

## 様式 C-19

### 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 18 日現在

機関番号：17102  
研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2009～2011  
課題番号：21592334  
研究課題名（和文） 口腔粘膜上皮における新たな温度感覚受容機構の解明  
研究課題名（英文） New Thermal sensory role of Oral epithelia  
研究代表者  
城戸 瑞穂 (KIDO MIZUHO)  
九州大学・歯学研究院・准教授  
研究者番号：60253457

#### 研究成果の概要（和文）：

口腔上皮は口腔を遍く覆い、食物や飲み物からの温度や機械刺激など多様な刺激に曝されている。口腔上皮はそれらの刺激を適切に受容し、刺激物や毒物は排出し、必要なものを取り込む事ができる。口腔への温度刺激は身体他の部位に比べ、高低の幅が広いが、その受容については、明らかとはいえない。私たちは、口腔上皮細胞自体が温度を受容する機構を備え、その刺激に対し、積極的に対応しているとの仮説を立て研究を行った。そして、口腔上皮細胞が温度感受性の TRPV チャネルを発現していることを示した。さらに、チャネル活性により口腔上皮細胞の細胞増殖や細胞間接着が制御されていることが示唆された。

#### 研究成果の概要（英文）：

The oral cavity is covered by oral epithelia. Oral epithelia undergo various stimuli such as temperature or mechanical stimuli. Oral epithelia properly sense those stimuli and then discard toxic or harmful substances and ingest materials necessary for our body. Even though a wider range of temperatures stimulates the oral cavity more than other parts of the body, we do not know the mechanisms of the oral thermal sensory system. We hypothesized that oral epithelia have thermal sensory properties and which then adapt to the oral environment. We found that thermosensitive transient receptor potential (TRP) channels were functionally expressed in oral epithelia. It is suggested that proliferation and epithelial cell-cell contact were regulated via channel activity.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：口腔解剖学  
科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学  
キーワード：口腔感覚、温度受容、TRPV チャネル、

## 1. 研究開始当初の背景

美味しい食事を楽しむことは生物が生きていく基本的な営みである。近年、味覚低下や味覚脱失を主とした口腔における感覚異常を訴え内科や歯科・耳鼻咽喉科を訪れる患者の数は20-30代・60代を中心に増え続けており、口腔咽頭科学会発表によると全国で約24万人である。味覚障害を放置すると、糖尿病や高血圧を引き起こす下地となる、あるいは、すでに糖尿病や高血圧に罹患している人は、味覚障害がさらに病気を悪化させる悪循環を招く。また、うつ状態が味覚障害を引き起こすと言われており、さらに味覚障害があることでうつ状態を悪化させる。このように、味覚障害は単に舌だけの問題ではなく、心身に影響を及ぼす疾患と捉えられるようになってきた。

「味」は、5つの基本味(甘味・苦味・酸味・塩味・うま味)を中心に、特異的な受容体が単離され、研究が進められている。その一方で温かさや冷たさ・歯触りといった、基本味ではくくれない「味」については、不明なままである。私たちは以前より唐辛子の主成分であるカプサイシンの受容体TRPV1(transient receptor potential channel-vanilloid subtype 1)が、口腔粘膜に分布する神経だけでなく、口腔上皮細胞自身にも発現していることを明らかにした。TRPV1はカプサイシンのみならず、42℃以上の熱や酸(プロトン)によっても活性化する

ことがわかっており、口腔内における温度受容への関与も考えられている。このTRPV1が発現している上皮には非常に密な神経支配が認められることから、このTRPV1発現口腔上皮細胞が直接カプサイシン刺激を受容していると仮定し、急性単離の系を確立に成功、単離した上皮細胞がカプサイシンや温度刺激に反応し細胞内カルシウムの上昇が起こることを見出した。よって、口腔上皮細胞が、感覚受容細胞として口腔内の環境変化を受け取り、密に分布している神経へと伝えていると考えている。

さらに、TRPV1とホモロジーの高いTRPチャネルは温度受容のチャネルとして知られており、TRPV3は32℃以上の温刺激、TRPV4は27℃以上の温度刺激で、TRPV2は52℃以上の熱、TRPM8は25℃以下の低温で活性化されることが報告されている。私たちは、口腔粘膜上皮にTRPV2、TRPV3、TRPV4、TRPM8mRNAが発現していることも予備実験で明らかにしている。

## 2. 研究の目的

口腔粘膜上皮を感覚器としてとらえ、唐辛子の主成分で脂溶性刺激物質であるカプサイシンが、口腔内でどのように受容されているか、また口腔上皮細胞にて温度感受性チャネルとして知られているTRPチャネルが刺激をどのように受容しているのか、上皮細胞か

らの伝達物質は何かを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

動物実験については、九州大学動物実験委員会の承認を得て動物福祉を考慮して行った。麻酔した Wistar ラットより口腔粘膜を剥離し、RNA 抽出を行い RT-PCR 法により温度感受性 TRP channel の発現を確認した。

生理学実験にはラットの口腔上皮を dispase 処理により上皮を剥離した。さらに酵素処理を行って、上皮細胞を単離した。その細胞をカバーガラス上に貼り付け、カルシウムイメージングを行った。

一酸化窒素遊離の測定には同様に剥離した口腔上皮を TRP 作用薬で刺激し、DOJINDO の NO 測定キットを用いた。ATP の遊離は Roche の ATP 測定キットを用いた。

顕微鏡観察には、4%パラホルムアルデヒド、0.2%ピクリン酸含有リン酸緩衝液にて灌流固定をおこなったラットから上皮を採取し、TRPV1 特異的抗体およびリン酸化 ERK 特異的抗体を用いて免疫染色を行った。観察は Keyence BIOREVO および Carl Zeiss LSM 510 META を用いて行った。

### 4. 研究成果

#### (1) RT-PCR

口腔上皮には、TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM4, TRPM5, TRPM8, TRPA1 が発現していることが確認できた。これらは、PCR 産物を DNA シークエンスすることにより、それぞれの遺伝子の配列を確認した。

これらの温度感受性 TRP の中で TRPV3 および

TRPV4 の発現が高い事が特徴的であった。

#### (2) カルシウムイメージング

単離した口腔上皮細胞に TRPV チャンネル作用薬であるカプサイシンや 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB)、camphor、4 Alpha-phorbol 12, 13-didecanone、GSK1016790A、menthol などの TRP チャンネルの作用薬による刺激で細胞内カルシウムの濃度の上昇が認められた。またこれらの変化は TRPV チャンネルの非選択的拮抗剤により抑制された。

#### (3) 伝達物質の遊離

上皮細胞から神経へと情報が伝わるためには、上皮から何らかの伝達物質が放出されることが考えられる。そこで、ATP および一酸化窒素を伝達物質の候補と考えて、刺激による ATP あるいは一酸化窒素の遊離を測定した。その結果カプサイシン刺激により一酸化窒素の遊離が増加した。また GSK1016790A により ATP の遊離が有意に上昇した。

#### (4) カプサイシン刺激による TRPV1 およびリン酸化 ERK の発現変化

免疫染色によりカプサイシン刺激による変化を比較した。カプサイシン刺激により上皮下神経叢におけるリン酸化 ERK 陽性神経の分布は明らかに増えていた。TRPV1 の反応については、顕著な差は認められなかった。

#### まとめ

口腔上皮には、機能的な TRPV チャンネル群が発現していることが分かった。またカプサイシンなどの刺激により、上皮から一酸化窒素などの遊離が認められ、上皮からの伝達物質の候補と考えられた。

またカプサイシン刺激により神経の活性化が認められたことからカプサイシンの刺激情報が上皮から神経へと伝わる可能性も考えられた。

#### 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1件)

Wang B, Danjo A, Kajiya H, Okabe K, and Kido MA. Oral Epithelial Cells are Activated via TRP Channels. J Dent Res (2011) 90(2): 163-7 査読有

[学会発表] (計6件)

① Kido MA. Oral mucosal epithelia as a sensor via TRP channels. In Calcium signaling in cellular sensation. 88th Annual Meeting of The physiological society of Japan and the 116th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists. (招待講演)

2011. 3. 28. Yokohama, Japan

② 合島怜央奈、王冰、高尾知佳、三原弘、加塩麻紀子、大崎康吉、富永真琴、城戸瑞穂 口腔上皮における温度感受性 TRP チャンネルの役割. 第5回三叉神経領域の感覚—運動統合機構研究会、長野 2011. 12. 3-4.

③ Aijima R, Wang B, Takao T, Mihara H, Kashio M, Tomonaga M, Kido MA. TRPV4 is an Osmo-sensor in the Oral Epithelium. The 9th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception 2011. 11. 4-6 Fukuoka.

④ Wang B, Aijima R, Takao T, Nisida M, Ohsaki Y, Noda M, Kido MA. TRPV4 is an Osmo-sensor in the Oral Epithelium. The 9th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception. 2011. 11. 4-6. Fukuoka

⑤ 合島怜央奈、王冰、畠山純子、大崎康吉、城戸瑞穂 口腔上皮細胞における TRP チャンネルを介した温度感受性. 第53回歯科基礎医学会 2011. 9. 30-10. 2 岐阜

⑥ 城戸瑞穂、王冰、鍛冶屋浩、合島怜央奈、西田基宏、高尾知佳、張旌旗、岡本富士雄、岡部幸司、野田百美、大崎康吉. 口腔粘膜における TRP チャンネルの役割 第7回 TRP チャンネル研究会 2011. 6. 2-3 岡崎

#### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

城戸 瑞穂 (KIDO MIZUHO)  
九州大学・歯学研究院・准教授  
研究者番号：60253457

研究者番号：

#### (3) 連携研究者

・ 王 冰 (Wang B)  
九州大学・歯学研究院・特任教授  
研究者番号：20452716

・ 張 旌旗 (Zhang JQ)  
九州大学・歯学研究院・技術専門職員  
研究者番号：80380707