

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11447

研究課題名（和文）メカノセンサー欠損によるエナメル質形成不全

研究課題名（英文）Enamel hypomineralization in mechano-sensitive ion channel deficiency mice

研究代表者

張 旌旗 (ZHANG, Jingqi)

九州大学・歯学部・技術専門員

研究者番号：80380707

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：歯科臨床では多様なエナメル質形成不全に遭遇するが、その機序は不明である。私たちは温度感受性TRPV3、TRPV4チャネルがエナメル質形成調節に関与すると仮説を立て、野生型（WT）とTRPチャネル遺伝子欠損マウス（V3KO、V4KO）を用いて、エナメル質形成への影響を調べた。WTの歯胚ではTrpv3、Trpv4の発現が観察された。走査電顕ではWTに比べてV3KO、V4KOマウス歯のエナメル質石灰化が不十分であった。EPMA解析ではV3KO、V4KOマウス臼歯と切歯のエナメル質にカルシウム、リンの分布が低かった。これらのことから、TRPチャネルはエナメル質の石灰化に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エナメル質形成における基質タンパクに関する研究が蓄積される一方、エナメル質の石灰化機序に関しては不明な点が多い。本研究は長年不明であった石灰化のカルシウム移動機構の分子実態の一端を明らかにすることでエナメル質形成不全の解明に意義深い。私たちは温度感受性TRPチャネルがエナメル質に強く発現し、TRPチャネル遺伝子欠損マウスでは歯の摩耗や脱灰によるカルシウムの喪失が野生型よりも顕著であることを見出した。本研究はエナメル芽細胞に高発現しているTRPチャネルがエナメル質の石灰化を制御することを示唆した。エナメル質形成を制御できれば、エナメル質形成不全を阻止でき、口腔疾患から人々の健康を守れると考える。

研究成果の概要（英文）：We encounter diverse enamel hypomineralization at the dental practice, however, the mechanisms are still not clearly demonstrated. We hypothesized that temperature sensitive TRP channels (TRPV3, TRPV4) would contribute to the regulation of enamel mineralization. We compared the effect of TRPV3, TRPV4 on enamel formation in wild type (WT) and TRP channel genetic deleted mice (V3KO, V4KO). Expression of Trpv3 and Trpv4 was observed in tooth germ. Scanning electron microscopy revealed that the tooth enamel formation in V3KO, V4KO mice was insufficient compared with that in WT. In EPMA analysis, the deposition of calcium, phosphorus in V3KO and V4KO mice was reduced in the enamel of the molar and the incisor compared with that in WT. These results suggest that TRP channels may influence enamel mineralization.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：エナメル質形成不全 エナメル芽細胞 エナメル質 TRPチャネル 感覚機能 歯

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

歯の最外層に位置するエナメル質は、体の中で最も硬い組織である。このエナメル質はエナメル芽細胞によって作られる。エナメル芽細胞は歯の萌出と同時に消失し、体の中には存在しない細胞となる。つまり、歯のエナメル質は一度欠損してしまうと二度と再生しない組織であり、金属やレジンなどの人工物による修復しかできない。従ってエナメル質形成に關与する調節因子の解明はヒトの歯に生じるエナメル質形成不全を理解する上でとても重要だと言える。実際に臨床では、様々な遺伝的要因および薬物投与や感染などの全身あるいは局所の要因により、幼児のエナメル質形成不全を引き起こしている。しかし、多くの場合はその機構は不明であり、現在でも適切な医療対応ができていない。そのため、エナメル質形成およびその石灰化機構の解明は喫緊な研究課題となっている。

TRP (Transient receptor potential) チャンネルは高いカルシウム透過性を有する温度感受性陽イオンチャンネルとして知られており、温度、機械的受容、浸透圧などの刺激によって活性化され、細胞内外のセンサーとして解析が進められてきた。これまでTRPチャンネルの多様な生理機能に関する報告が蓄積され、TRPチャンネルは創薬のターゲットとしても注目されている (Nilius et al., 2012)。TRPファミリー分子であるTRPV3、TRPV4は主に上皮に局在し、常温に近い温度で活性化され、TRPチャンネル遺伝子変異の患者では毛と皮膚の異常が見られ、一部の患者は歯の欠損が報告されている (Poulin et al., 1984)。

私たちは、上皮と同じく外胚葉由来のエナメル芽細胞に TRPV3、TRPV4 チャンネルが機能的に発現していることを見いだした。この TRP チャンネルをエナメル質形成の調節に關与すると仮説を立て、野生型 (WT) と TRP チャンネル遺伝子欠損マウス (V3K0、V4K0) を用いて歯の発生過程における TRP チャンネル発現の解明および成熟マウス歯のエナメル質における TRP チャンネル遺伝子欠失の影響について解明を試みた。

## 2. 研究の目的

歯科臨床においてしばしば遭遇するエナメル質形成不全は、エナメル芽細胞の成熟と石灰化に關係している。本研究では、高いカルシウム透過性を有するTRPV3、TRPV4チャンネルがエナメル芽細胞と中間層細胞に存在することに着目し、WTおよびV3K0、V4K0マウスを用いて、歯の発生過程におけるTRPV3、TRPV4チャンネルの発現、また成熟マウス歯のエナメル質におけるTRPV3、TRPV4チャンネル遺伝子欠失の影響について調べ、歯のエナメル質形成、特に石灰化への關与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究は C57BL/6 マウスを用いて実験を行った。動物実験の計画は九州大学動物実験委員会の審査と承認を受けた。

### (1) マウス歯胚の in situ ハイブリダイゼーションおよび免疫染色

胎生13.5、15.5、18.5日齢、生後1、5日齢のWTマウスの歯胚を採取し、in situ ハイブリダイゼーションおよび蛍光抗体法により免疫染色を行い、マウス歯胚における *Trpv3*、*Trpv4* の発現およびTRPV3、TRPV4の局在を調べた。

### (2) エナメルタンパクの免疫組織化学染色

3週齢のWTおよびV3K0、V4K0マウスの固定した切歯と臼歯を用いて凍結切片を作製し、エナメルタンパクの抗体による免疫組織化学染色を行った。WTおよびV3K0、V4K0マウス切歯と臼歯のエナメル芽細胞にアメロジェニン(AMEL)、アメロプラスチン(AMBN)、エナメルリン(ENAM)の発現を解析した。

#### (3) 走査電顕 (SEM) による構造解析

3週齢のWTおよびV3K0、V4K0マウスを麻酔下で灌流固定し、切歯と臼歯を採取し、歯の切断面を作製し、エタノール脱水、凍結乾燥、白金蒸着を経て、SEM (S-3400N, Hitachi) にて形態観察を行った。

#### (4) X線マイクロアナライザー (EPMA) による元素分析

WTおよびV3K0、V4K0マウスの切歯と臼歯を固定後、脱水を行い、エポキシ樹脂に包埋した。その後、切歯と臼歯の矢状面にて切削器により研磨し、EPMA (EPMA-1610, SHIMADZU) 分析装置にてマウス切歯と臼歯内のカルシウム、リンの元素分析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 歯胚における *Trpv3*、*Trpv4* 局在については、in situ ハイブリダイゼーション染色を用いて、WTマウス歯胚の歯堤、内エナメル上皮、外エナメル上皮に *Trpv3*、*Trpv4* の発現が観察された。生後5日のマウス歯胚では、鐘状期のエナメル芽細胞および中間層細胞に *Trpv3*、*Trpv4* が強く発現していることが観察された。また、生後5日のマウス歯胚におけるTRPV3、TRPV4抗体による免疫染色では、V3K0、V4K0マウスに比べてWTマウスのTRPV3、TRPV4は、歯胚のエナメル芽細胞の近位部、中間層細胞に発現し、中間層細胞では共存していることが観察された。

(2) マウス切歯と臼歯におけるエナメルタンパクの発現については、エナメルタンパク抗体による免疫組織化学染色を行った。WTおよびV3K0、V4K0マウス切歯のエナメル芽細胞にはいずれもアメロジェニン(AMEL)、アメロプラスチン(AMBN)、エナメルリン(ENAM)の免疫陽性反応が観察された。TRPチャンネル遺伝子欠損マウス歯のエナメルタンパクの発現分布は有意な差は認められなかった。

(3) 走査電顕による構造解析については、切歯、臼歯ともに外形や大きさ、エナメル質の厚さにおいて、WTとTRPチャンネル遺伝子欠損マウス間に有意な差は認められなかったが、エナメル小柱および小柱間質の発達についてはWTとTRPチャンネル遺伝子欠損マウスで異なっていた。WTの棒状のエナメル小柱に対して、V3K0、V4K0では細い糸状を呈し、小柱の形成が不十分で間隙が広がっていることが観察された。TRPチャンネル遺伝子欠損マウスの歯の形態観察では、WTに比べ、エナメル質の磨耗やEDTA脱灰によるカルシウムの喪失が多いことを見出した。

(4) 切歯および臼歯の切断面におけるEPMAの元素分析については、WTに比べてTRPチャンネル遺伝子欠損マウスの方が臼歯および切歯のエナメル質におけるカルシウム、リンの分布およびCa/Pの率が減少した。

### まとめ

本研究では、TRPチャンネルが歯の発生過程においてエナメル芽細胞に持続して発現し、歯のエ

ナメル質成長に重要な役割を演じていることが分かった。また、TRPチャンネル遺伝子欠損によって、エナメル質形成に必要なカルシウム、リンの分布が減少した。これらのことから、TRPチャンネルはエナメル質の形成調節に関与することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitsuki T, Yoshimoto RU, Aijima R, Hatakeyama J, Cao A-L, Zhang J-Q, Ohsaki Y, Mori Y, Kido MA	4. 巻 55(1)
2. 論文標題 Enhanced junctional epithelial permeability in TRPV4-deficient mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Periodontal Res.	6. 最初と最後の頁 51-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12685	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 吉本怜子、合島怜央奈、曹愛琳、大崎康吉、張旌旗、藤井慎介、清島保、西村英紀、城戸瑞穂
2. 発表標題 口腔粘膜の創傷治癒過程における温度感受性イオンチャネルの関わり
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 張旌旗、吉本怜子、合島怜央奈、大崎康吉、依田浩子、久木田敏夫、城戸瑞穂
2. 発表標題 熱感受性TRPVチャネル遺伝子欠損によるマウス歯エナメル質に及ぼす影響
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉本怜子、合島怜央奈、大崎康吉、藤井慎介、張旌旗、曹愛琳、Gao Weiqi、清島保、城戸瑞穂
2. 発表標題 TRPV4遺伝子欠失における口腔粘膜創傷治癒の解析
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Gao Weiqi、曹愛琳、吉本怜子、合島怜央奈、大崎康吉、張旌旗、城戸瑞穂
2. 発表標題 アレルギーモデルマウスの骨代謝調節とメカノセンサーチャネルの機能
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshimoto RU, Aijima R, Ohsaki Y, Cao A-L, Zhang J-Q, Kiyoshima T, Nishimura F, Kido MA.
2. 発表標題 Warm activated TRPV4 enhanced oral epithelial cell-cell adhesion and suppresses migration
3. 学会等名 96th General Session & Exhibition of the IADR, IADR Pan European Regional Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 曹愛琳、Gao Weiqi、吉本怜子、合島怜央奈、大崎康吉、張旌旗、城戸瑞穂
2. 発表標題 喘息モデルマウスの機械的アロディニアとTRPV1
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 張旌旗、久木田敏夫、城戸瑞穂
2. 発表標題 TRPチャネル遺伝子欠損によるエナメル質形成不全の構造解析
3. 学会等名 2017年度九州大学総合技術研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshimoto RU, Aijima R, Ohsaki Y, Zhang J-Q, Kiyoshima T, Nishimura F, Kido MA
2. 発表標題 Warm temperature enhance cell adhesion and migration via thermosensitive TRPV4
3. 学会等名 第65回国際歯科研究学会日本部会(JADR)総会・学術大会(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉本怜子、合島怜央奈、大崎康吉、張旌旗、曹愛琳、Gao Weiqi、清島保、城戸瑞穂
2. 発表標題 温度感受性イオンチャンネルTRPV4は口腔上皮細胞の細胞間接着と運動性を制御する
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 城戸瑞穂、吉本怜子、合島怜央奈、曹愛琳、張旌旗、大崎康吉
2. 発表標題 口腔粘膜における温度感受性TRPチャンネルのダイバーシティ
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉本怜子、合島怜央奈、西山めぐみ、大崎康吉、張旌旗、清島保、城戸瑞穂
2. 発表標題 温度感受性イオンチャンネルTRPV4を介したは口腔上皮細胞接着と細胞移動の調節
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kido MA, Aijima R, Yoshimoto RU, Kitsuki T, Cao A-L, Zhang J-Q, Ohsaki Y
2. 発表標題 Temperature sensitive TRP channels in Oral Mucosa
3. 学会等名 9th National Congress of Romanian Society of Cellular Biology with international participation (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 張旌旗、吉本怜子、合島怜央奈、大崎康吉、城戸瑞穂、久木田敏夫
2. 発表標題 温度感受性TRPV4チャネル欠損によるエナメル質形成不全の解析
3. 学会等名 総合技術研究会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 張旌旗、吉本怜子、合島怜央奈、木附智子、曹愛琳、大崎康吉、久木田敏夫、城戸瑞穂
2. 発表標題 エナメル質における温度感受性TRPチャネルの発現およびその影響についての形態学観察
3. 学会等名 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshimoto RU, Aijima R, Ohsaki Y, Zhang J-Q, Cao A-L, Kiyoshima T, Kido MA
2. 発表標題 Temperature changes affect intercellular adhesion of oral epithelial cells
3. 学会等名 YR Umami Forum 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 吉本怜子、合島怜央奈、大崎康吉、張旌旗、曹愛琳、清島保、西村英紀、城戸瑞穂
2. 発表標題 温度感受性イオンチャネルによる口腔上皮細胞の細胞間接着制御
3. 学会等名 平成28年度日本歯周病学会九州五大学、日本臨床歯周病学会九州支部合同大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 合島怜央奈、吉本怜子、曹愛琳、森啓輔、張旌旗、大崎康吉、檀上敦、山下佳雄、清島保、城戸瑞穂
2. 発表標題 ヒト口腔癌細胞株におけるTRPチャネルの機能解析
3. 学会等名 第58回歯科基礎医学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 吉本怜子、合島怜央奈、大崎康吉、曹愛琳、張旌旗、清島保、城戸瑞穂
2. 発表標題 TRPV4チャネルを介した温度変化による口腔上皮細胞調節
3. 学会等名 第58回歯科基礎医学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Zhang J-Q, Yoshimoto RU, Aijima R, Kitsuki T, Ohsaki Y, Cao A-L, Kido MA
2. 発表標題 Hypomaturation of dental enamel in thermosensitive TRP channel deleted mice
3. 学会等名 Tooth Morphogenesis & Differentiation 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	城戸 瑞穂 (KIDO Mizuho) (60253457)	佐賀大学・医学部・教授  (17201)	
研究分担者	清島 保 (KIYOSHIMA Tamotsu) (20264054)	九州大学・歯学研究院・教授  (17102)	
研究分担者	和田 裕子 (WADA Hiroko) (70380706)	九州大学・歯学研究院・助教  (17102)	