

Title	8 : TRP チャンネルを介したATP 放出は象牙芽細胞間情報連絡を担う
Author(s)	古屋, 忠; 佐藤, 正樹; 木村, 麻記; 小島, 佑貴; 東川, 明日香; 澁川, 義幸; 田崎, 雅和; 佐藤, 亨
Journal	歯科学報, 115(3): 275-275
URL	http://hdl.handle.net/10130/3698
Right	

No.7 : ラット顎下腺由来唾液腺導管細胞株 (SMIE) の時計遺伝子発現解析

佐藤涼一¹⁾, 澁川義幸²⁾, 石塚洋一¹⁾, 佐藤正樹²⁾, 木村麻記²⁾, 田崎雅和²⁾, 杉原直樹¹⁾
(東歯大・衛生)¹⁾ (東歯大・生理)²⁾

目的: 生物には行動や血圧などの生理機構として概日リズムと呼ばれる約24時間周期のリズムが存在している。概日リズムは睡眠や生体の代謝活動に深く関わっており、リズムの異常が特定の疾患の発症に関連し、相関関係が存在していると考えられている。唾液分泌量にも概日リズムが存在するが、その分泌リズムの形成メカニズムや調節因子については不明のまま残されている。本研究は唾液腺導管細胞の時計遺伝子の mRNA 発現量を解析し、唾液分泌の概日リズム形成メカニズムを検討した。

方法: ラット由来顎下腺継代培養細胞 (SMIE) からリアルタイム RT-PCR 法にて各種時計遺伝子 (Bmal1, Per2, Clock, Cry1) の mRNA 発現量を4時間ごとに48時間連続測定した。次にルシフェラーゼをレポーターとするプラスミド (pGL3-d1Luc) にヒト配列から推定したラット Bmal1 プロモーター領域を組み込み、レポータープラスミドを作成した。作成したプラスミドを SMIE にトランスフェクション後、細胞周期をリセットし、72時間

インキュベートしながらルシフェラーゼの発光量をリアルタイムレポーターアッセイにて測定した。

結果および考察: SMIE には4種の時計遺伝子 (Bmal1, Per2, Clock, Cry1) mRNA が発現していた。細胞の概日リズムをデキサメタゾンでリセット後、Bmal1 は測定開始16時間で、Cry1 は8時間で mRNA の最大発現量を観測した。両 mRNA とも発現量の日内変動は確認できたが、周期性は確認できなかった。次に翻訳後の Bmal1 が時計遺伝子タンパクとしての機能を有しているかをリアルタイムレポーターアッセイ法で確認した。Bmal1 レポーターを組み込んだ SMIE のルシフェラーゼ発光量は約24時間周期で日内変動した。発光量は Bmal1 プロモーターの活性を示しており、ルシフェラーゼ発光が周期的に増減した結果から、Bmal1 プロモーター領域へ作用する他の因子の存在と他の時計遺伝子タンパクによる Bmal1 へのネガティブフィードバックが働いていると示唆された。

No.8 : TRP チャネルを介した ATP 放出は象牙芽細胞間情報連絡を担う

古屋 忠¹⁾, 佐藤正樹²⁾, 木村麻記²⁾, 小島佑貴²⁾, 東川明日香²⁾, 澁川義幸²⁾, 田崎雅和²⁾,
佐藤 亨³⁾ (東京都)¹⁾ (東歯大・生理)²⁾ (東歯大・クラウンブリッジ補綴)³⁾

目的: 象牙芽細胞は侵害刺激を受容する膜タンパク質である transient receptor potential (TRP) チャネルを機能的発現している感覚受容細胞である。齶蝕、歯の切削や歯肉退縮により象牙質が露出すると、象牙質表面に侵害刺激が加わり、象牙細管を満たす象牙細管内液が象牙質表面側に移動し、象牙細管内に突起を持つ象牙芽細胞の細胞膜を変形させる。細胞膜変形は機械刺激感受性 TRP チャネルによって受容され、象牙質痛が発生する。近年、本細胞間のギャップ結合を介した連絡が報告されたが、化学的物質による細胞間連絡機構、その結果としての細胞内情報伝達機構はまだ明らかではない。そこで一つの象牙芽細胞に直接機械刺激を行い、その時の隣接する象牙芽細胞との情報連絡機構について検討した。

方法: 培養象牙芽細胞 (odontoblast lineage cells, OLC) 細胞膜に、ガラス微小管で2.2 μ m/秒の速度で直接機械刺激を行った。機械刺激に対する応答は Ca²⁺ 蛍光指示薬である fura-2 を用いて細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) の変化を記録し、細胞応答と細胞間距離の関係を検討した。

結果: 機械刺激は OLC の [Ca²⁺]_i を一過性に増加した。Capsaicin 感受性 TRPV1 チャネルの阻害薬 (capsazepine) と細胞外 Ca²⁺ の除去は、その [Ca²⁺]_i 増加を抑制した。機械刺激は、刺激された OLC のみならず、近傍に存在する OLC の [Ca²⁺]_i を細胞間距離依存的に増加させた。ATP 放出に関与する pannexin-1 の阻害薬 (mefloquine) は、刺激 OLC の [Ca²⁺]_i 増加には影響しなかったが、近傍 OLC の [Ca²⁺]_i 増加を濃度依存的に抑制した。ATP を受容する膜タンパク質を明らかにするために、イノシトール三リン酸生成に関与する phospholipase-C (PLC) の阻害薬 (U73122) を投与した。刺激 OLC の [Ca²⁺]_i 増加には影響しなかったが、近傍 OLC の [Ca²⁺]_i 増加を濃度依存的に抑制した。

考察: 象牙芽細胞は機械刺激により ATP を放出し、PLC 結合型ヌクレオチド受容体を介して象牙芽細胞間連絡を確立していることが示された。これらの結果は、傍分泌による象牙芽細胞間ネットワークが、象牙質表面刺激に伴う反応性象牙質形成の促進を増強する可能性を示唆している。