

Title	Voltage-dependent Sodium Channels and Calcium-activated Potassium Channels in Human Odontoblasts In Vitro
Author(s)	市川, 秀樹
Journal	歯科学報, 113(1): 102-103
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/3013">http://hdl.handle.net/10130/3013</a>
Right	

氏名(本籍)	いちかわひでき 市川秀樹 (北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1950号(甲第1196号)
学位授与の日付	平成24年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Voltage-dependent Sodium Channels and Calcium-activated Potassium Channels in Human Odontoblasts <i>In Vitro</i>
掲載雑誌名	Journal of Endodontics 第38巻 10号 1355-1362頁 2012年10月
論文審査委員	(主査) 田崎 雅和教授 (副査) 川口 充教授 東 俊文教授 澁川 義幸講師 一戸 達也教授

### 論文内容の要旨

#### 1. 研究目的

細胞膜間のイオン移動に伴うシグナル伝達は、生理学および病理学的な数多くの細胞過程を調節している。ヒト象牙芽細胞では様々なイオンチャネルの発現が報告されているが、それらイオンチャネル間の機能関連と細胞機能における役割については明らかにされていない。そこで、ヒト歯髄から抽出した象牙芽細胞における電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネルの生物物理学特性について検索をおこなった。加えて、ブラジキニン(BK)受容体活性化による細胞内 Ca<sup>2+</sup>動員、および Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>チャネルとの機能関連について検討した。

#### 2. 研究方法

実験材料にはヒト歯髄細胞由来象牙芽細胞(HOB細胞)を使用した。HOB細胞は、10%FBSおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシン(invitrogen社)を含むα-MEM(Invitrogen社)で培養した。イオンチャネルを流れる細胞膜電流はホールセルパッチクランプ法で記録した。また、Fura-2蛍光を用いた細胞内遊離 Ca<sup>2+</sup>濃度計測を行った。

#### 3. 研究成績および考察

HOB細胞の静止電位は $-27.6 \pm 4.0$  mV、膜容量は $50.6 \pm 10.1$  pFであった。保持電位 $-70$  mVからの脱分極パルスを与えると、内向き電流が記録された。しかし、保持電位 $-40$  mVでは内向き電流は記録されなかった。また、細胞外液のNa<sup>+</sup>をtrisに置換し、細胞外Na<sup>+</sup>を除去すると内向き電流は消失した。また電位依存性Na<sup>+</sup>チャネルブロッカーであるテトロドトキシン(TTX)(1 μM)を細胞外投与すると内向き電流は完全に消失した。これらの結果は、ヒト象牙芽細胞から記録された内向き電流が電位依存性Na<sup>+</sup>チャネル電流であることを示している。電位依存性Na<sup>+</sup>チャネル電流の活性化・不活性化とともに急速で、活性化は膜電位に依存していた。定常状態の不活性化過程を示すV<sub>0.5</sub>(細胞膜上の電位依存性Na<sup>+</sup>チャネルの半数(50%)が不活性化状態となる細胞膜電位)は、 $-59.4 \pm 4.8$  mVであり、ヒト象牙芽細胞の静止電位レベルでは、ほぼ全ての電位依存性Na<sup>+</sup>チャネルが不活性化状態にあることを示している。従って、このチャネルが活性化状態となるには、細胞膜電位の過分極シフトが必要である。一方で、BKは細胞内ストアからのCa<sup>2+</sup>放出とストア依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルからのCa<sup>2+</sup>流入を活性化させた。そこで、保持電位 $-40$  mVで記録される外向き電流に、Oskおよびcharybdotoxinを投与すると、外向き電流は有意に抑制されたが、iberiotoxinは外向き電流に対して

効果を持たなかったことから、ヒト象牙芽細胞が中間コンダクタンス  $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{K}^{+}$  チャネルを有していることが示された。

#### 4. 結 語

以上の結果から、BK が HOB 細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させる事で、 $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{K}^{+}$  チャネルを活性化し、HOB 細胞を過分極させる結果、電位依存性  $\text{Na}^{+}$  チャネルが活性化される事が示された。HOB 細胞の電位依存性  $\text{Na}^{+}$  チャネルは、歯髄の炎症にともなって活性化し、細胞機能の調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。

### 論 文 審 査 の 要 旨

ヒト象牙芽細胞では様々なイオンチャネルの発現が報告されているが、それらイオンチャネル間の機能連関と細胞機能における役割については明らかにされていない。そこで、ヒト歯髄から抽出した象牙芽細胞における電位依存性  $\text{Na}^{+}$  チャネルおよび  $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{K}^{+}$  チャネルの生物物理学的特性について検討を行った。イオンチャネルを流れる細胞膜電流はホールセルパッチクランプ法で記録した。保持電位  $-70\text{mV}$  で脱分極パルスを与えると内向き電流が記録されたが、保持電位  $-40\text{mV}$  では外向き電流のみ記録された。細胞外液の  $\text{Na}$  を除去すると、内向き電流は消失し、テトロドトキシン (TTX) 投与によっても内向き電流は消失した。不活性化状態となる細胞膜電位  $V_{0.5}$  は、 $-59.4 \pm 4.8\text{mV}$  であり、HOB 細胞の静止電位レベル (約  $-29\text{mV}$ ) では、ほぼ全ての電位依存性  $\text{Na}^{+}$  チャネルが不活性化状態にあるが、細胞が過分極となれば活性化可能であると考えられた。一方、保持電位  $-40\text{mV}$  で記録された外向き電流に OSK 1, キャリブドトキシン (CTX) を細胞外投与したところ外向き電流の著明な減少を認めたのに対し、アジトキシン (AgTX), イベリオトキシン (ITX) を投与しても外向き電流に対して効果がみられなかったことからヒト象牙芽細胞では intermediate conductance  $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{K}^{+}$  チャネルを有していることが示唆された。

本審査委員会では、1. RT-PCR データの妥当性、2. 培養細胞の同定について、3. 統計処理についての質問および指摘があった。これらの質問に対する回答として RT-PCR データは直接本論文に参与するものではないので削除とし、培養細胞同定についての記述も削除とした。また、適切な多重比較を用いて解析データの修正を行った。加えて、論文の文章構成や英語表現などについての指摘があり、修正が行われた。

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。