

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861762

研究課題名(和文) アルカリ感受性TRPチャネルを介した反応性修復象牙質形成機構の解明

研究課題名(英文) Reactionary dentin formation by alkali-sensing TRP channels

研究代表者

木村 麻記(Kimura, Maki)

東京歯科大学・歯学部・その他

研究者番号：90582346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：水酸化カルシウム製剤やMTAによる象牙質表面へのアルカリ刺激は象牙芽細胞においてTRPA1チャネルを含むイオンチャネル型受容体と代謝調節型受容体により受容され、アルカリ刺激で増加した細胞内Ca²⁺のNa⁺-Ca²⁺交換体による石灰化前線への排出が象牙質形成に関与する可能性が示唆された。加えて、象牙芽細胞におけるアルカリ刺激の受容は脱感作しないこと、アルカリ環境では細胞外Ca²⁺に対する感受性が高いことが示された。

研究成果の概要(英文)：In odontoblasts, alkaline stimuli activate the intracellular Ca²⁺ signaling pathway via Ca²⁺ influx from the extracellular space and intracellular Ca²⁺ release. These high-pH induced Ca²⁺ mobilizations showed dependence on extracellular Ca²⁺; TRPA1 channels mediated the Ca²⁺ influx. The plasma membrane and intracellular high-pH-sensing mechanisms in odontoblasts may play an important role in cellular functions during dentinogenesis induced by calcium hydroxide.

研究分野：口腔生理学

キーワード：象牙芽細胞 アルカリ刺激

1. 研究開始当初の背景

象牙芽細胞は神経堤由来の象牙質形成細胞である。象牙質表面に加えられた刺激は、修復あるいは防御機転としての生涯にわたる象牙質形成を誘発する。歯科臨床では第三象牙質、象牙質橋 (dentin bridge) 形成を誘発する目的で水酸化カルシウム製剤や mineral trioxide aggregate (MTA) が使用されている。これらの薬剤を、象牙質表面・歯髄内に投与すると強アルカリ性 (pH=10~12) を示す事で、反応性の第三象牙質形成や、象牙質橋形成を誘発すると考えられているが、これら水酸化カルシウム製剤・MTA による象牙質形成の詳細な駆動メカニズムについては謎のまま残されている。

2. 研究の目的

象牙質・歯髄への高アルカリ刺激に伴う反応性象牙質形成機構を明らかにするため、感覚受容分子センサーである TRP チャネル、なかでも高 pH 感受性 TRP チャネルに着目し、象牙芽細胞における高アルカリ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、TRPA1 チャ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 Ca²⁺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 Ca²⁺指示薬 (Fura-2) を負荷し、細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_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アルカリ刺激誘発性の電流を計測した。

4. 研究成果

(1) アルカリ刺激は [Ca²⁺]_i を増加する

細胞外 Ca²⁺存在下 (2.5 mM) において、pH 10 Krebs 溶液を投与すると、一過性に [Ca²⁺]_i は増加した。その後、3 分間隔で 1 分間の pH 10 Krebs 溶液の投与を行ったところ、4 回目の投与まで [Ca²⁺]_i 増加は変化しなかった。このことからアルカリ刺激による [Ca²⁺]_i 増加は脱感作しないことが示された。

(2) アルカリ刺激は細胞外から Ca²⁺ を流入する

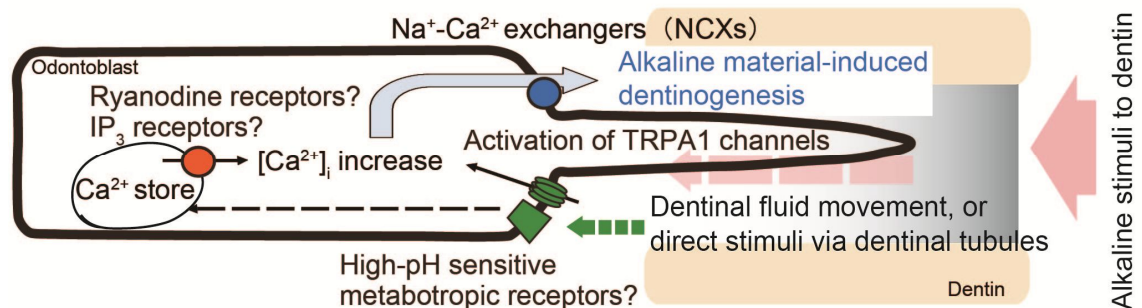
細胞外 Ca²⁺存在下 (2.5 mM) において、アルカリ溶液 (pH 8.5-10.5) を投与すると [Ca²⁺]_i が増加した。その増加は、細胞外 Ca²⁺非存在下において有意に減少した。細胞外 Ca²⁺存在下、細胞外 Ca²⁺非存在下ともに、アルカリ溶液誘発性の [Ca²⁺]_i 増加は pH 依存性を示した。pH 10.5 Krebs 溶液による [Ca²⁺]_i 増加のピーク値を最大値、pH 8.5 Krebs 溶液による [Ca²⁺]_i 増加のピーク値を最小値とした時、50% の反応を示す pH は細胞外 Ca²⁺存在下 (2.5 mM) において 9.63、細胞外 Ca²⁺非存在下において 9.83 であった。

(3) アルカリ刺激は細胞外 Ca²⁺濃度依存性に [Ca²⁺]_i を増加する

細胞外 Ca²⁺濃度変化時 (0.01-5.0 mM)、アルカリ溶液 (pH 7.5-9.5) を投与すると細胞外 Ca²⁺濃度依存性に [Ca²⁺]_i が増加した。アルカリ溶液による [Ca²⁺]_i 増加の EC₅₀ は 1.04 mM (pH 7.5)、0.46 mM (pH 8.5)、0.11 mM (pH 9.5) であった。(2) と (3) の結果より、アルカリ刺激による [Ca²⁺]_i 増加は pH と細胞外 Ca²⁺濃度に依存することから、細胞外 pH が高いほど細胞外 Ca²⁺濃度感受性が高くなることが示された。

(4) アルカリ刺激は内向き電流を誘発する

細胞外 Ca²⁺存在下 (2.5 mM) において、pH 9 Krebs 溶液を投与すると、内向き電流が誘発



された。その後、3分間隔で1分間のpH 9 Krebs溶液の投与を行ったところ、3回目の投与まで内向き電流の振幅は変化せず、脱感作しなかった。アルカリ刺激誘発性電流は細胞外pH依存性(pH 8-10)を示し、50%の反応を示すpHは8.90であった。

(5) TRPA1チャンネルアンタゴニストはアルカリ刺激誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加を抑制する細胞外 Ca^{2+} 存在下(2.5 mM)において、pH 10 Krebs溶液を投与すると、一過性に $[Ca^{2+}]_i$ は増加した。その増加はTRPA1チャンネルアンタゴニストであるHC030031の投与で有意に抑制された。この結果からアルカリ刺激はTRPA1チャンネルによって受容されることが示された。

(6) アルカリ刺激により増加した細胞内 Ca^{2+} は Na^+-Ca^{2+} 交換体(NCX)により排出されるNCX阻害薬であるKB-R7943をアルカリ溶液に加えて投与したときのピークから投与終了時までの蛍光強度比の差はアルカリ溶液のみを投与した時より小さくなった。この結果からアルカリ刺激により増加した細胞内 Ca^{2+} はNCXにより排出され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 8 件)

Shibukawa Y, Sato M, Kimura M, Tazaki M. (他 8 名, 3 番目) Odontoblasts as sensory receptors: transient receptor potential channels, pannexin-1, and ionotropic ATP receptors mediate intercellular odontoblast-neuron signal transduction. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 2014;467(4):843-63. doi: 10.1007/s00424-014-1551-x (査読有)

Soya M, Sato M, Sobhan U, Tsumura M (旧姓津村), Ichinohe T, Tazaki M, Shibukawa Y. Plasma membrane stretch activates transient receptor potential vanilloid and ankyrin channels in Merkel cells from hamster buccal mucosa. *Cell Calcium*, 2014;55(4):208-218. doi: 10.1016/j.ceca.2014.02.015 (査読有)

津村麻記, 佐藤正樹, 田崎雅和, 澁川義幸. (他 4 名, 2 番目) グアヤコールは象牙芽細胞の細胞内 Ca^{2+} 流入を活性化する. *歯科学報*, 2013;116(6):593-598. <http://hdl.handle.net/10130/3219> (査読有)

Tsumura M, Sato M, Tazaki M, Shibukawa Y. (他 6 名, 1 番目) Functional expression of TRPM8 and TRPA1 channels in rat odontoblasts. *Plos One*, 2013;8(12):e82233. doi: 10.1371/journal.pone.0082233 (査読有)

Sobhan U, Sato M, Shinomiya T, Okubo M, Tsumura M, Muramitsu T, Kawaguchi M, Tazaki M, Shibukawa Y. Immunolocalization and distribution of functional temperature-sensitive TRP channels in salivary glands. *Cell and Tissue Research*, 2013;354(2):507-519. doi: 10.1007/s00441-013-1691-x (査読有)

高橋史子, 津村麻記, Sobhan Ubaidus, 佐藤正樹, 田崎雅和, 澁川義幸. 象牙芽細胞におけるtransient receptor potential melastatin subfamily member 8チャンネルの発現の検索. *医学と生物学*, 2013;157(6-2): 985-990 (査読有)

Sato M, Tsumura M, Tazaki M, Shibukawa Y. (他 6 名, 3 番目) Hypotonic-induced stretching of plasma membrane activates TRPV channels and sodium-calcium exchangers in mouse odontoblasts. *Journal of Endodontics*, 2013;39(6):779-787. doi: 10.1016/j.joen.2013.01.012 (査読有)

Kuroda H, Sobhan U, Sato M, Tsumura M, Ichinohe T, Tazaki M, Shibukawa Y. Sodium-calcium exchangers in rat trigeminal ganglion neurons. *Molecular Pain*, 2013;9:22. doi: 10.1186/1744-8069-9-22 (査読有)

[学会発表](計 21 件)

Shimada M, Kimura M, Sato M, Sobhan U, Tazaki M, Shibukawa Y. Guaiacol activates TRPV3 channels in mouse odontoblast-lineage cells. グアヤコールは象牙芽細胞のTRPV3チャンネルを活性化する. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会合同大会, 平成27年3月21-23日, 神戸市

Kimura M, Sato M, Kojima Y, Higashikawa A, Nishiyama A, Satou R, Shiozaki Y, Shimada M, Ogura K, Mochizuki H, Shibukawa Y, Tazaki M. Ca^{2+} signaling activated by alkaline environment in rat odontoblasts. 象牙芽細胞におけるアルカリ活性化 Ca^{2+} シグナリング. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会合同大会, 平成27年3月21-23日, 神戸市

Kojima Y, Higashikawa A, Kimura M, Sato M, Ogura K, Mochizuki H, Shibukawa Y, Tazaki M. Voltage-dependent calcium influx pathway in rat odontoblasts. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92

回日本生理学会大会合同大会,平成27年3月21-23日,神戸市

Higashikawa A, Kojima Y, Kimura M, Sato M, Ogura K, Mochizuki H, Shibukawa Y, Tazaki M. Merkel cells transduce mechanical stimuli and release neurotransmitters. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会合同大会,平成27年3月21-23日,神戸市

Nishiyama A, Sato M, Kimura M, Katakura A, Tazaki M, Shibukawa Y. Intercellular odontoblast networks via extracellular glutamate. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会合同大会,平成27年3月21-23日,神戸市

Shiozaki Y, Sato M, Kimura M, Shibukawa Y, Sato T, Tazaki M. Functional expression of P2X₇ receptors in odontoblasts. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会合同大会,平成27年3月21-23日,神戸市

倉澤馨,佐藤正樹,木村麻記,小島佑貴,東川明日香,小倉一宏,望月浩幸,川口綾,西山明宏,塩崎雄大,佐藤涼一,澁川義幸,田崎雅和. 象牙芽細胞における酸感受性タンパク質の機能検索. 第298回東京歯科大学学会,平成26年10月18-19日,東京都

塩崎雄大,佐藤正樹,木村麻記,澁川義幸,佐藤亨,田崎雅和. 象牙芽細胞におけるイオンチャンネル型ATP受容体サブタイプ(P2X₇)の機能発現. 第298回東京歯科大学学会,平成26年10月18-19日,東京都

東川明日香,小島佑貴,木村麻記,佐藤正樹,小倉一宏,望月浩幸,澁川義幸,田崎雅和. メルケル細胞は機械刺激を受容し神経伝達をする. 第298回東京歯科大学学会,平成26年10月18-19日,東京都

小島佑貴,東川明日香,木村麻記,佐藤正樹,澁川義幸,田崎雅和. ラット象牙芽細胞における電位依存性Ca²⁺透過性チャンネル発現の検討. 第298回東京歯科大学学会,平成26年10月18-19日,東京都

東川明日香,小島佑貴,木村麻記,佐藤正樹,小倉一宏,望月浩幸,澁川義幸,田崎雅和. Merkel細胞は機械刺激を受容し神経伝達を行う. 第56回歯科基礎医学会学術大会,平成26年9月25-27日,福岡市

西山明宏,佐藤正樹,木村麻記,田崎雅和,

片倉朗,澁川義幸. グルタミン酸による象牙芽細胞-象牙芽細胞間シグナル伝達. 第56回歯科基礎医学会学術大会,平成26年9月25-27日,福岡市

陽田みゆき,木村麻記,佐藤正樹,田崎雅和,澁川義幸. グアヤコールの前投与は象牙芽細胞における低浸透圧刺激誘発性Ca²⁺流入を抑制する. 第56回歯科基礎医学会学術大会,平成26年9月25-27日,福岡市

倉澤馨,佐藤正樹,木村麻記,小島佑貴,東川明日香,小倉一宏,望月浩幸,陽田みゆき,澁川義幸,田崎雅和. 象牙芽細胞における酸・機械刺激誘発性Ca²⁺流入はamilorideで抑制される. 第56回歯科基礎医学会学術大会,平成26年9月25-27日,福岡市

澁川義幸,佐藤正樹,木村麻記,小島佑貴,東川明日香,田崎雅和.(他2名,3番目) Odontoblast hydrodynamic receptor theory: TRP チャンネルによって仲介される象牙質痛覚発現機構. 第56回歯科基礎医学会学術大会,2014年9月(招待講演)

木村麻記,佐藤正樹,小島佑貴,東川明日香,陽田みゆき,小倉一宏,望月浩幸,田崎雅和,澁川義幸. 象牙芽細胞のアルカリ感受性象牙質形成機構の解明. 第56回歯科基礎医学会学術大会,平成26年9月25-27日,福岡市

陽田みゆき,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TRPV3チャンネルに作用する. 第55回歯科基礎医学会学術大会,平成25年9月20-22日,岡山市

佐藤正樹,津村麻記, Sobhan Ubaidus, 児玉紗耶香,陽田みゆき,西山明宏,望月浩幸,小倉一宏,田崎雅和,澁川義幸. マウス由来象牙芽細胞における細胞膜伸展受容TRPチャンネルとNa⁺-Ca²⁺ exchangerの機能連関. 第55回歯科基礎医学会学術大会,平成25年9月20-22日,岡山市

津村麻記,佐藤正樹, Sobhan Ubaidus, 児玉紗耶香,陽田みゆき,西山明宏,田崎雅和,澁川義幸. 象牙芽細胞におけるアルカリ感受性の検討. 第55回歯科基礎医学会学術大会,平成25年9月20-22日,岡山市

Shibukawa Y, Sato M, Tsumura M, Kuroda H, Sobhan U and Tazaki M. Odontoblast as sensory receptor cell:

TRP channels, pannexin 1 and P2X3 receptor coupling mediate sensory transduction in dentin. 11th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation (TMD2013), May 26-31th, La Londe Les Maures, France

②Sato M, Tsumura M, Sobhan U, Tazaki M and Shibukawa Y. Expression of TRPM8 and TRPA1 channels in rat odontoblasts. 11th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation (TMD2013), May 26-31th, La Londe Les Maures, France

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木村 麻記 (Kimura, Maki)

東京歯科大学・歯学部・客員講師

研究者番号：9 0 5 8 2 3 4 6