

| | |
|-------------|---|
| Title | High pH-Sensitive TRPA 1 Activation in Odontoblasts Regulates Mineralization |
| Author(s) | 佐瀬, 俊之 |
| Journal | 歯科学報, 117(6): 516-517 |
| URL | http://hdl.handle.net/10130/4433 |
| Right | |
| Description | |

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 佐瀬俊之 (千葉県) |
| 学位の種類 | 博士(歯学) |
| 学位記番号 | 第2120号(乙第794号) |
| 学位授与の日付 | 平成27年11月18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 | High pH-Sensitive TRPA 1 Activation in Odontoblasts Regulates Mineralization |
| 掲載雑誌名 | Journal of Dental Research 第95巻 9号 1057-1064頁 2016年 doi: 10.1177/0022034516644702 |
| 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

象牙質表面に刺激が加わると、修復あるいは防御機転としての象牙質が形成される。象牙質表面・歯髄内へ投与された水酸化カルシウム製剤や mineral trioxide aggregate (MTA) は、強いアルカリ性環境 (pH=10~12) を作り出すことで、反応性の第三象牙質形成や、象牙質橋 (dentin bridge) 形成を誘発すると考えられている。しかしながら、これら水酸化カルシウム製剤・MTA による象牙質形成の詳細な細胞メカニズムについては不明である。本研究は、象牙質・歯髄への高アルカリ刺激による反応性象牙質形成機構を明らかにするため、高 pH 感受性感覚受容分子センサーである transient receptor potential ankyrin subfamily member 1 (TRPA 1) チャンネルに着目し、象牙質形成細胞である象牙芽細胞における高 pH 刺激の受容機構とそれに関連する細胞膜・細胞内信号を検討した。

2. 研究方法

イソフルラン、ベントバルビタール麻酔下で新生仔ウイスターラット (5~10日齢) より得た片側下顎骨から下顎骨歯髄横断切片を作製した。本切片から周囲の組織を取り除き、歯髄の外周に象牙芽細胞が配列する歯髄スライス標本を作製した。作製した歯髄スライス標本を酵素処理した後、24時間初代培養した。初代培養後の歯髄スライス標本周圍に存在する象牙芽細胞に、細胞内 Ca^{2+} 指示薬 (fura-2) を負荷し、2波長励起における蛍光強度比を記録することで細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を測定した。アルカリ刺激誘発性細胞膜電流は、初代培養後の歯髄スライス標本周圍に存在する象牙芽細胞にガラス管電極を適用し、電位固定条件下でホールセルパッチクランプ法を用いて計測した。

3. 研究成績および考察

細胞外 Ca^{2+} 存在下において、pH 10 Krebs 溶液を投与すると、一過性に $[Ca^{2+}]_i$ は増加した。その後3回の反復投与を行ったところ、 $[Ca^{2+}]_i$ 増加は変化しなかった。このことからアルカリ刺激誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加は脱感作しないことが示された。細胞外 Ca^{2+} 存在下におけるアルカリ溶液 (pH 8.5-10.5) 誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加は、細胞外 Ca^{2+} 非存在下において有意に減少した。細胞外 Ca^{2+} 存在下、細胞外 Ca^{2+} 非存在下ともに、アルカリ溶液誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加は pH 依存性を示した。この結果は象牙芽細胞においてアルカリ刺激が細胞外からの Ca^{2+} 流入とストアからの Ca^{2+} 放出を誘発することを示している。アルカリ溶液 (pH 7.5-9.5) により誘発され

た $[Ca^{2+}]_i$ 増加は細胞外 Ca^{2+} 濃度依存性を示した(細胞外 Ca^{2+} 濃度変化: 0.01–5.0 mM)。アルカリ溶液による $[Ca^{2+}]_i$ 増加に対する細胞外 Ca^{2+} 濃度依存性の EC_{50} はpH依存的に減少した。これらの結果から細胞外pHが高いほど細胞外 Ca^{2+} 濃度感受性が高くなることが示された。細胞外 Ca^{2+} 存在下において、pH 9 Krebs溶液の投与は内向き電流を誘発した。その後2回の反復投与を行ったところ、内向き電流の振幅は変化せず、脱感作しなかった。加えて、アルカリ刺激により誘発された内向き電流は細胞外pH依存性(pH 8–10)を示した。細胞外 Ca^{2+} 存在下において、pH 10 Krebs溶液の投与で誘発された $[Ca^{2+}]_i$ 増加はTRPA1チャネルアンタゴニストであるHC030031により有意に抑制された。このことから象牙芽細胞において、アルカリ刺激はTRPA1チャネルによって受容されることが示された。

4. 結 論

本研究で、象牙芽細胞がアルカリ刺激を受容することを明らかにした。象牙芽細胞において、アルカリ刺激はTRPA1チャネル活性化による細胞外からの Ca^{2+} 流入とストアからの Ca^{2+} 放出を介した細胞内カルシウムシグナル経路を活性化する。これらの高pH誘発性 Ca^{2+} 動員は細胞外 Ca^{2+} 濃度依存性を示す。加えて、細胞外pHが高いと象牙芽細胞の Ca^{2+} 感受性が高くなる。したがって、水酸化カルシウム製剤やMTAを投与すると象牙芽細胞にアルカリ刺激が加わりそれを象牙芽細胞が受容することで象牙質形成を駆動することが示唆された。

論 文 審 査 の 要 旨

本審査委員会では、1) 論文で示された細胞外アルカリ刺激に対する象牙芽細胞反応の臨床的意義について質問がなされた。それに対し、各種の合着用セメントは酸性を示し、補綴物合着時に疼痛(歯痛)が発生する事があること、加えて本論文で示したように、象牙芽細胞へのアルカリ刺激が、反応性象牙質形成を誘発するであろう事から、今後アルカリ性基剤による象牙質再生を促す合着用セメントの開発を考えたい旨の回答がされた。2) アルカリ性を示す水酸化カルシウム製剤による象牙質形成機構について質問がされた。従来、種々の水酸化カルシウム製剤あるいはmineral trioxide aggregate(MTA)は、その強アルカリ性(pH 10–12)から貼付部位の壊死を生じる事で歯髄幹細胞から象牙芽細胞の分化を誘導し、象牙質形成(dentin bridgeなど)が生じるとされていた。しかし本研究の結果は、象牙芽細胞が壊死する事なくアルカリ性環境を受容する事で象牙質形成を駆動している可能性を示している事が回答された。3) 本実験で用いた初代培養象牙芽細胞の作成方法、象牙芽細胞マーカーの有無、アルカリ感受性チャネルの局在などについて質問がなされた。これらの詳細は既に報告済みであり、論文中に参考文献を適切に引用している旨回答された。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。