

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791792

研究課題名 (和文) 口腔粘膜上皮における TRPV4 の機能調節と食嗜好の決定の関係

研究課題名 (英文) The relationship between functional regulation of TRPV4 in oral epithelium and food preference

研究代表者

王 冰 (オウ ヒョウ)

九州大学・歯学研究院・学術研究員

研究者番号：20452716

研究成果の概要 (和文)：

口腔上皮細胞が口腔内の状態を感じ取ることができると仮説を立てて、温刺激・物理刺激および化学刺激のセンサーとして知られている TRPV4 チャンネルの発現をラットを対象として調べた。ラット口腔粘膜上皮における TRPV4 の発現を mRNA レベルおよび蛋白レベルで確認した。また機能的な特徴を知るために電気生理実験法および Ca<sup>2+</sup> imaging 法を行い、TRPV4 の作用薬剤と阻害剤を利用し、TRPV4 が誘発した電流と Ca<sup>2+</sup> の移動を観察することができた。

研究成果の概要 (英文)：

I hypothesized that oral epithelial cells have perception of multi-stimuli in the oral environment. So I investigated the expression of TRPV4 channels, which were known as sensors for warm temperature, mechanical and chemical stimuli, in rat. I identified TRPV4 expression at mRNA and protein level. To investigate its functional characters, I took advantage of electrophysiological and Ca<sup>2+</sup> imaging methods. Using TRPV4 activators and inhibitors, I observed TRPV4 induced currents and Ca<sup>2+</sup> mobility.

交付決定額

(金額単位：4290000 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2100000	630000	2730000
2010 年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	990000	4290000

研究分野：九州大学大学院 歯学研究院 口腔常態制御学講座 分子口腔解剖学分野  
 科研費の分科・細目：若手研究 (B)

キーワード：TRPV4    ラット    口腔粘膜上皮

### 1. 研究開始当初の背景

(1) これまで食べ物由来の機械刺激は口腔粘膜に分布した神経終末が感知していると考えられていた。

(2) TRPV4 チャンネルは機械刺激・体液の低浸透圧・温刺激および  $4\alpha$ -PDD により活性化される。予備実験で、口腔上皮に発現していることを確認した。

### 2. 研究の目的

(1) 口腔粘膜上皮における TRPV4 の発現局在を明確にする。

(2) TRPV4 の機能的な発現を調べる。

(3) 口腔上皮から神経への情報を伝達するメカニズムを検討する。

### 3. 研究の方法

(1) RT-PCR、western blotting、免疫染色法で、口腔粘膜上皮における TRPV4 の局在を確認する。

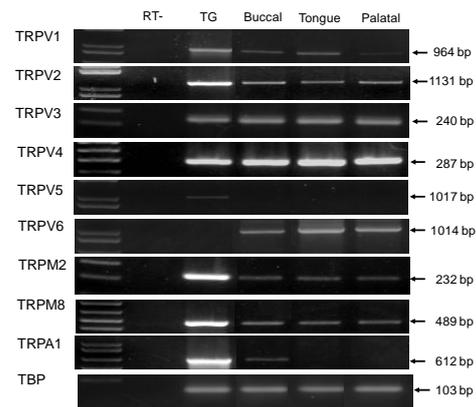
(2) ラット口腔上皮細胞を培養し、whole-cell patch clamp 法で、TRPV4 の作用薬剤と阻害剤を利用し、TRPV4 誘発した膜電流を観察する。

(3) カルシウムイメージング法で、TRPV4 作用薬剤および低浸透圧液灌流による細胞内カルシウム濃度変化を観察する。

(4) ATP release assay 法で、低浸透圧および TRPV4 作用薬剤による口腔上皮から ATP 分泌される量を比べる。

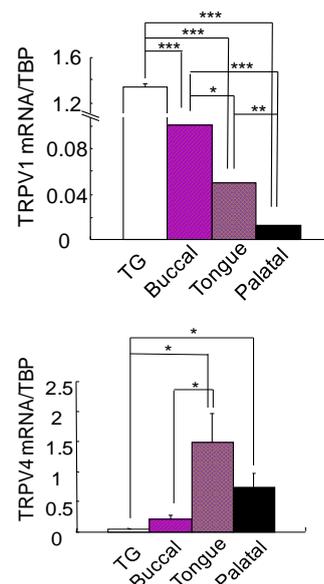
### 4. 研究成果

(1) Conventional RT-PCR 法で、ほとんどの温度感受性 TRP チャンネルはラットの口蓋上皮、頬粘膜上皮および舌上皮組織に mRNA レベルで発現すると明らかにした。



(ラットの頬粘膜上皮・舌上皮および口蓋上皮における TRP チャンネルの発現。三叉神経節 (TG) は positive control として用いた。)

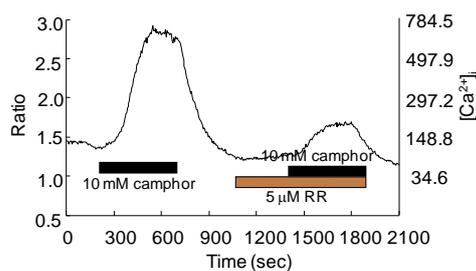
(2) Real-time PCR 法で、それぞれの TRP チャンネルは口腔内の部位により、発現様式が異なっていた。



(ラット頬粘膜上皮・舌上皮・口蓋上皮と三叉神経節における TRPV1 および TRPV4 の real time qPCR による発現量の比較)

(3) 急性単離したラット口蓋上皮細胞および培養した頬粘膜上皮細胞を使い、Ca<sup>2+</sup> imaging 法で、TRP チャンネルの作用薬剤およ

び阻害剤の投与で、TRP チャンルの機能的な発現が明らかになった。



(急性単離したラット口蓋上皮細胞において、TRPV3 作用薬剤 camphor により、細胞内カルシウムの濃度が上昇した。この上昇は TRPV チャンルの阻害剤 ruthenium red (RR) により、減弱された。)

以上の研究成果は口腔粘膜上皮が口腔内を被覆するだけではなく、食べ物由来の種々の刺激に対する最前線として、TRP チャンルを介し、センサーとして働いていることを示唆した。これらの成果は Journal of Dental Research に発表された。

(4) 培養したラット頬粘膜上皮細胞における TRPV4 の mRNA レベルおよび蛋白レベルでの発現を明らかにした。

(5) 電気生理学実験法を利用し、培養した頬粘膜上皮細胞において、TRPV4 の活性化剤  $4\alpha$ -PDD および GSK1016790A による膜電流の増強が見られた。また、この増強は TRPV チャンルの阻害剤 ruthenium red により、抑えられ、この電流が TRPV4 が誘発した電流と示唆された。

口腔上皮細胞からのホールセル記録を報告している研究者は私が知る限りはなく、口腔上皮細胞に発現しているチャンネルの電気生理学上の機能解析は当研究が確立した貴重な技術である。

(6)  $Ca^{2+}$  imaging 法で、TRPV4 の作用薬で、TRPV4 誘発した細胞内カルシウム濃度の上昇

を確認した。さらに、低浸透圧の外液で還流し、細胞内カルシウムの上昇、および TRPV4 特異な阻害剤によるこの上昇の減弱がまた観察でき、TRPV4 が低浸透圧による上皮細胞の反応に参与すると明らかにした。

(7) 急性単離した口腔上皮を等張液・高浸透圧液・低浸透圧液で刺激したところ、低浸透圧刺激により、ATP 遊離が顕著に増加し、TRP チャンル阻害剤である ruthenium red により阻害された。上皮からの伝達物質の候補として ATP 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1件)

Wang B., Danjo A., Kajiya H., Okabe K., Kido M.A. Oral Epithelial Cells are Activated via TRP Channels. Journal of Dental Research. 2011 90:163-167.

[学会発表] (計7件)

国際:

① Wang B., Kajiya H, Aijima R, Danjo A, Okamoto F, Okabe K, Kido M. A. Oral epithelium is Chemosensor and Osmosensor via TRP channels. (Fukuoka, Japan, 2010. 11 6-7) The 8th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (2010)

② Wang B., Danjo A, Kajiya H, Okabe K, Noda M, Kido M. A. Expression and Activation of TRP Channels in Oral Epithelial Cells. (Stockholm, Sweden, 2009. 9 26-27) TRP channels: from sensory signaling to human disease (2009)

国内:

① 王冰、檀上敦、鍛冶屋浩、合島怜央奈、岡

本富士雄、岡部幸司、城戸瑞穂 口腔上皮における温度感受性 TRP チャンネルの発現と機能的な活動 (福岡) 平成 22 年 10 月 9 日 日本解剖学会第 66 回九州支部学術集会

②王冰、合島怜央奈、岡本富士雄、鍛冶屋浩、岡部幸司、城戸瑞穂 口腔上皮細胞における TRPV4 の機能的な発現 (東京) 平成 22 年 9 月 20-22 第 52 回歯科基礎医学会学術大会 J Oral Biosci. 52 Suppl. 2010:130

③城戸瑞穂、王冰、鍛冶屋浩、岡部幸司、張旌旗、山座孝義 口腔粘膜上皮における TRP チャンネルの発現と機能解析 (盛岡市) 平成 22 年 3 月 28-30 第 115 回日本解剖学会学術集会総会

④城戸瑞穂、王冰、鍛冶屋浩、岡部幸司、張旌旗、山座孝義 口腔上皮におけるカプサイシン感受性細胞の解析 (新潟) 平成 21 年 9 月 9-11 第 51 回歯科基礎医学会学術大会 J Oral Biosci. 51 Suppl. 2009:84

⑤王冰、檀上敦、鍛冶屋浩、岡部幸司、城戸瑞穂 口腔上皮細胞における化学刺激および温度刺激感受性 TRP チャンネル (新潟) 平成 21 年 9 月 9-11 第 51 回歯科基礎医学会学術大会 J Oral Biosci. 51 Suppl. 2009:108

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

王 冰 (オウ ヒョウ)

研究者番号：

20452716