

Title	Plasma membrane stretch activates transient receptor potential vanilloid and ankyrin channels in Merkel cells from hamster buccal mucosa
Author(s)	征矢, 学
Journal	, (): -
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/3413">http://hdl.handle.net/10130/3413</a>
Right	

氏名	征矢 学
学位	博士 (歯学)
学位記番号	第2026号 (甲 第1260号)
学位授与年月日	平成26年 3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項
論文審査委員	主査 村松 敬 教授 副査 一戸 達也 教授 副査 柴原 孝彦 教授 副査 田崎 雅和 教授 副査 山本 仁 教授
学位論文名	Plasma membrane stretch activates transient receptor potential vanilloid and ankyrin channels in Merkel cells from hamster buccal mucosa

## 学位論文内容の要旨

### 1. 研究目的

感覚は刺激としてのエネルギーが感覚受容器に作用することで生じる。感覚受容器のなかでも口腔粘膜上皮に存在するメルケル細胞は自由神経終末と複合体を形成し、機械刺激を受容する機械受容器として働くと考えられている。しかし、メルケル細胞の機械刺激受容のメカニズムについて機能的に明らかにされていない。近年、感覚受容分子センサーとして、Transient receptor potential (TRP) channel が広く研究されている。そこで、メルケル細胞における機械刺激受容メカニズムを明らかにするため、機械刺激により生じる細胞膜変形を低浸透圧溶液による細胞膜伸展刺激と置き換え、細胞膜伸展における機械感受性 TRP channel 活性化による細胞内  $Ca^{2+}$  動員について検討した。

### 2. 研究方法

ゴールデンハムスター (4 週齢、雄性) にメルケル細胞マーカーのキナクリンを腹腔内投与し、頬粘膜触小体に存在するメルケル細胞を急性単離した。単離メルケル細胞を用いて、機械感受性 TRP channel の発現と機能検索のために免疫蛍光染色、Fura-2 AM を用いた細胞内遊離  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 測定を行った。

### 3. 研究成績および考察

免疫蛍光染色によりメルケル細胞に TRP vanilloid-1 (TRPV1)、TRPV2、TRPV4、TRP ankyrin-1 (TRPA1)、TRP melastatin-8 (TRPM8) channel の発現を認めた。細胞外  $Ca^{2+}$  存在下で高濃度 KCl 溶液による脱分極刺激を行うとメルケル細胞は一過性の  $[Ca^{2+}]_i$  増加を認めたが、メルケル細胞以外の上皮細胞

ではその応答を認めなかった。細胞外液の浸透圧を等張液から低浸透圧溶液に置き換えると、低浸透圧依存性に細胞の膨化が起こり、細胞膜伸展を生じた。細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  存在下でメルケル細胞に低浸透圧刺激による細胞膜伸展刺激を行うと、細胞膜伸展の程度と一致して低浸透圧依存性に一過性の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加を認めた。また、細胞膜伸展刺激による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加は、TRPV1、TRPV2、TRPV4、TRPA1 channel antagonist により有意に抑制されたが、TRPM8 channel antagonist はその抑制を認めなかった。細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で TRPV1、TRPV2、TRPV4、TRPA1、TRPM8 channel agonist 刺激を行うと、一過性の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加を認めたが、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下では認めなかった。

#### 4. 結論

本研究の結果から、メルケル細胞は低浸透圧刺激による細胞膜伸展が起こると TRPV1、TRPV2、TRPV4、TRPA1 channel を介して、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入を引き起こすことが示唆された。TRPV1、TRPV2、TRPV4、TRPA1 channel は細胞膜伸展を感知するセンサープロテインとして働いており、TRPM8 channel の発現は認めるものの、細胞膜伸展の感知には関与しないことが示唆された。また、メルケル細胞に存在する機械刺激感受性 TRP channel を経由した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  増加は、メルケル細胞が神経とシナプス伝達を介して、感覚を感知するためのトリガーとして働き、口腔粘膜において機械受容器として働くことが示唆された。

最終試験の結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第1260号	氏名	征矢 学
最終試験担当者	主 査	村松 敬	教 授
	副 査	一戸 達也	教 授
		柴原 孝彦	教 授
		田崎 雅和	教 授
		山本 仁	教 授
最終試験施行日	平成25年12月18日		
試験科目	歯科麻酔学		
試験方法	口頭試問		
試験問題	主題ならびに関連問題		
<p><u>結果の要旨</u></p> <p>本審査委員会は主題ならびに関連問題について最終試験を行った結果、十分な学識を有することを認め、合格と判定した。</p>			

## 学位論文審査の要旨

メルケル細胞は脊椎動物において神経との複合体を形成し、機械刺激を受容していると考えられているが、刺激を感知するセンサープロテインの発現や刺激受容のメカニズムについては機能的に明らかにされていない。そこで、ハムスター頬粘膜から急性単離したメルケル細胞において機械刺激感受性 TRP channel の機能的発現について検討を行った。免疫蛍光染色と細胞内遊離  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )を  $\text{Ca}^{2+}$  imaging 法にて測定した。その結果、免疫蛍光染色から TRPV1、TRPV2、TRPV4、TRPA1、TRPM8 channel の発現を認めた。それらのうち TRPV1、TRPV2、TRPV4、TRPA1 channel は細胞膜伸展を感知するセンサープロテインとして働いており、メルケル細胞が口腔粘膜において機械受容器として働くことが示唆された。

本審査委員会では、1. 使用動物、動物の加齢変化による影響、2. メルケル細胞-神経終末複合体からメルケル細胞のみを単離したことの妥当性、3. TRP channel の選択理由について、4. 低浸透圧溶液による細胞内組成変化に伴う影響の有無、5. Stretch activated channel との関連性などについて質問および指摘があった。これらの質問に対して、1. 口腔粘膜から単離可能なメルケル細胞存在部位としてハムスター頬粘膜触小体を選択したこと、触小体からの細胞単離の可否は加齢変化による影響を受けるため、メルケル細胞の機能分化の面から4週齢のハムスターは適切な時期であること、2. メルケル細胞-神経終末複合体からメルケル細胞のみ単離し検討することで複合体のうち機械受容器が自由神経終末側でなくメルケル細胞であることの機能的証明をした点で実験方法は妥当であること、3. TRP channel について機械刺激感受性 TRP channel のうち選択的 agonist、antagonist が存在するものを選択したこと、4. 低浸透圧溶液灌流下の一連の刺激後にデータが基線に戻ることから細胞内の組成変化による影響は考えられないこと、4. Stretch activated channel は現在 TRPV4 channel と同義語として報告されていること、と回答した。加えて、関連質問や文章構成、英語表現について指摘があった。

本研究で得られた結果は、今後の歯学の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。