

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861559

研究課題名(和文)象牙芽細胞の膜伸展感受性イオンチャンネル-ASICsとTRPチャンネルの機能連関

研究課題名(英文)Function of membrane stretch-sensitive ion channels, ASICs and TRP channel of odontoblast.

研究代表者

佐藤 正樹 (Sato, Masaki)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80598855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：歯を作る象牙芽細胞は知覚過敏に代表される鋭利痛を発生する感覚受容細胞として働いていることが明らかになってきた。虫歯や歯肉炎によって象牙質が露出すると、象牙質に無数に開いた象牙細管が口腔内に露出する。この細管内に虫歯菌が侵入し、酸で歯を溶かすと虫歯になり痛みが発生する。しかしなぜ酸が歯痛を誘発するかは不明であった。そこで培養象牙芽細胞への酸刺激は細胞内のカルシウム濃度の増加を誘発した。象牙質表面への酸刺激は、象牙芽細胞の酸感受性受容体(TRPV1, ENaC, GPR4)で感知され、カルシウム濃度依存的なカルシウム輸送が生じる結果、反応性象牙質形成が促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Odontoblast, making teeth has been found to act as sensory cells for generating a fast pain such as hyperalgesia. Dentin is exposed by tooth decay and gingivitis. Then dentinal tubules of the dentin surface are opened in the oral cavity. Bacteria found in tooth cavities to enter into the dentinal tubules, and then pain is generated by caries bacteria to make the acid. On the other hand, the cause the acid to induce toothache was unknown. Acidic stimulation to cultured odontoblasts increased intracellular calcium concentration. We suggested that acidic stimulation of the dentine surface was sensed by the acid-sensitive receptor, TRPV1, ENaC and GPR4, of odontoblasts, and calcium concentration-dependent calcium transport are generated, and promoted reactive dentin formation.

研究分野：口腔生理学

キーワード：象牙芽細胞 細胞外水素イオン TRPチャンネル 上皮性Na⁺チャンネル 酸感受性Gタンパク共役型受容体

1. 研究開始当初の背景

歯痛は一次痛(鋭利痛)を呈する象牙質痛と二次痛(鈍痛)を呈する歯髄痛の二種類に大別される。我々は先行研究において象牙質形成細胞である象牙芽細胞が一次痛に關与する感覚受容細胞ではないかと考え、象牙芽細胞感覚受容細胞説を提唱し、これを明らかにするために様々な研究を行ってきた。象牙芽細胞は象牙質に加わる様々な侵害刺激(温度、pH、メカニカルストレス等)を受容する transient receptor potential (TRP) チャンネルが機能発現することが明らかにされてきた。しかしそれらの TRP チャンネルがどのような刺激を受容し、象牙質痛を誘発するかは不明なままであった。そこで我々は象牙質痛の原因としてもっとも重要であると考えられる「虫歯」の痛みに着目した。

2. 研究の目的

象牙質には、象牙質表面と歯髄の液性連絡である象牙細管構造が存在する。エナメル質欠損により露出した象牙質への様々な刺激は、象牙細管内液の移動を誘発し、痛みを発生させる。また、象牙細管内液移動は、象牙質-歯髄境界面に存在する象牙芽細胞に対する機械刺激となる。象牙芽細胞は、機械刺激を細胞膜タンパク質(機械感受性イオンチャンネル)で受容し、生体防御反応としての第三象牙質を形成する。象牙質齲蝕により象牙細管が口腔内に露出すると、齲蝕原因菌が象牙細管内に侵入し付着・定着する。定着した齲蝕原因菌が産生した酸は象牙質を脱灰する一方で、産生された酸が、象牙細管内液を濃度勾配に従って拡散することで象牙芽細胞に作用する(酸刺激)と考えられている。近年、象牙芽細胞に細胞外の酸(細胞外 H⁺)を感知・受容する細胞膜タンパク質である transient receptor potential (TRP) チャンネルスーパーファミリーや acid sensing ion channels (ASICs) の存在が明らかになっている。しかし、これらの細胞膜タンパク質活性に対する細胞外 H⁺ 濃度依存性については不明のまま残されており、象牙芽細胞がどのように細胞外 H⁺ を受容し、その細胞機能を駆動しているかについては明らかではない。そこで本研究では、象牙芽細胞の細胞外 H⁺ 受容細胞膜タンパク質に着目し、象牙芽細胞機能を駆動す

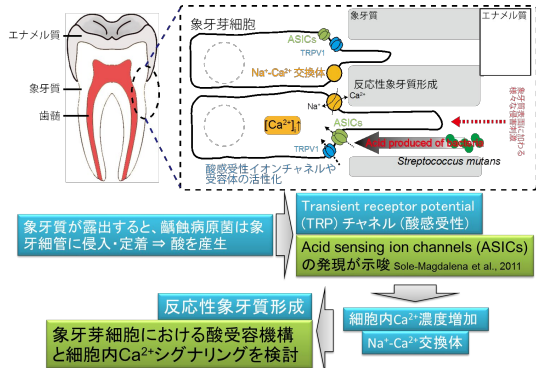


図1 研究の目的

る酸感受性細胞内 Ca²⁺シグナル伝達を明らか

にすることを目的とした(図1)

3. 研究の方法

実験にはマウス由来の象牙芽細胞系細胞 (odontoblast lineage cells, OLC) を用いた。標準細胞外液 (standard extracellular solution, ECS) にはクレーブス液を用いた(組成: 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, and 12 mM NaHCO₃ (pH 7.4))。細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 変化を Ca²⁺蛍光指示薬である fura-2 を用いて記録し、薬理的・化学的刺激に対する OLC の細胞内 Ca²⁺シグナルを計測した。[Ca²⁺]_i 計測のために、10 μM fura-2/AM と 50% pluronic acid F-127 を含む ECS を OLC に 60 分間負荷し、細胞内に fura-2 を取り込ませた。OLC は ECS で洗浄後、複数の単一細胞から [Ca²⁺]_i 変化を蛍光画像として取得し (Ca²⁺イメージング) 記録した(図2)。

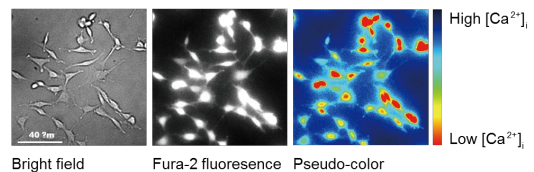


図2 Ca²⁺イメージング

[Ca²⁺]_i は、340 nm と 380 nm の励起光(2 波長励起)によって発生する 510 nm の fura-2 蛍光比で計測した。pH 7.0 - 4.0 の酸刺激溶液は、ECS から 12 mM NaHCO₃ を除去し、0.1 M HCl を加えることで調整した。また whole-cell patch clamp 法を用いて酸刺激に伴う細胞膜電流の変化を計測した。また現在知られている酸感受性膜タンパク質の象牙芽細胞における発現を検討するためにリアルタイム RT-PCR 法を用いて mRNA の検索を行った。

4. 研究成果

細胞外 Ca²⁺存在下(2.5 mM)あるいは「非」存在下(0 mM)で、OLC に細胞外 H⁺ 刺激(pH 7.0 - 4.0)を行うと、[Ca²⁺]_i は一過性に増加した。これらの一過性 [Ca²⁺]_i 増加は、細胞外 H⁺ 濃度(pH)に依存性を示した(半数効果 pH (Eph₅₀): pH 5.5)(n = 18)が、pH 7.0 - 6.0 の範囲における細胞外 H⁺ 刺激誘発性 [Ca²⁺]_i 増加の振幅は、細胞外 Ca²⁺濃度の影響を受けなかった。しかし、pH 5.5 以下(pH 5.5、5.0 および 4.0) の刺激による細胞外 H⁺ 刺激誘発性 [Ca²⁺]_i 増加は、細胞外 Ca²⁺存在下(2.5 mM)と比較して、細胞外 Ca²⁺「非」存在下(0 mM)で有意に増加した(P < 0.05, n = 5、図3)。

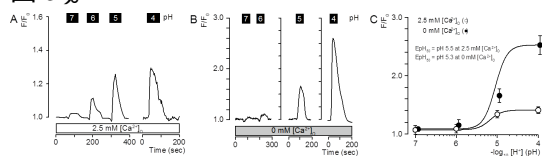


図3 象牙芽細胞の細胞外低 pH 依存性カルシウム応答

細胞外 Ca^{2+} 非存在下非存在下で、細胞内小胞体（細胞内 Ca^{2+} 貯蔵体； Ca^{2+} ストア）の Ca^{2+} 再取り込みポンプである sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase（SERCA）の阻害剤、cyclopiazonic acid（CPA；1.0 μM 、10.0 μM ）を投与すると、細胞外 H^+ 刺激誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は、濃度依存的に抑制された（ $P < 0.05$ ； $n = 3$ 、図4）。

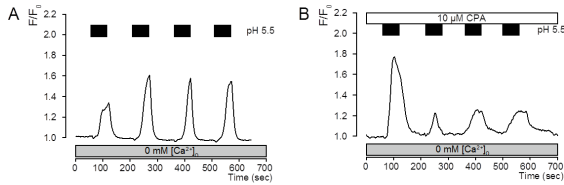


図4 低pH刺激に対するSERCA阻害剤の作用

同様に細胞外 Ca^{2+} 非存在下で、ストアからの Ca^{2+} 放出チャネルであるリアノジン受容体チャネルの阻害剤、dantrolene（0.1 μM ）を投与すると、細胞外 H^+ 刺激誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は有意に抑制された（ $P < 0.05$ ； $n = 3$ 、図5）。

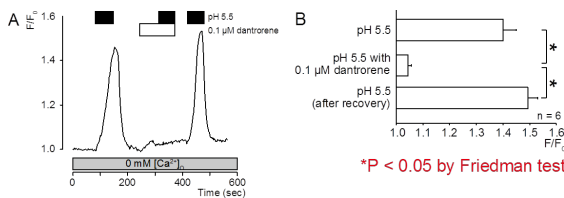


図5 低pH刺激に対するリアノジン受容体阻害剤の作用

加えて、細胞外 Ca^{2+} 非存在下で、上皮性 Na^+ チャネル、T型電位依存性 Ca^{2+} チャネル、ASICsの非選択的阻害剤である amiloride（5.0 μM ）を投与すると、細胞外 H^+ 刺激誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は有意に抑制された（ $n = 3$ 、図6）。

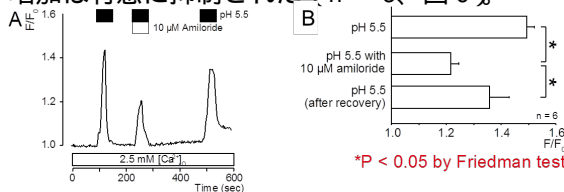


図6 低pH刺激に対するASICs阻害剤の作用

また象牙芽細胞に発現する酸感受性膜タンパク質を検討するために、リアルタイムRT-PCRを用いて、全身性に発現がみられる酸感受性膜タンパク質の検索を行った。aGPCRではGPR4の発現が顕著に多いことが示された（図7）。またwhole-cell patch clamp法を用いてOLCの膜電流記録を行った。OLCの膜電位を固定するvoltage clamp法を用いて細胞外 H^+ 刺激に対する電流応答を-100 mVから100 mVまで継時的変化させる方法で記録した。OLCに生じる膜電流は0 mV付近から細胞外 H^+ 濃度依存的に外向き電流が増加することが示された（図8）。

象牙芽細胞には、酸感受性を示すTRPチャネルやASICsなどのイオンチャネル型受容体が発現する。一方、近年GTP-結合タンパク質

（Gタンパク質）共役型受容体（G-protein

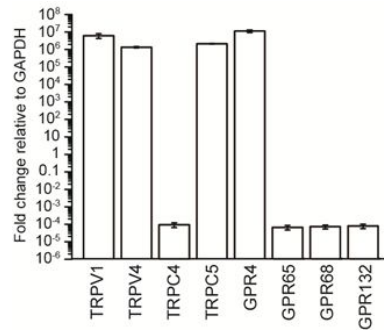


図7 象牙芽細胞に発現する酸感受性膜タンパク質

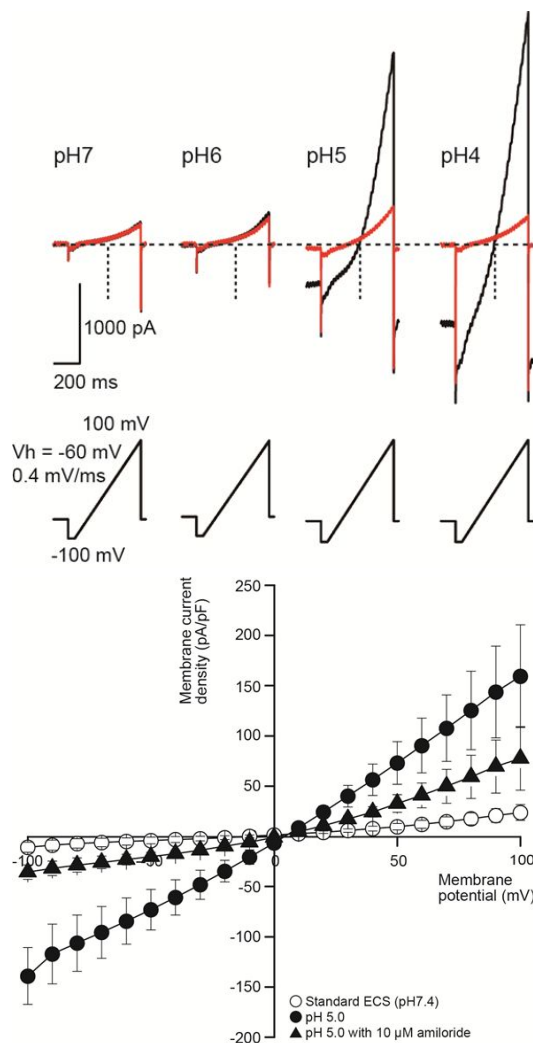


図8 Whole-cell patch clamp法を用いた細胞外 H^+ 刺激に対するOLCの応答

coupled receptors、GPCR）が細胞外 H^+ の感知に関与しているとの報告がある。ランゲルハンス島の細胞には、G-protein coupled “ H^+ -sensing” receptors（酸感受性Gタンパク質共役型受容体）が発現しており、細胞外 H^+ 刺激がGタンパク質を活性化させ、それに引きつづくホスホリパーゼC / cAMPカスケード反応による細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出を誘発する。象牙芽細胞には少なく

とも 5 種類の GPCR (グルタミン酸受容体、P2Y-nucleotide 受容体、ムスカリン作動性アセチルコリン受容体、アドレナリン受容体、ブラジキニン受容体) 発現が報告されているが、これらは H⁺感受性を示さない。一方、我々の結果は、細胞外 Ca²⁺非存在下では、Ca²⁺存在下と比較して強い細胞外 H⁺ 刺激誘発性 [Ca²⁺]_i 増加を示した。加えて細胞外 Ca²⁺濃度にかかわらず、細胞外 H⁺ 刺激誘発性 [Ca²⁺]_i 増加の E_{pH50} は pH 5.5 であった。このことは、硬組織脱灰のクリティカル pH 以下の細胞外 H⁺ 刺激が、細胞内 Ca²⁺ストアからの Ca²⁺放出を活性化できることを示唆している (細胞外に Ca²⁺が存在しない (0 mM) とき Ca²⁺は細胞内に流入できないので、本実験結果にイオンチャネルあるいはイオンチャネル型受容体を介する細胞内 Ca²⁺流入は関与しない)。加えて、細胞内ストアからのリアノジン感受性 Ca²⁺放出チャネル阻害薬 (dantrolene) と細胞内ストアへの Ca²⁺再取り込み阻害薬 (CPA) が細胞外 H⁺ 刺激誘発性 [Ca²⁺]_i 増加を抑制したことから、象牙芽細胞への細胞外 H⁺ 刺激は細胞内信号を介したリアノジン感受性 Ca²⁺ストアからの Ca²⁺放出を活性化することが示唆された (図 9)。

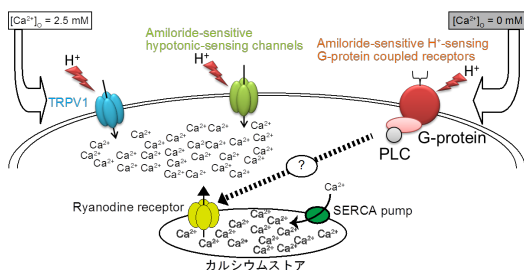


図 9 象牙芽細胞における低 pH 受容機構

以上の結果は、象牙質石灰化前線における細胞外液 Ca²⁺濃度の増減変化 (象牙質石灰化によるイオン化カルシウムの減少と象牙芽細胞による経細胞 Ca²⁺輸送による外液イオン化カルシウム濃度の増加) が、象牙芽細胞の細胞外 H⁺ 誘発性細胞内 Ca²⁺シグナルに対するポジティブ・ネガティブフィードバックループとなる可能性を示唆している。象牙質脱灰を生じる酸 (pH 6.0 以下) は、象牙細管を介して象牙芽細胞の G-protein coupled “H⁺-sensing” receptors (酸感受性 G タンパク質共役型受容体) で感知される事で、細胞外 (石灰化前線) Ca²⁺濃度依存的な細胞内 Ca²⁺動員を制御する結果、歯質脱灰に引き続く病理的な第三象牙質形成が調節され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)

[学会発表] (計 3 件)

1. Sato M, Kurasawa K, Kimura M, Kojima Y, Higashikawa A, Nishiyama A, Shiozaki Y, Satou R, Shimada M, Ogura K, Mochizuki H,

Shibukawa Y and Tazaki M. Extracellular H⁺-Activate Intra- and Trans-Cellular Calcium Signaling in Odontoblast. (Poster) 93th International Association for Dental Research, USA, Massachusetts, Boston (<arch 11-14, 2015)

2. 倉澤馨、佐藤正樹、木村麻記、小島佑貴、東川明日香、小倉一宏、望月浩幸、川口綾、西山明宏、塩崎雄大、佐藤涼一、澁川義幸、田崎雅和 象牙芽細胞における酸感受性膜タンパク質の機能検索 (口頭発表)、第 298 回東京歯科大学学会・総会、2014 年 10 月 18 日、東京都、歯科学報 114(5): 507

3. 倉澤馨、佐藤正樹、木村麻記、小島佑貴、東川明日香、小倉一宏、望月浩幸、澁川義幸、田崎雅和 象牙芽細胞における酸・機械刺激誘発性 Ca²⁺流入は amiloride で抑制される (ポスター発表)、第 56 回歯科基礎医学学会学術大会、2014 年 9 月 25-27 日、福岡市、J Oral Biosci Suppl 2014, 137

[図書] (計 2 件)

1. 澁川義幸、木村麻記、佐藤正樹、小島佑貴、東川明日香、古屋 忠、佐瀬俊之、田崎雅和 「神経を抜く」という表現は正しい? 歯髄はさまざまな細胞群で構成される 日本歯科評論 3月号 (2016)

2. 澁川義幸、田崎雅和、木村麻記、佐藤正樹 口腔の生理から考える臨床 (9) 口腔と歯の痛み-歯科臨床で必要な基礎事項 日本歯科評論 9月号 (2015)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 正樹 (SATO, Masaki)

東京歯科大学・歯学部歯学科・助教

研究者番号: 80598855

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

田崎 雅和 (TAZAKI, Masakazu)

東京歯科大学・歯学部歯学科・教授

研究者番号: 40155065

澁川 義幸 (SHIBUKAWA, Yoshiyuki)

東京歯科大学・歯学部歯学科・准教授

研究者番号: 30276969

木村 麻記 (KIMURA, Maki)

東京歯科大学・歯学部歯学科・助教

研究者番号: 90582346

岡林 堅 (OKABAYASHI, Ken)

日本大学・生物資源科学部獣医学科・講師
研究者番号：20409072

(4)連携協力者

倉澤 馨 (KURASAWA, Kaoru)

東京歯科大学・歯学部歯学科・学部6年

研究者番号：ナシ