

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592876

研究課題名(和文)象牙質知覚過敏症における知覚メカニズムの解明：浸透圧による象牙芽細胞の応答

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism on dentin hypersensitivity; cell response by hypertonic stress.

研究代表者

徳田 雅行 (Masayuki, Tokuda)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：20253891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の生存率は、700 mOsm/Lで3 h 以上培養すると著しく低下した。細胞および核の形態は高浸透圧刺激で不均等になった。活性型 caspase-3の発現は、高浸透圧刺激で上昇した。propidium iodide陽性細胞が高浸透圧で増加していることが確認された。mitogen-activated protein kinase の阻害剤で高浸透圧による細胞死が減少した。以上のことから、スクロースによる高浸透圧刺激はMAPKを介して象牙芽細胞の細胞死を誘導することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Osmotic stress is one cause of dental pain due to caries or dentin hypersensitivity. The mechanism of osmotic-induced dental pain is not completely understood. The purpose of this study was to examine the responses of odontoblasts under sucrose-induced hyperosmotic stress. Cell viability decreased over 700 mOsm for 3 h cell culture. The shapes of cells and nuclei became irregular and vacuolar under hyperosmotic stress. The expression of cleaved caspase-3 was increased after treatment with hyperosmotic stress. Flow cytometry analysis detected no annexin V-positive cells, indicating apoptosis. Three MAPKs phosphorylation were induced by hyperosmotic stress. Inhibitors of three MAPKs inhibited the hyperosmotic stress-induced decline in cell cultures at 500 and 700 mOsm. Hyperosmotic stress induces cell death of OLCs with sucrose through a MAPK pathway.

研究分野：歯科保存学

キーワード：象牙質知覚過敏症

1. 研究開始当初の背景

象牙質知覚過敏症の原因は、まだ不明な点が多い。現在は、主として象牙細管の開口によって、細管内の組織液が動き神経を刺激するという動水力学説が広く受け入れられている。細管内の組織液の移動は、エナメル質の欠損、歯頸部歯肉の退縮などのよる根面露出など、様々な事象に由来する。一方、最近では象牙芽細胞自身が外来刺激の受容体であるとする説も有力である。

われわれはこれまで、歯髓細胞および象牙芽細胞を用いて以下のような研究結果を得ている。

- 1) 歯髓炎起因因子である *Prevotella intermedia* (P. i.) LPS 刺激による歯髓細胞からの炎症性メディエーター (IL-1, 6, 8, TNF- α) の検出 (J. Endod. 22:9-12, 1996
J. Endod. 27:273-277, 2001
J. Endod. 28:177-180, 2002,
J. Endod. 29:48-50, 2003)
 - 2) P. i. LPS 刺激による炎症反応と歯髓細胞からの痛覚を司る神経ペプチドの放出誘導とその炎症との関連 (J. Endod. 30:770-774, 2004,
Connect. Tissue Res. 46:153-158, 2005)
 - 3) 温度感覚受容体 (VR1) の歯髓細胞での発現と炎症性サイトカインの産生 (J. Endod. 31:652-658, 2005)
 - 4) 痛覚の情報伝達に関するプロテアーゼ活性化受容体 (PAR-2) の歯髓細胞上の発現とその神経ペプチドの放出誘導 (J. Immunol. 174:5796-5804, 2005)
 - 5) LPS による誘導性の脳内モルヒネであるアナダマイドによる歯髓細胞の細胞死誘導 (論文投稿準備中)
- これらの結果から、う蝕による歯髓炎の誘導や痛覚にかかわる因子の誘導および歯髓壊死に至る過程には様々な生体側の

因子が関わっていることを明らかにしてきた。とくに、歯髓細胞および象牙が細胞における感覚受容体の発見は、これらが知覚受容体となりえる可能性が高いことを示すものである。最近では、予備データではあるが、う蝕起因物質であるショ糖 (スクロース) が浸透圧の上昇にかかわることから、同物質が象牙芽細胞に対してさまざまな細胞応答因子を誘導し、ひいては細胞死に至ることを明らかにしている。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は象牙質知覚過敏症のまだ解明されていない基礎的研究を完成し、知覚伝達のメカニズムを応用した新しい診断法や治療薬への臨床応用に展開するための基礎となる研究を行う。研究期間内には以下のことを明らかにする。

浸透圧の変化による細胞の動態を明らかにする。これは、形態を含め主に細胞死に関する実験 (核破壊、フローサイトメトリによる細胞周期の動向など) を行う。次に、細胞応答因子、特に細胞内転写因子等の発現誘導を観察する。さらには、圧センサーであるアクアポリンの発現誘導およびその因果関係を明らかにし、両者の関連性を調べる。

浸透圧による炎症性ファクターの誘導実験を行う。これには、対照として細菌性の起炎物質である LPS を用いる。もし有為な炎症性ファクターが確認された場合、浸透圧との関連を細胞内転写因子など中心に検索を行う。

致死ファクターである HMGB1 との関係性を明らかにする。これは、細胞死に至った細胞が放出する因子であり、浸透圧による同分子の発現誘導を観察し、浸透圧と致死ファクターの関係を明らかにする。

神経伝達物質と浸透圧の関係を明らかにする。これは、象牙芽細胞および歯髓細胞が浸透圧受容体として機能していることを前提に、神経伝達物質の発現分析を行う。

3. 研究の方法

象牙質知覚過敏症の基礎的研究から臨床応用へと展開するために、本研究計画では以下の研究項目を行った。

浸透圧刺激に対する象牙芽細胞および歯髓細胞の動態分析を行う。
高浸透圧および低浸透圧下における細胞形態の観察、細胞内転写因子の発現分析など

浸透圧と炎症性ファクターの発現との関係分析を行う。
高浸透圧および低浸透圧下における炎症性サイトカインの発現分析など

浸透圧と致死ファクターとの相互関係分析を行う。
High Mobility Group Box 1 の発現分析、アポトーシスファクター（核の断片化、フローサイトメトリ解析、カスパーゼ3の発現分析など）

浸透圧による神経伝達物質の発現誘導の解析を行う。
高浸透圧および低浸透圧下における神経伝達物質（Substance P, CGRP など）

4. 研究成果

スクロースで誘導される高浸透圧下での象牙芽細胞の応答を調べるために、マウス歯胚由来の象牙芽細胞株（OLC）を用いて実験を行った。象牙芽細胞のマーカーである dentin sialophosphoprotein と dentin matrix protein 1 は、RT-PCR 法にて高浸透圧刺激に関係なく発現していた。細胞の生存率は、700 mOsm/L で 3 h 以上培養すると著しく低下した。細胞お

よび核の形態は高浸透圧刺激で不均等になった。活性型 caspase-3 の発現は、高浸透圧刺激で上昇した。アポトーシスの指標となる propidium iodide 陽性細胞が高浸透圧で増加していることがフローサイトメトリ解析で確認された。また、mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化が高浸透圧刺激により誘導され、それらの阻害剤で高浸透圧による細胞死が減少した。以上のことから、スクロースによる高浸透圧刺激は MAPK を介して象牙芽細胞の細胞死（アポトーシス）を誘導することが示唆された。

さらに、代用甘味料であるキシリトールを用いた高浸透圧刺激に対する象牙芽細胞の応答を調べた。まず、スクロース、ソルビトール、マンニトール、アラビノースおよびリキソースを用いた刺激試験を行い、MTT アッセイにて測定したところ、キシリトールは象牙芽細胞の生存活性を抑制しなかった。これは、キシリトールが HeLa 細胞に対して致死活性があったことから、象牙芽細胞に特異的な現象であることがわかった。また、浸透圧に対する受容体の発現を調べたところ、Transient receptor potential (TRPV)-1, 3, 4 の発現があることを RT-PCR 分析にて確認し、キシリトールで TRPV1 mRNA の発現を誘導することがわかった。また、キシリトールは、LPS で誘導された IL-6 の発現を一時的に抑制することがわかった。さらに、アクアポリン (AQP)-2 の発現も免疫染色法にて確認した。AQP と TRPV1 のインヒビターおよび TRPV1 siRNA がキシリトールの細胞死を増強することから、キシリトールによる細胞死からの逃避は、TRPV1 と AQP-2 が関与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2件)

1. Tokuda M, Fujisawa M, Kawakami Y, Morimoto-Yamashita Y, Torii M: Involvement of TRPV1 and AQP2 in hypertonic stress by xylitol in odontoblast cells. Connect Tissue Res., 56:44-49, 2015. (査読有)
2. Fujisawa M, Tokuda M, Morimoto-Yamashita Y, Tatsuyama S, Arany S, Sugiyama T, Kitamura C, Shibukawa Y, Torii M: Hyperosmotic stress induces cell death in an odontoblast-lineage cell line.; J Endodon., 38: 931-935, 2012. (査読有)

[学会発表](計1件)

徳田 雅行, 藤澤 真理, 川上 克子, 江本真規子, 鳥居 光男; 象牙芽細胞培養系におけるキシリトールによる高浸透圧刺激の影響。日本歯科保存学会秋季大会 2013年10月17日(秋田県総合生活分化会館(アトリオン)秋田県秋田市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

徳田 雅行 (TOKUDA Masayuki)

鹿児島大学・医歯学研究科・准教授

研究者番号: 20253891

(2)研究分担者

森元 陽子 (MORIMOTO Yoko)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号: 30437967