

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 15日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592380

研究課題名（和文）Ca<sup>2+</sup>透過性イオンチャネル（TRP）による破骨細胞のアポトーシス誘導機序の解明研究課題名（英文）Role of transient receptor potential (TRP) of Ca<sup>2+</sup>-permeable cation channels in osteoclast apoptosis

研究代表者

岡本 富士雄 (OKAMOTO FUJIO)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60153938

研究成果の概要（和文）：破骨細胞に発現する Ca<sup>2+</sup>透過性陽イオンチャネル TRPM7 の陽イオン輸送動態を捉えアポトーシスとの関連について検討した。TRPM7 は生理的濃度の Mg<sup>2+</sup>存在下では不活性化されているが、酸性環境では Mg<sup>2+</sup>存在下でも細胞内への陽イオン輸送が活性化された。この性質は酸性環境を形成して骨吸収する破骨細胞において、骨から溶出する Ca<sup>2+</sup>や Mg<sup>2+</sup>の細胞内への輸送に好都合と考えられた。しかし、TRPM7 がアポトーシス誘導に関与している可能性は薄いと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Osteoclasts express TRPM7, a Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>-permeable cation channel. However, the functional role of TRPM7 in osteoclasts is unknown. We examined the properties of cation transport through TRPM7 in mature osteoclasts and further investigated the contribution of TRPM7 to osteoclast apoptosis. Although cation transport via TRPM7 was inactive in the presence of physiological concentration of Mg<sup>2+</sup>, extracellular acidification abrogated the Mg<sup>2+</sup>-dependent blockade. Osteoclasts extrude H<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> and form an acidic compartment to dissolve inorganic component of bone matrix. Abrogation of Mg<sup>2+</sup>-dependent block of cation transport at acidic extracellular milieu is convenient for uptake of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> eluted from bone during bone resorption. Our evidence also showed that TRPM7 was less likely to participate in osteoclast apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：破骨細胞, TRPM7 チャネル, 陽イオン輸送, アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

骨の強度は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の均衡が保たれることで維持される。骨破壊性疾患では、この均衡が崩れ、骨吸収が亢進する。骨吸収の亢進は破

骨細胞の分化亢進、骨吸収機能の亢進および生存期間の延長によるものに分けられる。従って、骨破壊性疾患の原因解明と治療法の確立には、破骨細胞の分化、機能、生存と死を制御するメカニズムを総括的に理解するこ

とが大切である。

近年、破骨細胞の分化と機能の制御については、分化を誘導する RANKL シグナルの解明 (Takayanagi. et al., 2002)、および、骨吸収機能を支える H<sup>+</sup>ポンプや Cl<sup>-</sup>チャンネル分子の発見と機能解析 (Kornak et al., 2001) によって飛躍的に理解が深まった。これに対して、破骨細胞の life span (寿命) の制御については、アポトーシスを誘導するデス受容体 (Roux et al., 2005) やミトコンドリアを介する経路 (Oursler et al., 2005)、NF- $\kappa$ B や JNK を介する経路 (Ikeda et al., 2008) (Vaira et al., 2008) が報告されているが、アポトーシスを含めた細胞死を誘導するシグナルの複雑さゆえ、矛盾する見解も多く、解明すべき点が数多く残されている。その中でも特に、普遍的なアポトーシス誘導シグナルである細胞内 Ca<sup>2+</sup>については、その動員機序および作用機序ともに十分に解明されていない。

Ca<sup>2+</sup>依存性のアポトーシス経路として、Ca<sup>2+</sup>依存性の酵素群 (例えばカルパイン、カルモジュリン依存性酵素 (CaMK) やカルシニューリンなど) を介したカスパーゼ活性化経路とミトコンドリアからのチトクローム C 放出を介する経路が示唆されているが、近年、これらの経路の活性化に Ca<sup>2+</sup>透過性陽イオンチャンネル (TRP) が関わっている可能性が示唆されている (Anant et al., 2005)。我々は、破骨細胞に発現する TRP チャンネルを検索した結果、数種類の TRP チャンネルサブタイプ (TRPV2 や TRPM7 など) が発現し、サブタイプの発現様態は前駆破骨細胞から成熟破骨細胞への分化の進行とともに変化することを見出し報告している (米国骨代謝学会 2007、日本骨代謝学会 2008)。これらの知見より、破骨細胞の分化からアポトーシスに至るまでの寿命が TRP サブタイプの発現様態によってコントロールされている可能性が推察できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、TRP チャンネルによる破骨細胞のアポトーシス制御機序を解明することを目的とする。そのために、破骨細胞に発現する TRP チャンネルを検索し、発現の高い TRP チャンネル分子を同定する。また、破骨細胞における陽イオン輸送動態の特徴を明らかにする。さらに、同定した TRP の発現抑制によって、陽イオン輸送動態とアポトーシス誘導にどのような変化が現れるかを明らかにする。

本研究は、TRP チャンネルを標的とした新たなアポトーシス誘導薬の開発に繋がるものと期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験に用いる破骨細胞の誘導

本研究では、マウス骨髄細胞から M-CSF と

RANKL 刺激によって誘導した破骨細胞およびマウス骨髄細胞と骨芽細胞をプロスタグランジン E<sub>2</sub> と活性型ビタミン D<sub>3</sub> 存在下で共培養して誘導した破骨細胞を用いた。誘導した細胞が、酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) 陽性であり、骨吸収活性を有することをもって成熟破骨細胞であることを確認した。

### (2) アポトーシス細胞の検出と判定

①まず、細胞の生死を判定するために、Trypan Blue 染色を施し、死細胞と生細胞とを区別した。

②アポトーシス細胞の判定には DAPI 染色によるクロマチン凝縮を指標に検出した。また、蛍光標識 Annexin V 染色により、アポトーシス初期にみられる細胞膜構造の変化を検出した。ネクローシス細胞との区別には Annexin V 染色と同時に Propidium iodide (PI) 染色を行い、PI で染色された細胞をネクローシス細胞とみなした。

### (3) 破骨細胞に発現する TRP チャンネルの検索と発現局在の確認

破骨細胞における TRP 分子の発現は DNA マクロアレイ法、RT-PCR 法および Western blot 法を用いて検討する。また、TRP 分子の発現局在は、破骨細胞を免疫染色し、コンフォーカルレーザー顕微鏡を用いて調べた。

### (4) 電気生理学的手法を用いた陽イオン電流および Ca<sup>2+</sup>電流の記録

破骨細胞へ Whole-cell Patch clamp 法を適用し、voltage clamp 下にて TRP を介して流れる陽イオン電流を誘導した。誘導した電流成分から Ca<sup>2+</sup>電流を分離し TRP の Ca<sup>2+</sup>透過性を調べた。この電流 (膜電流) を指標に TRP の陽イオン輸送活性を評価した。

### (5) 破骨細胞における標的 TRP 分子の発現抑制

当初の実験計画では、TRP 分子の発現抑制のため、標的 TRP に対する siRNA または shRNA を作成し、リポソーム法またはエレクトロポレーション法を用いて破骨細胞へ導入する予定であったが、標的とした TRPM7 分子の発現を効果的に抑制できなかった。そこで、研究分担者が作出した、破骨細胞特異的 TRPM7 ノックアウトマウスより骨髄細胞を採取し、TRPM7 を欠損した破骨細胞 (TRPM7 KO 0c) を誘導した。破骨細胞特異的 TRPM7 ノックアウトマウスは、カテプシン K 遺伝子座に Cre リコンビナーゼをノックインすることにより作製した破骨細胞特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスと TRPM7 遺伝子座に 2 つの loxP 配列を挿入した TRPM7 flox マウスを交配して、破骨細胞特異的に TRPM7 遺伝子を欠

損したマウスを作製した。破骨細胞における標的 TRP 分子 (TRPM7) の発現が抑制されたことは、Western blot 法にて確認した。

#### (6) 倫理面への配慮

本研究において、遺伝子組み換え実験に抵触する実験については、「福岡歯科大学組み換え DNA 安全委員会」の承認を受けた後、安全指針に従って行った。また、動物実験については「福岡歯科大学動物実験委員会」の承認を受けた後、福岡歯科大学動物実験指針に沿って行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 破骨細胞に発現する TRP チャネルの検索

マウス骨髄細胞を M-CSF で前駆破骨細胞へ分化した後、RANKL で破骨細胞へ分化誘導した。DNA マイクロアレイを用いて検索した結果、破骨細胞に特異的な酵素群 MMP9、cathepsin K、炭酸脱水素酵素 II、TRAP、H<sup>+</sup>-ATPase とともに、TRPV2 と TRPM7 の発現が上昇することが分かった (図 1 A)。また、両 TRP の発現経過を RT-PCR 法により調べると、発現量は RANKL 刺激後 24 時間以降に有意に増加することが分かった (図 1 B)。

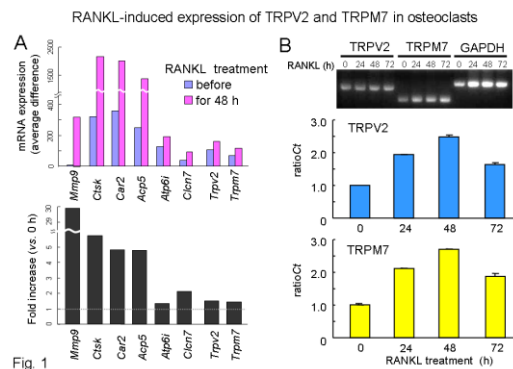


図 1

我々は、TRPV2 に関しては、破骨細胞分化のマスター転写因子 NFATc1 の活性化に必須である Ca<sup>2+</sup>シグナルの形成に係わっていることを明らかにした (Kajiya et al., 2010)。一方、TRPM7 は Ca<sup>2+</sup>だけでなく Mg<sup>2+</sup>に対しても高い透過性を示し、また、細胞内 C 末領域にはキナーゼモチーフを有するユニークな膜輸送タンパクである。多くの細胞に広範に発現し、分化、増殖、生存、遊走および Mg<sup>2+</sup>吸収などに関与することが報告されている。しかし、破骨細胞における TRPM7 の機能は全く分かっていない。そこで、本研究では、この TRPM7 に注目し、アポトーシスとの関連について検討した。

#### (2) TRPM7 のイオン輸送体としての機能解析

RANKL 刺激により誘導した多核の成熟破骨細胞に Whole-cell Patch clamp 法を適用し

て、まず、TRPM7 のイオン輸送機能を捉えることを試みた。TRPM7 の陽イオン輸送活性は Mg<sup>2+</sup>による抑制 (Mg<sup>2+</sup>ブロック) を受けることが知られているため、Whole-cell Patch clamp 法には、Mg<sup>2+</sup>を含まない細胞外液と電極内液を用いた。また、破骨細胞には ClC7 型 Cl<sup>-</sup>輸送体を介した Cl<sup>-</sup>輸送が活発に働いているため (Ohgi et al., 2011)、低 Cl<sup>-</sup>濃度の細胞外液と電極内液を使用して Cl<sup>-</sup>輸送の混入を極力避けた。

図 2 は Mg<sup>2+</sup>非存在下で誘導した陽イオン電流を示す。RANKL 刺激により形成された破骨細胞からは、過分極側で弱い内向き電流が、脱分極側では強い外向きの電流 (外向き整流性陽イオン電流) が誘発された (図 2 A(a))。膜電位 -90 mV と +90 mV にて計測した内向き電流と外向き電流は、共に RANKL 刺激後 48 時間以降、有意に増大した (図 2 B(a))。一方、RANKL で刺激しなかった細胞 (TRAP 陰性細胞) からは、弱い外向き整流性陽イオン電流が誘発されたが (図 2 A(b))、経時的な電流の増大は認められなかった (図 2 B(b))。

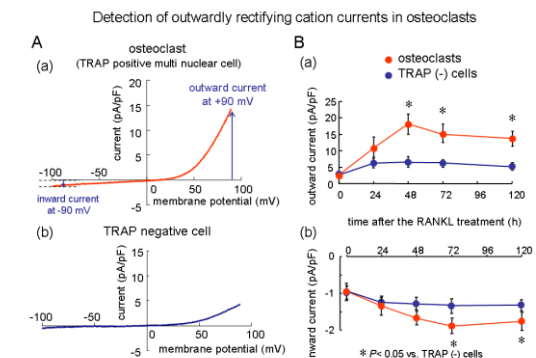


Fig. 2

図 2

#### (3) 外向き整流性陽イオン電流に対する種々の TRPM7 modulator およびイオン環境変化の効果

破骨細胞から誘導された外向き整流性陽イオン電流が TRPM7 のイオン輸送活性を反映しているかどうかを検討する目的で、TRPM7 の活性を修飾する種々の薬剤およびイオン環境の変化が外向き整流性陽イオン電流に及ぼす影響を調べた (図 3)。Mg<sup>2+</sup>非存在下で誘導した外向き整流性電流は、細胞外液への Mg<sup>2+</sup>添加、2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB)、carvacrol、lipoxigenase 阻害剤の添加によって抑制された。一方、膜透過性の cAMP (db-cAMP) の投与、また、細胞外液の酸性化 (pH<sub>o</sub>4) および細胞外液からの 2 価陽イオン除去 (Mg<sup>2+</sup> Ca<sup>2+</sup>-free) によって活性化された (図 3 A)。膜電位 -90 mV と +90 mV にて計測した内向き電流と外向き電流に対する効果を図 3 B に示した。このような破骨細胞から誘導された外向き整流性陽イオン電流の性質は、強制発現細胞を用いて報告され

た TRPM7 の性質と一致した。そこで、以下、この電流を TRPM7 様電流とよぶ。

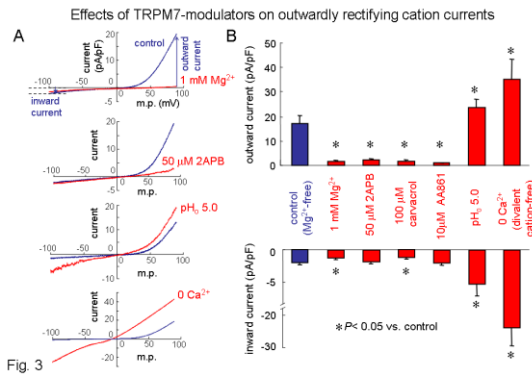


図 3

#### (4) TRPM7 様外向き整流性陽イオン電流の $Mg^{2+}$ 感受性

TRPM7 の特徴として  $Mg^{2+}$  による抑制 ( $Mg^{2+}$  ブロック) を受けることが知られている。そこで破骨細胞から誘導した TRPM7 様電流の  $Mg^{2+}$  感受性について調べた (図 4)。まず、電極内液中の  $Mg^{2+}$  を除いた状態で、細胞外液中の  $Mg^{2+}$  濃度を増加させると、濃度依存性に外向き電流 (図 4 A(a)) と内向き電流が抑制された (図 4 A(b))。外向き電流 (膜電位 +90 mV にて測定) と内向き電流 (膜電位 +90 mV にて測定) の  $IC_{50}$  はそれぞれ 0.05 mM (図 4 B(a)) と 0.07 mM (図 4 B(b)) であり、両者の  $Mg^{2+}$  感受性はほぼ一致した。なお、内向き電流には背景電流 (細胞外液中の  $Na^+$  を細胞膜不透過性の NMDG<sup>+</sup> に置換した後に残った電流) が含まれているため、内向き電流の大きさはこの背景電流を差し引いて正味の大きさで示した。

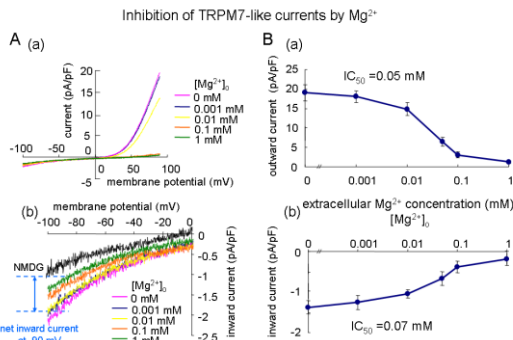


Fig 4

図 4

続いて TRPM7 様電流に対する細胞内  $Mg^{2+}$  の影響を調べた。その結果、電極内液に  $Mg^{2+}$  を添加 (0.001~1 mM) して、細胞内へ投与すると、外向き電流と内向き電流は共に濃度依存的に抑制された。

体液に含まれる  $Mg^{2+}$  濃度は、細胞外液で 0.5~1 mM、細胞内液で数 mM であるため、破骨

細胞から誘導される TRPM7 様電流は、生理的  $Mg^{2+}$  濃度の環境下で活性化される可能性は低いと推察できる。しかし、骨吸収を行う破骨細胞は、酸を分泌して骨ミネラルを溶解するため、自ら酸性環境に暴露されることになり、酸性領域での TRPM7 様電流の性質を調べる必要がある。

#### (5) 酸性環境下での TRPM7 様電流の $Mg^{2+}$ 感受性

図 5 A は酸性環境下での TRPM7 様電流に対する細胞外  $Mg^{2+}$  の作用を示す。細胞内へ  $Mg^{2+}$  は投与していない。pH<sub>o</sub> 5.4 の酸性細胞外液環境下においても、pH<sub>o</sub> 7.4 と同様な外向き電流に対する  $Mg^{2+}$  の抑制作用が認められた (図 4 参照)。一方、内向き電流は外液の  $Mg^{2+}$  濃度を 1 mM まで上昇させても抑制されなかった。また、酸性細胞外液環境下 (pH<sub>o</sub> 5.4 以下) では、細胞内への  $Mg^{2+}$  投与 (電極内  $Mg^{2+}$  濃度 1 mM) によって、外向き電流は抑制されるのに対して、内向き電流は抑制されなかった (図 5 B)。

生理的 pH と酸性環境下における内向き電流の  $Mg^{2+}$  感受性を図 6 にまとめた。生理的 pH (pH<sub>o</sub> 7.4) では、内向き電流は、細胞内および細胞外液に存在する生理的濃度の  $Mg^{2+}$  によって抑制されているが、酸性環境 (pH<sub>o</sub> 5.4) では、 $Mg^{2+}$  による抑制を受け難くなること分った。

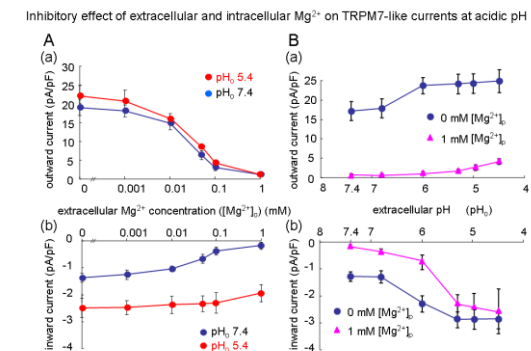


Fig 5

図 5

#### $Mg^{2+}$ -dependent block of inward currents was abrogated at acidic milieu

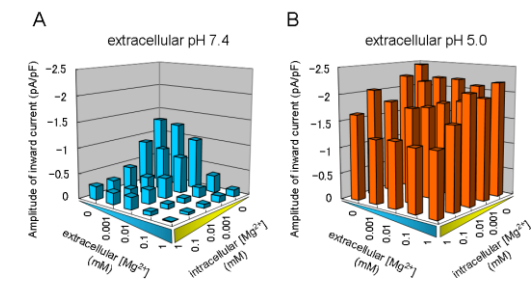


Fig 6

図 6

(6) TRPM7 ノックアウト破骨細胞 (TRPM7 KO Oc) から誘導した陽イオン電流の  $Mg^{2+}$  感受性  $Mg^{2+}$  非存在下で TRPM7 KO Oc から誘導した陽イオン電流は、対照の TRPM7 を発現する破骨細胞 (TRPM7 Oc) と異なり外向き整流性を示さなかった (図 7A, B)。また、TRPM7 KO Oc から誘導した陽イオン電流は、内向き成分と外向き成分ともに細胞外液に加えた  $Mg^{2+}$  による抑制を受けなかった (図 7C)。従って、TRPM7 Oc から誘導した外向き整流性電流は、TRPM7 のイオン輸送活性を反映することが明白になった。

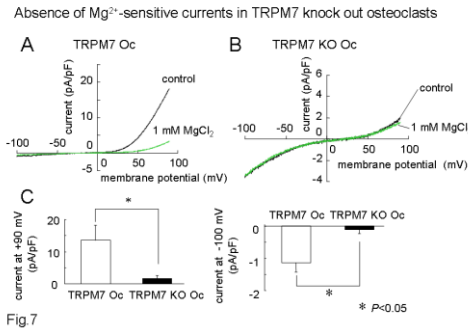


図 7

(7) 破骨細胞における TRPM7 の欠損がアポトーシスに及ぼす効果

破骨細胞特異的 TRPM7 ノックアウトマウスの骨髄細胞より TRPM7 KO Oc を分化誘導した場合と正常マウスの骨髄から TRPM7 Oc を誘導した場合の破骨細胞 (TRAP 陽性多核細胞) の形成を比較した (図 8A)。ノックアウトマウスと正常マウス共に、破骨細胞数は RANKL 刺激後 4 日でピークに達し、その後、減少した。両マウス間で形成された破骨細胞数に有意差は認められなかった。

破骨細胞数がピークに達した RANKL 刺激後 4 日目にアポトーシス誘導刺激を加え、12 時間後、アポトーシスを起こした細胞を計測した。アポトーシス誘導刺激には酸化ストレス ( $H_2O_2$ )、staurosporine およびゾレドロン酸を用いた。TRAP 陽性多核細胞の内、核のクロマチン凝集を認めた細胞をアポトーシス細胞とみなし、その細胞数を割合で示した (図 8B)。 $H_2O_2$ 、staurosporine、ゾレドロン酸を投与した群では、投与しない control 群に比べてアポトーシス細胞の割合は増加傾向を示した。特に staurosporine は顕著にアポトーシスを誘導した。しかし、アポトーシス細胞の割合は、TRPM7 を発現していない TRPM7 KO Oc と TRPM7 を発現する TRPM7 Oc との間で有意な差は認められなかった。同様の結果は Annexin V を用いたアポトーシス細胞の検出によっても得られた。

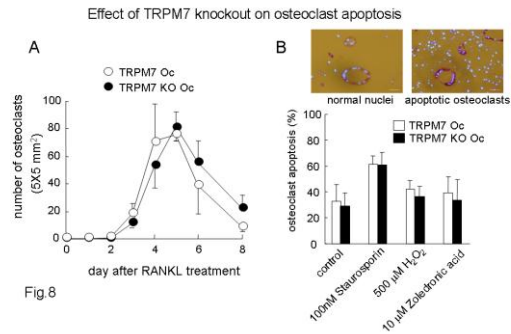


図 8

(8) 考察

破骨細胞から誘導した外向き整流性陽イオン電流は、その性質および TRPM7 KO Oc との比較から、TRPM7 の陽イオン輸送活性を反映していることが明らかになった。この輸送は、生理的 pH (pH7.4) 環境では、細胞内外の  $Mg^{2+}$  による抑制 ( $Mg^{2+}$  ブロック) を受けて不活性化されているが、酸性環境 (< pH5.4) では、 $Mg^{2+}$  ブロックが解除され、細胞内への陽イオン輸送が活性化されることが明らかになった。この性質は、骨吸収状態の破骨細胞が形成する酸性環境での陽イオン輸送に適した性質と考えられる (図 9 参照)。

TRPM7 が破骨細胞のアポトーシスに関与する可能性については、TRPM7 の発現の有無がアポトーシスに影響するという明確な証拠は認められなかった。TRPM7 は  $Ca^{2+}$  透過性を示す陽イオンチャネルであるが、 $Mg^{2+}$  に対して高い透過性を示すことが知られている。骨は  $Ca^{2+}$  とともに多量の  $Mg^{2+}$  を含んでいる。酸性環境で活性化される TRPM7 は骨吸収とともに骨から溶出する  $Ca^{2+}$  や  $Mg^{2+}$  の細胞内輸送とこれに起因した骨吸収機能の制御に関与していると考えられる。

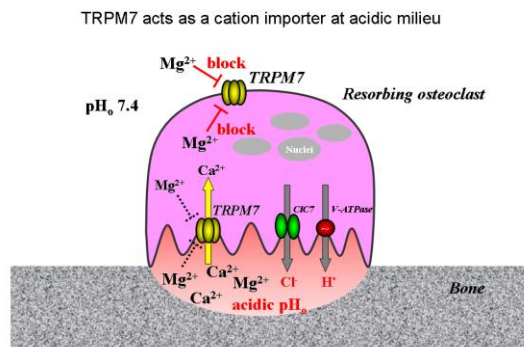


図 9

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 Hiroshi Kajiya, Fujio Okamoto, Kimiko Ohgi, Akihiro Nakao, Hidefumi Fukushima, Koji Okabe, Characteristics of ClC7 Cl<sup>-</sup> channels and their inhibition in mutant (G215R) associated with autosomal dominant osteopetrosis type II in native osteoclasts and hClcn7 gene-expressing cells. Pflugers Arch-Eur J Physiol 458, 1049-1059, 2009. 査読有
- ② Hiroshi Kajiya, Fujio Okamoto, Tetsuomi Nemoto, Keiichiro Kimach, Kazuko Toh-Goto, Shuji Nakayama, Koji Okabe, RANKL-induced TRPV2 expression regulates osteoclastogenesis via calcium oscillations. Cell Calcium 48, 260-269, 2010. 査読有
- ③ Kimiko Ohgi, Fujio Okamoto, Hiroshi Kajiya, Ryuji Sakagami, Koji Okabe, Antibodies against ClC7 inhibit extra cellular acidification-induced Cl<sup>-</sup> currents and bone resorption activity in mouse osteoclasts. Naunyn-Schmied Arch Pharmacol 383, 79-90, 2011. 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 大城希美子、岡本富士雄、鍛冶屋浩、根本哲臣、来海慶一郎、岡部幸司、新規抗 ClC7 抗体は破骨細胞 ClC7 型 Cl<sup>-</sup>チャネルの Cl<sup>-</sup>輸送と骨吸収活性を抑制する。第 28 回日本骨代謝学会、平成 22(2010)年 7 月 22 日、京王プラザホテル (東京都)
- ② 大城希美子、岡本富士雄、鍛冶屋浩、根本哲臣、堤 貴司、岡部幸司、新規抗 ClC7 抗体の破骨細胞 ClC7Cl<sup>-</sup>チャネル活性と骨吸収活性に対する抑制作用。第 52 回歯科基礎医学会、平成 22(2010)年 9 月 20 日、タワーホール船堀 (東京都)
- ③ 岡本富士雄、鍛冶屋浩、大城希美子、岡部幸司、破骨細胞分化において RANKL 依存的に発現する Transient Receptor Potential Melastatin 7 (TRPM7) の機能。第 29 回日本骨代謝学会、平成 23(2011)年 7 月 28 日、大阪国際会議場 (大阪市)
- ④ 岡本富士雄、鍛冶屋浩、大城希美子、岡部幸司、破骨細胞から誘導される TRPM7 様外向き整流性陽イオン電流の性質。第 5 回トランスポーター研究会九州部会 平成 23(2011)年 9 月 17 日、ホテル JAL シティ宮崎 (宮崎市)
- ⑤ 岡本富士雄、鍛冶屋浩、大城希美子、根本哲臣、岡部幸司、破骨細胞分化に伴って発現する TRPM7 様電流の性質。第 62 回西日本生理学会、平成 23(2011)年 10 月 14 日、佐賀大学医学部 (佐賀市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

鍛冶屋 浩 (KAJIYA HIROSHI)  
福岡歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：80177378

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