

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：37114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893319

研究課題名(和文) 骨ミネラル輸送体TRPM7を介した歯槽骨形成及び再生機構の解明

研究課題名(英文) investigation of mechanism of alveolar bone development and regeneration through analysis of TRPM7, bone mineral transporter.

研究代表者

堤 貴司 (Tsutsumi, Takashi)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70736652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、TRPM7に着目することにより歯槽骨形成のメカニズムと再生療法によって誘導される骨新生機構を解明し、より効率的な歯槽骨再生療法を導き出すことである。TRPM7はCa²⁺、Mg²⁺透過型陽イオンチャネルであり、ミネラル輸送を行う一方で、多様な生理作用を示すαキナーゼ領域を持つことが知られている。本研究ではαキナーゼ変異マウスを用いてin vivo及びin vitro実験系によりTRPM7が、脛骨および顎骨の骨質に与える影響を評価した。

研究成果の概要(英文)：The main aim of this research is investigating the mechanism of alveolar bone development and new bone formation induced by bone regeneration therapy through analysis focused on TRPM7 and generating more effective bone regeneration therapy. TRPM7 is calcium ion and magnesium ion permeable cation ion channel, transports minerals and also contains alpha kinase domain that has various physiological effects. In this research, we estimated the effect of TRPM7 on tibia and alveolar bone properties through in vivo and in vitro experiments using alpha kinase domain mutant mice.

研究分野：歯学

キーワード：歯学

1. 研究開始当初の背景

今日の歯科治療では歯の保存のためやインプラント治療の際に歯槽骨の再生が図られ、様々な骨補填材が利用されており、現在使用されている骨補填材は、生体内で吸収された後、骨形成誘導を引き起こし生体に高い親和性を示すことが知られている。しかしながら、臨床で広く応用されているにも関わらずどのような過程を経て新生骨が形成されるのか、またその後どのようなメカニズムで生体が本来持つ骨リモデリングを受けるのか詳細には解明されていない。我々は今回、ミネラル透過型イオンチャネル TRPM7a キナーゼ変異マウスにおいてエナメル質が菲薄化していることを発見し、硬組織の石灰化過程における重要な機能を有していることを示唆するデータを獲得することができた(図1)。

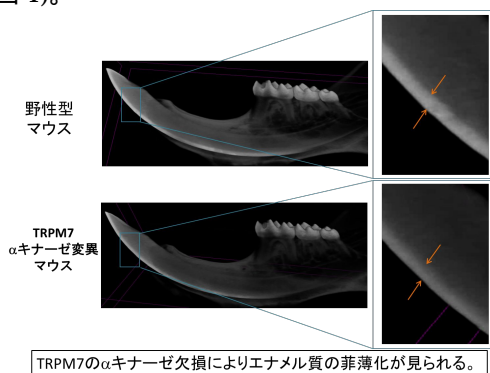


図 1.

TRPM7 は Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 透過型陽イオンチャネルであり、ミネラル輸送を行う一方で、独特のキナーゼ活性領域を持つユニークな分子で、多様な生理作用を示すことが知られている。TRPM7 は、陽イオンチャネルである Transient Receptor Potential (TRP) ファミリーの中でも TRPM ファミリー (Melastatin 受容体) に属する非選択性陽イオンチャネルであり、C 末端側 αキナーゼ活性領域を持ち酵素活性を持つイオンチャネルとして知られている。この αキナーゼドメインを有していることは、TRPM7 の大きな特徴でありその機能により、単に Ca^{2+} や Mg^{2+} の輸送体として働きミネラルの恒常性を担うだけでなく、細胞増殖や細胞死等の多岐に渡る生命現象に関わることが分かっている(図2)。

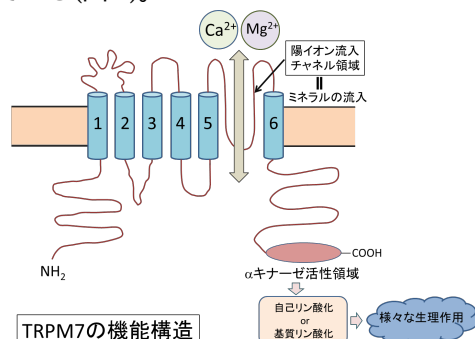


図 2.

骨代謝に関する知見としては、RANKL による破骨細胞分化誘導において必須の因子であることが報告されており (Yang et al.2013)、また骨芽細胞分化に関与することも知られている (Abed et al.)。さらに、骨髄由来の間葉系幹細胞の生存において重要な役割を担うことも分かっている。(Cheng et al.) によって、in vitro を主体とした研究では TRPM7 は、骨組織の形成・吸収に深く関与することが示唆されている。しかしながら、in vivo の研究による骨組織の発達・形成に関する報告は未だに十分であるとはいえず、特に歯槽骨、歯周組織など口腔内の組織に限局すれば研究は、ほぼ進んでいないといえる。今回の研究で、TRPM7 が骨組織の形成および石灰化にどのように関わるのか、特に歯槽骨への影響を解明することができれば、歯槽骨の形成過程という未だに不明な点が多く残存する領域に新たな知見をもたらすことができる。また、再生した新生骨に関する分子生物学的な解析という観点から考えた場合も、独特の酵素活性能力を有する TRPM7 は、新生骨に対する生体応答の解析というこれまで明らかにすることが困難であった領域に新たな道筋をもたらすことができると考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、TRPM7 に着目することにより歯槽骨形成のメカニズムと再生療法によって誘導される骨新生機構を解明し、より効率的な歯槽骨再生療法に結び付けることである。今回の研究で、TRPM7 が骨組織の形成および石灰化にどのように関わるのか、特に歯槽骨への影響を解明することができれば、歯槽骨の形成過程という未だに不明な点が多く残存する領域に新たな知見をもたらすことができる。また、再生した新生骨に関する分子生物学的な解析という観点から考えた場合も、独特の酵素活性能力を有する TRPM7 は、新生骨に対する生体応答の解析というこれまで明らかにすることが困難であった領域に新たな道筋をもたらすことができると考えられる。

3. 研究の方法

本研究の研究課題は、以下の通りであり平成 26~27 年度の 2 ヶ年計画で行う。

研究課題 1. “TRPM7 が、脛骨および顎骨の骨質に与える影響の評価”

研究課題 2. “骨組織の成長・発達における TRPM7 の役割の解析”

研究課題 3. “再生された歯槽骨に対して TRPM7 が示す応答の解析”

実験計画は、平成 26 年度は、αキナーゼ変異マウスを用いた解析を先行して行い、12 月を目途にコンディショナルノックアウトマウスの作製を行い、その後歯槽骨再生モデルの確立を目指す。平成 27 年度は、26 年度

の継続課題に加えて歯槽骨再生モデルを用いた解析を中心に行う予定である。

実験には、TRPM7 の a キナーゼドメインに変異を挿入し、キナーゼ活性を欠失した変異マウスと破骨細胞や骨芽細胞等の細胞特異的に TRPM7 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスおよび野性型マウスを用いることにより a キナーゼ単独の機能および各種細胞における TRPM7 の細胞特異的な機能を評価する。TRPM7 は、完全に欠損させると胎生致死となる因子であるため、このような取り組みで解析を進めていく。

【平成 26 年度の研究計画】

研究課題 1,2,3 を行う。

研究課題 1 “TRPM7 が、脛骨および顎骨の骨質に与える影響の評価” は、以下の通り細項目を設ける。

脛骨および顎骨の骨密度(BMD)測定

野生型(WT; Wild Type)マウス、TRPM7^Δキナーゼ変異マウス、TRPM7 コンディショナルノックアウトマウスの顎骨および上顎骨、下顎骨を採取し、本学のマイクロ CT 撮影装置 skyscan1176(東陽テクニカ)にて撮影し、付属ソフトウェアにて画像の再構築および BMD 解析を行い、全身の骨質の評価を行う。実験には、8~12 週齢の成長期を終え、骨格的にも安定した時期のマウスを用いて特に WT マウスとの間に差異がないかどうか評価する。特に、脛骨と顎骨の測定値の相関関係を注目する。

脛骨および顎骨の骨形態計測パラメータの測定。

BMD を測定した のサンプルは、BV/TV(骨量), BS/TV(骨面), Tb.Th(骨梁幅), Tb.Sp(骨梁間隙)等のアメリカ骨代謝学会が定める静的骨形態計測パラメータを計測し、さらに詳細な骨質の評価を行う。計測結果を基に必要なに応じて、テトラサイクリン、カルセインによる骨標識を行い、動的パラメータを解析し、骨の石灰化能力を評価する。

研究課題 2 “骨組織の成長・発達における TRPM7 の役割の解析” は、以下の通り細項目を設ける。

病理組織学的解析による TRPM7 の骨組織形成機能評価

WT マウスの脛骨および歯槽骨を凍結標本もしくは樹脂包埋による病理組織標本作製し HE 染色および TRPM7 の免疫染色と骨標識による石灰化速度の計測を行い、TRPM7 の骨組織における発現量および発現の局在と石灰化能との関係性を評価する。さらに a キナーゼ変異マウス、コンディショナルノックアウトマウスとの石灰化能の比較を行い、TRPM7 の骨組織形成・石灰化能を複合的に評価する。

in vitro 実験系による TRPM7 の骨組織形成機能評価

マウス骨髄より獲得した間葉系幹細胞に脂

肪分化誘導、軟骨分化誘導、骨芽細胞分化誘導を行い、PCR, western blotting 等により TRPM7 の発現傾向の差異を評価する。また、Wnt シグナルや MAP kinase 系等の細胞内シグナルの動きも解析し、TRPM7 の機能を詳細に分析する。特に TRPM7 のミネラル輸送能力と a キナーゼの生理活性作用のどちらがどのように関与するのかに着目して解析を行う。

研究課題 3 “再生された歯槽骨に対して TRPM7 が示す応答の解析” は、細項目 を設け実施する。

マウス歯槽骨再生モデルの構築

実験に用いる骨補填材の選別および歯槽骨再生を図る条件を設定し、歯槽骨再生モデルの構築を行う。骨補填材は、臨床応用されているハイドロキシアパタイト系、リン酸三カルシウム系から実験に適した素材を選定する。歯槽骨再生を図るマウス側の環境としては、切歯もしくは臼歯の抜歯、一定範囲の顎骨切除等を想定しているが、よい効果的な環境が望める場合は、その他の方法も試みる。

【平成 27 年度の研究計画】

平成 26 年度の継続研究課題および、研究課題 3 を行う。

研究課題 3 “再生された歯槽骨に対して TRPM7 が示す応答の解析” は、細項目 を設け実施する。

歯槽骨再生モデルにおける TRPM7 の機能解析

歯槽骨再生モデルにおいて病理組織学的解析や in vitro 実験系による解析により TRPM7 の歯槽骨再生に対する反応を解析する。

病理組織学的解析

新生骨周囲の組織を回収し、病理標本作製した後に、HE 染色および TRPM7 の免疫染色を行い新生骨に対する TRPM7 の発現の局在を解析する。

in vitro 実験系

骨補填材上もしくは新生骨上で培養した細胞より RNA, タンパク質を回収し PCR, western blotting にて解析を行う。細胞培養の足場としては、既製品の骨補填材上に加えて、再生療法によって生まれた新生骨を採取し、足場として利用する方法も予定している。まずは、TRPM7 の発現の傾向を確認し、Wnt シグナルや MAP kinase 系等の TRPM7 より下流のシグナルの解析を行っていく。

4. 研究成果

研究課題1 “TRPM7が、脛骨および顎骨の骨質に与える影響の評価”

脛骨および顎骨の骨密度(BMD)測定
脛骨および顎骨の骨形態計測パラメーター

以上の課題に関する結果を以下に示す。

8週齢のC57/BL6マウスを野生型マウスとして同週齢のTRPM7aキナーゼ変異マウスと比較し顎骨の骨密度を測定した結果、TRPM7aキナーゼ変異マウスの骨密度は、野生型と比較して有意に低下していたことが分かった(図3)。BV/TV(骨量),BS/TV(骨面),Tb.Th(骨梁幅),Tb.Sp(骨梁間隙)等の骨代謝パラメーターにも有意差を認めた。(詳細なデータは割愛する。)

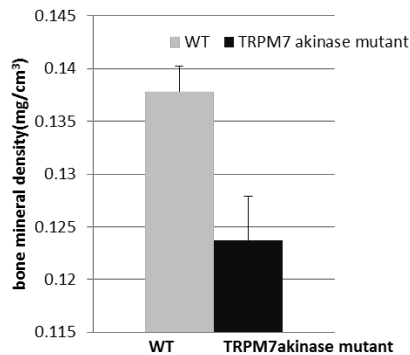


図3

研究課題2 “骨組織の成長・発達におけるTRPM7の役割の解析”

以上の課題に関しては、本学の実験動物受け入れ体制の整備が遅延したこと、その後のTRPM7aキナーゼ変異マウスの交配が安定するまでに想定よりも時間を要したために解析に用いることができる変異マウスの個体数に限りがあった。そのため、変異マウスは、まずは研究課題1の解析に用いることとしたため、研究課題2に関しては研究計画に遅延が発生しており、十分なデータが収集できていない。今後の課題として取り組む予定である。また、当初の研究計画に加えていなかったが、エナメル質周囲におけるTRPM7の発現の局在に関しては、一部解析を行っており、エナメル質の形成時においてTRPM7の発現の局在を確認した。(詳細なデータは割愛する。)

研究課題3 “再生された歯槽骨に対してTRPM7が示す応答の解析”

以上の研究課題に関しては、主に細項目マウス歯槽骨再生モデルの構築に努めた。

まずは、野生型マウスとしてddYマウス6週齢の上顎第一臼歯を抜歯し、4週後に規定

量の歯槽骨をスチール製ラウンドバーにて削除した。2週間後、1ヶ月後、2ヶ月後に組織を採取し、マイクロCTにて骨の再生量の測定および再生骨の骨質の評価を行った。実験に適切な骨削除量の規定および、適切な組織回収期間の設定の模索に努めた。細項目に関しては、細項目の条件決めの模索の時点で研究期間が完了したため、今後の課題とすることとした。

また、研究計画立案時は予定になかったが、骨削除後の再生過程での周囲軟組織の病理学的解析および分子生物学的解析を行い、骨再生後の再形成・再吸収のメカニズムの解明を軟組織側からアプローチすることを目的とした新たな実験モデルの構築を現在検討中であり、その一部は既に解析を開始している。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

堤 貴司, 都築 尊, 松浦尚志, 城戸寛史, 高橋裕, 「プラットフォームスイッチングモデルにおけるtype-XIIコラーゲンの動態。」, 日本補綴歯科学会九州支部学術大会, 2015.8月23日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 貴司

(福岡歯科大学口腔歯学 助教)

研究者番号： 70736652

(2) 研究分担者

該当ナシ

(3) 連携研究者

該当ナシ