

研究者：田中 亜生（所属：東京歯科大学 千葉歯科医療センター 小児歯科）

研究題目：象牙芽細胞の感覚受容機能の獲得に関する発生学的研究

目的：

歯髄の知覚の受容には、自由神経終末説、象牙芽細胞受容器説、動水力学説、知覚受容体複合説があり、現在では動水力学説が最も有力な説とされているが、歯髄の知覚受容のメカニズムは解明されていない。象牙芽細胞は象牙質形成能の他、感覚受容機能を持つことが知られている。Shibukawa *et al.* (2015, *European Journal of Physiology*) は成熟した象牙芽細胞に発現する transient receptor potential (TRP) チャンネルに着目し、培養したヒト象牙芽様細胞の感覚受容機能に TRP チャンネル、pannexin 1 (PANX-1) チャンネルが重要な役割を演じていることを報告した。しかし、これらは *in vitro* における成熟した象牙芽細胞の結果であり、象牙芽細胞が分化課程のどの段階で感覚受容機能を獲得するのかについては不明である。そこで本研究は、象牙芽細胞の感覚受容機能の獲得時期を明らかにすることを目的とした。

対象および方法：

本研究では、生後 (PN) 0、3、6、9、12 日齢の雄 Wistar ラットを組織学と免疫組織化学用に使用し、PN 0、3、6 については RT-qPCR 用に使用した。

実験動物は深麻酔下において 0.1M PBS (pH7.4) 緩衝 4% パラフォルムアルデヒド溶液で灌流固定を施したのち、直ちに下顎骨を取り出し、4℃にて 24 時間浸漬固定を行った。その後、10% EDTA 溶液により 4℃で 3~4 週脱灰を行った。通法に従ってパラフィンブロックを作製し、4μm の前額断連続切片を作製した。PN 9、12 の試料は O. C. T. コンパウンドに包埋し、40μm の凍結前額断連続切片を作成した。各切片は通法に従ってヘマトキシリン・エオジン重染色を施した。また一部の切片は ABC 法を用いて免疫組織化学染色を施した。パラフィン切片には一次抗体として抗 DSP 抗体、抗 TRPA1 抗体、抗 TRPV4 抗体、抗 PANX-1 抗体を使用した。凍結切片には一次抗体として抗 Neurofilament heavy (NF) 抗体を使用した。

RT-qPCR では、深麻酔下において下顎第一臼歯歯胚を摘出し、機械的に歯乳頭を分離した後、anRNAlater RNA Stabilization Reagent (QIAGEN, Limburg, Germany) に浸漬した。anRNeasyMicro Kit (QIAGEN, Limburg, Germany) を使用し歯乳頭から Total RNA を抽出した後、aQuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Limburg, Germany) を使用し、cDNA を合成した。Real-time PCR は Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) (TaKaRa Bio, Inc., Shiga, Japan) と an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いて行った。使用したプライマーと Universal Probe Library (UPL) は Table 1 に示す。それぞれの mRNA の相対発現量は 18S rRNA mRNA を内在性コントロールとして $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法を用いて計測した。また、統計分析は Steel - Dwass test (EZR version 1.37) を使用した。

Table 1 RT-qPCR で使用したプライマーと UPL

	Primer	Sequence	UPL
<i>TRPV4</i>	Forward primer	CACAAGAAAGCCGATATGAGG	#49
	Reverse primer	GGGAGCACTTGAGAAGCAAC	
<i>TRPA1</i>	Forward primer	GGACCTCACTTCTCTTTTGGGA	#94
	Reverse primer	TCCTTTTGAACCTGTCTTGG	
<i>18S rRNA</i>	Forward primer	GGTGCATGGCCGTTCTTA	#22
	Reverse primer	AACTAGTTAGCATGCCGAGTC	

結果および考察：

PN 0 では、髄角付近および歯頸部付近の内エナメル上皮に接する歯乳頭細胞は立方形を呈し、象牙質の形成は認められなかった。また、抗 DSP 抗体、抗 TRPA1 抗体、抗 TRPV4 抗体、抗 PANX-1 抗体に対する陽性反応も観察されなかった。PN 3、6 では髄角付近の内エナメル上皮に接する歯乳頭細胞は象牙芽細胞に分化しており、象牙質の形成が認められた。また、抗 DSP 抗体、抗 TRPA1 抗体、抗 TRPV4 抗体、抗 PANX-1 抗体に対する陽性反応が高円柱状を呈する象牙芽細胞に認められた。しかしながら、歯頸部付近の象牙芽細胞に分化していない歯乳頭細胞では、全ての抗体に対する陽性反応は観察されなかった。一方で、抗 TRPA1 抗体に対する陽性反応が Hertwig 上皮鞘 (HERS) に認められた。

PN 9 では歯冠象牙質の形成のみが観察されたが、PN12 では歯根象牙質の形成が観察された。PN 9 では、髄角付近の象牙芽細胞から離れた神経線維において、抗 NF 抗体に対する陽性反応が観察され、PN12 ではさらに、象牙芽細胞層に侵入するような神経線維が認められた。しかし、PN 9、12 のどちらも、歯頸部付近においては抗 NF 抗体に対する陽性反応が観察されなかった。

PN 6 における *TRPA1* の発現量は、PN 0 ($p < 0.05$) および PN 3 ($p < 0.01$) における発現量よりも有意に低かった。PN 0 と PN 3 の *TRPA1* の発現量に、有意差は認められなかった。PN 6 における *TRPV4* の発現量は、PN 0 ($p < 0.01$) および PN 3 ($p < 0.01$) における発現量よりも有意に低かった。PN 0 と PN 3 の *TRPV4* の発現量に、有意差は認められなかった。また、*TRPA1* および *TRPV4* のどちらにおいても、日齢が上がるにつれて発現量が減少していく傾向がみられた。

Shibukawa *et al.* によると、刺激を受容するための TRPA1 または TRPV4 チャンネル、神経伝達物質を放出するための PANX-1 チャンネル、神経伝達物質を受容するための神経線維によって、象牙質細胞の感覚受容機能が確立することを報告している。以上の全てのチャンネルと象牙芽細胞に近接した神経線維が発現するのは PN12 であったため、象牙芽細胞の感覚受容機能は歯根が形成され始める PN12 頃から発現することが示唆された。

TRPA1 および *TRPV4* の発現量は日齢が上がるにつれて減少した。日齢が上がるにつれ歯胚は大きくなるため、歯胚に対する未熟な象牙芽細胞の割合は少なくなる。*TRPA1* および *TRPV4* は未熟な象牙芽細胞に強く発現するため、日齢が上がるにつれて減少している可能性が考えられた。

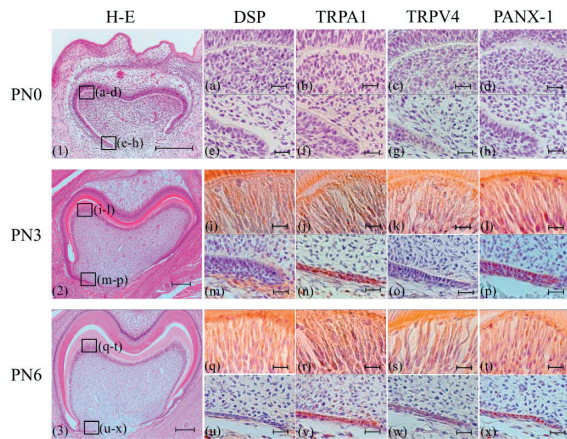


Figure 1

Figure 1

(1, a-h): PN0, (2, i-p): PN3, (3, q-x): PN6

(1-3): H-E 染色、(a), (e), (i), (m), (q), (u): 抗 DSP 抗体、(b), (f), (j), (n), (r), (v): 抗 TRPA1 抗体、(c), (g), (k), (o), (s), (w): 抗 TRPV4 抗体、(d), (h), (l), (p), (t), (x): 抗 PANX-1 抗体

(a-d), (i-l), (q-t), (e-h), (m-p), (u-x): (1-3) の黒枠の拡大像

Bars: (1-3) 200 μ m、(a-x) 20 μ m

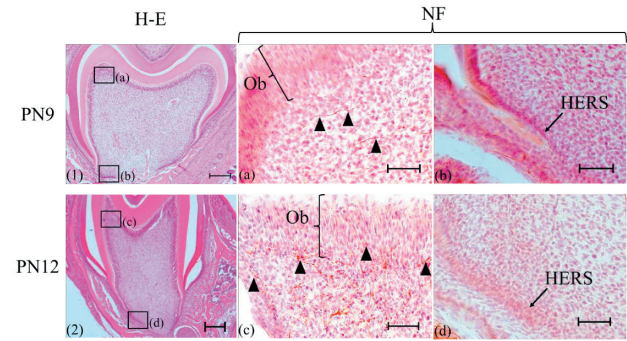


Figure 2

Figure 2

(1, a, b): PN9, (2, c, d): PN12

(1), (2): H-E 染色、(a-d): 抗 NF 抗体

(a-d): (1), (2) の黒枠の拡大像

Ob: 象牙芽細胞層、HERS: Hertwig 上皮鞘

Bars: (1), (2) 200 μ m、(a-d) 50 μ m

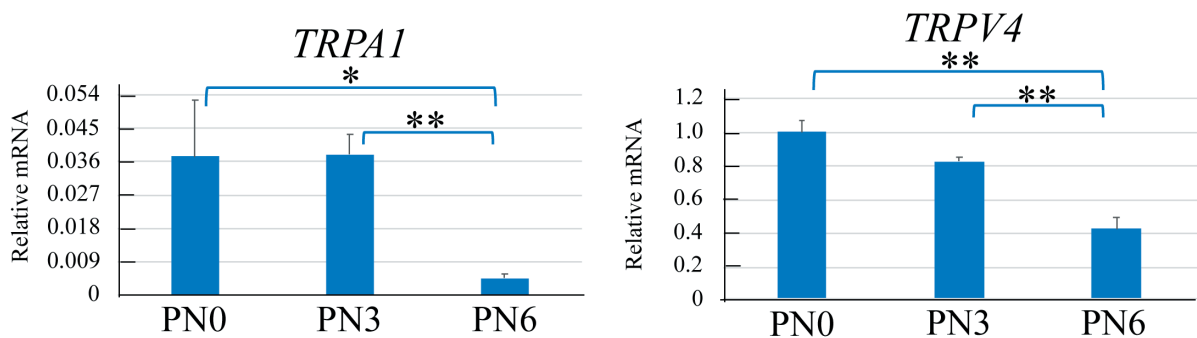


Figure 3

Figure 3

TRPA1 および *TRPV4* に関する RT-qPCR の結果、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

成果発表：（予定を含めて口頭発表、学術雑誌など）

日本小児歯科学会第34回関東地方会大会 若き研究者の集いでの発表

象牙芽細胞の感覚受容機能に関する発生的研究～免疫組織化学と定量化～

Anatomical Science International への投稿（<https://doi.org/10.1007/s12565-019-00517-y>）

Developmental studies on the acquisition of perception conducting pathways via TRP channels in rat molar odontoblasts using immunohistochemistry and RT-qPCR