

論文審査結果報告書

論文提出者氏名 池田 恵理奈

学位論文題目：Expression of vesicular nucleotide transporter in rat odontoblasts

審査委員（主査）教授 自見 英治郎 印

（副査）教授 竹内 弘 印

（副査）教授 松尾 拓 印

論文審査結果の要旨

【目的】 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。象牙芽細胞による痛みの伝達機構には動水力学説をはじめとした多くの説が存在するが、象牙芽細胞から神経へのシグナル伝達は不明な点が多い。近年、歯髄の神経線維はイオンチャ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、さらにATP分解酵素のNTPDaseが象牙芽細胞周囲の神経線維で発現していることが報告されており、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ている。また、細胞外へのATPの放出には小胞型ヌクレオチドトランスポーター（VNUT）が関与することが知られていることから、本研究では、疼痛刺激を受けた象牙芽細胞で、VNUTを介して細胞外にATPを放出することを組織学的および細胞生物学的手法を用いて検討した。

【方法と結果】 6週齢の雄性SDラットより第一臼歯を抜歯し、歯髄を分離してVNUTの発現をRT-PCR法で確認した。ラットの上顎第一臼歯を分離し、厚さ8 μmの凍結切片を作製し、抗Nestin抗体と抗VNUT抗体、抗SNAP25（膜融合タンパク）抗体、および抗P2X₃抗体を用いて免疫染色を行ったところ、象牙芽細胞におけるVNUTの局在が確認された。さらに、象牙芽細胞の細胞膜に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受容体の局在を確認した。象牙芽細胞様細胞株KN3細胞でVNUTの発現を確認した後に、熱刺激を加えるとVNUTおよび熱ショックタンパク質（HSP）遺伝子発現の上昇とVNUTからのATPの放出が認められた。一方、VNUTのsiRNAを用いてKN3細胞のVNUTの発現を抑制すると、熱刺激によるATPの放出が抑制された。

【結論】 象牙芽細胞が痛み刺激を受けるとVNUT陽性小胞が増加し、ATPが小胞内へ取り込まれた後にATPを含んだ小胞がSNAP25を介して膜癒合することでATPが開口分泌されると考えられる。さらに放出された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。

本研究内容について申請者の池田 恵理奈氏に対し、主査と2名の副査で実験のデザインやATPの測定方法などを質問したが、概ね適切な回答を得た。総じて、審査委員会では本論文を学位論文として価値あるものと判断した。