

機関番号：32650

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成20年度～平成22年度

課題番号：20592187

研究課題名（和文）歯牙発生過程における近遠心頬舌側決定因子：
歯胚 Ca 信号の非対称性分布と制御機構

研究課題名（英文）Factor(s) for mesio-distal/bucco-lingual determination during tooth development: asymmetrical distribution of calcium signals in the tooth germ

研究代表者

澁川義幸 (SHIBUKAWA YOSHIYUKI)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：30276969

研究成果の概要（和文）：

歯牙の前後軸としての近遠心軸に対する頬舌側非対称性形態形成の決定因子を明らかにするために、歯胚を構成する細胞群における細胞内 Ca^{2+} 局在の非対称性を検討した。胎生マウス歯胚近心側細胞は、他の部位と比べ、高い細胞内 Ca^{2+} 濃度を有していた。歯胚を上皮成長因子で刺激すると、近心側細胞において細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過性増加が見られた。従って、歯胚発生過程において transient receptor potential (TRP) P2 (TRPP2) channels を介した細胞内 Ca^{2+} の空間的集積が歯胚細胞群に生じることによって歯牙近心側が決定するであろうことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To clarify the factor(s) in determination of bucco-lingual asymmetry against mesio-distal axis in morphological tooth development, we examined the spatial asymmetrical distribution pattern of intracellular Ca^{2+} concentration in the cells composed the tooth germ. Group of cells located in the mesial side of tooth germ had high intracellular Ca^{2+} concentration, compared with other areas in the tooth germ. Following stimulation of tooth germ with epithelial growth factor, transient increase in the intracellular Ca^{2+} concentration was observed in the group of cells located in the mesial side of tooth germ. The results indicate that, during tooth development, asymmetrical distribution high intracellular Ca^{2+} concentration in the group of cells via transient receptor potential (TRP) P2 (TRPP2) channels determines mesial side of tooth germ.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3120,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1050,000	4550,000

研究分野：生理学・口腔生理学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：歯学・口腔生理学・カルシウムシグナル・歯牙発生・再生医学

1. 研究開始当初の背景

細胞内 Ca イオンは、歯牙硬組織形成細胞を含めた多くの細胞において、代謝、開口分泌、分化、増殖、細胞死等のような本質的な生物過程を修飾する多くの細胞内信号の1つである(Berridge, *J Physiol (Lond)*, 1997; Shibukawa et al., *J Bone Miner Res*, 2003; Shibukawa et al., *J Biol Chem*, 2006)。

一方、発生過程において、体の前後軸に沿った「右」と「左」の決定(左右非対称性(Left-Right Asymmetry))は、各臓器器官の原器における細胞内 Ca イオン濃度の違いによって生じることが近年着目されている(Tanaka et al., *Nature*, 2005)。

歯牙では左右側で対称な形態を有する。しかしながら歯牙における前後軸を、近遠心を結ぶ頬舌的中心線とすれば、歯牙は厳密に近心・遠心・頬側・舌側という非対称性を有する。

2. 研究の目的

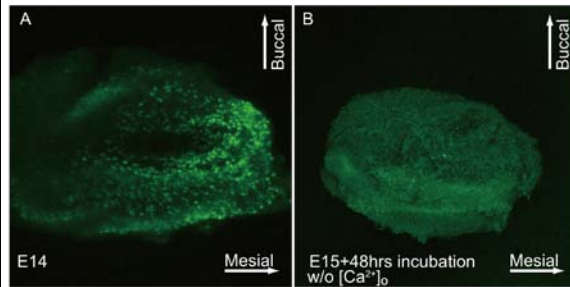
本研究では、歯牙の前後軸としての近遠心軸に対する頬舌側非対称性の決定因子を明らかとするために、各発生段階の歯胚を構成する細胞群の細胞内 Ca イオン局在の非対称性分布の存在を検討した。

3. 研究の方法

胎生 14 日・15 日齢胎生マウスから臼歯歯胚を取り出した。胎生 14 日齢マウス臼歯歯胚は帽状期歯胚、胎生 15 日齢マウス臼歯歯胚は鐘状期歯胚であることが知られている。急性単離された歯胚を測定用チャンバーの底部に近・遠心・頬・舌側が明確となるように固定し、細胞内 Ca²⁺ 指示薬 (OregonGreen488 BAPTA-1/AM) を負荷し、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光強度で細胞内遊離 Ca²⁺ 濃度を記録した。細胞内遊離 Ca²⁺ 濃度は、OregonGreen488 BAPTA-1 の一波長励起蛍光を指標とした。また、単離された歯胚は、細胞外 Ca²⁺ の存在下・非存在下で初代器官培養を行い、同様に細胞内遊離 Ca²⁺ 濃度を記録した。

4. 研究成果

急性単離された帽状期歯胚(胎生 14 日齢マウス臼歯歯胚)細胞の細胞内 Ca²⁺ 濃度は、歯胚遠心側に比べて、近心側の細胞群において高かった(図 A)。しかしながら、鐘状期歯胚(胎生 15 日齢マウス臼歯歯胚)を、細胞外 Ca²⁺ の非存在下で初代器官培養を



48 時間行くと、歯胚近心側細胞群における細胞内 Ca²⁺ 濃度の空間的高分布は、消失した(図 B)。

また、帽状期歯胚を、上皮成長因子で刺激すると、近心側の細胞群において細胞内 Ca²⁺ 濃度の一過性増加が観察された。従って、歯胚近心側細胞群には、上皮成長因子によって活性化される transient receptor potential (TRP) channels P2 (TRPP2) が存在し、TRPP2 を介した細胞内 Ca²⁺ の空間的集積が、歯胚細胞に生じることによって歯牙近心側が決定することが示唆された。

今後、TRPP2 チャンネルの歯胚における空間的局在、その他の細胞内 Ca²⁺ によって誘導されるシグナル伝達系を明らかにしていく予定である。

また、歯牙近遠心軸に対する頬舌側非対称性が獲得された細胞群は、その形態形成に伴い、上皮性のエナメル芽細胞、神経堤由来の象牙芽細胞に各々分化することで、歯牙硬組織としてのエナメル質・象牙質を形成していく。本研究成果においては、これら細胞における硬組織形成機構も明らかにした。

1) エナメル芽細胞・象牙芽細胞共にナトリウム-カルシウム交換機構を発現しており、血清由来の Ca²⁺ を、硬組織石灰化前線に細胞内輸送することで硬組織形成を行う事を明らかにした。

2) 象牙芽細胞に、温度感受性・浸透圧感受性 TRP チャンネルが発現しており、象牙質に加えられた各種外的刺激を象牙芽細胞の TRP チャンネルが受容していることを明らかにした。

加えて、歯牙形成に伴う歯髓分布ニューロンの発生過程を明らかにするため、神経成長因子の受容体である高親和性チロシンキナーゼ受容体 (TrkA) の遺伝的先天性欠失による疾患である先天性無痛無汗症 (CIPA) 患者の感覚中枢制御機構についても検討を行った。本結果に関する論文は準備中であり、近く国際雑誌に投稿する予定である。

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 17 件)

1. Sodium-calcium exchangers in rat ameloblasts., Shibukawa Y, (他 5 名, 2 番目), *J Pharm Sci*, 査読あり, 112: 223-230, 2010.
2. Ca^{2+} channels in odontoblasts., Shibukawa Y (他 5 名, 1 番目), *J Oral Biosci*, 査読あり, in Press, 2010.
3. Dental pain and odontoblasts: facts and hypotheses., Magloire H, Shibukawa Y, (他 5 名, 4 番目), *J Orofac Pain*, 査読あり, in Press, 2010
4. Ca^{2+} Extrusion via Na^+ - Ca^{2+} Exchangers in Rat Odontoblasts., Shibukawa Y, (他 13 名, 15 番目), *J Endodont*, 査読あり, 36: 668-674, 2010.
5. Odontoblast TRP Channels and Thermo/Mechanical Transmission., Son AR, Shibukawa Y, Shin DM (他 3 名, 5 番目), *J Dent Res*, 査読あり, 88: 1014-1019, 2009.
6. Cortical Dysfunction in Patients with Temporomandibular Disorders., Shibukawa Y (他 11 名, 1 番目), *J Oral Biosci*, 査読あり, 51: 65-71, 2009
7. Cortical Mechanism of Oral Sensation in Human., Shibukawa Y, *Int J Oral-Med Sci*, 査読あり, 8: 65-73, 2009
8. Oral Structure Representation in Human Somatosensory Cortex., Tamura Y, Shibukawa Y (他 3 名, 2 番目), *Neuroimage*, 査読あり, 43: 128-135, 2008
9. Ketamine, not fentanyl, suppresses pain-related magnetic fields associated with trigeminally innervated area following CO₂ laser stimulation., Shibukawa Y (他 4 名, 2 番目), *Neurosci Res*, 査読あり, 62: 105-111, 2008.
10. Cortical Representation Area of Human Dental Pulp., Shibukawa Y (他 4 名, 2 番目), *J Dent Res*, 査読あり, 87: 358-62, 2008.
11. 澁川義幸 (他 5 名, 6 番目), 歯の痛みを科学する, 歯髄・象牙質感覚および口腔感覚の脳における感覚情報処理. 日本歯科評論, 70 (11) : 127-135, 2010
11. 澁川義幸 (他 7 名, 1 番目), 歯の痛みを科学する, 象牙質/ 歯髄複合体の侵害受容機構と象牙芽細胞機能. 日本歯科評論, 70(10) : 103-114, 2010
12. 澁川義幸, 歯の痛みを科学する, 歯髄・象

牙質感覚とは何か? 侵害受容感覚 (痛覚) と口腔の機能, 日本歯科評論, 70(6) : 128-136, 2010

13. Muramatsu T (他 6 名, 2 番目), Proliferation, migration and apoptosis of periodontal ligament cells after tooth replantation. *Oral Diseases* 16: 263-268, 2010.
14. Muramatsu T (他 6 名, 4 番目), Expression and function of laminin and integrins on adhesion/migration of primary culture cells derived from rat oral epithelium. *J Perio Res* 45: 284-291, 2010
15. Muramatsu T (他 7 名, 2 番目), Down-regulated genes in mouse dental papillae and pulp. *J Dent Res* 89: 679-683, 2010.
16. Muramatsu T (他 8 名, 3 番目), Effect of stretching stress on gene transcription related to early-phase differentiation in rat periodontal ligament cells. *Bull Tokyo Dent Coll* 51: 129-37, 2010.
17. Muramatsu T (他 5 名, 1 番目), Clinico-Pathologic Conference: Case 4. Langerhans cell histiocytosis (LCH). *Head & Neck Pathology* 4:343-346, 2010

[学会発表] (計 4 2 件)

1. 澁川義幸, 先天性無痛無汗症における感覚認知機構, 第 52 回 歯科基礎医学会 学術大会ならびに総会, 2010 年 9 月 20 日 (月), 東京 (招待講演)
2. 澁川義幸, 食・テクスチャーの神経基盤: 脳における口腔内体性感覚発現, 東京歯科大学 創立 120 周年記念 学術講演会, 2010 年 5 月 9 日 (日), 東京 (招待講演)
3. 澁川義幸, 象牙芽細胞における TRPV1/ Ca^{2+} シグナル第 51 回 歯科基礎医学会 学術大会ならびに総会, 2009 年 9 月 9 日 (水)、新潟市
4. 澁川義幸, K^+ 依存性 Na^+ - Ca^{2+} 交換 (NCKX) における K^+ 結合/輸送制御, 歯牙硬組織形成と Na^+ - Ca^{2+} 交換 (NCX) 輸送, トランスポーターワークショップ IN 福岡関連セミナー, 平成 20 年 11 月 3 日、福岡市 (招待講演)
5. Y Shibukawa, Teeth and Brain Function, From Human Brain Science to Clinical Dentistry Approach, 96th FDI Annual World Dental Congress, Stockholmsmassen, Stockholm, Sweden, September 24-27, 2008 (招待講演)
6. Kim HJ, Inflammatory regulation of voltage-dependent Na^+ channels in dental pulp cells, 57th Annual Meeting, Japanese

Association of Dental Research, Kitakyusyu.

7. 黒田英孝, ラット三叉神経節細胞における ATP 受容体発現の検索, 第 290 回 東京歯科大学学会 (例会)、平成 22 年 10 月 16 日、千葉市

8. 高橋史子, TRPM8 チャネルの発現の検索, 第 290 回 東京歯科大学学会 (例会)、平成 22 年 10 月 16 日、千葉市

9. 田中らいら, 象牙芽細胞様細胞に対する eugenol の生理学的研究, 第 290 回 東京歯科大学学会 (例会)、平成 22 年 10 月 16 日、千葉市

10. H. Ichikawa, Electrophysiological Properties Of AQP6 In Mouse Parotid Acinar Cells, 88th General Session of the International Association for Dental Research, July 15, 2010, Barcelona, Spain.

11. Y. Shibukawa, CIPA Patients Exhibit No Dysfunction In PNS/CNS Encoding Tactile Sensation, 88th General Session of the International Association for Dental Research, July 15, 2010, Barcelona, Spain.

12. M. Tsumura, Receptor/channel Expression Of TRPV1/TRPV2/CB1 But Not CB2 In Rat Odontoblasts, 88th General Session of the International Association for Dental Research, July 15, 2010, Barcelona, Spain.

13. Muramatsu T., Low Glucose Condition Induces AMPKs Expression in Dental Pulp Cells, 88th General Session of the International Association for Dental Research, July 15, 2010, Barcelona, Spain.

14. Tazaki M., Age-related changes in the encapsulated corpuscles in mouse lip mucosa, 88th General Session of the International Association for Dental Research, July 15, 2010, Barcelona, Spain.

15. 黒田英孝, ラット三叉神経節細胞における ATP 受容体発現の検索, 第 9 回 釧路ニューロサイエンスワークショップ, 平成 22 年 7 月 3 日, 釧路市

16. 笠原正貴, 星状神経節ブロックは三叉神経刺激による体性感覚誘発脳電位の潜時に影響を与えるか? 第 9 回 釧路ニューロサイエンスワークショップ, 平成 22 年 7 月 3 日, 釧路市

17. H Ichikawa, Electrophysiological properties of AQP6 in mouse parotid acinar cells, 第 87 回 日本生理学会大会, 平成 22 年 5 月 19-21 日, 盛岡市

18. M Tsumura, TRPV1-mediated Ca²⁺-signaling in rat odontoblasts, 第 87 回 日本生理学会大会, 平成 22 年 5 月 19-21 日, 盛

岡市

19. 津村麻記, 象牙芽細胞の TRPV1 チャネルを介した Ca²⁺シグナル, 第 288 回 東京歯科大学学会 (例会)、平成 21 年 10 月 17 日、千葉市

20. Y. Shibukawa, Patients with congenital insensitivity to pain and anhidrosis exhibit no dysfunction in peripheral/central nervous system encoding tactile sensation, 18th International Congress on Brain Electromagnetic Topography, 2009 年 9 月 29-30 日、京都府

21. 津村麻記, 象牙芽細胞の TRPV1 における Ca²⁺シグナリング, 第 51 回 歯科基礎医学会 学術大会ならびに総会, 2009 年 9 月 9 日 (水)、新潟市

22. 澁川義幸, ヒト一次体性感覚野口腔内領域の同定, 第 51 回 歯科基礎医学会 学術大会ならびに総会, 2009 年 9 月 9 日 (水)、新潟市

23. 市川秀樹, マウス耳下腺腺房細胞の AQP6 の電気生理学による特性, 第 51 回 歯科基礎医学会 学術大会ならびに総会, 2009 年 9 月 9 日 (水)、新潟市

24. Endoh T, Calcitonin gene-related peptide- and adrenomedulin-induced facilitation of calcium current in submandibular ganglion, International Congress of Physiological Sciences, July 27-August 1, 2009

25. Shibukawa Y, Oral structure representation in human somatosensor cortex, International Congress of Physiological Sciences, July 27-August 1, 2009, Kyoto

26. H Ichikawa, Electrophysiological properties of AQP6 in mouse parotid acinar cells, 11th International Symposium on Exocrine Secretion, Tokushima

27. 澁川義幸, TrkA 遺伝子変異疾患である無痛無汗症における中枢性感覚認知, 第 12 回 日本薬物脳波学会・第 8 回 釧路ニューロサイエンスワークショップ, 平成 21 年 7 月 3-4 日、釧路市

28. 金亨俊, ヒト歯髄細胞は時間-電位依存性ナトリウムチャネルを発現している, 第 287 回 東京歯科大学学会 (例会)、平成 21 年 6 月 6 日、千葉市

29. 鹿野哲生, ヒト歯髄細胞における細胞内 Ca²⁺放出とストア依存性 Ca²⁺チャネル, 第 287 回 東京歯科大学学会 (例会)、平成 21 年 6 月 6 日、千葉市

30. 内田悠志, 培養骨芽細胞における活性型ビタミン D のカルシウムシグナルに対する

non-genomic action, 第 287 回 東京歯科大学学会 (例会)、平成 21 年 6 月 6 日、千葉市

31. 市川秀樹, マウス耳下腺腺房細胞での aquaporin6 の発現, 第 287 回 東京歯科大学学会 (例会)、平成 21 年 6 月 6 日、千葉市

32. 澁川義幸, NCKX2 の K⁺-binding に対する EDTA と La³⁺の効果, トランスポーターワークショップ in 福岡、平成 20 年 11 月 3 日、福岡大学 (福岡市)

33. 高橋賢, 咬合が刺激負荷時の重心動揺に与える影響, 第 286 回 東京歯科大学学会 (総会)、平成 20 年 10 月 18 日、千葉市

34. 山本仁, マウス横口蓋ヒダ形成時に一過性に出現する細胞群について, 第 50 回歯科基礎医学会学術大会総会, 平成 20 年 9 月 23-25 日、東京

35. Satoh Y, Effects of acetaldehyde on blood pressure in rats, The Second USA-Japan Joint Workshop on Alcohol-Related Problems, 平成 20 年 9 月 17 日、横浜市

36. A Ueda, Modulation of voltage-dependent Na⁺ currents in atrial myocyte by bupivacaine and ropivacaine, The Second USA-Japan Joint Workshop on Alcohol-Related Problems, The Second USA-Japan Joint Workshop on Alcohol-Related Problems, 平成 20 年 9 月 17 日、横浜市

37. M Kimura, Effects of thiopental on intracellular Ca²⁺ transient and Ca²⁺ currents in single atrial cells from guinea pig, The Second USA-Japan Joint Workshop on Alcohol-Related Problems, Program and Abstract, The Second USA-Japan Joint Workshop on Alcohol-Related Problems, 平成 20 年 9 月 17 日、横浜市

38. 上田彩香, モルモット心房筋単離細胞の Na⁺チャネル電流に及ぼす局所麻酔薬の影響, 第 81 回 日本薬理学会 年会、平成 20 年 3 月 18 日、横浜市

39. Y. Shibukawa, Ca²⁺ Extrusion via Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Subtype 3 in Rat Odontoblasts, 86th General Session of the International Association for Dental Research, July 2-5, 2008, Canada.

40. K. Nakatsuka, Influence of lip sensation on lip-closing force in humans, 86th General Session of the International Association for Dental Research, July 2-5, 2008, Canada.

41. Y. Tamura, Oral Structure Representation in Human Somatosensory Cortex -A magnetencephalographic study,

86th General Session of the International Association for Dental Research, July 2-5, 2008, Canada.

42. 田村洋平, ヒト体性感覚野における口腔粘膜再現領域, 第 25 回 日本脳電磁図トポグラフィ研究会, 平成 20 年 6 月 27-28 日、木更津市

43. 松浦信幸, 脳磁図を用いた先天性無痛無汗症患者の知覚認識機構の解明, 第 25 回 日本脳電磁図トポグラフィ研究会, 平成 20 年 6 月 27-28 日、木更津市

44. 西澤秀哉, ピエゾ駆動触圧覚刺激装置を用いた無痛無汗症患者の知覚認識機構の解明 -脳磁図を用いた検討-, 第 25 回 日本脳電磁図トポグラフィ研究会, 平成 20 年 6 月 27-28 日、木更津市

[図書] (計 2 件)

1. Another view of the brain system. Kumai T, Shibukawa Y. Nova Science, Publishers Inc, Hauppauge, NY, 2009.

2. Ocular Transporters in Ophthalmic Diseases and Drug Delivery, Shibukawa Y (他 6 名, 2 番目), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

澁川義幸 (SHIBUKAWA YOSHIYUKI)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 30276969

(2)研究分担者

村松 敬 (MURAMATSU TAKASHI)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 00276982