

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03822

研究課題名(和文) チャネルキナーゼTRPM7による骨格形成制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of bone development mediated by 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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：チャネルキナーゼTRPM7に注目し、骨髄間葉系細胞に特異的なTRPM7欠損マウス(Prx1/cKO)、及びTRPM7キナーゼ変異(KR)マウスを用いて、骨形成におけるTRPM7のミネラル輸送とキナーゼ活性の機能を検討した。TRPM7は主に成長板軟骨や海綿骨に発現した。Prx1/cKOマウスは長管骨の短縮、海綿骨量の減少、軟骨の菲薄化や肥大化軟骨の分化に障害を示した。また、骨吸収系マーカーやRANKL発現は増加傾向にあった。一方、KRマウスでは影響がなく、キナーゼ活性の関与は少ないと考えられた。従って、TRPM7の特にイオン輸送機能が軟骨分化やそれに続く骨形成機構に重要であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨の発達や形成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、ミネラル輸送とキナーゼ活性を有するTRPM7に注目し、骨髄間葉系細胞に特異的な遺伝子改変マウスを用いて、骨格形成におけるミネラル輸送分子のシグナル伝達機構や機能との関係、特にin vivo実験系における骨格形成への直接的な機能について取組む点である。これらの取組は、骨格形成異常の病態の理解や骨組織の再生研究へ新しい戦略を提供し、社会的な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 mesenchymal cell specific TRPM7 conditional knock out (Prx1/cKO) mice and TRPM7 kinase mutant (KR) mice, the function of mineral transport and kinase activity of TRPM7 in bone formation was investigated. TRPM7 expression was mainly observed in growth plate cartilage and trabecular bone. Prx1/cKO mice showed shortened bones and impaired trabecular bone formation, and suppression of the growth plate area due to impaired differentiation of hypertrophic chondrocyte. Moreover, bone resorption markers and RANKL expression tended to be upregulated. No phenotype was observed in KR mice, indicating less involvement in the kinase activity. These findings suggest that TRPM7 is critical as a cation channel rather than as a kinase in bone development via the regulation of both chondrogenesis and osteoclastogenesis.

研究分野：口腔生理学

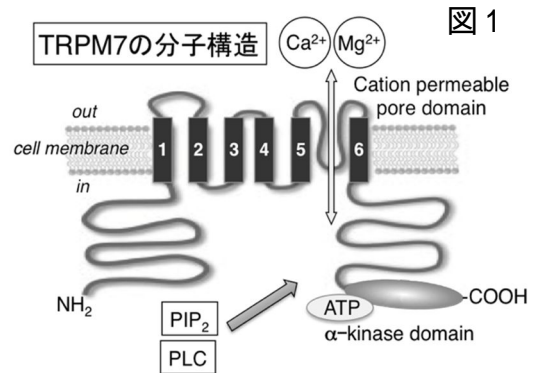
キーワード：TRPM7 骨格形成 ミネラル輸送 キナーゼ活性 骨髄間葉系細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 身体の骨格は膜性骨化や内軟骨性骨化の過程を介して骨髄間葉系細胞から分化した軟骨細胞や骨芽細胞により形成され、骨格形成後は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が織りなす骨リモデリングにより骨量や骨質が維持される。骨髄間葉系細胞が骨芽細胞へ分化する過程には Runx や Osterix など多くの転写調節因子が関わり、成熟した骨芽細胞が基質小胞やコラーゲン等の有機成分を分泌し骨基質の石灰化が進む。これらの分化を司るサイトカインシグナルには NFATc1 や PLC など細胞内 Ca^{2+} 濃度や Mg^{2+} 濃度に依存する調節系が多く含まれるばかりか、石灰化の基盤となる基質小胞の形成や分泌にも細胞内 Ca^{2+} や Mg^{2+} 等のミネラルイオンの供給が必須である。これまで骨形成を支持するミネラル輸送体としては、主に骨芽細胞株を用いた *in vitro* 実験系において TRPP1、TRPP2、TRPV2、TRPV4、TRPM3、TRPM4、TRPM7、L-type Ca^{2+} channel、ATP 感受性チャネル等の発現や一部の電流や細胞内 Ca^{2+} シグナリングについて断片的に報告されている。特に TRPV4 欠損マウスでは軟骨分化に障害があることが報告されている (Muramatsu et al. 2007)。しかしながら、骨格形成におけるミネラル輸送分子のシグナル伝達機構や機能との関係、特に *in vivo* 実験系における骨格形成への直接的な機能については、未だ充分かつ総合的に理解されていないのが現状である。

(2) 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、 Ca^{2+} や 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)。TRPM7 の発現は全身組織にコピキタスに分布するが、中でも歯の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我々は発見した。また、この TRPM7 の全身欠損マウスは胎生致死で解析不能あり、生命維持に必須な分子といえる。チャネルとキナーゼの 2 つのドメインを有する TRPM7 の分子構造において、最近、低温電子顕微鏡を用いて報告された (Duan et al. 2018)。この C 末領域は PIP₂ 自身や P13 リン酸が TRPM7 の活性化を制御すると共に、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)。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 Ca^{2+}/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) 我々は全身でも TRPM7 が歯に高発現することに着目し、歯のエナメル質形成機構における TRPM7 のミネラル輸送とキナーゼ活性の両方の機能の重要性を検討した。TRPM7 のキナーゼ活性だけを欠失した TRPM7 キナーゼ変異 (KR) マウスは生存する。我々はこの KR マウスを解析した結果、切歯にエナメル質形成不全や石灰化異常を認め、チャネル機能に影響を与えずエナメル芽細胞の分化に重要な BMP シグナルの smad・p38 や CREB のリン酸化が抑制されることを発見した (Ogata et al. 2017: 図 11 参照)。従って、TRPM7 のキナーゼ活性は BMP の下流シグナルや CREB のリン酸化を介してエナメル質形成を担うことを明らかにした。一方、全身で最も多い硬組織である骨における TRPM7 と骨形成機構との関係については不明である。我々は骨髄間葉系細胞に特異的な Prx1/cK0 マウスを解析した結果、驚いたことに長管骨が著名に短縮する骨格形成異常を示すことを発見した。従って、TRPM7 が骨格形成においても前述のエナメル質形成と共通する普遍的な機能、若しくは骨特異的な新規の機能を有する可能性が大いに考えられるが、その骨形成における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. 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ミネラル透過型陽イオンチャネルである TRPM7 が、歯に高発現しエナメル芽細胞の分化や石灰化を担い歯の硬組織形成に必須の分子であることを明らかにした。一方の硬組織である骨での機能を検討した結果、骨髄間葉系細胞に特異的な Cre を用いた TRPM7 コンデョシヨナル欠損マウスでは、特に長管骨が著名に短縮する骨格形成異常を示すことを発見した。本研究は骨形成や骨リモデリング機構における 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、我々が開発した骨髄間葉系細胞や骨芽細胞に特異的な TRPM7 コンデョシヨナル欠損マウスや TRPM7 キナーゼ変異マウスを用いた *in vivo* 実験系、及び *in vitro* 実験系で解明することにある。これらの取組みは、骨格形成異常の病態解明や骨組織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) 我々は 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) を作製している。この TRPM7-Cre マウスと赤色蛍光タンパクである tdTomato 遺伝子発現マウスの交配により TRPM7-Cre/Tomato マウスを作製し、TRPM7 発現を可視化することで発現動態を解析が可能となった。そこで、この TRPM7-Cre/tomato マウスと in situ hybridization 法により TRPM7 の遺伝子発現を、また、TRPM7 抗体による免疫染色により 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) 骨の形成における 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機能の役割をそれぞれ検討するために、下記 3 種類の遺伝子改変マウス、及び変異マウスを用いて in vivo 実験系での機能解析に取り組んだ。

骨髄間葉系細胞に特異性の高い Paired related homeobox 1 (Prx1) の Prx1-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骨髄間葉系細胞に特異的な TRPM7 コンディショナル欠損マウス

骨芽細胞に特異性の高い Leptin の Prx1-Cre マウスと TRPM7-flox マウスとの交配により作成した骨芽細胞に特異的な TRPM7 コンディショナル欠損マウス

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

上記 と のマウスの骨組織への 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 TRPM7 キナーゼ活性の骨の成長や形成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。また、上記 のマウスの骨組織への 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 の骨芽細胞における機能を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 線形態解析、骨形態パラメーター解析、HE 染色、アリザリンレッド染色、アルシアンブルー染色、TRAP 染色による破骨細胞解析、免疫組織染色により RANKL や軟骨マーカーの組織での発現解析等を用いて、in vivo 表現型の形態や組織の解析に取り組んだ。

(3) 上記の各マウスから採集した間葉系細胞等を用いて、real time PCR 法や抗体処理により、TRPM7、RANKL、OPG 等の重要な細胞マーカーの mRNA やタンパク発現を比較した。

4. 研究成果

(1) 骨組織における TRPM7 発現動態の検討

我々が独自に開発した TRPM7-Cre/tomato マウスや TRPM7 の in situ hybridization 法を用いた骨組織の解析の結果、主に成長板軟骨や海綿骨において TRPM7 の遺伝子発現が強く認められた。一方、TRPM7 の各種抗体を用いた免疫組織染色に取り組んだが、選択的な TRPM7 抗体が確認できていない。

(2) 骨髄間葉系細胞に特異的な TRPM7 コンディショナル欠損 (Prx1/cKO) マウスを用いた、TRPM7 のイオンチャネルとキナーゼ機能の双方を欠失した表現型の検討

Prx1/cKO マウスの in vivo 解析の結果、野生型マウスと比較して長官骨の骨長の著明な短縮や海綿骨量の減少が認められた (図 2 参照)。骨形態計測の解析では骨量 (BV / TV) や骨梁数 (Tb.N) などの海綿骨パラメーターや皮質骨面積 (Ct.Ar) および皮質骨厚 (Ct.Th) の皮質骨パラメーターも減少していた。

Prx1/cKO マウスでは、野生型マウスと比較して骨形成パラメーターや骨形成率は優位な変化は認められなかった。一方、成長板軟骨に菲薄化が認められたため軟骨を解析した。その結果、特に肥大化軟骨細胞の面積や軟骨細胞サイズの減少し、また、免疫抗体染色により Col2a1、Col10a1、Mmp13 等の軟骨分化マーカーの発現が野生型マウスと比較してダウンレギュレーションされていた。これらの所見は、Prx1/cKO マウスでは軟骨形成に障害があることを示唆している。

骨芽細胞への影響を検討するために、骨芽細胞に特異的な Leptin/TRPM7 コンディショナル欠損 (LR/cKO) マウスを解析した。その結果、野生型マウスと比較して骨形成系への表現型への優位な影響は認められなかった。

Prx1/cKO マウスでは、海綿骨量の減少と共に、成長板軟骨との境界領域に破骨細胞の著明な集積が認められた。骨吸収系パラメーターは増加傾向にあり、破骨細胞分化因子である RANKL の発現が上昇していた。また、RANKL 陽性細胞が破骨細胞と共に成長板と海綿骨の境界領域に蓄積することも確認された。これらの所見は、Prx1/cKO マウスでは破骨細胞を介する骨吸収が亢進傾向にあることを示唆している。

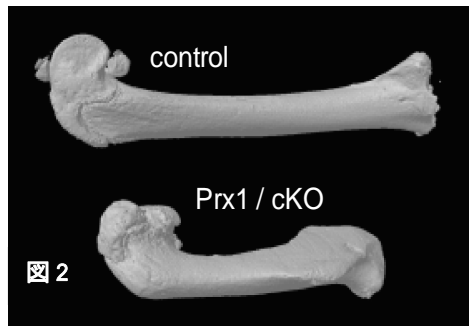


図 2

(3) TRPM7 キナーゼ変異 (KR) マウスを用いた、TRPM7 のキナーゼ機能を欠失した表現型の検討

TRPM7 のキナーゼ機能の関与を検討するために、キナーゼドメインの点変異 (K1646R) による TRPM7 キナーゼ変異 (KR) マウスを解析した。その結果、野生型マウスと比較して表現型に明らかな影響は認められなかった。従って、骨形成における TRPM7 のキナーゼ活性の関与は少ないと考えられた。我々はこれまで TRPM7 が歯に高発現し、KR マウスでは歯にエナメル質形成不全等の障害が生じることを報告している。本研究において、骨組織でキナーゼ活性の欠失型に影響は認められない理由の一つは、TRPM7 の発現が歯に比べて少なく、実質的な酵素 (キナーゼ) 発現量が低いからだと推察される。

(4) 以上のことから、TRPM7 は骨組織においては主に成長板軟骨や海綿骨に発現するチャンネル蛋白であること、また、Prx1/cKO マウスの結果より、TRPM7 は軟骨の分化や形成に重要であることや、さらに部分的には破骨細胞形成の調節により長骨形成に関与する可能性が明らかとなってきた。また、この所見は、TRPM7 キナーゼ変異 (KR) マウスでは認められないことより、TRPM7 の陽イオンチャンネル機能を介するミネラル輸送が中心となって重要な役割を果たすことが示唆された。今後は、骨吸収機能への関与の詳細や TRPM7 のイオン電流や Ca イメージング法を用いたイオン輸送の *in vitro* 解析等も検討し、TRPM7 の軟骨形成や骨成長における多様な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3件（うち査読付論文 2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 Okada H, Okabe K, Tanaka S.	4. 巻 22(1)
2. 論文標題 Finely-Tuned Calcium Oscillations in Osteoclast Differentiation and Bone Resorption.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22010180.	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 -

1. 著者名 Okada H, Kajiya H, Omata Y, Matsumoto T, Sato Y, Kobayashi T, Nakamura S, Kaneko Y, Nakamura S, Koyama T, Sudo S, Shin M, Okamoto F, Watanabe H, Tachibana N, Hirose J, Saito T, Takai T, Matsumoto M, Nakamura M, Okabe K, Miyamoto T, Tanaka S.	4. 巻 34(9)
2. 論文標題 CTLA4-Ig directly inhibits osteoclastogenesis by interfering with intracellular calcium oscillations in bone marrow macrophages.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Bone Miner Res.	6. 最初と最後の頁 1744-1752
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbmr.3754.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岡部幸司、進 正史	4. 巻 270(10)
2. 論文標題 TRPM7と歯の石灰化制御機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 961-968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 進 正史, 岡本富士雄, 鍛冶屋浩, 岡部幸司
2. 発表標題 成熟期エナメル芽細胞のイオン輸送機構
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡部幸司, 進 正史, 鍛冶屋浩, 岡本富士雄
2. 発表標題 TRPM7 と歯のエナメル質形成機構
3. 学会等名 2020年度TRPチャンネル研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kayoko Ogata, Kyoko Oka, Masashi Shin, Tetsuichiro Inai, Koji Okabe
2. 発表標題 Role of TRPM7 in cranial neural crest cell during craniofacial development
3. 学会等名 7th Tripartite Conference on Tooth and Bone in Development &Regeneration (TCTBDR) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 進 正史・森 志穂美・溝口利英・岡本 富士雄・鍛冶屋 浩・荒井 敦・宇田川 信之・岡部幸司
2. 発表標題 チャンネルキナーゼTRPM7の骨格形成における発現と軟骨形成制御
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masashi Shin
2. 発表標題 Chanzyme TRPM7 in bone formation and tooth development
3. 学会等名 Cutting Edge of Bone and Mineral Research in 2019 will take place in Fukuoka Japan.
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福岡学園 学術データベース
http://www.college.fdcnet.ac.jp

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	進 正史 (Shin Masashi) (70549261)	福岡歯科大学・口腔歯学部・講師 (37114)	
研究分担者	鍛冶屋 浩 (Kajiya Hiroshi) (80177378)	福岡歯科大学・口腔歯学部・講師 (37114)	
研究分担者	岡本 富士雄 (Okamoto Fujio) (60153938)	福岡歯科大学・口腔歯学部・講師 (37114)	
研究分担者	溝口 利英 (Mizoguchi Toshihide) (90329475)	東京歯科大学・歯学部・准教授 (32650)	
研究分担者	松下 正之 (Matsushita Masayuki) (30273965)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (18001)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------