

令和元年5月31日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05509

研究課題名(和文) 歯の石灰化制御分子TRPM7の情報伝達と機能解析

研究課題名(英文) Signal transduction and functional analysis of TRPM7 in the regulatory mechanism of tooth mineralization

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：チャネルキナーゼTRPM7が歯に高発現することに注目し、エナメル芽細胞特異的TRPM7欠損(cK0)、及びTRPM7キナーゼ変異(KR)マウスを用いて、歯の形成におけるTRPM7のミネラル輸送とキナーゼ活性の機能を検討した。KRマウスのエナメル芽細胞ではTRPM7のイオン輸送は正常で、エナメル質形成不全と共にBMPシグナル分子のリン酸化の減弱が認められた。一方、cK0マウスではTRPM7イオン輸送の障害と共に、強いエナメル質形成不全や細胞形態の異常が認められた。従ってTRPM7のイオン輸送とキナーゼ活性の双方が、エナメル芽細胞の分化や形態維持を調節し、エナメル質形成に寄与することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の石灰化過程を担うミネラル輸送の分子同定や石灰化機構に関しては多くが不明であり解明すべき必須課題である。本研究の学術的意義は、生体において最もエナメル芽細胞に高発現するミネラル輸送体TRPM7に注目し、歯の細胞特異的な遺伝子改変マウスを用いて、これまで困難であった歯の石灰化調節の分子機構解明に取り組む点である。これらの取組は、歯の形成異常を特徴とする病態機序を解く上でも重要であり、歯の再生研究の基盤形成や創薬開発に向けての展開への社会的貢献にもつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Channel kinase TRPM7 is a unique bi-functional cation channel containing a protein kinase domain and highly expressed in teeth. Using ameloblast-specific TRPM7 conditional knock out (cK0) mice and TRPM7 kinase mutant (KR) mice, the function of mineral transport and kinase activity of TRPM7 in tooth formation was investigated. In KR mice, the channel function of TRPM7 in ameloblasts was normal, but the minor enamel defects with hypomineralization and decreased phosphorylation of BMP signal molecules were observed. On the other hand, cK0 mice showed the severe enamel hypomineralization and abnormal ameloblast morphology together with suppression of TRPM7 ion transport. Therefore, it was found that both TRPM7 ion transport and kinase activity contribute to enamel formation through modulation of ameloblast differentiation and cell morphology.

研究分野：口腔生理学

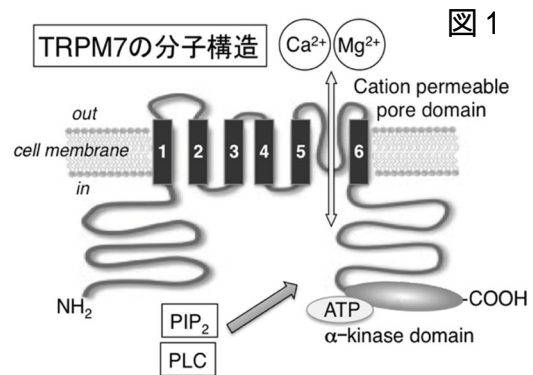
キーワード：TRPM7 エナメル芽細胞 エナメル質形成 ミネラル輸送 キナーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 歯の硬組織はいったん形成されると吸収されず機能を維持するため、歯を形成する細胞の分化や石灰化過程に異常があると障害が生じやすい硬組織である。近年、歯の再生研究は進みつつあるが、一方で歯の石灰化過程を担うミネラル輸送の分子同定や石灰化機構に関してはほぼ不明であり、今後の歯の発育障害の病態解明や歯の再生治療の推進に向けて解明すべき必須課題である。これまで歯のミネラル輸送体としては、初期培養細胞や一部の細胞株において TRPA1、冷刺激感受 TRPM8、熱感受性 TRPV1、 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体、L-type  $\text{Ca}^{2+}$ channel、ATP 感受性チャネル等の発現や電流が報告されているが、主に象牙質痛覚の受容機構との検討で、その分子同定と歯の形成との直接的な機能関係は明らかでない。特に、エナメル芽細胞に関する情報は殆どなく、最近、 $\text{Na}^+$ - $\text{Mg}^{2+}$ 交換輸送体である CNNM4 がエナメル芽細胞層に発現し、その欠損マウスがエナメル質減形成を示すことが報告されたが (Yamazaki et al. 2013) その機能や石灰化機構との関係は不明である。こういった背景の中、我々は歯の細胞にミネラル輸送体である TRPM7 が高発現し石灰化を担うことを見いだした。ただ、その情報伝達や石灰化との関連機構についてはこれからである。

(2) これまで我々は破骨細胞の分化と共に transient receptor potential (TRP) ファミリーに属する TRPV2 と TRPM7 の発現が誘導され、TRPV2 を介する  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションと NFATc1 活性化が破骨細胞分化を誘導する機構を報告した (Kajiya et al. 2010) 。また、TRPM7 の機能研究として、TRPM7-flox マウスを作製し、破骨細胞特異的な TRPM7 コンディショナル KO マウスの作製に成功した。この破骨細胞には TRPM7 様イオン輸送が消失しており、骨への表現型や骨吸収機能等を検討している。TRPM7 は TRPM ファミリー (Melastatin 受容体) に属する非選択性の陽イオンチャネルで、 $\text{Ca}^{2+}$  や  $\text{Mg}^{2+}$  に対する透過性が特段に高いことから、細胞内ミネラル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」と呼ばれている (図 1 参照) 。この C 末領域は PIP<sub>2</sub> 自身や PI3 リン酸が TRPM7 の活性化を制御すると共に、流入  $\text{Mg}^{2+}$  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) 。また、T リンパ球において TRPM7 のキナーゼドメインがカスパーゼで切断されアポトーシスを誘導することが報告された (Dasai et al. 2012) 。このように TRPM7 はキナーゼ活性型  $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$  輸送体として、細胞増殖、細胞接着運動、細胞死、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) 。



(3) 我々は TRPM7 キナーゼドメインの点変異 (K1646R) によりキナーゼ活性だけを欠失したキナーゼ変異マウスを *in vivo* 解析した結果、正常飼育環境では野生型と差異はなかったが、切歯に関しては色が白色を呈し、マイクロ CT や走査電子顕微鏡 (SEM) の解析でエナメル質形成不全の石灰化異常が認められた。TRPM7 の組織分布を *in situ* hybridization や RT-PCR、組織免疫染色等を用いて検討したところ、驚くことに全身でも象牙芽細胞やエナメル芽細胞に極めて高く発現することを発見した。また、象牙芽細胞様細胞株 (mDP 細胞) やエナメル芽細胞株 (SF2 細胞) を用いた *in vitro* 実験においても、TRPM7 が高発現し TRPM7 様の陽イオン輸送も優位に存在した。以上のことより、TRPM7 は歯に特異的に高発現する分子で、TRPM7 のユニークな性質であるイオンチャネル機能、及びキナーゼ機能が歯の石灰化調節に関与すると考えられる。今後、象牙芽細胞やエナメル芽細胞における TRPM7 のミネラル輸送やリン酸化機構と、これに続く歯の発生や石灰化調節機構との情報伝達を解明していく必要がある。

### 2. 研究の目的

前述のように、我々はキナーゼ活性を有するユニークな  $\text{Ca}^{2+}$  透過型陽イオンチャネルである TRPM7 が、生体中でも特に象牙芽細胞やエナメル芽細胞に極めて高発現し、この分子が歯の石灰化を担うことを発見した。本研究の目的は、歯の石灰化調節における TRPM7 のイオンチャネルとしてのミネラル輸送機能とキナーゼとしてのリン酸化機能の役割やこれに続くシグナル伝達機構を、*in vitro* 実験系と我々が開発した歯の細胞に特異的な TRPM7 コンディショナル欠損マウスや TRPM7 キナーゼ変異マウスを用いた *in vivo* 実験系で解明することにある。また、歯に高発現する TRPM7 をプロモーターとした TRPM7-Cre マウスを作製し、新規の歯特異的な遺伝子改変システムの開発にも取り組む。これらの取組みは、歯の発育障害の病態解明や歯の再生研究へ新しい戦略を提供すると考えられる。

### 3. 研究の方法

(1) 歯の形成における TRPM7 のイオンチャネルとしてのミネラル輸送機能とキナーゼとしてのリン酸化機能の役割をそれぞれ検討するために、下記 2 種類の遺伝子改変マウスを用いて *in*

vivo 実験系での機能解析に取り組んだ。TRPM7 のキナーゼ機能を検討するために、キナーゼドメイン部分(K1646R)の点変異によりTRPM7のキナーゼ機能のみを欠失したTRPM7キナーゼ変異マウスを用いた。エナメル芽細胞に特異性の高いサイトケラチン14(CK14)のCK14-Creマウスと我々が開発したTRPM7-floxマウスとの交配により作成した、エナメル芽細胞に特異的なTRPM7コンディショナル欠損マウスを用いた。TRPM7の歯の形成や石灰化過程における機能解析に取り組んだ。

上記とマウスの歯の組織へのin vivo表現型の形態や組織解析を野生型マウスと比較することで、TRPM7の有するイオンチャネル機能の重要性とキナーゼ活性の歯の形成や石灰化過程における役割がin vivoレベルで証明できると考えている。具体的には、マイクロCTを用いたX線解析、走査電子顕微鏡(SEM)でのエナメル質の構造解析、エナメル質のミネラルイオン組成の分析、アリザリンレッド染色による石灰化の解析、in situ hybridization法やTRPM7免疫染色によるTRPM7分子の組織や細胞内での局在の解析等に取り組んだ。

(2) 各マウスから採集したエナメル芽細胞や細胞株 mHAT9d、及び SF2 等を用いて、real time PCR 法やウエスタンブロット法により、TRPM7 の mRNA やタンパク発現、及びシグナル分子のリン酸化を比較した。また、株化細胞を石灰化誘導培地にて長期間培養し、アリザリンレッド染色により沈着物の石灰化度を評価した。さらに、TRPM7-shRNA を導入し、TRPM7 タンパクのノックダウンによる TRPM7 に依存性した石灰化を調べた。

(3) ホールセル・パッチクランプ法を用いて、各マウスより採集したエナメル芽細胞における TRPM7 様の陽イオン電流 ( $Mg^{2+}$ 感受性電流、及び 2-APB、FTY720 感受性電流) を記録し、その電流密度を比較した。また、 $Ca^{2+}$ 蛍光指示薬(Fura-2)を用いて  $Ca^{2+}$ イメージング法により細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度変化を測定し、TRPM7 による細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度調節機構を解析した。

(4) TRPM7 分子が歯に特異的に高発現する性質を利用して、歯特異的な遺伝子発現調節システムの構築を目的に、TRPM7 遺伝子のプロモーター調節下に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス (TRPM7-Cre) の作製に取り組んだ。

#### 4. 研究成果

(1) エナメル質形成における TRPM7 のキナーゼとしての機能的な重要性を検討する目的で、野生型と TRPM7 キナーゼドメイン内の点変異 (K1646R:KR) マウスを解析し比較検討した。

野生型に比べ KR マウスの切歯は色が白色を呈し、マイクロCT解析により KR マウスのエナメル質には弱い石灰化低下がみられ、走査型電子顕微鏡解析によりエナメル質の結晶構造の脆弱化が認められた。また、KR マウスのエナメル質では Ca や炭素の含有量の低下と共に、ビッカース硬度の優位な低下が認められた。従って、KR マウスは弱いエナメル形成不全を呈することが分かった。

real time PCR 法によりマウス臓器間の発現を比較したところ TRPM7 は歯に高発現し、同じファミリーに属する TRPM6 の歯における発現は非常に低かった。

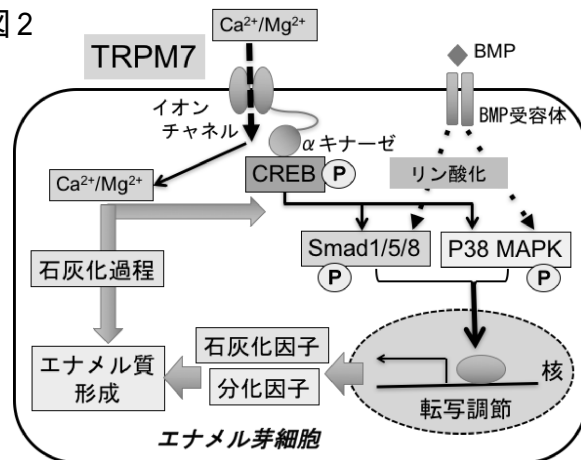
in situハイブリダイゼーションと免疫染色により TRPM7 の発現を検討した結果、野生型、KR マウス共に TRPM7 はエナメル芽細胞と象牙芽細胞に強い発現を認めた。

野生型、KR 各々のマウスの切歯から単離したエナメル芽細胞を用いて、TRPM7 様電流をパッチクランプ法により測定したところ、KR 型でも野生型と同程度の電流が観察できたことから、この変異がイオンチャネルの機能に大きな影響を与えていないことが確認された。

TRPM7 のキナーゼ機能としての下流シグナルを検討するために、エナメル質形成に関わる BMP の主要シグナルである Smad1/5/9、p38 のリン酸化、及び cAMP response element binding protein (CREB) のリン酸化を免疫染色により切歯エナメル質の解析を行った。その結果、Smad1/5/9、p38 のリン酸化、及び CREB のリン酸化は、主に野生型マウス切歯の前分泌期や

分泌期のエナメル芽細胞に認められたが、KR マウスにおいては、これらの部位における 3 つの転写調節因子のリン酸化の減弱が認められた。野生型と KR マウスから採集したエナメル芽細胞や細胞株 mHAT9d を用いて、Smad1/5/9、p38、CREB のリン酸化をウエスタンブロット法により比較した結果、KR マウスではリン酸化の減弱が認められた。また、これら 3 つの転写調節因子と TRPM7 分子との相互作用を確認するために免疫沈降解析を行った。その結果、TRPM7 が CREB と直接的な会合しリン酸化を受けることが示唆された。

図 2



以上より、TRPM7 のキナーゼ機能はチャンネル活性には大きな影響は与えずに、分泌期のエナメル芽細胞の BMP シグナルや CREB のリン酸化カスケードの活性化に寄与することでエナメル芽細胞の分化を調節すると考えられた(図2参照)。従って、TRPM7 キナーゼはエナメル質形成や石灰化に重要な役割をもつことが明らかとなった。これらの成果をまとめ論文発表を行った(下記の発表雑誌論文 参照)。

(2)次に、エナメル芽細胞特異的な TRPM7 コンディショナル欠損(cK0)マウスを用いて、TRPM7 のイオンチャンネルとキナーゼ機能の双方を傑出した表現型を解析し、前述(1)の TRPM7 のキナーゼ機能と比較することで、TRPM7 を介するイオン輸送機能の重要性を検討した。

野生型に比べ cK0 マウスの切歯は白色を呈し、エナメル質の欠損が認められた。また、マイクロ CT 解析によりエナメル質には著名な石灰化低下がみられ、歯の硬度低下が認められることより、cK0 マウスは重篤なエナメル形成不全を呈することが分かった。

cK0 マウスではエナメル芽細胞層の配列の乱れや細胞形態の異常が認められた。

cK0 マウスの切歯から単離したエナメル芽細胞を用いて、TRPM7 様電流をパッチクランプ法により測定した。多数例での解析の結果、電流が著名に抑制される細胞群と一部に影響を受けない細胞群の二つの群が観察された。この結果は、採集したエナメル芽細胞の純度の問題と個々の細胞の Cre 酵素による欠損効率の二つの課題を含んでいると考えられるが、基本的には電流が著名に抑制されている細胞に関しては、TRPM7 の欠失が実行されていると考えられた。また、このことは Ca<sup>2+</sup> イメージング法でも一部確認された。

現在、エナメル芽細胞株 mHAT9d、及び SF2 等を用いて、石灰化誘導培地にて長期間培養し沈着物の石灰化度を評価を行い、TRPM7-shRNA を導入し TRPM7 タンパクのノックダウンによる TRPM7 に依存性した石灰化の解析を行っている。

以上より、cK0 マウスでは TRPM7 のイオンチャンネル機能が障害を受けると共に、エナメル芽細胞層の配列の乱れや細胞形態の異常により、重篤なエナメル形成不全を呈することが分かった。従って、TRPM7 のイオン輸送はエナメル質形成や石灰化において極めて重要な役割をもつと考えられる。

(3) 歯に特異的に高発現する TRPM7 遺伝子のプロモーター調節下に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス(TRPM7-Cre)の作製に取組んだ。これにより様々な遺伝子をより歯特異的にノックアウトできる新規のシステムを開発できるばかりか、歯において TRPM7 と共発現し機能的に共役する分子群の解析も可能となる。ベクター構築、インジェクションと産子取得、ファウンダー同定、F1 マウス作製、レポーターマウス個体復元、F2 マウス作製を経て Cre マウス作製までの過程を実績のある開発業者と相談しながら進めることで、TRPM7-Cre マウス作製に成功した。本研究予算の一部はこの TRPM7-Cre マウス作製費用に当てた。まずは、tdTomato を発現するマウスとの交配により、TRPM7 発現を赤色に視覚化できるマウスの作製に成功し、TRPM7 発現部位の解析が可能となった。

(4) 以上のことから、TRPM7 は、エナメル芽細胞に特徴的に発現するチャンネル蛋白であり、TRPM7 のイオン輸送とキナーゼとしての双方の機能が、それぞれエナメル芽細胞の形態維持や分化を調節することで、エナメル質形成や石灰化に必須な分子であることが明らかとなってきた。現在、shRNA を用いた TRPM7 タンパクのノックダウンによる TRPM7 様イオン電流と石灰化との関係、及び cK0 マウスの in vitro 解析を行っており、これらの結果も含めて、歯の石灰化機構における TRPM7 の役割をさらに解明したいと考えている。

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計4件)

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*, 査読有, 66, 2016, pp. 86-91.

doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.02.009.

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*, 査読有, 7(1), 2017, 18099.

doi: 10.1038/s41598-017-18291-0.

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

Ohgi K, [Kajiya H](#), Goto-T K, [Okamoto F](#), Yoshinaga Y, [Okabe K](#), Sakagami R, Toll-like receptor 2 activation primes and upregulates osteoclastogenesis via lox-1, *Lipids Health Dis*, 査読有, 17(1), 2018,132.

doi: 10.1186/s12944-018-0787-4.

[学会発表](計8件)

進 正史、岡本富士雄、鍛冶屋 浩、緒方佳代子、岡部幸司、バートレット・ジョン、MMP20 は cadherin のシグナル調節を介してエナメル質形成を制御する、第 34 回日本骨代謝学会、2016.

岡部幸司、緒方佳代子、進 正史、岡本富士雄、鍛冶屋 浩、Chanzaim: エナメル質石灰化に関わる TRP チャネルの発現と機構、第 58 回歯科基礎医学会(招待講演)、2016.

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.

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.

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.

進 正史、溝口利英、岡本富士雄、鍛冶屋 浩、岡部幸司、間葉系細胞由来 TRPM7 による骨格形成制御、第 36 回骨代謝学会、2018.

進 正史、岡本富士雄、鍛冶屋 浩、原田英光、岡部幸司、マウスエナメル芽細胞の新規標識・分取法、第 60 回歯科基礎医学会学術大会、2018.

進 正史、岡本富士雄、鍛冶屋 浩、岡部幸司、TRPM7 によるエナメル質形成制御、第 69 回西日本生理学会、2018.

[その他]

ホームページ等

福岡学園・学術情報データベース

<https://acinfo.college.fdcnet.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：進 正史                      ローマ字氏名：(SHIN, Masashi)  
所属研究機関名：福岡歯科大学              部局名：口腔歯学部                      職名：講師  
研究者番号(8桁)：70549261

研究分担者氏名：岡本 富士雄                  ローマ字氏名：(OKAMOTO, Fujio)  
所属研究機関名：福岡歯科大学                  部局名：口腔歯学部                      職名：講師  
研究者番号(8桁)：60153938

研究分担者氏名：鍛冶屋 浩                      ローマ字氏名：(KAJIYA, Hiroshi)  
所属研究機関名：福岡歯科大学                  部局名：口腔歯学部                      職名：講師  
研究者番号(8桁)：80177378

研究分担者氏名：松下 正之                      ローマ字氏名：(MATSUSHITA, Masayuki)  
所属研究機関名：琉球大学                      部局名：医学(系)研究科                  職名：教授  
研究者番号(8桁)：30273965

研究分担者氏名：岡 暁子                          ローマ字氏名：(OKA, Kyoko)  
所属研究機関名：福岡歯科大学                  部局名：口腔歯学部                      職名：准教授  
研究者番号(8桁)：60452778