

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293380

研究課題名(和文) TRP分子による歯牙石灰化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a mechanism of tooth mineralization through TRP channel

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ミネラル輸送を担う陽イオンチャンネルと酵素の機能を併せ持つユニークなTRPM7に着目し、歯の石灰化における役割について検討を行った。TRPM7は全身中でも歯のエナメル芽細胞や象牙芽細胞に高い発現を認めた。また、エナメル芽細胞株及び象牙芽細胞株細胞においてもTRPM7の高い発現を認めると共に、TRPM7様イオン電流が検出された。キナーゼ機能を欠失したTRPM7キナーゼ変異マウスでは、切歯が白色化しエナメル質の形成不全が観察された。以上のことから、TRPM7はエナメル芽細胞および象牙芽細胞に特徴的に発現するチャンネル蛋白であり、エナメル質形成の石灰化過程等で重要な役割を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Transient receptor potential (TRP) melastatin subfamily member 7 (TRPM7) is a unique bi-functional cation channel containing a protein kinase domain. In the present study, we focused on the role of TRPM7 in tooth mineralization. TRPM7 was highly expressed in odontoblasts and ameloblasts in tooth. Both of ameloblastic and odontoblastic cell line showed not only higher expression of TRPM7 but also higher activity of TRPM7-like currents. TRPM7-kinase inactive mutant mice was analyzed to study TRPM7 function in vivo and showed the enamel defect with hypomineralization of incisors. TRPM7 is highly expressed in ameloblasts and odontoblasts during tooth development, closely involved in mineralization of dentin and enamel matrix.

研究分野：口腔生理学

キーワード：TRPM7 ミネラル輸送 歯の石灰化 エナメル芽細胞 象牙芽細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯牙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。これまで *in vitro* 系研究は遅れていたが、最近、iPS 細胞より象牙芽細胞やエナメル芽細胞への誘導が可能となり、歯牙の発生や再生への分子生物学的な研究が加速されると考えられる。しかしながら、そ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、今後の歯牙発育障害の病態解明や歯牙再生治療の推進に向けて解明すべき必須課題である。

(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、RANKL が破骨細胞前駆細胞に 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 と TRPM7 の発現を誘導することを発見し、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機構を報告した (Kajiya et al. 2010)。その後、もう一方の TRPM7 の機能研究の取組みとして、TRPM7-flox マウスを作成しカテプシン Cre マウスとの交配で、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。現在、この KO マウスの破骨細胞には TRPM7 様イオン輸送は記録されないことも確認し、骨への表現型や骨吸収機能等を *in vivo* 及び *in vitro* 系で解析中である。

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、 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。また、TRPM7 は外液の酸性化で活性化されることやメカノセンサーチャネルとして機能することも報告されている (Numata et al. 2008)。一方、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もあり、この C 末領域は PIP_2 自身や PI_3 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)。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により切断され Fas 受容体を刺激してアポトーシスを誘導することが Cell に報告された (Dasai et al. 2012)。このように TRPM7 はキナーゼ活性を有する $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 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 欠損やキナーゼドメイン変異のマウスは胎生致死となる (Jin et al. 2008)。

(3) 我々は、この TRPM7 研究の一環として、生体内の TRPM7 の組織分布を検討したところ、歯牙に特異的に高発現を確認していた。従って、 Ca^{2+} 透過型陽イオンチャネルである TRPM7 分子が、両細胞のミネラル輸送機構とこれに続く歯の形成や石灰化調節機構へ関与する可能性が示唆される。一方、象牙芽細胞におけるミネラル輸送体としては、これまでにヒト、ラット、マウスの初期培養細胞や一部の細胞株において TRPA1、冷刺激感受性 TRP (TRPM8)、熱感受性 TRP (TRPV1)、 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX1,3)、L-type Ca^{2+} channel 等の発現や電流が報告されており、主に象牙質痛覚の受容機構との関係が検討されている。しかしながら、選択性が限られた薬剤を用いた薬理学的解析が主体で、その分子同定と歯牙形成との直接的な機能関係は明らかでない。ましてや、エナメル芽細胞のミネラル輸送体においては、 Ca^{2+} -ATPase や NCX の発現が報告されているのみで情報は殆どない。従って、象牙芽細胞やエナメル芽細胞のミネラル輸送機構とこれに続く歯の発生や石灰化調節機構との関係は不明であり、我々は「TRPM7 が歯牙形成や石灰化調節機構を担う機能分子である」との仮説を考えている。

2. 研究の目的

歯は上皮-間葉系の相互作用により主に象牙芽細胞とエナメル芽細胞から形成されるが、それぞれの石灰化過程を担う分子の同定は不明である。本研究は歯牙形成に関わる新規分子として、我々が生体中でも特に歯に極めて高発現する TRP 分子として発見したキナーゼ活性を有するユニークな Ca^{2+} 透過型陽イオンチャネルである TRPM7 に注目し、この分子のミネラル輸送機構とこれに続く歯の発生と石灰化調節機構への関与を *in vitro* 実験系と種々の遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* 実験系で解明することにある。これらの取組みは、歯牙発育障害の病態解明や歯牙再生研究へ新しい指針を提供すると考えられる。

3. 研究の方法

(1) *in situ* hybridization および real time PCR を用いて、マウスの全身組織における TRPM7 mRNA 発現のスクリーニングを行った。また、胎生期から生後初期のマウスを用いて、抗 TRPM7 抗体による免疫組織染色や HE 染色を行い、硬組織における TRPM7 分子の発現局在を観察した。

(2) エナメル芽細胞株 SF2 及び象牙芽細胞株 mDP 細胞、及び骨芽細胞株 MCT3T3-E1 細胞を用いて、TRPM7 の発現を検討した。real time PCR 法、及びウエスタンブロット法により、TRPM7 mRNA 及びタンパク発現を比較した。また、各種株化細胞を石灰化誘導培地にて長期間培養し、アルカリフォスファターゼ活性の

測定や、アリザリン染色や von Kossa 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。

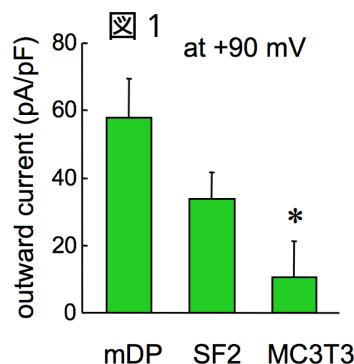
(3) ホールセル・パッチクランプ法を用いて、各種株化細胞における TRPM7 様の陽イオン電流 (Mg^{2+} 感受性電流) を記録し、その電流密度を比較した。また、TRPM7-shRNA を用いた TRPM7 ノックダウンによる TRPM7 様イオン電流の選択的な抑制を検討した。

(4) TRPM7 の *in vivo* 実験系での機能解析に取り組んだ。TRPM7 の全身欠損マウスは胎生致死であるため解析困難である。そこで、キナーゼドメイン部分の点変異により TRPM7 のキナーゼ機能を欠失した TRPM7 キナーゼ変異マウスを用いた。歯や硬組織の組織解析には、マイクロ CT 解析や走査電子顕微鏡を用いて、検討を行った。また、エナメル芽細胞、及び象牙芽細胞に特異的なタンパクの Cre マウスと我々が開発した TRPM7-*fllox* マウスとの交配により、象牙芽細胞及び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作製し、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。

4. 研究成果

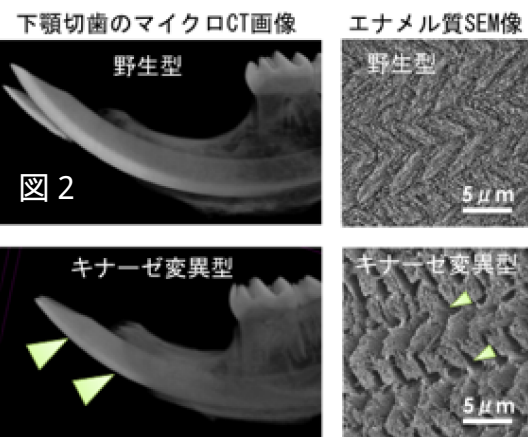
(1) まず、TRPM7 の発現部位を *in situ* hybridization および real time PCR を用いてマウスの全身組織でスクリーニングを行った。その結果、TRPM7 mRNA は他の組織に比べて歯において特段に高い発現を認めた。一方で、TRPM7 と類似機能を持ち分子相同性の高い TRPM6 の発現は非常に低かった。また、マウスにおける TRPM7 タンパクの発現を免疫組織学的な解析により検討を行った。胎生 16.5 日齢以降の歯胚の歯乳頭およびエナメル器に発現を認め、さらに発生が進むと、TRPM7 はエナメル芽細胞と象牙芽細胞に高い発現を認めた。

(2) 次に、エナメル芽細胞株 SF2 及び象牙芽細胞株 mDP 細胞を用いて *in vitro* での TRPM7 の発現を検討した。その結果、両細胞株とも骨芽細胞株に比べて、組織での発現解析と同様に、TRPM7 の高い発現が認められた。また、これらの細胞に発現する TRPM7 が陽イオンチャンネルとしての機能活性を有するかどうかをパッチクランプ法にて検討を行った。その



結果、SF2 及び mDP 細胞は共に、骨芽細胞株に比べて、優位に高い密度の TRPM7 様陽イオン電流が検出された (図 1 参照)。従って、TRPM7 は、エナメル芽細胞および象牙芽細胞に特異的に発現し、陽イオン輸送を担うことが明らかとなった。SF2 細胞は石灰化誘導培地にて長期間培養するとアリザリン染色陽性の石灰化物を沈着させた。現在、shRNA を用いた TRPM7 タンパクのノックダウンによる TRPM7 様イオン電流の抑制と石灰化機能との関係を検討中である。

(3) 歯に特異的に高発現する TRPM7 の *in vivo* での機能解析に取り組んだ。TRPM7 の全身欠損マウスは胎生致死であるため、TRPM7 のキナーゼ機能を欠失した TRPM7 キナーゼ変異マウスを用いて、TRPM7 の *in vivo* 機能解析を行った。この変異マウスは野生型と比較して、体型や健康状態などに差はなかったが、興味あることに切歯が白色化を呈した。そのため歯のマイクロ CT 解析を行ったところ、変異マウスではエナメル質層の不透過性が優位に減少していた (図 2 参照)。また、走査電子顕微鏡にて歯の組織解析を行った結果、エナメル質の小柱構造の脆弱化が認められた。従って、キナーゼ変異マウスでは、切歯エナメル質の形成不全、及び石灰化不全が観察され、TRPM7 がエナメル質の形成やその石灰化に関与する可能性が考えられた。さらなる TRPM7 の歯における *in vivo* 解析のために、現在、エナメル芽細胞特異的なタンパクの Cre マウスと TRPM7-*fllox* マウスとの交配によりエナメル芽細胞特異的な TRPM7 コンディショナル欠損マウスの検討を行っている。



(4) 以上のことから、TRPM7 は、エナメル芽細胞および象牙芽細胞に特徴的に発現するチャンネル蛋白であり、エナメル質形成の石灰化過程等で重要な役割を持つことが明らかになってきた。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、及びエナメル芽細胞特異的な TRPM7 コンディショナル欠損マウスの検討を行っており、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
(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)

Ohgi K, Kajiya H, Okamoto F, Nagaoka Y, Onitsuka T, Nagai A, Sakagami R, Okabe K, A novel inhibitory mechanism of nitrogen-containing bisphosphonate on the activity of Cl⁻ extrusion in osteoclasts. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 査読有, 386(7), 2013, pp.589-598.

doi: 10.1007/s00210-013-0857-0.

Tsutsumi T, Kajiya H, Fukawa T, Sasaki M, Nemoto T, Tsuzuki T, Takahashi Y, Fujii S, Maeda H, Okabe K, The potential role of transient receptor potential type A1 as a mechanoreceptor in human periodontal ligament cells, *Eur J Oral Sci*, 査読有, 121(6), 2013, pp.538-544.

doi: 10.1111/eos.12083.

破歯細胞と歯牙交換機構

福島秀文、鍛冶屋 浩、岡本富士雄、高田圭介、岡部幸司、日本歯科評論、第 858 号 Vol.74(4)、2014、pp.149-151

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.

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.

[学会発表](計8件)

片桐千秋、圓谷智之、岡本富士雄、岡部幸司、松下正之、象牙芽細胞における TRPM7 の発現解析、第 91 回日本生理学会、2014.3.16-18. 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島市)

福島秀文、圓谷智之、岡本富士雄、片桐千秋、鍛冶屋 浩、松下正之、岡部幸司、Chanzime: TRPM7 の硬組織石灰化における役割、第 65 回西日本生理学会、2014.10.23-24. 琉球大学研究者交流施設 50 周年記念会館 (那覇市)

Tsumuraya T, Fukushima H, Katagiri C, Okamoto F, Okabe K, Matsushita M, Expression analysis of TRPM7 in odontoblasts. 第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会合同大会、2015.3.21-23. 神戸国際会議場 (神戸市)

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、2015.7.23-25. 京王プラザホテル(東京)

Meet the Expert3
緒方佳代子、福島秀文、岡本富士雄、岡 暁子、永島勝之、岡部幸司、Chanzime: TRPM7 は歯の石灰化に關与する、第 33 回日本骨代謝学会、2015.7.23-25. 京王プラザホテル (東京)

緒方佳代子、岡 暁子、福島秀文、岡本富士雄、永島勝之、尾崎正雄 岡部幸司、歯の石灰化における TRPM7 の役割、第 57 回歯科基礎医学会、2015.9.11-13. 朱鷺メッセ (新潟市)

緒方佳代子、福島秀文、圓谷智之、岡 暁子、岡本富士雄、片桐千秋、鍛冶屋 浩、松下正之、尾崎正雄、岡部幸司、TRPM7 は歯の石灰化に關与する、第 66 回西日本生理学会、2015/10/9 -10. 久留米大学筑学会館 (久留米市)

Tsumuraya T, Ogata K, Katagiri C, Okamoto F, Fukushima H, Oka K, Okabe K, Matsushita M, Functional Analysis of TRPM7 in Odontoblasts. 第 93 回日本生理学会、2016/3/22 -24. 札幌コンベンションセンター (札幌市)

[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：8 0 2 2 4 0 4 6

(2)研究分担者

松下 正之 (MATSUSHITA Masayuki)
琉球大学・医学(系)研究科・教授
研究者番号：3 0 2 7 3 9 6 5

岡本 富士雄 (OKAMOTO Fujio)
福岡歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：6 0 1 5 3 9 3 8

福島 秀文 (FUKUSHIMA Hidefumi)
東北大学・歯学研究科・准教授
研究者番号：7 0 4 1 2 6 2 4

鍛冶屋 浩 (KAJIYA Hiroshi)
福岡歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：8 0 1 7 7 3 7 8

(2)連携研究者

福本 敏 (FUKUMOTO Satoshi)
東北大学・歯学研究科・教授
研究者番号：3 0 2 6 4 2 5 3