

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：37114

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15689

研究課題名(和文) チャネルキナーゼTRPM7を介する骨Mg<sup>2+</sup>代謝機構の解明研究課題名(英文) Elucidation of Mg<sup>2+</sup>-metabolic mechanisms through the Channel-kinase TRPM7

研究代表者

岡部 幸司 (okabe, koji)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：80224046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞に発現するMg<sup>2+</sup>透過型陽イオンチャネルであるチャネルキナーゼTRPM7に注目し、破骨細胞を介するMg<sup>2+</sup>代謝機構を検討した。破骨細胞特異的TRPM7コンディショナル欠損(cKO)マウスとTRPM7キナーゼ変異(KR)マウスを用いて骨形態解析や血清Mg<sup>2+</sup>濃度検査を行った。8週齢のcKOやKRマウスでは骨形態パラメーター、血清Mg<sup>2+</sup>濃度、及び培養破骨細胞の骨吸収活性に違いはなかった。一方、30週齢のcKOマウスでは破骨細胞数が減少し骨量が増加した。従って、Mg<sup>2+</sup>透過型チャネルであるTRPM7が加齢に伴い破骨細胞を介する骨吸収や骨リモデリングに重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated Mg<sup>2+</sup>-metabolic mechanisms through the Channel-kinase TRPM7 which is a Mg<sup>2+</sup>-permeable cation channel in osteoclasts. Analyses of bone morphometry and serum Mg<sup>2+</sup> concentration were performed using the osteoclast-specific TRPM7 conditional KO (cKO) mice and TRPM7-kinase mutant (KR) mice. There were no significant differences in bone morphometry parameters, serum Mg<sup>2+</sup> concentration and bone resorption activity of cultivated osteoclast between cKO and KR and wild type mice of 8-week-old. On the other hand, 30-week-old cKO mice showed a significant increase in bone volume and decrease in the number of osteoclast. These findings suggest that Mg<sup>2+</sup>-permeable TRPM7 channel plays an important role in the bone resorption and bone remodeling by osteoclasts with aging.

研究分野：生理学

キーワード：TRPM7 破骨細胞 コンディショナルKOマウス Mg<sup>2+</sup>代謝機構

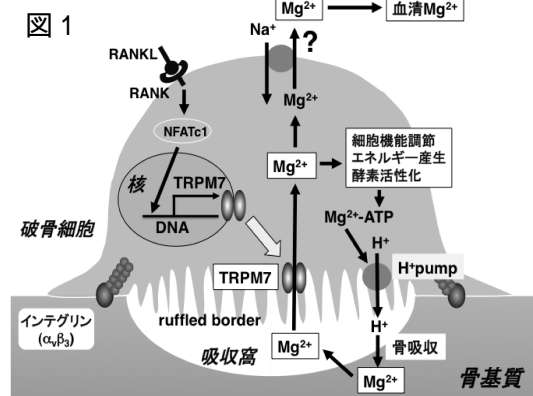
1. 研究開始当初の背景

(1)  $Mg^{2+}$  は多くの酵素活性やエネルギー産生系を中心として細胞の増殖や分化など殆どの生命現象に不可欠な因子である。生体の  $Mg^{2+}$  恒常性は、主に小腸上皮からの  $Mg^{2+}$  吸収と腎尿細管上皮からの  $Mg^{2+}$  排出のバランスで保たれている。一方、生体内  $Mg^{2+}$  の 65% は骨にリン酸塩として蓄積され、骨での  $Mg^{2+}$  代謝が不足した場合には  $Ca^{2+}$  と置き換わり  $Mg^{2+}$  が体内に補充されると考えられており、 $Mg^{2+}$  恒常性への骨  $Mg^{2+}$  供給系の重要性が示唆される。しかしながら、骨における  $Mg^{2+}$  供給系を担う輸送体分子や具体的な  $Mg^{2+}$  代謝機構は不明である。

(2) これまで我々は破骨細胞のイオン輸送と骨吸収機能の調節に関する多くの研究を行い、破骨前駆細胞への RANKL 投与により  $Ca^{2+}$  透過性陽イオンチャネルの一種である transient receptor potential (TRP) ファミリーに属する TRPV2 の発現が促進され、TRPV2 を介する  $Ca^{2+}$  流入が  $Ca^{2+}$  オシレーションを形成し calcineurin 及び NFATc1 の活性化を経て破骨細胞分化が誘導されることを報告した (Kajiya et al. 2010)。一方、この研究の DNA マイクロアレイ解析において、TRP ファミリー (Melastatin 受容体) に属する TRPM7 が TRPV2 と同様に RANKL 投与により破骨前駆細胞に優位に誘導され、分化と共に発現量が増加することや、TRPM 阻害剤により破骨細胞形成が抑制されることを発見したが、その機能は未だ不明である。この TRPM7 は非選択性の陽イオンチャネルで、 $Mg^{2+}$  に対する透過性が特段に高いことから、細胞内  $Mg^{2+}$  恒常性を担う輸送分子として注目されている。TRPM7 は、その C 末側に キナーゼドメインを持ち酵素活性を有するユニークなイオンチャネルでチャネルキナーゼと呼ばれており、PIP2 自身や PI3 リン酸が TRPM7 の活性化を制御することや、流入  $Mg^{2+}$  により自己リン酸化され下流シグナルを調節している (Runnels et al. 2002)。このようにキナーゼ活性を有する  $Mg^{2+}$  輸送体として、細胞増殖、アポトーシス、発ガン等の多岐の生命現象に関わる必須分子であり、TRPM7 欠損マウスは胎生致死となる (Jin et al. 2008)。しかしながら、破骨細胞における TRPM7 分子の  $Mg^{2+}$  輸送機構とこれに続く骨吸収機能調節や生体  $Mg^{2+}$  恒常性調節への関与については全く不明である。

(3) 従来の報告では TRPM7 を介する  $Na^+$  を中心とした一価の陽イオン輸送は生理的な  $Mg^{2+}$  濃度下では  $Mg^{2+}$  ブロックにより強く抑制されており、低  $Mg^{2+}$  濃度条件下において観察できると報告されている。我々は既に破骨細胞において  $Mg^{2+}$  によりブロックされる TRPM7 様の陽イオン電流の存在を確認しているが、驚く

ことに外液酸性化に依存して TRPM7 様電流に対する  $Mg^{2+}$  ブロック作用が減弱し電流が強く活性化されることを発見した。この TRPM7 が酸活性化  $Mg^{2+}$  輸送である性質は、骨基質への酸分泌による強酸性環境で多くの無機成分を溶解し血中に輸送する破骨細胞にとっては意義深い。つまり、吸収窩内に溶出した数十 mM にも及び高濃度  $Mg^{2+}$  は、酸性環境下で ruffled border 上の TRPM7 の酸活性化  $Mg^{2+}$  輸送により濃度勾配に従って細胞内へ取込まれ、破骨細胞機能を調節するだけでなく、取込んだ  $Mg^{2+}$  を対側膜から骨髓腔内や血中に輸送するという「破骨細胞を経由した溶出  $Mg^{2+}$  輸送機構」の関与の可能性を考えており、この効率的かつ合理的な TRPM7 を介する  $Mg^{2+}$  代謝調節系を明らかにすることは意義深い (図 1 参照)。



2. 研究の目的

本研究の目的は、破骨細胞特異的 TRPM7 コンディショナル欠損マウス、及び TRPM7 キナーゼ変異マウスを用いて、*in vivo* と *in vitro* 実験系によりチャネルキナーゼ TRPM7 の  $Mg^{2+}$  代謝における役割を解明する点にある。このことは、破骨細胞による新規の骨  $Mg^{2+}$  代謝制御を解く上で重要な意義があると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 全身的な TRPM7 遺伝子欠損マウスは胎生致死で成体での機能を解析できないため、まず、Cre-loxP のシステムを用いて破骨細胞特異的な TRPM7 のコンディショナル欠損マウスの作製に取り組んだ。具体的には Cre マウスには破骨細胞特異的なタンパクであるカテプシン K-Cre マウスを用い、我々が開発した TRPM7-fllox マウスとの交配を行い、破骨細胞特異的 TRPM7 コンディショナル欠損 (TRPM7-ckO) マウスの作出に取り組んだ。一方、TRPM7 キナーゼドメインに点変異を挿入し、キナーゼ活性だけを欠失したキナーゼ変異マウスは、連携研究者の松下教授 (琉球大学) より既に供与されている。これらの TRPM7 変異マウスを準備することで *in vivo* と *in vitro* 解析を進めた。

(2) 前述の TRPM7-cKO マウス及び TRPM7 キナーゼ変異マウスを用いて、骨組織における *in vivo* 表現型の骨形態解析を行い、野生型マウスと比較検討した。まず、各種マウスにカルセインを事前投与し、長管骨における骨形成や骨吸収機能を骨形態計測の手法を用いて解析を行った。また、軟 X 線や単純 X 線による解析後、マイクロ CT を用いて骨量等を解析すると共に、骨組織（脛骨）を GMA 樹脂包埋することで切片を作製し、トルイジンブルー染色等の各種染色により骨形成系、及び骨吸収系のパラメーターを調べた。また、前述の骨形態解析を 8 週齢（若年齢期）と 30 週齢（加齢期）の野生型、及び TRPM7 変異マウスを用いて比較検討することで加齢との関係を調べた。これらの結果をまとめて骨リモデリングにおける破骨細胞の TRPM7 の役割を検討を行った。

(3) 破骨細胞に発現する TRPM7 の血中  $Mg^{2+}$  代謝における役割を検討するために、野生型マウス、TRPM7-cKO マウス及び TRPM7 キナーゼ変異マウスを用いて、血清  $Mg^{2+}$  濃度変化の解析を行った。方法としては、マウスの血清を採集し、 $Mg^{2+}$  指示薬を用いて吸光度測定により  $Mg^{2+}$  濃度を測定した。

(4) 野生型マウス、TRPM7-cKO マウス及び TRPM7 キナーゼ変異マウスより骨髓系細胞を採集し、M-CSF や RANKL 投与により破骨細胞を誘導した。これらの破骨細胞を象牙切片上で培養することにより骨吸収活性を比較した。また、これらの破骨細胞を用いて、パッチクランプ法により、 $Mg^{2+}$  感受性、酸活性化や TRPM 阻害薬感受性等を指標として、TRPM7 を介するイオン電流を同定した。また、この電流成分に  $Mg^{2+}$  透過性電流が含まれるかどうかを調べ、 $Mg^{2+}$  輸送機能の性質を検討した。Mag-fura-2 を用いて外液酸性化による細胞内  $Mg^{2+}$  濃度変化を測定し、TRPM7 による細胞内  $Mg^{2+}$  濃度調節機構を解析した。

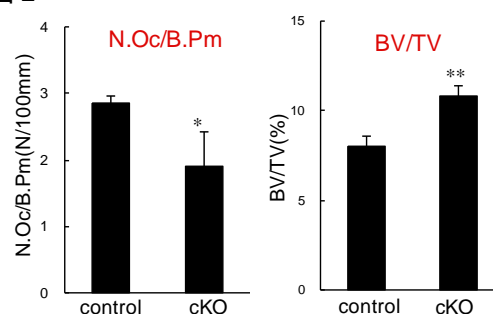
#### 4. 研究成果

(1) まず、平成 27 年度において、TRPM7-flox マウスと破骨細胞特異的タンパクであるカテプシン K-Cre マウスの交配により、破骨細胞特異的 TRPM7 コンディショナル欠損 (TRPM7-cKO) マウスの作出と繁殖に成功し、これを用いて骨組織での表現型の解析に取り組むことが可能となった。

(2) この TRPM7-cKO マウス、TRPM7 キナーゼ変異マウス、及び野生型マウス (control) にカルセインを投与し、8 週齢（若年齢期）と 30 週齢（加齢期）における骨形成や骨吸収機能を骨形態計測の手法を用いて *in vivo* 解析にて比較検討を行った。その結果、8 週齢（若年齢）の TRPM7-cKO マウスや TRPM7

キナーゼ変異マウスでは野生型と比べると、破骨細胞数や骨量に減少する傾向は認められたが統計的に優位な差は認められなかった。また、この 8 週齢の TRPM7-cKO マウスの血清  $Mg^{2+}$  濃度や、採集した破骨細胞の骨吸収活性を検討したが、野生型と比べて有意な違いが認められなかった。一方、30 週齢（加齢期）の TRPM7-cKO マウスでは野生型 (control) と比べて、骨表面当たりの破骨細胞数 (N.Oc/B.Pm) や骨吸面のパラメーターに有意な減少と共に、単位骨量 (BV/TV) の有意な増加が認められた (図 2 参照)。従って、TRPM7 が加齢に従って破骨細胞を介する骨吸収や骨リモデリングに重要な役割を果たすことが明らかとなった。

図 2



(3) パッチクランプ法で検討した結果、野生型マウスから誘導した破骨細胞では  $Mg^{2+}$  感受性の TRPM7 様電流が記録された。一方、TRPM7-cKO マウスから誘導した破骨細胞では、この TRPM7 様電流量は野生型に比べると有意に減少していた。また、野生型マウスの破骨細胞を用いて、外液を高  $Mg^{2+}$  濃度条件とし、パッチクランプ法や Mag-fura-2 を用いて、この  $Mg^{2+}$  透過性電流や細胞内  $Mg^{2+}$  濃度変化を検討した。その結果、バックグラウンドの電流や蛍光変化に比べ、 $Mg^{2+}$  感受性の電流や蛍光変化量が現状では不明確であった。

(4) 加齢に伴って、TRPM7 が破骨細胞の分化や骨吸収機能の維持に重要な役割を果たすことが明らかとなった。一方で 8 週齢の TRPM7-cKO マウスの血清  $Mg^{2+}$  濃度や破骨細胞の骨吸収活性には有意な変化が認められなかった。今後は、加齢 TRPM7-KO マウスでの血中  $Mg^{2+}$  濃度変化や、採集した破骨細胞の骨吸収活性や培養液中の  $Mg^{2+}$  濃度を検討する必要がある。また、細胞内  $Mg^{2+}$  濃度測定には他の感受性色素や測定方法も検討する余地がある。加えて、RANK-Cre マウスを用いて、破骨細胞分化のより初期段階での TRPM7-cKO マウスを更に解析することも重要であると考えられる。

以上に取り組み、破骨細胞 TRPM7 による血清  $Mg^{2+}$  恒常性の調節機構の解明に取り組みたいと考えている。

## 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5件)

Yamaguchi Y, Sakai E, Okamoto K, Kajiya H, Okabe K, Naito M, Kadowaki T, Tsukuba T, Rab44, a novel large Rab GTPase, negatively regulates osteoclast differentiation by modulating intracellular calcium levels followed by NFATc1 activation, Cell Mol Life Sci, 75(1), 2018, pp.33-48.  
DIO: 10.1007/s00018-017-2607-9.

Ogata K, Tsumuraya T, Oka K, Shin M, Okamoto F, Kajiya H, Katagiri C, Ozaki M, Matsushita M, Okabe K, The crucial role of the TRPM7 kinase domain in the early stage of amelogenesis, Sci Rep, 7(1), 2017, 18099.  
DIO: 10.1038/s41598-017-18291-0.

Tsuzuki T, Kajiya H, T-Goto K, Tsutsumi T, Nemoto T, Okabe K, Takahashi Y, Hyperocclusion stimulates the expression of collagen type XII in periodontal ligament, Arch Oral Biol, 66, 2016, pp.86-91.  
DIO: 10.1016/j.archoralbio.2016.02.009.

Katsumata Y, Kajiya H, Okabe K, Fukushima T, Ikebe T, A salmon DNA scaffold promotes osteogenesis through activation of sodium-dependent phosphate cotransporters, Biochem Biophys Res Commun, 査読有, 468(4), 2015, pp.622-628.  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.172.

Nagaoka Y, Kajiya H, Ozeki S, Ikebe T, Okabe K, Mevalonates restore zoledronic acid-induced osteoclastogenesis inhibition, J Dent Res, 査読有, 94(4), 2015, pp.594-601.  
DOI: 10.1177/0022034514564187

[学会発表](計7件)

進 正史、緒方佳代子、圓谷 智之、岡 暁子、岡本富士雄、鍛冶屋 浩、片桐千秋、尾崎正雄、松下正之、岡部幸司、エナメル質形成における TRPM7 のキナーゼ活性とチャネル機能の意義、第95回日本生理学会、2018年3月28日、高松

緒方佳代子、岡 暁子、進 正史、岡本富士雄、鍛冶屋 浩、尾崎正雄、岡部幸司、神経堤細胞特異的 TRPM7 欠損マウスを用

いた歯の発達における TRPM7 の役割解析、第44回福岡歯科大学学会総会・学術大会、2017年12月3日、福岡

進 正史、緒方佳代子、圓谷智之、岡 暁子、岡本富士雄、鍛冶屋 浩、片桐千秋、尾崎正雄、松下正之、岡部幸司、TRPM7 キナーゼを介するリン酸化シグナルとエナメル質形成制御、第68回西日本生理学会、2017年10月6日、福岡

進 正史、緒方佳代子、岡 暁子、岡本富士雄、鍛冶屋 浩、岡部幸司、TRPM7 のキナーゼドメインを介したエナメル質形成制御、第35回日本骨代謝学会、2017年7月27日、福岡

大城希美子、鍛冶屋 浩、岡本富士雄、坂上竜資、岡部幸司、破骨細胞形成に対する脂質異常の影響、第58回歯科基礎医学会、2016年8月24日～26日、札幌

岡部幸司、緒方佳代子、進 正史、岡本富士雄、岡 暁子、鍛冶屋 浩、エナメル質石灰化に関わる TRP チャネルの発現と機能、第58回歯科基礎医学会、2016年8月24日～26日、札幌

岡部幸司、破骨細胞のイオン輸送と機能～生きた破骨細胞のダイナミックな生命現象を求めて、第33回日本骨代謝学会、2015年7月23日～25日、東京

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.fdcnet.ac.jp/col/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

岡部 幸司 (OKABE Koji)  
福岡歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：80224046

### (2)研究分担者

岡本 富士雄 (OKAMOTO Fujio)  
福岡歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：60153938

福島 秀文 (FUKUSHIMA Hidefumi)  
東北大学・歯学研究科・准教授  
研究者番号：70412624

### (3)連携研究者

松下 正之 (MATSUSHITA Masayuki)  
琉球大学・医学(系)研究科・教授  
研究者番号：30273965