

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月15日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011年～2012年

課題番号：23792107

研究課題名（和文）口腔粘膜上皮における新規メカノセンサー機構の解明

研究課題名（英文）The elucidation of new mechanosensor in oral mucosal epithelium

研究代表者

王 冰（おう ひょう）

九州大学・大学病院・学術研究員

研究者番号：20452716

研究成果の概要（和文）：

口腔粘膜上皮における TRPV4(Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4) チャンネルが唾液由来の低浸透圧刺激を感受し、口腔上皮構造の恒常性を維持すると仮説を立てて、ラットおよび TRPV4 欠損マウスを対象として、TRPV4 の低浸透圧感受性と作用を検討した。口腔頬粘膜上皮細胞を培養し、TRPV4 の mRNA レベルおよび蛋白レベルの発現を確認した。電気生理学的実験法および Ca<sup>2+</sup> imaging 法を行い、TRPV4 の作用薬および低浸透圧刺激を加え、TRPV4 が誘発した電流と Ca<sup>2+</sup> の移動を観察できた。同じ刺激で、口腔上皮から放出された ATP の量は増え、ATP が末梢神経まで情報を伝える mediator であると示唆された。免疫染色法を利用し、低浸透圧刺激により細胞骨格である actin の再構築が認められ、TRPV4 により、細胞間の結合が維持されていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

I hypothesized that TRPV4 (Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4) channels in oral mucosal epithelium have sensitivity of hypoosmolarity from saliva, and support the homeostasis of oral epithelial structure. I investigated the sensitivity of hypoosmolarity and its function using rats or TRPV4 knockout mice. I cultured primary buccal epithelial cells and confirmed TRPV4 expression in mRNA level and protein level. I took advantage of electrophysiological and Ca<sup>2+</sup> imaging methods, and found TRPV4 induced currents and Ca<sup>2+</sup> mobility using TRPV4 activators and hypotonic stimulation. With the same stimuli, there was a rise of ATP released from oral epithelial cells, which suggested ATP to be a mediator to peripheral nerves. I used the method of immunocytochemistry and found hypoosmolarity induced reorganization of actin, a kind of cytoskeleton. This suggested that TRPV4 supports intercellular contact.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000 円	990,000 円	4,290,000 円

研究分野：口腔解剖

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：ワード

TRPV4、口腔粘膜上皮、低浸透圧、Whole-cell patch clamp、Ca<sup>2+</sup> imaging、頬粘膜、ATP

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 口腔粘膜上皮は低浸透圧が含まれる物理刺激に曝されている。
- (2) TRPV4 チャンネルは低浸透圧感受性のカチオンチャンネルである。以前の研究で、TRPV4 が口腔粘膜上皮に豊富に発現していることを証明した。

## 2. 研究の目的

- (1) 口腔粘膜上皮における TRPV4 の mRNA レベルおよび蛋白レベルの発現を確認する。
- (2) TRPV4 の作用薬および低浸透圧刺激に対する機能的な発現を調べる。
- (3) TRPV4 により、口腔上皮から神経への情報伝達するメカニズムを検討する。
- (4) 低浸透圧による TRPV4 の活性化が及ぼす口腔上皮構造の恒常性への影響を調べる。

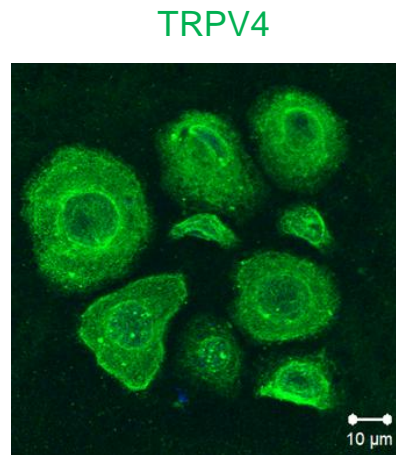
## 3. 研究の方法

- (1) RT-PCR、western blotting、免疫染色法で、口腔上皮組織および培養細胞における TRPV4 の局在を確認する。
- (2) ラットおよび野生型・TRPV4 欠損マウスの頬粘膜上皮細胞を培養し、whole-cell patch clamp 法で、TRPV4 作用薬剤・阻害剤および低浸透圧刺激を利用し、TRPV4 により誘発した膜電流を観察する。
- (3) Ca<sup>2+</sup> imaging 法で、TRPV4 作用薬剤および低浸透圧液還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分泌される ATP 量を比べる。
- (5) 電子顕微鏡と蛍光免疫染色法で、低浸透圧刺激を加え、細胞間の接着および細胞骨格の構築を観察する。

## 4. 研究成果

- (1) Conventional RT-PCR 法で、培養した頬粘膜上皮細胞における TRPV4 の mRNA レベルの発現を確認した。Western blotting と免疫染色法で、組織および培養細胞における TRPV4 の蛋白レベルの発現を確認した。

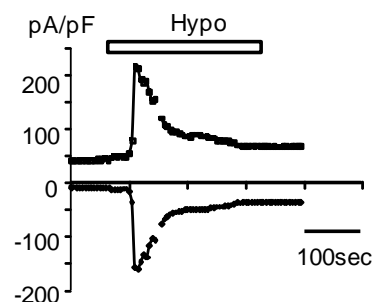
図 1 :

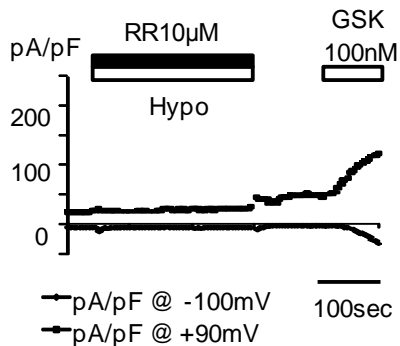


(培養したラット頬粘膜上皮細胞における TRPV4 の発現)

- (2) 電気生理学的実験法を利用し、培養した頬粘膜上皮細胞において、TRPV4 の活性化剤 GSK1016790A による膜電流の増強が見られた。この増強は TRPV4 チャンネル阻害剤 ruthenium red および TRPV4 特異な阻害剤 RN-1734 により抑制され、この電流が TRPV4 により誘発した電流と示唆され、TRPV4 の機能的な発現が証明された。さらに、組織液より低い浸透圧を細胞外の刺激液にすることで、一過性の膜電流の増強が見られた。この電流は ruthenium red により抑制され、TRPV4 による低浸透圧感受性が示唆された。

図 2 :

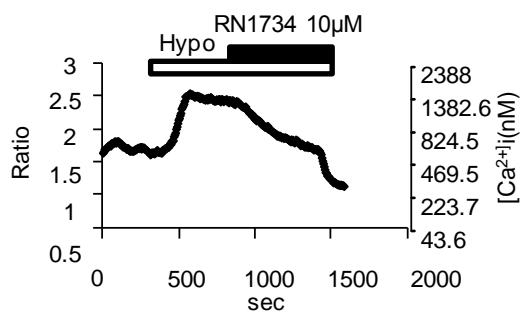




(培養したラット頬粘膜上皮細胞に、低浸透圧刺激を加え、一過性の膜電流の増強が見られた。その増強は TRPV4 チャンネルの阻害剤である ruthenium red (RR)により、抑制された。)

(3) Ca<sup>2+</sup> imaging 法で、TRPV4 の作用薬および低浸透圧で、細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた。この上昇は ruthenium red および RN-1734 により、抑制された。また、RN-1734 存在下で、低浸透圧による細胞体積の膨張およびその後の容積調節が見られなかった。さらに、TRPV4 欠損マウスを利用し、野生型に見られた GSK1016790A および低浸透圧が誘発したルシウム濃度の上昇が見られなかった。TRPV4 が低浸透圧による上皮細胞の反応に寄与することを明らかにした。

図 3 :



(培養したラット頬粘膜上皮細胞内のカルシウム濃度は低浸透圧下で上昇した。この上昇は TRPV4 特異な阻害剤である RN1734 により、減弱された。)

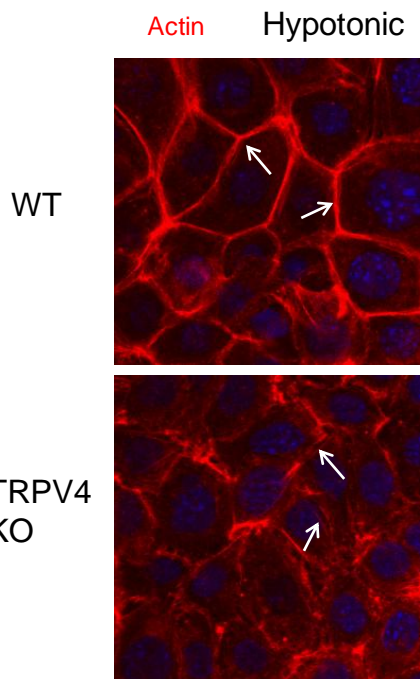
(4) ATP release assay 法で、急性単離した頬粘膜上皮を等張液・高浸透圧液・低浸透圧液で刺激したところ、低浸透圧により、ATP 遊離が顕著に増強した。また、培養した頬粘膜上皮細胞を利用し、TRPV4 の活性化剤 GSK1016790A および低浸透圧刺激により、ATP 遊離の有意な増強が見られた。さらに、免疫

染色法で、培養細胞における ATP の輸送体である VNUT の発現を確認した。上皮からの伝達物質の候補として ATP が示唆された。

(5) 電子顕微鏡を利用し、低浸透圧細胞外液処置後、細胞間の接着が緊密になったと考えられた。

(6) TRPV4 欠損マウスと野生型マウスを利用し、蛍光免疫染色法で、培養した頬粘膜上皮細胞を低浸透圧液で処置し、野生型に細胞骨格である actin が細胞間接着部位に集積することが見られたが、欠損マウスには見られなかった。低浸透圧による TRPV4 の活性化が細胞間の結合を維持することが示唆された。

図 4 :



(低浸透圧液処置で、wild type マウスの頬粘膜上皮細胞における actin は細胞接着部位に集積した。それは TRPV4 knockout マウスに見えなかった。)

## 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 Wang B, Aijima R, Takao T, Nishida M, Ohsaki Y, Zhang JQ, Noda M, Kido MA. Oral Epithelium Has Osmosensitivity via

TRPV4. ( Jeju Korea, 2012 8 23~2012 8 27)  
2012 International Ion Channel  
Conference(IICC)

②Wang B, Aijima R, Takao T, Nishida M,  
Ohsaki Y, Noda M, Kido MA. Functional  
Expression of TRPV4 as an Osmo-sensor in  
the Oral Epithelium. (Fukuoka, Japan, 2012  
5.31~2012.6.2) Purine 2012 in Fukuoka

③王冰、合島怜央奈、高尾知佳、西田基宏、  
大崎康吉、張旌旗、野田百美、城戸瑞穂  
TRPV4 チャンネルを介した口腔上皮の浸透圧感  
受性 (福岡市 2012年9月1日) 第6回トラ  
ンスポーター研究会 九州部会

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

王 冰 (Wang Bing)

九州大学・大学病院・学術研究員

研究者番号：  
20452716