

論文要旨

氏名

池田 恵理奈

論文の要旨

歯の疼痛伝達には象牙芽細胞が感覚受容細胞として機能していることが分かっている。象牙芽細胞における痛みの伝達機構には動水力学説を初めとした多くの説が存在しているが、象牙芽細胞から神経へのシグナル伝達に関して明確な機構は未だ分かっていない。近年、歯髄の神経線維はイオンチャンネル型のアデノシン三リン酸 (ATP) レセプターである P2X₃ 受容体を発現すること (A. M. Alavi et. al., 2001)、NTPDase (ATP 分解酵素) が象牙芽細胞周囲の神経線維で発現していること (X. Lui, L. Yu et. al., 2012) が示されている。これらの結果から歯髄の象牙芽細胞周囲での ATP 情報伝達機構の存在が示唆されるが、刺激を受けた象牙芽細胞が細胞外に ATP を放出する機構を持つかについては明らかになっていない。細胞外への ATP の放出機構についてはいくつか提案されており、その一つに小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT) がある。VNUT は細胞内で ATP を小胞内へ輸送し、細胞外に ATP を開口分泌する。

本研究では象牙芽細胞において ATP の小胞型伝達機構が存在するかどうかを明らかにするために象牙芽細胞における VNUT の発現を調べた。

In vivo では 6 週齢の雄の SD ラットより第一臼歯を抜歯し、歯髄を分離して RT-PCR を行った。また、またラットを安楽死させ、灌流固定を行った後、上顎第一臼歯を分離し、厚さ 6 μm の凍結切片を作成した。その後、抗 Nestin 抗体と抗 VNUT 抗体および抗 SNAP25 (膜融合タンパク) 抗体と抗 P2X₃ 抗体で免疫染色を行った。In vitro では最初に KN3 細胞 (象牙芽細胞様細胞) において抗 Nestin 抗体と抗 VNUT 抗体での免疫染色を行った。その後、KN3 細胞に熱刺激を加え、VNUT および HSP (熱ショックタンパク質) の遺伝子発現を RT-PCR 法にて、VNUT からの ATP の放出をルシフェラーゼによる ATP 計測法をそれぞれ用いて調べた。また siRNA による VNUT 遺伝子の発現抑制を行い、コントロール群と刺激群におけるそれぞれの VNUT 遺伝子の発現の有無と ATP の放出量の変化を調べた。

結果として、RT-PCR によって歯髄における VNUT の発現が確認され、免疫組織化学染色により象牙芽細胞における VNUT の局在が確認された。また、象牙芽細胞細胞膜に膜融合タンパク質である VNUT と SNAP25 の共局在、および象牙芽細胞近傍の歯髄神経における P2X₃ 受容体の局在が確認された。以上より、ATP が小胞分泌により歯髄神経線維の P2X₃ 受容体へ結合し、伝達されることが示唆された。また、熱刺激によって象牙芽細胞における VNUT の発現が示され、象牙芽細胞から細胞外への ATP の放出が確認された。また、VNUT siRNA によって VNUT 遺伝子の発現の抑制と細胞外 ATP 増加量の減少が確認され、これにより ATP の放出に VNUT が関与することが示唆された。

以上のことより、象牙芽細胞において刺激を受けることにより、おそらく TRPV1 等の受容体を介して VNUT 陽性小胞が増加し、ATP が小胞内へ取り込まれる。その後 ATP を含んだ小胞が SNAP25 により膜融合をおこし、ATP が開口分泌され、ATP は歯髄神経上の P2X₃ 受容体に結合し、刺激が伝達されることが示された。すなわち歯の疼痛伝達における象牙芽細胞からの ATP の放出に VNUT による ATP 放出機構が関与することが示唆された。