

Title	Intercellular odontoblast communication via ATP mediated by pannexin-1 channel and phospholipase C-coupled receptor activation
Author(s)	古屋, 忠
Journal	歯科学報, 117(2): 156-157
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/4219">http://hdl.handle.net/10130/4219</a>
Right	
Description	

氏名(本籍)	ふるや 古屋 忠 (東京都)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第 2117 号(乙第 791 号)
学位授与の日付	平成27年9月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Intercellular odontoblast communication via ATP mediated by pannexin-1 channel and phospholipase C-coupled receptor activation
掲載雑誌名	Frontiers in Physiology 第6巻 326頁 2015年 doi : 10.3389/fphys.2015.00326
論文審査委員	(主査) 佐藤 亨教授 (副査) 矢島 安朝教授 村松 敬教授 田崎 雅和教授 山本 仁教授

## 論文内容の要旨

### 1. 研究目的

歯髄最外層、象牙質直下に位置する象牙芽細胞は、様々な侵害刺激を受容する細胞膜タンパク質である transient receptor potential (TRP) チャンネルを機能的に発現している感覚受容細胞である。

歯を含む硬組織の形成では細胞間連絡による協調的細胞機能調節が重要であり、象牙芽細胞間にはギャップ結合を介した電気的細胞間連絡があることが報告されている。また、象牙芽細胞には G タンパク質共役型 ATP-ADP 感受性ホスホリパーゼ C (PLC) 結合型ヌクレオチド受容体の機能的発現が報告されているが、詳細な象牙芽細胞機械刺激による細胞間の連絡機構のメカニズムはまだ明らかにされていない。

そこで単一細胞への直接機械刺激を行った時の象牙芽細胞間における情報伝達機構を検討した。

### 2. 研究方法

象牙芽細胞の継代培養細胞であるマウス由来象牙芽細胞系細胞 (odontoblast lineage cells, OLC, Arany et al., 2009; Fujisawa et al., 2012) の細胞膜にガラス微小管 (先端直径 2 - 3  $\mu\text{m}$ ) を用いて、単一象牙芽細胞に対する細胞膜直接機械刺激を行った。細胞膜表面の直上から、マイクロマニピレーターを用いて 4.3, 8.5, 12.5  $\mu\text{m}$  とガラス微小管を垂直に移動 (速度: 2.2  $\mu\text{m}/\text{秒}$ ) させることで直接機械刺激を行った。機械刺激に対する象牙芽細胞の応答はカルシウム蛍光指示薬である fura-2/AM を用いて二波長励起による細胞内カルシウムイオン濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の変化を多点同時に多細胞から記録した。また  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  応答と細胞間距離の関係についても検討した。

### 3. 研究成績および結論

象牙芽細胞に直接機械刺激を加えると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が一過性に増加した。一方、カプサイシン感受性のある TRP vanilloid subfamily member 1 (TRPV1) チャンネルの阻害剤であるカプサゼピンは、機械刺激誘発性  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加を有意に抑制した。また細胞外カルシウムを除去すると機械刺激誘発性  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の一過性増加は消失した。加えて直接機械刺激した象牙芽細胞の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が増加するだけでなく、刺激象牙芽細胞に接触せず周囲に存在する近傍象牙芽細胞においても  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が増加した。一方でヒト胎児由来腎臓細胞 (human embryonic kidney cells; HEK293 cells) に対して同様の直接機械刺激を行ったところ、刺激された HEK293 cells では  $[\text{Ca}^{2+}]_i$

が増加したが、近傍 HEK293 cells では $[Ca^{2+}]_i$  増加はみられなかった。

次に細胞からの ATP 放出に関与する pannexin-1 の阻害剤である mefloquine の効果を検討した。Mefloquine は刺激象牙芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$  増加には影響しなかったが、近傍象牙芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$  増加を濃度依存的に抑制した。機械刺激細胞から放出された ATP を受容する細胞膜タンパク質を明らかにするために、P2Y 受容体と結合し、細胞内 inositol trisphosphate ( $IP_3$ ) 生成に関与する phospholipase-C (PLC) の阻害剤である U73122 の効果を検討した。U73122 は刺激象牙芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$  増加には影響しなかったが、近傍象牙芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$  増加を濃度依存的に抑制した。

象牙芽細胞は機械感受性 TRP チャネルを介して $[Ca^{2+}]_i$  を増加した。機械刺激により増加した $[Ca^{2+}]_i$  は pannexin-1 からの ATP 放出を誘発する。刺激象牙芽細胞外に放出された ATP は、周囲に存在する近傍象牙芽細胞の P2Y 受容体を活性化させることで ATP による象牙芽細胞間情報伝達が確立すると示唆された。これらの結果は、ATP の傍細胞性分泌によって活性化する象牙芽細胞間情報伝達ネットワークが、象牙質表面刺激に伴う反応性象牙質形成の促進、あるいは感覚受容-伝達機構の変調をもたらす可能性を示唆している。

### 論文審査の要旨

象牙芽細胞の機械刺激による細胞間情報連絡機構のメカニズムを明らかにする目的で、単一象牙芽細胞への機械刺激を行い、細胞間の情報伝達機構を検討した。

その結果、象牙芽細胞への機械刺激は TRP チャネルを介して $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させ、ATP の放出を誘発し、近傍象牙芽細胞のホスホリパーゼ C 関連 (ATP/ADP) 受容体 (P2Y 受容体) を活性化させることで象牙芽細胞間の情報伝達を確立していることが示唆された。

本審査委員会では、1) 論文(象牙芽細胞間の情報伝達機構)の臨床的意義について質問がなされた。それに対し歯の切削後、最も刺激を受けた象牙芽細胞を中心に多くの細胞の間で空間的な情報伝達が生じ、刺激に応じた反応性象牙質形成が生じている可能性を回答した。また、これらの情報伝達機構が、将来的な象牙質再生を促す創薬の基礎的根拠をなすであろう旨の回答がなされた。2) 象牙芽細胞機械刺激が反応性象牙質形成を誘発するか否かについて、象牙質特異的タンパク質発現の検討に関する質問がなされた。本細胞に機械(細胞膜伸展)刺激を行うと、象牙質特異的タンパク質 mRNA の発現増加がみられることを回答した。この研究結果は、すでに誌上報告している旨の回答も併せてなされた。3) 論文内で「反応性象牙質」という用語を用いていることに関して、現在の第三象牙質(補綴象牙質)の考え方に対する質問がなされた。近年、補綴象牙質は、刺激に伴い象牙芽細胞が形成する「反応性象牙質」と、刺激による象牙芽細胞の壊死と、結果としての歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化によって形成される「修復象牙質」に区別されている旨の説明がなされた。4) その他、文章の構成、用語の統一、英語表現についての指摘があり訂正が行われた。

本研究から得られた結果は、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。また英語およびドイツ語の2科目についても、十分な知識があると認め合格と認定した。