

Title	グアヤコールは象牙芽細胞の細胞内Ca <sup>2+</sup> 流入を活性化 する
Author(s)	鷗田, みゆき; 津村, 麻記; 佐藤, 正樹; Sobhan, Ubaidus; 大多和, 由美; 山下, 秀一郎; 田崎, 雅和; 澁 川, 義幸
Journal	歯科学報, 113(6): 593-598
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/3219">http://hdl.handle.net/10130/3219</a>
Right	

## グアヤコールは象牙芽細胞の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 流入を活性化する

鷗田みゆき<sup>1)</sup> 津村麻記<sup>2)</sup> 佐藤正樹<sup>2)</sup> Sobhan Ubaidus<sup>2)</sup>  
 大多和由美<sup>1)</sup> 山下秀一郎<sup>3)</sup> 田崎雅和<sup>2)</sup> 澁川義幸<sup>2)</sup>

抄録：鎮痛効果の高い歯内療法薬として用いられるグアヤコールの象牙芽細胞に対する作用は明らかではない。本研究では、マウス由来の象牙芽細胞系細胞にグアヤコールを作用させた時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化をカルシウムイメージング法で測定し、グアヤコールの象牙芽細胞に対する作用を検討した。細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で象牙芽細胞にグアヤコールを投与すると細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は増加したが、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下ではその増加が認められなかった。このことからグアヤコールは細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  流入チャンネルに直接作用し、細胞外から  $\text{Ca}^{2+}$  を流入させることが示唆された。 $\text{Ca}^{2+}$  流入に関与するチャンネルを特定する目的で、TRPV2およびTRPV4チャンネルの阻害薬とグアヤコールを象牙芽細胞に同時投与し、グアヤコール単独投与時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化と比較した。その結果、グアヤコールはTRPV2・TRPV4チャンネルではなく、その他のTRPチャンネルを含めた  $\text{Ca}^{2+}$  流入チャンネルに作用し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を増加させることが示された。

### 緒 言

象牙芽細胞は、象牙質形成および石灰化を担う細胞で、発生過程における象牙質形成に関係するのみならず、象牙質表面刺激による反応性象牙質の形成

にも関与する。反応性象牙質形成は、象牙質への外的刺激から歯髄を保護するための生体防御反応であり<sup>1,2)</sup>、このことから象牙芽細胞が象牙質刺激を受けていることが示唆される<sup>3-6)</sup>。象牙芽細胞による象牙質刺激の受容は、本細胞が感覚受容細胞としても機能することを示唆している<sup>3-6)</sup>。細胞に加わる様々な機械的、温度的、化学的侵害刺激を受容する分子センサーに、transient receptor potential (TRP) チャンネルファミリーが知られている<sup>7-9)</sup>。TRPチャンネルは非選択的陽イオン透過性チャンネルで、スーパーファミリーを形成し、ほ乳類においては6つのサブファミリーに分けられている<sup>9)</sup>。その1つであるTRP vanilloid subfamily member (TRPV) チャンネルは種々の刺激に反応するポリモーダル受容器で、フェノール骨格を有するカプサイシンの受容体タンパク質としてクローニングされた<sup>10,11)</sup>。

フェノール系薬剤のグアヤコールは、古くは抜歯時の除痛に利用されたこともあり<sup>12)</sup>、高い鎮痛効果で知られる。現在、その優れた鎮痛効果は歯内療法薬として応用されている<sup>13,14)</sup>。グアヤコールはカプサイシンと同様なフェノール骨格を有し、構造が類似する化合物であることから、カプサイシン同様にTRPVチャンネルに作用する可能性が考えられる。フェノール系の薬剤の一つであるユージオールは、象牙芽細胞のTRPV1チャンネルに直接作用し、頻回投与で脱感作を誘発することが示唆されている<sup>15)</sup>。しかし、グアヤコールに関する細胞生理学的研究報告が少なく、象牙芽細胞に対する作用メカニズムについても未だ不明である。象牙芽細胞におけるTRPV1チャンネルの薬理的、生物物理学的特性は良く知られている<sup>5,6,16)</sup>。一方、象牙芽細胞におけるTRPV2およびTRPV4チャンネルの発現とそ

キーワード：グアヤコール、象牙芽細胞、TRPチャンネル

<sup>1)</sup> 東京歯科大学口腔健康臨床科学講座総合歯科学分野

<sup>2)</sup> 東京歯科大学生理学講座

<sup>3)</sup> 東京歯科大学口腔健康臨床科学講座歯科補綴学分野

(2013年8月16日受付)

(2013年9月18日受理)

別刷請求先：〒101-0061 東京都千代田区三崎町2-9-18

東京歯科大学口腔健康臨床科学講座総合歯科学分野

鷗田みゆき

の機械刺激感受性は知られているが<sup>3,17)</sup>, その薬理学的特性についての詳細は少ない。TRPV 2とTRPV 4チャンネルは, 温度感受性であると同時に, 機械刺激感受性を示す TRP チャンネルである。加えて, TRPV 4チャンネルは浸透圧刺激にも感受性を示し, いずれも象牙芽細胞の機械受容センサーとして注目されている<sup>17)</sup>。そこで本研究では, グアヤコールの象牙芽細胞への直接作用を検討する為, TRPV 2チャンネル, TRPV 4チャンネルに着目した。象牙芽細胞系細胞(mouse odontoblast lineage cells; OLC)にグアヤコールを作用させた時の細胞内遊離Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)の変化を測定し, 解析および検討を行った。

### 材料および方法

#### 1. マウス由来象牙芽細胞系細胞(mouse odontoblast lineage cells: OLC)調整

実験に使用した細胞は, マウス胎児歯乳頭細胞から培養され, 継代培養しても象牙芽細胞の特徴を保有する細胞である<sup>18-20)</sup>。本研究に用いた OLC は鹿児島大学徳田雅行先生から提供された。OLC は直径35mmの plastic dish (Corning, New York, USA) に播種し, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin, 1% fungizone (Invitrogen, Grand Island, New York, USA) を含む  $\alpha$ -modified eagle medium (Invitrogen) 中で, 2日間培養した(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。

#### 2. 溶液

標準細胞外液の組成は, 136mM NaCl, 5mM KCl, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM HEPES, 10mM glucose, 12mM NaHCO<sub>3</sub>であった(pH7.4; tris(hydroxymethyl)aminomethane)。細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化に, 細胞外Ca<sup>2+</sup>の存在が関与しているかを調べる際には, 標準細胞外液からCaCl<sub>2</sub>を除去したCa<sup>2+</sup> free細胞外液を調製して使用した。

#### 3. 試薬

グアヤコール(Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan)は, エタノールで stock solution を調製し, 標準細胞外液中で最終濃度0.9 $\mu$ M で実験に使用した。TRPV 2チャンネル阻害薬とし

て tetraethylammonium chloride (TEA) を使用した (Wako Pure Chemical Industries Ltd.)。TRPV 4チャンネル阻害薬は 2, 4-dichloro-N-isopropyl-N-(2-isopropylaminoethyl) benzenesulfonamide (RN 1734) を使用した (Tocris Bioscience, Bristol, UK)。Ca<sup>2+</sup>チャンネル非選択的阻害薬は lanthanum (III) chloride heptahydrate (La<sup>3+</sup>) を使用した (Sigma, St Louis, MO, USA)。

#### 4. 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度測定

OLC の生理活性は, 細胞内遊離Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)の変化を指標として測定した。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>はカルシウム蛍光プローブ fura-2-acetoxymethyl ester (fura-2/AM; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いたカルシウムイメージング法で可視化した。OLC を10 $\mu$ M fura-2/AM と0.1% (w/v) pluronic acid F-127 (Invitrogen) を含む標準細胞外液もしくはCa<sup>2+</sup> free細胞外液中で37°C, 60分間静置し, fura-2を負荷した。

Fura-2はCa<sup>2+</sup>と結合すると蛍光特性が変化する物質で, 励起波長は340nm と380nmの二波長である。細胞内にfura-2を導入した後, 二波長励起による510nmの蛍光強度(F<sub>340</sub>とF<sub>380</sub>)を測定し, その蛍光比(R<sub>F340/F380</sub>)として[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を表した。蛍光比は蛍光顕微鏡 (IX71; Olympus, Tokyo, Japan) と計測システム (Aquacosmos, Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) を用いて記録した。

#### 5. 解析

測定データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。実験数はNで示した。データはt検定または一元配置ANOVAによって有意差検定を行った。有意水準は5%に設定した。

## 結果

#### 1. グアヤコールによる細胞外Ca<sup>2+</sup>の流入

OLCの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>応答は, R<sub>F340/F380</sub>値変化(F)を, その静止時の値(F<sub>0</sub>)に対して標準化した(F/F<sub>0</sub>)。従って, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>応答記録のベースラインはF/F<sub>0</sub>=1.0とした。細胞外Ca<sup>2+</sup>存在下(2.5mM)で0.9 $\mu$ Mグアヤコールを投与すると[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の増加がみられた。グアヤコール投与による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>増加のピーク値は

1.  $1.12 \pm 0.03 F/F_0$  units ( $N = 4$ )であった。しかしながら、細胞外  $Ca^{2+}$  非存在下で同様に  $0.9 \mu M$  グアヤコールを投与した場合には  $[Ca^{2+}]_i$  の増加はみられなかった。細胞外  $Ca^{2+}$  非存在下でグアヤコール投与した際の  $[Ca^{2+}]_i$  増加のピーク値は  $0.88 \pm 0.03 F/F_0$  units ( $N = 4$ )であった。その後、細胞外  $Ca^{2+}$  存在下で再び  $0.9 \mu M$  グアヤコールを投与すると  $[Ca^{2+}]_i$  は増加した(図1)。細胞外  $Ca^{2+}$  存在下および  $Ca^{2+}$  非存在下でのグアヤコール投与による  $[Ca^{2+}]_i$  の増加量の間には統計学的な有意差が認められた(図1B,  $P < 0.05$ )。このことから、グアヤコールは細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入を誘発することが示された。

2. グアヤコールの TRPV 2 および TRPV 4 チャネル,  $Ca^{2+}$  チャネルに対する影響

グアヤコールによって誘発される細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入経路を検討するために、TRPV 2 チャネル

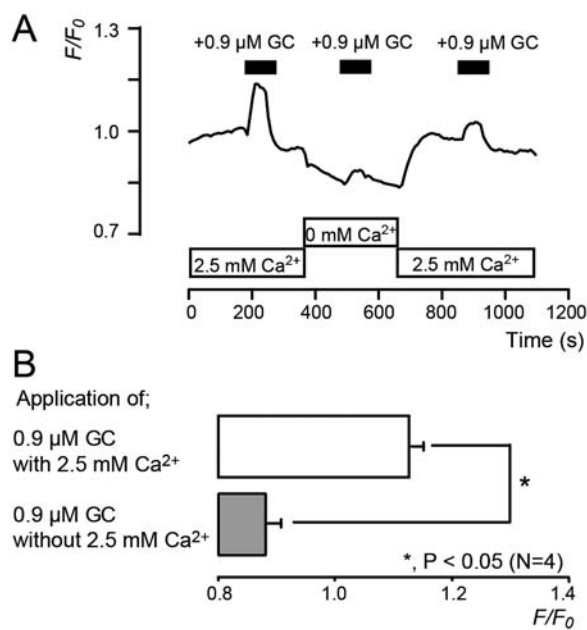


図1 グアヤコールによる細胞外  $Ca^{2+}$  の流入  
 (A)細胞外  $Ca^{2+}$  存在下(2.5mM)または非存在下(0 mM)(下部の白色のバー)における  $0.9 \mu M$  グアヤコール(GC)により誘発された一過性の  $[Ca^{2+}]_i$  増加。黒色のバーは細胞外液へのグアヤコールの投与時間を示す。(B)細胞外  $Ca^{2+}$  存在下(2.5mM)(白色のバー)と非存在下(灰色)での  $0.9 \mu M$  グアヤコール投与による  $[Ca^{2+}]_i$  増加を示す。定常状態における  $F/F_0$  は1.0とし、データは4実験の平均値  $\pm$  標準誤差で示した。このデータ間の有意差は  $P < 0.05$  をもって有意差ありとし、アスタリスクで表した

阻害薬である TEA, TRPV 4 チャネル阻害薬の RN1734 および  $Ca^{2+}$  チャネル非選択的阻害薬の  $La^{3+}$  をグアヤコールと同時に投与した際の  $[Ca^{2+}]_i$  の変化を測定した。細胞外  $Ca^{2+}$  存在下で  $0.9 \mu M$  グアヤコールを投与すると  $[Ca^{2+}]_i$  の増加がみられた。その後、グアヤコールと TRPV 2 チャネル阻害薬 1 mM TEA を同時投与してもこの増加は変化しなかった(図2A, B)。また、 $10 \mu M$  RN1734(図2C, D)あるいは  $100 \mu M$   $La^{3+}$ (図2E, F)を  $0.9 \mu M$  グアヤコールと同時に投与した場合にも  $0.9 \mu M$  グアヤコール投与時にみられた  $[Ca^{2+}]_i$  の増加は変化しなかった。

考 察

象牙芽細胞は、象牙質基質タンパクの合成や分泌に関与し、象牙質形成における  $Ca^{2+}$  を細胞内輸送する。 $Ca^{2+}$  の輸送メカニズムについては様々な  $Ca^{2+}$  シグナル経路が明らかにされつつある<sup>6, 21-25</sup>。細胞内小胞体は  $Ca^{2+}$  の貯蓄場所であり、 $Ca^{2+}$  の取り込みや放出に関与する  $Ca^{2+}$  ストアとして機能する。本研究では、細胞外  $Ca^{2+}$  存在下で OLC にグアヤコールを作用させた場合には細胞内遊離  $Ca^{2+}$  濃度が増加したが、細胞外  $Ca^{2+}$  非存在下ではその増加がみられなかった。よって、グアヤコールによる細胞内遊離  $Ca^{2+}$  濃度の増加は、細胞内  $Ca^{2+}$  ストアにプールされている  $Ca^{2+}$  の細胞内放出ではなく、細胞外から細胞内への  $Ca^{2+}$  流入によって生じることが示された。

一方、細胞膜上の  $Ca^{2+}$  流入チャネルには、刺激による細胞膜電位変化(脱分極)で開口し  $Ca^{2+}$  を透過させる電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルと、電位変化に影響を受けない電位「非」依存性  $Ca^{2+}$  チャネルがある。電位非依存性  $Ca^{2+}$  チャネルは通過させるイオンの選択性が比較的低く、 $Ca^{2+}$  のみでなく他の多価陽イオンも透過させる。TRP チャネルは、様々な刺激で開口する非選択的  $Ca^{2+}$  透過性陽イオンチャネルで、TRPV 1, TRPV 2 および TRPV 4 チャネルはマウスやラットの象牙芽細胞の細胞膜上にも発現していることが明らかになっている<sup>5, 6, 16, 17</sup>。グアヤコールと同時に  $Ca^{2+}$  チャネル非選択的阻害薬である  $La^{3+}$  を OLC に作用させたところ、グアヤコール単独投与によって誘発される細胞内遊離



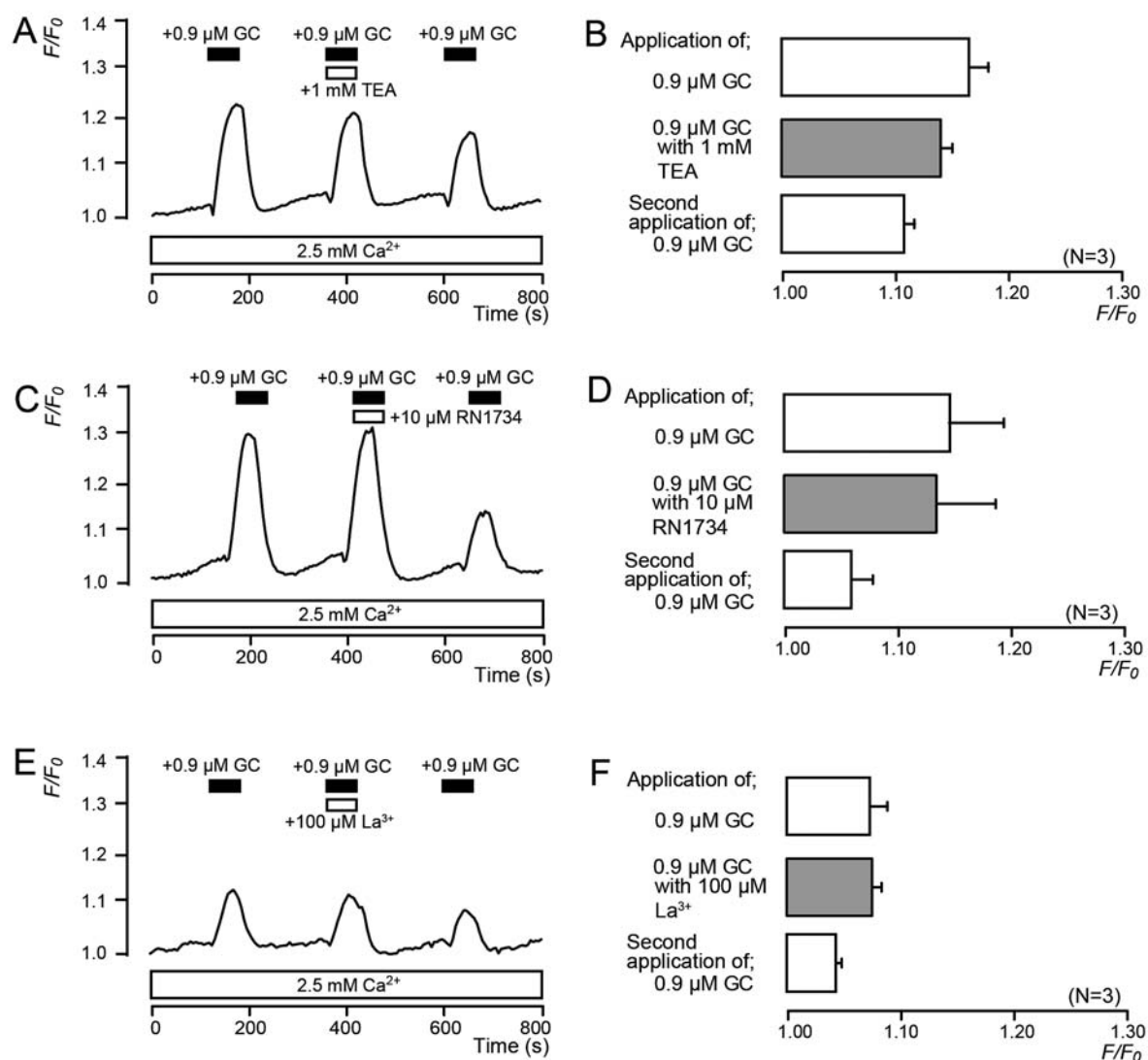


図2 グアヤコールの TRPV 2, TRPV 4 チャンネルおよび  $Ca^{2+}$  チャンネルに対する影響

(A, C, E)細胞外  $Ca^{2+}$  存在下 (2.5mM) (下部の白色のバー)において, 1 mM TEA (TRPV 2 チャンネル阻害薬; A), 10 $\mu$ M RN1734 (TRPV 4 チャンネル阻害薬; C), 100 $\mu$ M  $La^{3+}$  (カルシウムチャンネル阻害薬; E)の存在下または非存在下での 0.9 $\mu$ M グアヤコール (GC) により誘発された一過性の  $[Ca^{2+}]_i$  増加。図中の上部黒色のバーは細胞外液へのグアヤコールの投与時間を, 白色のバーは細胞外液への各阻害薬の投与時間を示す。(B, D, F)細胞外  $Ca^{2+}$  存在下 (2.5mM) での 0.9 $\mu$ M GC 投与 1 回目 (白色上段) および 2 回目 (白色下段) の  $[Ca^{2+}]_i$  増加を示す棒グラフと TRPV 2 および TRPV 4 チャンネル, カルシウムチャンネル阻害薬をグアヤコールと同時投与した時の  $[Ca^{2+}]_i$  増加の棒グラフ (灰色)。各データは 3 実験の平均値  $\pm$  標準誤差で示した。これらのデータ間に有意差は認められなかった

$Ca^{2+}$  濃度の増加に影響はなかった。このことから, グアヤコールによる細胞外  $Ca^{2+}$  の細胞内への流入には電位依存性・電位非依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルの関与は否定された。象牙芽細胞への薬理的刺激や生体物理学的刺激は TRPV 2 および TRPV 4 チャンネルの開口を誘発するが<sup>3, 5, 6, 16, 17</sup>, TRPV 2 チャンネルと TRPV 4 チャンネルの阻害薬はグアヤコール誘発性  $Ca^{2+}$  流入を抑制しなかった。したがって, グアヤ

コールは  $Ca^{2+}$  流入を誘発するが, TRPV 2 および TRPV 4 チャンネルはその流入に関与しないことが示された。

グアヤコールは鎮痛効果が高いだけでなく, 抗炎症作用があるとされる。矢崎<sup>14)</sup>は, 歯内療法に用いられる歯科専用薬剤のうち活性酸素の消去作用とラジカル消去性および生体刺激性や為害性から考えて, 理想的な歯内療法薬はグアヤコールであろうと

述べている。細胞に対するグアヤコールの影響として、ハムスター肺由来培養細胞にグアヤコールを作用させた場合、細胞の発育が0.1%グアヤコールで完全に阻止されたという報告がある<sup>26)</sup>。一方、ヒト歯髓由来の線維芽細胞を用いた実験で、フェノール系薬剤に細胞増殖を促進する作用があるという報告もある<sup>27)</sup>。また、ヒト歯髓細胞において、グアヤコールが硬組織形成や修復象牙質形成と関連する遺伝子発現に影響する可能性も示されている<sup>28)</sup>。今後、細胞膜・内Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達とグアヤコールの関連を詳細に検討し、グアヤコールの象牙芽細胞シグナル伝達系に対する作用点を明らかにする必要があるが、グアヤコール誘発性Ca<sup>2+</sup>流入が象牙芽細胞の細胞機能(象牙質形成や感覚の受容の調節)を駆動しているかもしれない。

今回、OLCのグアヤコール誘発性Ca<sup>2+</sup>流入に、TRPV2・TRPV4チャネルおよび電位依存性・電位非依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルが関与しないことが明らかとなった。この結果は、グアヤコールが象牙芽細胞の他のチャネルに作用して細胞内遊離Ca<sup>2+</sup>濃度を増加させることを示唆している。今後、その他のTRPチャネルに対する作用を検討する必要がある。

## 結 論

マウス由来の象牙芽細胞系細胞にグアヤコールを作用させた時の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化について、fura-2を用いたCa<sup>2+</sup>イメージング法で検討した。グアヤコールはCa<sup>2+</sup>流入チャネルに直接作用し、細胞外からCa<sup>2+</sup>を流入させることが示唆された。しかし、グアヤコール誘発性Ca<sup>2+</sup>流入にTRPV2チャネル・TRPV4チャネル、電位依存性・電位非依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルの関与は否定された。

## 文 献

- Goldberg M, Smith AJ: Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15: 13-27, 2004.
- Fransson H: On the repair of the dentine barrier. *Swed Dent J Suppl*: 9-84, 2012.
- Magloire H, Maurin JC, Couble ML, Shibukawa Y, Tsumura M, Thivichon-Prince B, Bleicher F: Topical review. Dental pain and odontoblasts: facts and hypotheses. *J Orofac Pain*, 24: 335-349, 2010.
- Magloire H, Lesage F, Couble ML, Lazdunski M, Bleicher F: Expression and localization of TREK-1 K<sup>+</sup> channels in human odontoblasts. *J Dent Res*, 82: 542-545, 2003.
- Son AR, Yang YM, Hong JH, Lee SI, Shibukawa Y, Shin DM: Odontoblast TRP channels and thermo/mechanical transmission. *J Dent Res*, 88: 1014-1019, 2009.
- Okumura R, Shima K, Muramatsu T, Nakagawa K, Shimono M, Suzuki T, Magloire H, Shibukawa Y: The odontoblast as a sensory receptor cell? The expression of TRPV1(VR-1)channels. *Arch Histol Cytol*, 68: 251-257, 2005.
- Minke B, Cook B: TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev*, 82: 429-472, 2002.
- Clapham DE, Runnels LW, Strübing C: The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*, 2: 387-396, 2001.
- Clapham DE: TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426: 517-524, 2003.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D: The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389: 816-824, 1997.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D: Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288: 306-313, 2000.
- Marichal B: Guaiacol in the extraction of teeth. *Dental Cosmos*, 44: 784, 1902.
- Asai Y, Nakamura Y, Imanishi T, Ishikawa T, Sekine N: Clinico-pathological study on the effects of guaiacol and zinc-oxide guaiacol upon pulp tissue. *Bull Tokyo Dent Coll*, 10: 227-253, 1969.
- 矢崎欽也: 象牙質・歯髓複合体における活性酸素の生成誘導因子と消去因子についての薬理学的解析. *歯科学報*, 101: 272-285, 2001.
- 田中らいら, 佐藤正樹, 津村麻記, Sobhan Ubaidus, 市川秀樹, 田崎雅和, 澁川義幸: ユージノールは象牙芽細胞のTRPV1チャネルに作用する. *J Oral Biosci*, 53 suppl: 169, 2011.
- Tsumura M, Sobhan U, Muramatsu T, Sato M, Ichikawa H, Sahara Y, Tazaki M, Shibukawa Y: TRPV1-mediated calcium signal couples with cannabinoid receptors and sodium-calcium exchangers in rat odontoblasts. *Cell Calcium*, 52: 124-136, 2012.
- Sato M, Sobhan U, Tsumura M, Kuroda H, Soya M, Masamura A, Nishiyama A, Katakura A, Ichinohe T, Tazaki M, Shibukawa Y: Hypotonic-induced stretching of plasma membrane activates transient receptor potential vanilloid channels and sodium-calcium exchangers in mouse odontoblasts. *J Endod*, 39: 779-787, 2013.
- Arany S, Kawagoe M, Sugiyama T: Application of spontaneously immortalized odontoblast cells in tooth regeneration. *Biochem Biophys Res Commun*, 381: 84-89, 2009.
- Fujisawa M, Tokuda M, Morimoto-Yamashita Y, Tatsuyama S, Arany S, Sugiyama T, Kitamura C, Shibukawa Y, Torii M: Hyperosmotic stress induces cell death in an odontoblast-lineage cell line. *J Endod*, 38: 931-935, 2012.
- Arany S, Nakata A, Kameda T, Koyota S, Ueno Y,

- Sugiyama T : Phenotype properties of a novel spontaneously immortalized odontoblast-lineage cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 342 : 718–724, 2006.
- 21) Linde A, Lundgren T : From serum to the mineral phase. The role of the odontoblast in calcium transport and mineral formation. *Int J Dev Biol*, 39 : 213–222, 1995.
- 22) Linde A : Dentin mineralization and the role of odontoblasts in calcium transport. *Connect Tissue Res*, 33 : 163–170, 1995.
- 23) Shibukawa Y, Suzuki T :  $\text{Ca}^{2+}$  signaling mediated by  $\text{IP}_3$ -dependent  $\text{Ca}^{2+}$  releasing and store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rat odontoblasts. *J Bone Miner Res*, 18 : 30–38, 2003.
- 24) Shibukawa Y, Suzuki T : Measurements of cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in odontoblasts. *Bull Tokyo Dent Coll*, 38 : 177–185, 1997.
- 25) Lundgren T, Linde A : Voltage-gated calcium channels and nonvoltage-gated calcium uptake pathways in the rat incisor odontoblast plasma membrane. *Calcif Tissue Int*, 60 : 79–85, 1997.
- 26) 周 明勇 : 培養細胞に対するグアヤコールの作用について. *歯学*, 73 : 38–51, 1985.
- 27) 塚本芳雄, 福谷幸子, 武内信二郎, 岡本卓士, 森 政和 : ヒト歯髓由来線維芽細胞の増殖能におよぼすフェノール系薬剤の影響. *歯基礎誌*, 31 : 357–362, 1989.
- 28) Kato T, Shirayama K, Tsutsui TW, Tsutsui T : Induction of mRNA expression of osteogenesis-related genes by guaiacol in human dental pulp cells. *Odontology*, 98 : 165–169, 2010.

## Guaiacol activates $\text{Ca}^{2+}$ influx in mouse odontoblast lineage cells

Miyuki SHIMADA<sup>1)</sup>, Maki TSUMURA<sup>2)</sup>, Masaki SATO<sup>2)</sup>  
 Ubaidus SOBHAN<sup>2)</sup>, Yumi OHTAWA<sup>1)</sup>, Shuichiro YAMASHITA<sup>3)</sup>  
 Masakazu TAZAKI<sup>2)</sup>, Yoshiyuki SHIBUKAWA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Clinical Oral Health Science, Division of General Dentistry, Tokyo Dental College

<sup>2)</sup>Department of Physiology, Tokyo Dental College

<sup>3)</sup>Department of Clinical Oral Health Science, Division of Prosthodontics, Tokyo Dental College

**Key words** : *Guaiacol, Odontoblasts, TRP channels*

Guaiacol, an endodontic treatment drug, has high analgesic activity. Its pharmacological effect(s) on the cellular functions of odontoblasts remains unclear. Odontoblasts play important roles in physiological and pathological dentin formation, as well as mineralization. In addition, these cells are related to the nociceptive function of dentinal sensitivity. Transient receptor potential (TRP) channels, which are plasma membrane proteins, participate in the thermo-, osmo-, and mechano-receptive functions of odontoblasts. In the present study, to clarify the pharmacological action(s) of guaiacol on  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel activity in mouse odontoblast lineage cells (OLC), we examined the intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) by fura-2 fluorescence imaging. In the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , the application of 0.9  $\mu\text{M}$  guaiacol increased  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in OLC. In the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , however, this guaiacol-induced increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was not observed. The results indicate that guaiacol evokes  $\text{Ca}^{2+}$  influx from the extracellular medium via  $\text{Ca}^{2+}$  channels in OLC. This guaiacol-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx was not affected by antagonists for TRPV (TRP vanilloid) subfamily member-2 (TRPV 2) and member-4 (TRPV 4) channels, as well as  $\text{La}^{3+}$ . These results suggest that guaiacol activates the  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channels on the plasma membrane of odontoblasts, such as other TRPV channel families, with the exception of TRPV 2 and TRPV 4 channels. (*The Shikwa Gakuho*, 113 : 593–598, 2013)