

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6月15日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792132

研究課題名（和文） 象牙芽細胞における刺激受容機構と象牙質形成の機能連関

研究課題名（英文） Functional coupling of sensory reception and dentin formation following external stimuli in odontoblasts.

研究代表者

津村 麻記 (Tsumura Maki)

東京歯科大学生理学講座・助手

研究者番号：90582346

研究成果の概要（和文）：象牙芽細胞に発現する $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ 交換体は、象牙質への外的刺激に伴う象牙質石灰化前線への直接的な Ca^{2+} 輸送経路、細胞内 Ca^{2+} 濃度を維持するための Ca^{2+} 輸送経路として機能していることが示唆された。加えて、象牙芽細胞はTRPV1チャネル、TRPM8チャネル、TRPA1チャネルにより露出象牙質への外的刺激を受容し、感覚伝達などの細胞機能を駆動する感覚受容細胞として役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Functional TRPV1- $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger coupling mediates Ca^{2+} extrusion to drive reactionary dentinogenesis and maintain $[\text{Ca}^{2+}]_i$ homeostasis. This study suggests that two separate dental pulp functions, that in protective dentin formation and that in sensory reception, are simultaneously driven by TRPV1, TRPM8, TRPA1 activation following stimuli applied external to odontoblasts.

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	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生理学

1. 研究開始当初の背景

象牙芽細胞は象牙質形成細胞であり、生涯にわたる生理的象牙質形成と生体内外からの刺激に伴う病的象牙質形成を駆動することは広く知られている。しかしながら、歯牙硬組織疾患などに伴う象牙質表面からの外的刺激と関連した象牙質形成における象牙芽細胞の役割は未知である。加えて、歯牙への外的刺激受容－象牙質形成過程と深く関連する歯髄・象牙質感覚の受容機構も未だ統一見解はない。

2. 研究の目的

本研究では象牙芽細胞における象牙質への外的刺激と関連する象牙質形成過程ならびに歯髄・象牙質感覚の受容機構における象

牙芽細胞の役割を明らかにするため、熱・冷刺激である温度刺激、機械刺激、侵害刺激に感受性をもつチャネルである TRP (transient receptor potential) チャネルに着目し、象牙芽細胞における外的刺激の受容機構と、それに関連する細胞膜・細胞内信号を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 歯髄スライス標本作製

ペントバルビタール麻酔下で新生仔ウイスターラット（5～10日齢）より得た片側下顎骨からマイクロスライサーを用いて厚さ500 μm の下顎骨歯髄横断切片を作製した。本切片から周囲の不要な組織を取り除き、歯髄の外周に象牙芽細胞が配列する歯髄スラ

イス標本を作製した。作製した歯髄スライス標本は酵素処理後、24時間初代培養を行った。

(2) 免疫蛍光染色及び免疫化学染色

歯髄の外周に配列する細胞が象牙芽細胞であることを同定するために dentin matrix protein-1, dentin sialoprotein, nestin を用いて免疫蛍光染色を行った。また、TRPV1 チャンネルとカンナビノイド (CB) 受容体 1、TRPM8 チャンネル、TRPA1 チャンネルの象牙芽細胞における局在を調べるために免疫化学染色を行った。

(3) 細胞内 Ca^{2+} 濃度測定

歯髄スライス標本周囲に存在する象牙芽細胞に細胞内 Ca^{2+} 指示薬 (Fura-2) を負荷し、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を 2 波長励起における蛍光強度比で記録した。

(4) パッチクランプ記録

歯髄スライス標本周囲に存在する象牙芽細胞にガラス管電極を適用し、電位固定条件下でホールセルパッチクランプ記録を行うことで TRPV1 チャンネル電流を計測した。

4. 研究成果

(1) TRPV1 チャンネルアゴニスト、低 pH 刺激は $[Ca^{2+}]_i$ を増加させる

TRPV1 チャンネルアゴニストのカプサイシン (CAP)、レシニフェラトキシン (RF)、TRPV1 チャンネルと CB 受容体アゴニストであるアナンドアミド (AEA) を投与すると、細胞外 Ca^{2+} 非存在下では $[Ca^{2+}]_i$ に変化はみられなかったが、細胞外 Ca^{2+} 存在下では $[Ca^{2+}]_i$ が増加した。これらの $[Ca^{2+}]_i$ の増加は、TRPV1 チャンネルアゴニストであるカプサゼピン (CPZ) で抑制された。また、低 pH 刺激においても CPZ 感受性の一過性の Ca^{2+} 流入が観察された。これらの結果から象牙芽細胞に TRPV1 チャンネルが発現していることが示された。

(2) TRPV1 チャンネルのアゴニスト結合部位の特定

CAP と AEA を投与してから TRPV1 チャンネルが活性化されるまでに遅延時間が生じた。しかしながら、細胞外 Ca^{2+} 非存在下で AEA をあらかじめ投与した後に細胞外に Ca^{2+} を投与するとすぐに $[Ca^{2+}]_i$ が増加したことから、細胞外にある CAP と AEA が TRPV1 チャンネルにおける結合部位に到達するまでに時間がかかるため CAP と AEA の細胞外投与による TRPV1 チャンネル活性化に遅延時間が生じたことが示唆された。また、パッチクランプ記録において、CAP を細胞内に投与した時は細胞外に投

与した時より早く内向き電流が誘発された。これらの結果から CAP と AEA の結合部位が細胞内に存在することが示唆された。RF の細胞外投与では $[Ca^{2+}]_i$ の増加と内向き電流の誘発に遅延時間はみられなかった。これは RF の結合部位が象牙芽細胞に発現する TRPV1 チャンネルにおいて細胞外に存在することを示唆している。

(3) TRPV1 チャンネルと Na^+ - Ca^{2+} 交換体のカップリング

TRPV1 チャンネル活性化で細胞内に流入した Ca^{2+} の排出経路について検討した。細胞外 Ca^{2+} 存在下で RF の投与による $[Ca^{2+}]_i$ の増加がピークに達した後の細胞からの Ca^{2+} 排出速度を示す減衰時定数は、 Na^+ - Ca^{2+} 交換体 (NCX) 阻害薬である KB-R7943 を同時に投与することにより延長した。このことから TRPV1 チャンネル活性化時において Ca^{2+} 排出により $[Ca^{2+}]_i$ を調節するため TRPV1 チャンネルと NCX が機能的にカップリングしていることが示唆された。

(4) CB1 受容体と TRPV1 チャンネルのクロストーク

CB 受容体アゴニストである 2-arachidonylglycerol (2-AG) の投与時には、CB1 受容体アンタゴニストである AM251、adenylyl cyclase 阻害薬である SQ22536、CPZ 感受性の一過性の Ca^{2+} 流入がみられ、その $[Ca^{2+}]_i$ の増加は CB2 受容体アンタゴニストである JTE907 では抑制されなかった。CAP、AEA、2-AG の反復投与を行ったところ、それぞれの投与により誘発された $[Ca^{2+}]_i$ の増加は 2-AG 投与時では脱感作せず、AEA 投与時で若干、CAP 投与時で強く脱感作した。これらの結果から、象牙芽細胞は CB1 受容体と TRPV1 チャンネルを発現しており、外的な刺激がなくても CB1 受容体の活性化は adenylyl cyclase を介した細胞内 cAMP シグナル経路により TRPV1 チャンネル誘発性の Ca^{2+} 流入を引き起こすことが示唆された。

(5) 象牙芽細胞における TRPM8 チャンネルの発現と局在

免疫組織学染色において TRPM8 チャンネルは象牙芽細胞の膜遠心部と象牙芽細胞突起に発現していることが示された。

細胞外 Ca^{2+} 存在下で TRPM8 チャンネルアゴニストのメントール、イシリン、WS3、WS12 を投与すると $[Ca^{2+}]_i$ が増加した。イシリン、WS3、WS12 による $[Ca^{2+}]_i$ の増加は TRPM8 チャンネルアゴニストのカプサゼピンまたは選択的な TRPM8 チャンネルアゴニストの 5-benzoyloxytryptamine (5-BOT) で抑制された。細胞外 Ca^{2+} 非存在下で WS3 を投与したと

きには $[Ca^{2+}]_i$ に変化はみられなかった。また、WS12の反復投与を行ったところ、WS12による $[Ca^{2+}]_i$ の増加は脱感作した。これらの結果から象牙芽細胞にTRPM8チャンネルが発現していることが示された。

(6)象牙芽細胞におけるTRPM8チャンネルの発現と局在

免疫組織学染色においてTRPA1チャンネルは象牙芽細胞の膜遠心部と象牙芽細胞突起に発現していることが示された。

細胞外 Ca^{2+} 存在下でTRPA1チャンネルアゴニストのイソチオシアン酸アリル(AITC)を投与すると $[Ca^{2+}]_i$ は増加し、その増加はTRPA1チャンネルアンタゴニストであるHC030031で抑制された。また、AITCの反復投与を行ったところ、AITCによる $[Ca^{2+}]_i$ の増加は脱感作した。このことから象牙芽細胞にTRPA1チャンネルが発現していることが示された。

(7)TRPM8チャンネル、TRPA1チャンネルの温度感受性

細胞外 Ca^{2+} 存在下で $[Ca^{2+}]_i$ に対する冷刺激の影響について検討した。冷刺激は細胞外液の温度を $35^{\circ}C$ から $22^{\circ}C$ 、 $26^{\circ}C$ から $13^{\circ}C$ に変化させることで行った。細胞外液の温度 $35^{\circ}C$ から $22^{\circ}C$ の冷刺激は $[Ca^{2+}]_i$ の増加を誘発し、その増加は5-BOTにより抑制された。細胞外

液の温度 $26^{\circ}C$ から $13^{\circ}C$ の冷刺激は $[Ca^{2+}]_i$ の増加を誘発し、その増加はHC030031により抑制された。これらの結果から、象牙芽細胞に加わる冷刺激はTRPM8チャンネル、TRPA1チャンネルによって受容されていることが示唆された。

(8)TRPM8チャンネル、TRPA1チャンネルの機械感受性

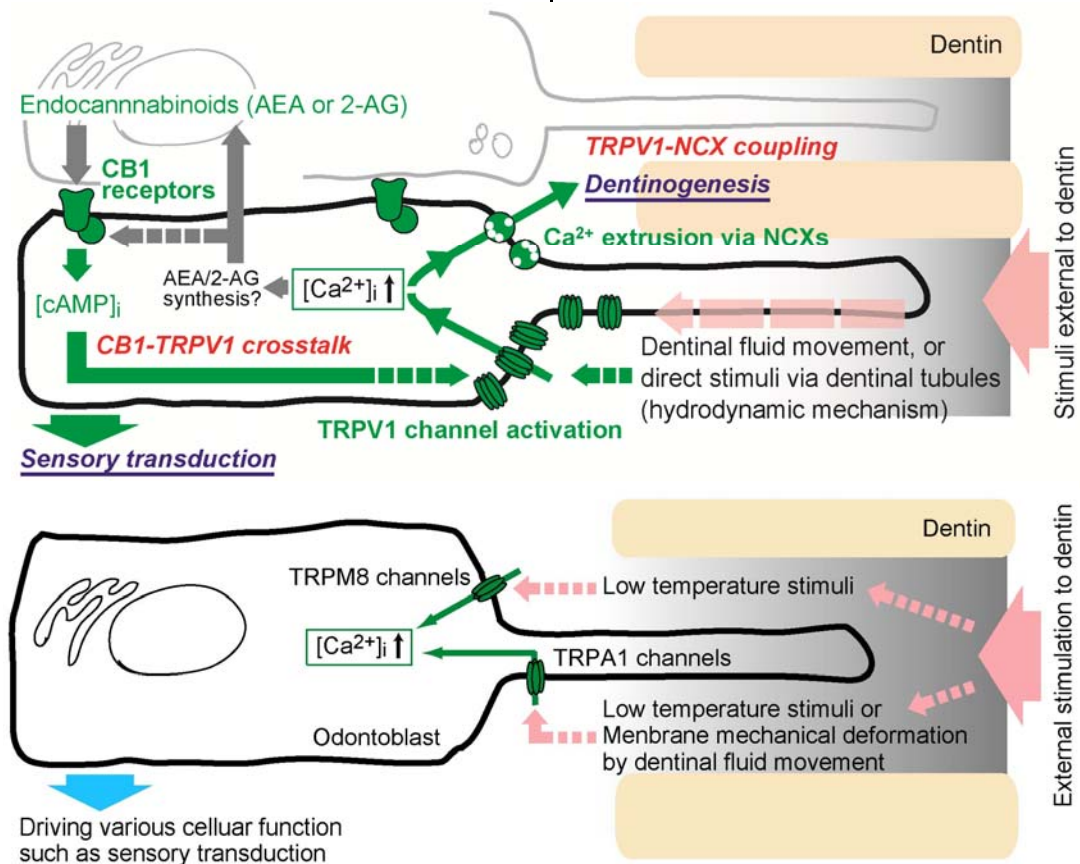
低浸透圧溶液の投与により膜伸展を誘発させた。低浸透圧溶液は $[Ca^{2+}]_i$ を増加した。この増加はHC030031の投与で抑制されたが、5-BOTの投与では抑制されなかった。これらの結果から象牙芽細胞に発現するTRPA1チャンネルは膜伸展刺激を受容することが示唆された。

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4件)

- (1)Masaki Sato, Ubaidus Sobhan, Maki Tsumura, Hidetaka Kuroda, Manabu Soya, Akihiro Nishiyama, Akira Katakura,



Tatsuya Ichinohe, Masakazu Tazaki and Yoshiyuki Shibukawa. Hypotonic-induced stretching of plasma membrane activates TRPV channels and sodium-calcium exchangers in mouse odontoblasts. J Endod, 査読有 2013;39(6):779-787

(2) Ichikawa H, Kim H.J, Shuprisha A, Shikano T, Tsumura M, Shibukawa Y and Tazaki M. Voltage-dependent sodium channels and calcium-activated potassium channels in human odontoblasts in vitro. J Endod, 2012; 38(10):1355-1362 査読有

(3) Tsumura M, Sobhan U, Muramatsu T, Sato M, Ichikawa H, Sahara Y, Tazaki M, Shibukawa Y. TRPV1-mediated calcium signal couples with cannabinoid receptors and sodium-calcium exchangers in rat odontoblasts Cell Calcium. 2012;52(2):124-136 査読有

(4) Masakazu Tazaki, Hideki Ichikawa, Maki Tsumura, Masaki Sato, Ubaidus Sobhan, Yoshiyuki Shibukawa. Bradykinin up-regulates voltage-dependent sodium channels in human odontoblast. 医学と生物学, 2012;156(6): 404-409 査読有

[学会発表] (計 19 件)

(1) 佐藤正樹、津村麻記、黒田英孝、川口綾、Sobhan Ubaidus、西山明宏、吉成正雄、井上孝、田崎雅和、澁川義幸、象牙芽細胞における細胞膜伸展刺激受容と三叉神経節細胞共培養系における連絡機構、第 294 回東京歯科大学学会、平成 24 年 10 月 20 日、千葉市、

(2) 嶋田みゆき、津村麻記、佐藤正樹、Sobhan Ubaidus、山下秀一郎、田崎雅和、澁川義

幸、グアヤコールは象牙芽細胞の Ca^{2+} チャンネルに直接作用する、第 294 回東京歯科大学学会、平成 24 年 10 月 20 日、千葉市

(3) Ubaidus Sobhan, Masaki Sato, Takashi Shinomiya, Migiwa Okubo, Maki Tsumura, Masao Yoshinari, Takashi Inoue, Masakazu Tazaki, Mitsuru Kwaguchi, Yoshiyuki Shibukawa. Functional role of thermosensitive TRP channels in salivary gland during salivary secretion. 第 294 回東京歯科大学学会、平成 24 年 10 月 20-21 日、千葉市

(4) 西山明宏、佐藤正樹、津村麻記、田崎雅和、片倉朗、澁川義幸、象牙芽細胞におけるグルタミン酸受容体の機能検索、第 294 回東京歯科大学学会、平成 24 年 10 月 20-21 日、千葉市

(5). 津村麻記、Sobhan Ubaidus、佐藤正樹、西山明宏、田崎雅和、澁川義幸、象牙芽細胞における TRPM8 チャンネルと TRPA1 チャンネルの発現検索、第 54 回歯科基礎医学会学術大会 平成 24 年 9 月 14-16 日、郡山市

(6) Sobhan Ubaidus、佐藤正樹、四宮敬史、大久保みぎわ、津村麻記、田崎雅和、川口充、唾液腺における TRP チャンネル発現と分泌メカニズム、第 54 回歯科基礎医学会学術大会 平成 24 年 9 月 14-16 日、郡山市

(7) 津村麻記、Sobhan Ubaidus、佐藤正樹、西山明宏、田崎雅和、澁川義幸、象牙芽細胞における TRPV1 チャンネル・CB1 受容体・ Na^{+} - Ca^{2+} 交換体の機能関連、第 6 回トランスポーター研究会九州部会、平成 24 年 9 月 1 日、福岡市

(8) 佐藤正樹、津村麻記、Sobhan Ubaidus、黒田英孝、田崎雅和、澁川義幸、マウス象牙芽細胞系細胞における細胞膜伸展刺激受容 TRP channels と NCX の機能関連、第 6 回トランスポーター研究会九州部会、平成 24 年 9 月 1 日、福岡市

(9) 佐藤正樹、津村麻記、Sobhan Ubaidus、黒田英孝、征矢学、正村綾、田崎雅和、一戸達也、澁川義幸、象牙芽細胞系細胞における機械刺激受容と三叉神経節細胞共培養系における伝達機構、第 11 回釧路ニューロサイエンスワークショップ、平成 24 年 7 月 6-7 日、釧路市

(10) Sobhan Ubaidus, Muramatsu Takashi, Tsumura Maki, Sato Masaki, Tazaki Masakazu, Shibukawa Yoshiyuki. Immunolocalization of potassium dependent (NCKX) and potassium independent (NCX) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger proteins in salivary glands. 第 89 回日本生理学会、平成 24 年 3 月 29-31 日、松本市

(11) 高橋史子、津村麻記、Sobhan Ubaidus、村松敬、佐藤正樹、市川秀樹、田崎雅和、澁川義幸、象牙芽細胞における TRPM8/TRPA1 チャネルの発現の検索、第 53 回歯科基礎医学会学術大会 平成 23 年 9 月 30 日-10 月 1 日、岐阜市

(12) 田中らいら、佐藤正樹、津村麻記、Sobhan Ubaidus、市川秀樹、田崎雅和、澁川義幸、ユージノールは象牙芽細胞の TRPV1 チャネルに作用する、第 53 回歯科基礎医学会学術大会 平成 23 年 9 月 30 日-10 月 1 日、岐阜市

(13) Tsumura M, Shibukawa Y, Muramatsu T, Sobhan U, Sato M, Ichikawa H, Tazaki M, Functional coupling between TRPV1, CB1 and NCXs in rat odontoblasts. 6th International Conference on $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange 2011, Ischia, Naples, Italy

(14) Sobhan U, Muramatsu T, Sato M, Tsumura M, Tazaki M, Shibukawa Y. Potassium dependent and independent $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger proteins is mainly expressed in myoepithelial cells/ductal cells of rat salivary glands. 6th International Conference on $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange 2011, Ischia, Naples, Italy

(15) Shibukawa Y, Tsumura M, Sato M, Ubaidus S, Muramatsu T, Matsuda T, Baba A, Tazaki M. NCX expression in enamel/dentin-forming cells. 6th International Conference on $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange 2011, Ischia, Naples, Italy

(16) Sato M, Sobhan U, Tsumura M, Ichikawa H, Tazaki M, Muramatsu T, Shibukawa Y. Activation of TRP channels by osmotic stimulation and Ca^{2+} extrusion by $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers in mouse odontoblast lineage cells. 6th International Conference on $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange 2011, Ischia, Naples, Italy

(17) 津村麻記、Sobhan Ubaidus、佐藤正樹、村松敬、田崎雅和、澁川義幸、象牙芽細胞における TRPV1/TRPV2 チャネルを介した外的刺激受容と象牙質形成の機能関連、第 31 回日本歯科薬物療法学会、平成 23 年 6 月 24-25

日, 千葉市

(18) 佐藤正樹、津村麻記、Ubaidus Sobhan、市川秀樹、村松敬、田崎雅和、澁川義幸、マウス象牙芽細胞系細胞における浸透圧受容器 TRPV4 と Na^+ - Ca^{2+} 交換体の機能関連
第 31 回日本歯科薬物療法学会, 平成 23 年 6 月 24-25 日, 千葉市

(19) Ubaidus Sobhan、村松敬、佐藤正樹、津村麻記、田崎雅和、澁川義幸、Localization and the Role of TRPs in Salivary Gland. 第 31 回日本歯科薬物療法学会, 平成 23 年 6 月 24-25 日, 千葉市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津村 麻記 (Tsumura Maki)

東京歯科大学生理学講座・助手

研究者番号 : 90582346