

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：8 2 6 4 8

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790266

研究課題名（和文）胎仔骨石灰化のための母子間ミネラル輸送メカニズムの解明

研究課題名（英文）Molecular Mechanism of the maternal-fetal mineral transport for fetal bone mineralization

研究代表者

鈴木 喜郎（SUZUKI YOSHIRO）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教

研究者番号：40348503

研究成果の概要（和文）：妊娠終期の限られた期間内において胎仔は骨格系を獲得するが、その分子メカニズムは不明な点が多い。本研究では骨格形成のためのミネラル輸送に着目し、胎盤における母子間ミネラル輸送路の分子実体を探索した。その結果、その候補として TRPM6 を同定した。TRPM6 はマウス母子間ミネラル輸送に重要とされる胎盤内卵黄嚢に多く存在し、胎仔骨の形成に合わせて発現が顕著に増加していた。さらにヒト胎盤上皮由来細胞において TRPM6 様の活性が認められた。以上のことから TRPM6 は胎仔骨形成のための母子間ミネラル輸送に重要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Fetus develops mineralized bones during very last days of pregnancy. However, the molecular mechanism of the mineral transport has still been unclear. In an attempt to the molecular identification of the maternal-fetal mineral transport during fetal bone formation, I found TRPM6 as a candidate mineral entry pathway. TRPM6 was mainly localized in the intraplacental yolk sac, which is thought to be the place for the maternal-fetal mineral transport, and its expression was significantly increased during the last 4 days of pregnancy, which coincides with the fetal bone formation in mice. Moreover, TRPM6-like activity was observed in a cell line derived from human placental trophoblasts. These results suggest that TRPM6 plays an important role in the maternal-fetal mineral transport in order to sustain fetal bone formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：カルシウム、マグネシウム、胎盤、母子間輸送、TRP チャネル

1. 研究開始当初の背景

カルシウムをはじめとするミネラルの恒常性維持は生体にとって極めて重要であり、小腸における吸収、骨における代謝、腎臓における再吸収が協調的に働くことによって実現されている。しかしながら骨が形成され

る時期におけるミネラル不足を個体全体としてどのように補うのかは未だ不明な点が多い。特に胎児期後期におけるミネラル輸送阻害は子宮内胎児成長遅延（IUGR）の原因の1つと考えられ重大な問題となっている。

ミネラル輸送上皮(小腸、腎臓および胎盤)におけるミネラル吸収経路は細胞間隙を通る傍細胞輸送と細胞の中を通る経細胞輸送の2つが存在することが知られているが、活性型ビタミンD等で調節されミネラル恒常性維持に重要なのは後者であると考えられている。1999年に発現クローニング法によって小腸からTRPV6が、腎臓からTRPV5が経細胞カルシウム吸収路の候補としてそれぞれ同定され、現在もなお分子実体の有力な候補となっている。その後TRPV6KOマウスにおける小腸カルシウム吸収低下、TRPV6KO胎仔における低カルシウム血症・低体重仔、ヒトTRPV6遺伝子多型の尿路カルシウム結石発症への関与が報告され、上記仮説が一部裏付けられた。しかしながらTRPV6KOマウスの経細胞カルシウム輸送は完全にはならず、小腸および胎盤において約40%の低下を示したことから、TRPV5/6ではない別の分子実体の存在も同時に示唆された。

近年、低体重出生がその後の心血管疾患罹患リスクを増大させるという報告が相次ぎ注目されている。低体重出生の原因は大きく分けて早産と子宮内発育制限(IUGR)があり、IUGRの原因は母親由来(妊娠高血圧症候群)および胎盤由来が考えられているが不明な点が多い。イオン環境、特に母親のカルシウム摂取量が血圧の上昇阻止に重要であるとの報告や、 $MgSO_4$ が発展途上国における妊娠高血圧症の治療に有効であるとの疫学的な報告がある。実際、胎児に充分量のミネラルを供給することは胎児心筋細胞の増殖分化に重要であるため、それらの欠乏は胎児の心臓の発達に支障をきたし母親の健康に悪影響を及ぼすとともに出生後の心血管疾患のリスクを増大させ得ると推測できる。しかしながら、胎盤におけるミネラル輸送の分子基盤が不明なため、それらを標的とした治療法は開発されていない。

2. 研究の目的

本研究計画の目的は、分子生物学的手法を用いて胎盤におけるミネラル輸送路の分子実体を解明し、その生理的意義を *in vitro* および *in vivo* において確認することである。さらに、同輸送路に対する阻害剤を用いて妊娠高血圧症との関連を明らかにすることによって栄養学的、薬理的治療法の開発を

指す。

3. 研究の方法

胎盤におけるミネラル輸送の分子機序を明らかにするため、母子間ミネラル輸送活性が劇的に増加する妊娠最終期において発現量が増加する遺伝子をカルシウムもしくはマグネシウム透過性のTRPチャネルファミリーおよび輸送体ファミリーにおいて探索する。同定された輸送体のcDNAをクローニングした後、胎盤内局在および発現量の変化を解析し、胎仔骨石灰化のための母子間輸送を実際に担い得るかどうかを確認する。次にその輸送体を強制発現させた場合の膜電流の特徴と、胎盤絨毛上皮細胞に存在する内在性膜電流の特徴が一致するかを検討し、さらにsiRNAを用いて輸送体の発現をノックダウンした際に同電流が抑制されるかを示す。培養細胞のmonolayerにおける Ca^{2+} もしくは Mg^{2+} の一方方向性輸送を観察し、同輸送体に対する阻害剤の効果を検討した後、妊娠マウス(正常および妊娠高血圧モデル)に阻害剤を投与し、本輸送体のヒト疾患(妊娠高血圧症)への関与を明らかにする。

4. 研究成果

TRPスーパーファミリーのうちTRPV1-6, TRPM1-7, およびTRPA1においてRT-PCR法を用いてスクリーニングを行った結果、妊娠最終期に発現上昇が起こる遺伝子としてTRPM6を同定することができた。Quantitative PCR法を用いて発現量のタイムコースを解析した結果、胎仔骨石灰化の時期に合わせて発現が顕著に増加することがわかった(Fig. 1)。

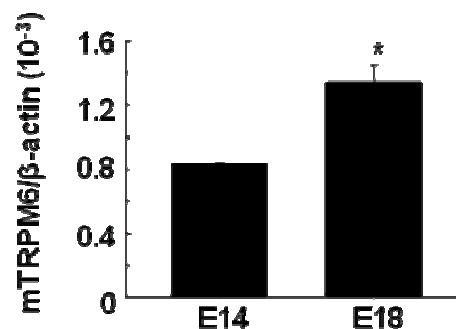


Fig. 1. マウス妊娠終期の胎盤におけるTRPM6 mRNA発現量の変化

In situ hybridization 法を用いて発現部位を解析したところ、TRPM6 は calbindin_{D9k} と同様、マウス母子間ミネラル輸送に重要であるとされる胎盤内卵黄嚢 (intraplacentar yolk sac) に多く発現していた (Fig. 2)。

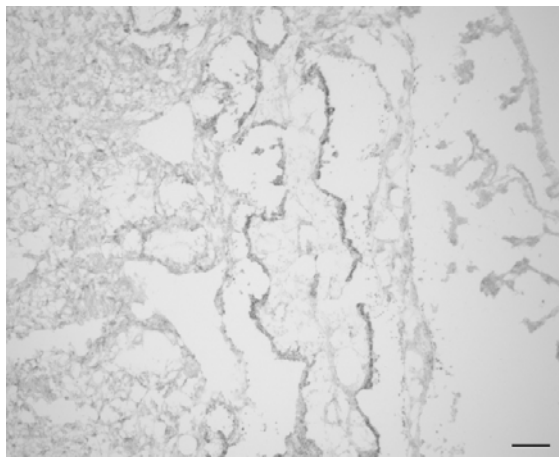


Fig. 2. マウス胎盤 (E18) における TRPM6 mRNA の局在

またパッチクランプ法を用いて膜電流を解析したところ、ヒト胎盤絨毛上皮細胞由来の BeWo 細胞において 2-APB および carvacrol によって活性化する内在性 TRPM6 様電流が認められた (Fig. 3)。

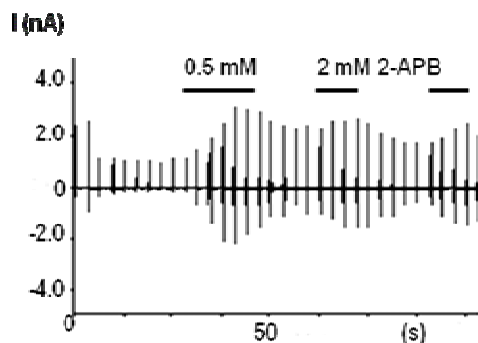


Fig. 3. ヒト胎盤上皮由来細胞における TRPM6 様電流

次に RACE 法を用いて胎盤 TRPM6 の分子実体を詳細に解析した結果、ヒト胎盤より TRPM6 の 5 側の新規スプライス・バリエーション群をクローニングすることができた (Fig.

4)。このバリエーション群の N 末端側のアミノ酸配列は報告されている TRPM6 の 3 種類のアイソフォーム (TRPM6a, TRPM6b, TRPM6c) とは異なるものであった。

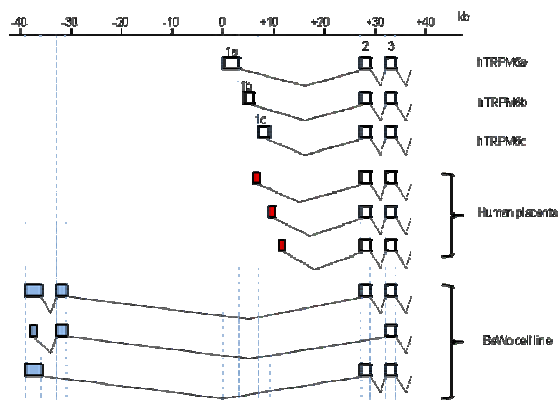


Fig. 4. ヒト TRPM6 遺伝子の構造

以上のことから TRPM6 は胎盤において新規スプライス・バリエーションを胎盤内卵黄嚢 (マウス) もしくは絨毛上皮細胞 (ヒト) に胎仔骨石灰化の時期に合わせて妊娠終期に発現し、胎仔骨石灰化のための母子間ミネラル輸送に重要な役割を果たしていると考えられる。

一方、TRPM6 の in vivo における生理的意義については、現時点で TRPM6 特異的な阻害剤が存在しないことから TRPM6 のコンディショナルノックアウトマウスの作製に着手している。今後そのマウスを解析することによって上記仮説を証明したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) 鈴木喜郎 「カルシウム輸送体 TRPV5/6 の機能と異常」 腎と骨代謝 26 (2013) 査読無

(2) Kovacs G et al (5 番目). "TRPV6 permeates several heavy metals." Cell Calcium 49:43-55, 2011 査読有

(3) Landowski CP, et al (3 番目). "Chemical inhibitors of the calcium

entry channel TRPV6.” Pharm Res
28:322-330, 2011 査読有

〔学会発表〕(計6件)

Yoshiro Suzuki “Roles of TRPV6 and TRPM6 channels in maternal-fetal calcium transport” International Symposium on Epithelial Barrier and Transport (2012年9月15日 口演 滋賀県)

Yoshiro Suzuki “Epithelial TRP channels for maternal-fetal calcium transport” 2012 International Ion Channel Conference (2012年8月25日 ポスター 韓国・濟州島)

鈴木喜郎「TRPM6の母子間カルシウムおよびマグネシウム輸送における役割」第89回日本生理学会大会(2012年3月30日 長野県ポスター)

鈴木喜郎「TRPチャンネルの母子間ミネラル輸送における役割」第58回中部日本生理学会大会(2011年11月2日 福井県 一般口演)

Yoshiro Suzuki “Roles of TRP channels for maternal-fetal mineral transport” International Joint Meeting of Cellular and Molecular Physiology(2011年7月31日 東京都 口演)

鈴木喜郎「胎仔骨石灰化のための母子間マグネシウム輸送に關与する分子の探索」第22回日本微量元素学会學術總會(2011年7月1日 京都府 一般口演)

〔その他〕

ホームページ:

<http://researchmap.jp/yoshiro/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 喜郎 (SUZUKI YOSHIRO)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教

研究者番号: 40348503

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし