

Title	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
Author(s)	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
Journal	歯科学報, 112(4): 540-540
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/2865">http://hdl.handle.net/10130/2865</a>
Right	

No.7: ラット三叉神経節細胞における P2Y<sub>12</sub> 受容体の発現検索

川口 綾<sup>1)2)</sup>, 征矢 学<sup>1)2)</sup>, 黒田英孝<sup>1)2)</sup>, 佐藤正樹<sup>1)</sup>, 田崎雅和<sup>3)</sup>, 一戸達也<sup>2)</sup>, 澁川義幸<sup>1)3)</sup>  
 (東歯大・口科研・hrc8)<sup>1)</sup> (東歯大・歯麻)<sup>2)</sup> (東歯大・生理)<sup>3)</sup>

**目的:** 口腔粘膜上皮や歯の感覚をつかさどる三叉神経に障害が生じると神経障害性疼痛を引き起こす。しかしその“痛み”のメカニズムに関しては、急激に研究が進んでいる一方で分子生物学的知見は少なく、また不明な点も多い。後根神経節を用いた実験から、ニューロン・グリア細胞膜上の ATP 受容体活性が、神経障害性疼痛のメカニズムの一つであることが明らかとなった。ATP 受容体は細胞外ヌクレオチドをアゴニストとする細胞膜上の受容体であり、イオンチャネル型 P2X 受容体 (サブタイプ: P<sub>2</sub>X<sub>1,7</sub>) と GTP 結合タンパク質共役型 P2Y 受容体 (サブタイプ: P<sub>2</sub>Y<sub>1,2,4,6,11-14</sub>) に大別される。現在、感覚神経上の P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>2,3</sub> やグリア細胞上の P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>12</sub> が神経障害性疼痛に関与するとされている。

これらの結果を基に、三叉神経節に存在する ATP 受容体の検索が遂行されてきた。P2Y<sub>12</sub> において、サテライトグリア細胞での病理学的・機能的発現が確認され、神経障害性疼痛への関与が示唆されてきた。しかし、実際に損傷を受けるニューロンに関しては、P2Y<sub>12</sub> の mRNA 発現は確認されているものの、機能的発現に関する報告は非常に限られている。そこで今回ラット三叉神経節ニューロンにおける P2Y<sub>12</sub> 受容体の機能的検索を行うこととした。

**方法:** 新生仔 Wistar/ST ラット (7日齢) より急性単離した三叉神経節を初代培養し、免疫組織化学染色および Ca<sup>2+</sup> 蛍光色素である fura-2 を用いた細胞内遊離 Ca<sup>2+</sup> 濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) を行った。

**成績および考察:** P2Y<sub>12</sub> 受容体は細胞体・軸索に存在し、A ニューロンマーカーである NF-H と、共存した。初代培養三叉神経節細胞に、細胞外 Ca<sup>2+</sup> 存在下で P2Y<sub>1,12,13</sub> agonist である 2-Methylthio-ADP を投与すると、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は一過性に増加し、濃度依存性 (EC<sub>50</sub> = 0.03 μM) を示した。この増加は P2Y<sub>12</sub> antagonist である AR-C 66096 により濃度依存的 (IC<sub>50</sub> = 4.0 nM) に抑制された。2-Methylthio-ADP を投与した際の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の一過性の増加は細胞外 Ca<sup>2+</sup> 非存在下においても確認された。この応答は、細胞外 Ca<sup>2+</sup> 存在下での応答との間に有意差を認められなかった。これらの結果より、P2Y<sub>12</sub> 受容体は A ニューロンに局在し、細胞内 Ca<sup>2+</sup> ストアからの Ca<sup>2+</sup> 放出を活性化する可能性が示唆された。

今後は、顎顔面神経障害性疼痛モデルラットを応用し、P2Y<sub>12</sub> 受容体と神経障害性疼痛の関連性を検索することで、さらなる三叉神経支配領域における侵害受容性疼痛や神経障害性疼痛について考察していきたいと考える。

## No.8: 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

佐藤正樹<sup>1)</sup>, 津村麻記<sup>1)2)</sup>, 黒田英孝<sup>1)3)</sup>, 川口 綾<sup>1)3)</sup>, Sobhan Ubaidus<sup>1)</sup>, 西山明宏<sup>4)</sup>,  
 吉成正雄<sup>1)5)</sup>, 井上 孝<sup>1)6)</sup>, 田崎雅和<sup>2)</sup>, 澁川義幸<sup>1)2)</sup> (東歯大・口科研・hrc8)<sup>1)</sup> (東歯大・生理)<sup>2)</sup>  
 (東歯大・歯麻)<sup>3)</sup> (東歯大・オーラルメディシン口外)<sup>4)</sup> (東歯大・理工)<sup>5)</sup> (東歯大・臨検病理)<sup>6)</sup>

**目的:** 象牙芽細胞は象牙質形成細胞であり、様々な侵害刺激に対して感受性をもつ侵害刺激受容細胞である。しかし刺激を受容した象牙芽細胞が、三叉神経節細胞を興奮させる仕組みについてはいまだ明らかではない。本研究は象牙芽細胞と象牙芽細胞、象牙芽細胞と三叉神経節細胞における興奮連絡様式を明らかにすることを目的とした。

**方法:** 実験には継代培養されたマウス由来象牙芽細胞系細胞 (odontoblast lineage cells, OLC) と、5~9日齢の新生児ラットから採取した象牙芽細胞と三叉神経節細胞を初代培養して用いた。細胞への刺激はガラス微小電極を用い、単一細胞への細胞膜伸展刺激を行った。刺激受容細胞と周辺細胞の活性は、カルシウム蛍光試薬を用いた二波長励起による蛍光比を記録した。

**成績:** OLC への直接刺激は、刺激 OLC と周辺 OLC の細胞内カルシウムイオン濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) を増加した。また [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の増加は刺激 OLC からの距離に依存した。刺激 OLC の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 増加は、TRPV1 チャンネルの阻害剤である 1 μM capsaizepine により抑制された。ATP 放出に関与する Pannexin-1

(PANX-1) の阻害剤である mefloquine は、周辺 OLC の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 増加を濃度依存的に抑制した。象牙芽細胞と三叉神経節細胞の共培養系では、刺激象牙芽細胞と周辺象牙芽細胞・三叉神経節細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> が増加した。加えて mefloquine は濃度依存的に周辺象牙芽細胞・三叉神経節細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 増加を抑制した。また P2X 受容体の阻害剤である NF110, P2Y 受容体の阻害剤である U-73122 は、周辺三叉神経節細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の増加を濃度依存的に抑制した。

**考察:** 象牙芽細胞による修復象牙質形成反応は、TRP チャンネルが受容した侵害刺激強度に依存し、刺激受容象牙芽細胞から放出される ATP が PANX-1 を介して隣接する象牙芽細胞へ拡散することで、直接侵害刺激を受容していない象牙芽細胞における修復象牙質形成を促すと考えられる。さらに象牙芽細胞が放出する ATP は三叉神経節細胞の ATP 受容体にも作用し、三叉神経節細胞を活性化すると考えられる。以上の結果は、象牙芽細胞が一次感覚受容細胞である可能性を強く示唆するものである。