田みゆき、澁川義幸、他 10 名), Expression of store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) mediated by Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels in rat odontoblasts, 第 93 回日本生理学会大会, 2016
- ⑮ 佐藤正樹(木村麻記、隴田みゆき、澁川義幸、他 7 名), Evoked inward currents in trigeminal ganglion neurons caused by intracellular transmitters, ATP, released from mechanically stimulated odontoblasts, 第 93 回日本生理学会大会, 2016
- ⑯ 佐藤正樹(木村麻記、隴田みゆき、澁川義幸、他 9 名), 三叉神経節ニューロンの象牙芽細胞機械刺激誘発性内向き電流の解析, 第 300 回東京歯科大学学会, 2015
- ⑰ 木村麻記(佐藤正樹、隴田みゆき、澁川義幸、他 5 名), 象牙芽細胞における store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CARC) channels) の発現, 第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 2015
- ⑱ 佐藤正樹(木村麻記、隴田みゆき、澁川義幸、他 5 名), 象牙芽細胞機械刺激で誘発される三叉神経節ニューロン内向き電流: 象牙芽細胞-ニューロン共培養による odontoblast hydrodynamic receptor theory の電気生理学的解析, 第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 2015
- ⑲ 木村麻記(佐藤正樹、隴田みゆき、澁川義幸、他 8 名), Ca^{2+} signaling activated by alkaline environment in rat odontoblasts, 象牙芽細胞におけるアルカリ活性化 Ca^{2+} シグナリング, 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回日本生理学会大会合同大会, 2015
- ⑳ 隴田みゆき(木村麻記、佐藤正樹、澁川義幸、他 2 名), Guaiacol activates TRPV3 channels in mouse odontoblast-lineage cells, グアヤコールは象牙芽細胞の TRPV3 チャネルを活性化する, 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回日本生理学会大会合同大会, 2015
- ㉑ 隴田みゆき(木村麻記、佐藤正樹、澁川義幸、他 1 名), グアヤコールの前投与は象牙芽細胞における低浸透圧刺激誘発性 Ca^{2+} 流入を抑制する, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 2014
- ㉒ 木村麻記(佐藤正樹、隴田みゆき、澁川義幸、他 5 名), 象牙芽細胞のアルカリ感受性象牙質形成機構の解明, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

隴田 みゆき (Shimada Miyuki)
東京歯科大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号: 60297348

(2) 研究分担者

澁川 義幸 (Shibukawa Yoshiyuki)
東京歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 30276969

佐藤 正樹 (Sato Masaki)
東京歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 80598855

木村 麻記 (Kimura Maki)
東京歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 90582346