

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2022

課題番号：16K11578

研究課題名（和文）メカノセンサー制御による象牙質・歯髄複合体形成機序の解明

研究課題名（英文）Mechanism of dentin-pulp complex formation by mechanosensor control

研究代表者

畠山 純子（Hatakeyama, Junko）

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：50374947

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）：メカノストレスにより活性化するTRPVチャンネルに着目し、象牙芽細胞にTRPV4刺激を与えたときの石灰化の程度を検討した。ラット歯髄由来象牙芽細胞様細胞株、KN-3細胞におけるTRPV4の遺伝子発現とタンパク発現を認めた。TRPV4抑制剤、促進剤添加による細胞増殖に差は認められなかった。アリザリンレッド染色において、促進剤の添加により有意な石灰化の促進とアルカリフォスファターゼ活性の増加を認めた。一方、抑制剤の添加では石灰化の促進は認められず、アルカリフォスファターゼ活性の抑制を認めた。メカノセンサーTRPV4は象牙芽細胞様細胞の硬組織形成に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でTRPV4によるラット歯髄由来象牙芽細胞様細胞株の石灰化が促進された。この成果は、メカノセンサーのアンタゴニストやアゴニストを標的とした象牙質誘導能を有する修復材の創出のための基盤構築を図る一端となる。TRPV4を覆髄材に応用することで、デンティンブリッジの形成や修復象牙質の形成促進を目的として、TRPV4の作動薬あるいは拮抗剤を将来の齲蝕治療の戦略へと加えることが示唆される。メカノセンサーのアンタゴニストやアゴニストを標的とした象牙質誘導能を有する修復材の創出のための基盤構築を図る。

研究成果の概要（英文）：Focusing on TRPV channels activated by mechanostress, the degree of calcification of dentinoblasts upon TRPV4 stimulation was examined. Gene and protein expression of TRPV4 was observed in KN-3 cells, a dentinoblast-like cell line derived from rat dental pulp, and no difference in cell proliferation was observed by addition of TRPV4 inhibitor or promoter. Alizarin red staining showed significant enhancement of calcification and increase in alkaline phosphatase activity with the addition of the promoter. On the other hand, the addition of inhibitors did not promote calcification and suppressed alkaline phosphatase activity. The mechanosensor TRPV4 may be involved in hard tissue formation of dentinoblast-like cells.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：歯内治療学

キーワード：象牙芽細胞様細胞 機械刺激センサー TRPV4

1. 研究開始当初の背景

歯は咀嚼によりメカノストレスが加わると、象牙芽細胞および歯髄の細胞がそれに対応し、象牙質の形成を行っていると考えられる。生体の多くの組織が、メカノストレスを感知し応答していると考えられており、このメカノストレス感受性は接触、痛み、聴覚喪失、高血圧などの多くの生物学的過程や疾患にダイナミックに関わっている。近年、Piezo ファミリー、TRP ファミリーが長年探されてきたメカノストレスによって活性化されるイオンチャネルであることが明らかとなったが、その詳細なメカニズムについては不明な点が多かった。

本研究で着目した TRPV4 チャネルは 25–35 °C の温度感受性を有し、浸透圧やメカノストレス、アラキドン酸代謝物などによっても活性化することが知られていた。申請者らは口腔粘膜上皮に TRPV4 が発現すること、さらに選択的な作用薬により活性化されることを見出し、機能的なチャネルであることを発表した(Wang et al., J Dent Res 2010、木附智子、畠山純子 他、日本歯科基礎医学会学術大会抄録集 2015 年、新潟)。一方 Piezo チャネルは、動物から植物、原生動物の間で保存されている大型の膜貫通タンパク質であり、機械力によって活性化されるイオンチャネルである。申請者らは口腔粘膜、特にメカノストレスを強く受容する解剖学的位置にある付着上皮に Piezo 蛋白の強い発現を認めることを報告してきた(畠山純子 他、日本歯科基礎医学会学術大会抄録集 2014 年、福岡)。

2. 研究の目的

歯にメカノストレスやう蝕などの侵襲が加わると修復象牙質が形成される。修復象牙質形成には、象牙質と象牙細管の間にカルシウムが送り込まれる必要があるが、そのメカニズムの一つとして象牙芽細胞の細胞膜にナトリウム・カルシウム交換体の存在が示された。また象牙芽細胞にメカノセンサーである TRPV4 チャネルが存在し、機能的な働きをしていることが報告された (Shibukawa et al., 2015 PflugerArch, Sato et al., 2013 J Endod)。しかしこれらの研究からは、メカノストレス受容による TRPV4 チャネルの活性化により象牙質にカルシウムの排出がなされ、反応性象牙質形成が起こることが予想されるが、メカノストレス受容による象牙質の基質分泌や硬組織形成についての知見は、未だなされていないのが現状である。

そこで、本研究では TRPV4 や Piezo などのメカノセンサーが歯髄細胞の骨芽細胞への分化促進および象牙質マトリックスの産生の結果、硬組織である象牙質形成を促進するという仮説を詳細に検証することとした。

3. 研究の方法

- 1) 歯胚および象牙質・歯髄複合体におけるメカノセンサーの発現解析を行う。局在を免疫組織学的染色および in situ Hybridization により、発現量を定量的 PCR 法により解析した。
- 2) 象牙芽細胞様細胞に、TRPV4 の活性化剤または抑制剤を添加したときの石灰化の程度を検討した。

材料

- ・細胞 KN-3 細胞 (Rat 歯髄由来象牙芽細胞様細胞
九州歯科大学 北村知昭教授より供与。継代 3~4 代目を使用)
- ・TRPV4 抑制剤 : RN1734 (Wako Pure Chemical industries, Osaka, Japan)
- ・TRPV4 促進剤 : 4 - PDD (Tocris, Bristol, UK)

実験方法

- ・細胞培養方法
MEM (Invitrogen Life Technology, Carlsbad, CA)
+ 10% FBS + 100 μ g/mL of streptomycin, 100 U/mL of penicillin
- ・細胞増殖試験 Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて計測した。
- ・アリザリンレッド染色: 石灰化誘導培地にて 28 日間培養 (2 日ごとに培地を交換) 後染色し、5% ギ

酸にて溶解し、450nm の吸光度計にて測定。 Ascorbic Acid (Wako Pure Chemical industries) 50 μg/ml + B-glycerophosphate (Sigma-Aldrich) 10 mmol/l

・ALP 活性: 1 週間培養 (2 日ごとに培地を交換)。ラボアッセイ TM ALP kit (Wako)を用いて計測した。

・免疫組織化学的染色:C57 BL/6N mice (8w 齢)を灌流固定後、頭蓋を摘出した。EDTA (10%) にて4W 脱灰したのち、凍結切片 (10 μm) を作成した。TRPV4,を発現する細胞を VECTA STAIN Elite ABC Standard Kit(Vector lab) 免疫組織化学法を用いて同定した。ヘマトキシリンにて核染色を行った。DAB 染色、Ab: TRPV4 (Abcam- ab39260)、2nd Ab: Rabbit, nuclear: hematoxylin

・統計処理 One-ways ANOVA and Tukey post-hoc test (p < 0.05, p < 0.01)

・蛍光免疫染色 培養後サブコンフルエントの状態の KN-3 細胞を、VectaFluor Excel Amplified Fluorescent Staining Kit (Vector lab) 免疫組織化学法を用いて、TRPV4 の発現を同定した。

・定量的 PCR

培養後サブコンフルエントの状態 で TRIZOL (Life Technologies)を用いて、RNA を抽出した。Revatrace (Toyobo)を用いて逆転写を行い、SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Life Technologies) を用いて定量的 PCR を行った。

- PCR の条件 -

50°C for 2 min

95°C for 10 min

95°C for 15 sec (Denature)

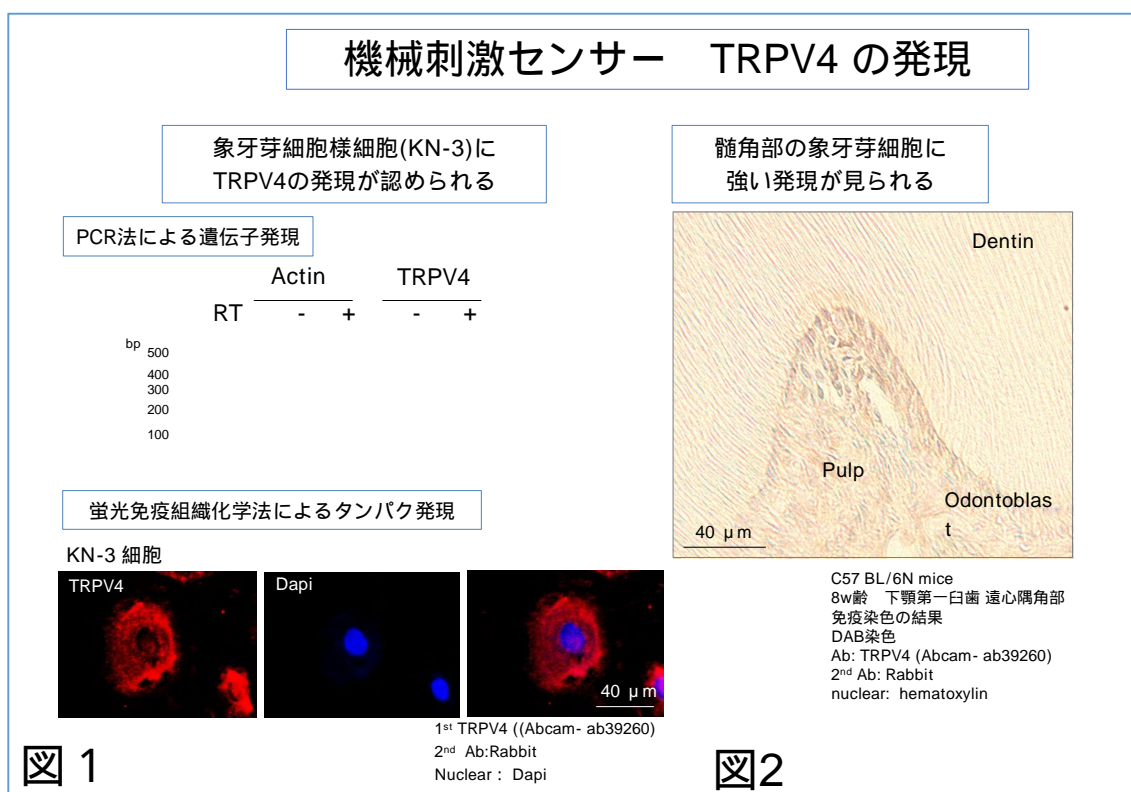
60°C for 1 min (Annealing) 40 cycles

4. 研究成果

1) 機械刺激センサー TRPV4 の発現 (図1,図2)

象牙芽細胞様細胞 KN-3 細胞は RT-PCR にて TRPV4 の発現が認められた。蛍光免疫組織化学法にて細胞に TRPV4 の発現が認められた。(図1)

C57 BL/6N マウス (8w 齢) 下顎第一臼歯 遠心隅角部には、歯髄に比較して強い TRPV4 の発現が認められた。(図2)



2) TRPV4 は象牙芽細胞の増殖に関与しない。(図 3)

次に、TRPV4 の抑制剤と促進剤とこれらの溶媒である DMSO が KN-3 の細胞増殖に関与するのかの確認を行った。KN-3 細胞の継代 3~4 代目の細胞を用い、TRPV4 抑制剤である RN1734、TRPV4 促進剤である PDD で培養 0、1、2、3、4 日目で差がなかった。

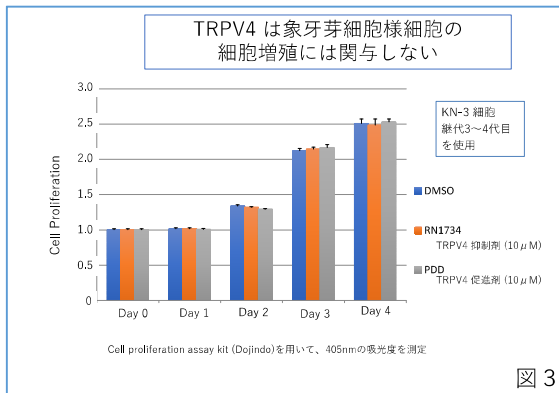


図 3

3) TRPV4 は象牙芽細胞の石灰化を促進する。(図 4)

次に TRPV4 が象牙芽細胞用細胞の石灰化に関与するかどうかを確認するために、カルシウムを赤く染めるアリザリンレッド染色を行なった。石灰化誘導培地に TRPV4 抑制剤を添加すると、アリザリンレッドでの染色は溶媒だけに比較して有意に抑制された。一方、促進剤を添加すると、有意な促進を認めた。

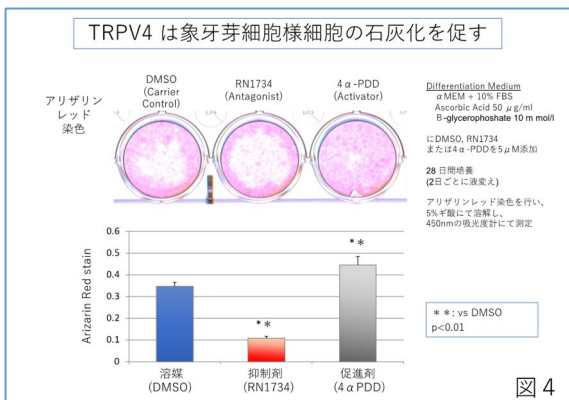


図 4

4) TRPV4 は象牙芽細胞様細胞の ALP 活性を促進する。(図 5)

次に石灰化のマーカーでもある ALP 活性を測定した。抑制剤添加では同濃度の DMSO に対して 5 および 10 μM で有意に抑制された。促進剤の添加では、1 および 5 μM で DMSO に比較して、有意な ALP 活性を認めた。

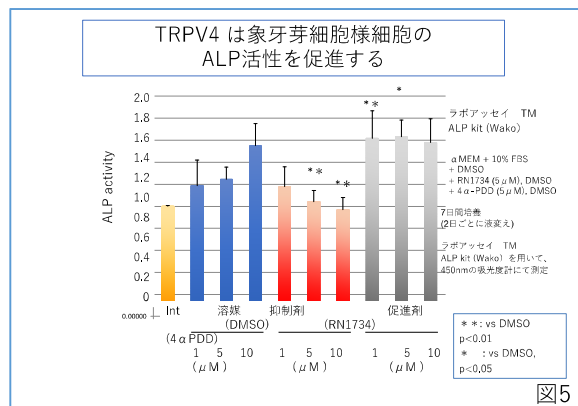
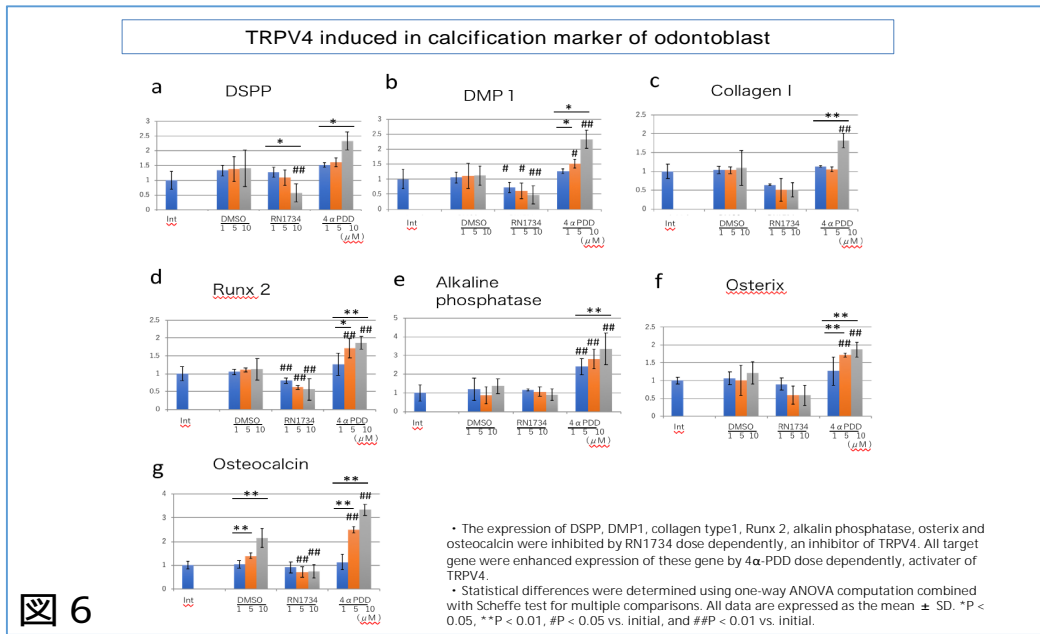


図 5

5. TRPV4 は象牙芽細胞様細胞の石灰化因子遺伝子発現に関与する。

象牙質の石灰化に関与することが知られている因子の発現は、TRPV4 抑制剤により濃度依存的に抑制され、促進剤により発現の上昇が認められた。



以上より、

■ 蛍光免疫染色、PCR 法により、KN-3 細胞は、メカノセンサーチャネル TRPV4 を発現していた。TRPV4 抑制剤、TRPV4 促進剤を添加しても、細胞増殖に差はないことから、TRPV4 は KN-3 細胞の増殖に関与しなかった。

TRPV4 抑制剤、TRPV4 促進剤を添加すると、アリザリンレッド染色および ALP 活性がそれぞれ抑制または促進されることから、TRPV4 が KN-3 細胞の石灰化に関与する可能性が示唆された。

石灰化関連遺伝子の発現は、TRPV4 抑制剤により濃度依存的に抑制され、促進剤により発現の上昇が認められた。

これらのことから、メカノセンサーTRPV4 は象牙芽細胞様細胞の硬組織形成に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 畠山純子1), 米田雅裕2), 廣藤卓雄
2. 発表標題 機械刺激センサーTRPV4を介した象牙芽細胞様細胞の石灰化
3. 学会等名 第12回 日本総合歯科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畠山純子、畠山雄次、鷺尾絢子、諸富孝彦、北村知昭、阿南壽
2. 発表標題 象牙芽細胞様細胞(KN-3)の石灰化における機械刺激センサーTRPV4チャネルの影響
3. 学会等名 第149回 日本歯科保存学会2018年 秋季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Junko HATAKEYAMA, Hisashi ANAN, Yuji HATAKEYAMA, Ayako Washio, Takahiko MOROTOMI, Chiaki KITAMURA
2. 発表標題 The TRPV4 mechanosensor contributes to mineralization in the KN-3 odontoblast-like cell line
3. 学会等名 第11回 世界歯内療法学会(IFEA) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 畠山純子、畠山雄次、松本典祥、水上正彦、松崎英津子、泉 利雄、鷺尾絢子、諸富孝彦、北村知昭、阿南 壽
2. 発表標題 機械刺激センサーTRPV4を介した象牙芽細胞(KN-3)
3. 学会等名 第39回日本歯内療法学会学術会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 畠山純子、畠山雄次、松本典祥、水上正彦、松崎英津子、泉 利雄、鷺尾絢子、諸富孝彦、北村知昭、阿南 壽
2. 発表標題 機械刺激センサーTRPV4を介する象牙芽細胞様細胞(KN-3)における石灰化機構の解明
3. 学会等名 第147回日本歯科保存学会 秋季学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 畠山純子、畠山雄次、松本典祥、水上正彦、松崎英津子、泉 利雄、鷺尾絢子、諸富孝彦、北村知昭、阿南 壽
2. 発表標題 象牙芽細胞様細胞(KN-3)における機械刺激センサーTRPV4を介した石灰化機構の解明
3. 学会等名 第38回 日本歯内療法学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	城戸 瑞穂 (Kido Mizuho) (60253457)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	
研究分担者	阿南 壽 (Anan Hisashi) (80158732)	福岡歯科大学・口腔歯学部・病院顧問 (37114)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------