

令和元年6月6日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08476

研究課題名(和文) ノックアウトマウスによる脳エストロゲンの骨代謝制御機構の研究

研究課題名(英文) Analysis of regulation of bone mass using brain-specific SF-1 knockout mice

研究代表者

池田 やよい (Ikeda, Yayoi)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：00202903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：研究開始当初、2種類のノックアウトの作成と解析を開始したが、「グローバルSF-1KOマウス」については、作成、維持ができないことから研究を中止した。「脳特異的SF-1KOマウス」については、成熟後まで維持することができ、個体の基本データ、およびCTによる骨の解析を進めており、データが得られている。仮説に基づいた予想通り、「脳特異的SF-1KOマウス」の骨密度が正常に比べて高まる傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エストロゲン骨への作用が未梢と脳で異なり、その分子機構にSF-1が関与することが示唆され、エストロゲンの骨代謝制御の分子機構研究において新たな展開となり、解明に大きく貢献できる。エストロゲン欠如による骨粗鬆症は、歯周病悪化を引き起こし、口腔領域の治療に大きく影響するものである。本研究成果は、骨粗鬆症のエストロゲン補填療法で使用されるエストロゲン製剤として、脳でのエストロゲンの作用を抑え、より強力な治療効果をもつ新薬開発の基礎データとしての意義がある。

研究成果の概要(英文)：The orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 (SF-1) is expressed in both Sertoli and Leydig cells in testes. We generated conditional knockout (cKO) mice, in which SF-1 was specifically inactivated in the brain using Cre-loxP recombination with Nestin-Cre. Expression levels of SF-1 were specifically lower in the brain of the brain-specific SF-1 KO mice compared with wild-type controls, whereas those in the testis or the adrenal gland were similar between the two genotypes. The body weight was apparently lower in the brain-specific SF-1 KO mice than in wild-type controls during postnatal development. Micro-CT analysis showed that bone mineral density was increased in both the trabecular and cortical bone compartments in brain-specific SF-1 KO mice compared with controls. The results indicate that inactivation of central SF-1 signaling results in increased bone mass, suggesting that central inhibitory SF-1 actions are involved in the regulation of bone mass.

研究分野：発生学、組織学

キーワード：エストロゲン 骨代謝 ノックアウトマウス

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

### 1. 研究開始当初の背景

女性ホルモンエストロゲンは、卵巣で産生され、生殖系の調節に働き、脳の性分化や性行動、骨の維持・形成に働く。最近、脳エストロゲンが骨吸収促進に働くことが報告された。しかし、脳エストロゲンによる骨代謝制御の中核と作用機序は明らかでない。申請者らはステロイド合成の転写因子 Steroidogenic factor 1(SF-1) の役割を研究しており、SF-1 が内分泌・生殖系の機能、及び発生と性分化に重要であることを明らかにした。我々の作製した「グローバル SF-1KO マウス」は、生殖腺を発生初期から欠如するため、全身にエストロゲンのない動物モデルとして多くの研究に利用されている。さらに、組織特異的遺伝子破壊技術を用いて作製した「脳特異的 SF-1KO マウス」は、脳の視床下部腹内側核(VMH)の構造異常が起こり、この部位で ER の発現低下が起こることを示し、SF-1 と ER の中核としての機能的関連を示唆している。

### 2. 研究の目的

本研究は、我々の作製した2種類の SF-1KO マウス、すなわち全身的に SF-1 遺伝子を破壊した「グローバル SF-1KO マウス」を全身にエストロゲンのない動物モデル、「脳特異的 SF-1KO マウス」を脳でエストロゲンの作用しない動物モデルとして利用することにより、エストロゲンの骨代謝への全身的作用と脳での局所的作用の違いを明らかにし、脳エストロゲンによる骨代謝制御の分子機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

下の(1)~(6)を順に進める。

- (1)「グローバル SF-1KO マウス」と「脳特異的 SF-1KO マウス」の基本データの収集
- (2)骨の性状の解析
- (3)骨と脳における関連遺伝子発現の解析
- (4)骨組織細胞(骨芽細胞、破骨細胞)の分化能の解析
- (5)エストロゲン暴露実験
- (6)データのまとめ、考察、発表(各年度)

### 4. 研究成果

(結果の概要)研究開始当初、2種類のノックアウトの作成と解析を開始したが、「グローバル SF-1KO マウス」については、作成、維持ができないことから研究を中止した。「脳特異的 SF-1KO マウス」については、成熟後まで維持することができ、個体の基本データ、およびCTによる骨の解析を進めており、データが得られている。仮説に基づいた予想通り、「脳特異的 SF-1KO マウス」の骨密度が正常に比べて高まる傾向が認められた。今後さらにデータを蓄積し、成果をまとめて発表する予定である。

以下にこれまで得られた成果を記載する。

#### (1)「脳特異的 SF-1KO マウス」の基本データ

SF-1 遺伝子を正常にもつ Wild 群、SF-1 遺伝子が1つ破壊された Hetero 群、SF-1 遺伝子が2つとも破壊された cKO 群の3つの群について、生後5週から23週までの体重は、脳特異的 SF-1KO マウスでは正常よりも少ない傾向であることがわかった(図1)。今後は、23週以降の経過を調べる。

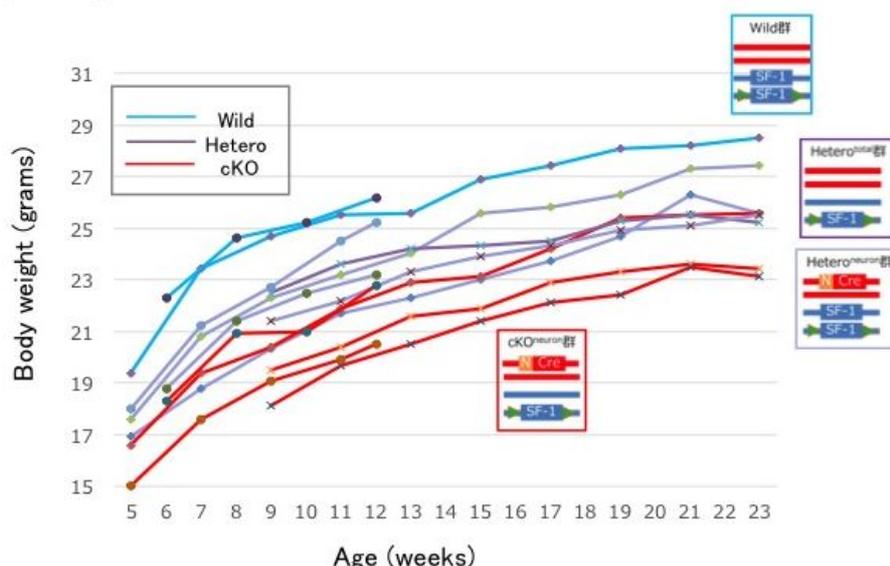


図1 生後の体重変化

また、SF-1 の発現部位である脳、精巣、副腎の各臓器における SF-1 の発現量を定量 RT-PCR 法により調べて上記の3群で比較すると、脳における発現量が cKO で明らかに低かったが、精巣、副腎においては各群間に有意な差は認められなかった(図2)。この結果から、脳特異的に SF-1 遺伝子が破壊されていることが確認された。

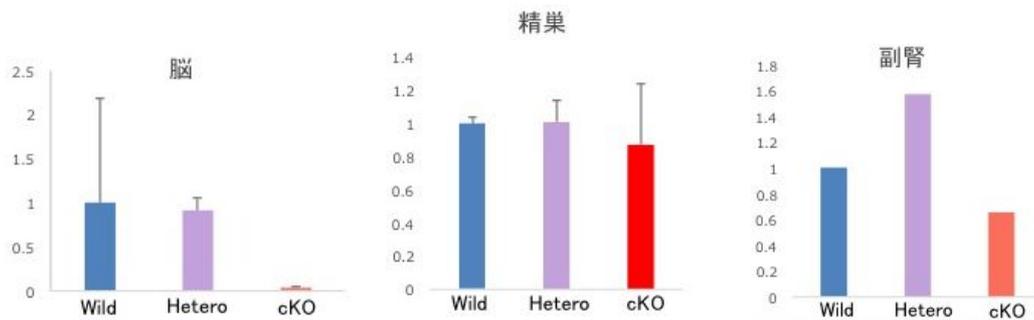


図2 各臓器におけるSF-1遺伝子発現量

(2) 「脳特異的SF-1KOマウスの骨の性状の解析

マイクロCTによる測定結果において、12週齢オスでは脳特異的SF-1KOマウスの海綿骨BV/TV(%), 緻密骨の厚さのいずれについても、わずかにWild群に比べて増加傾向を示すという結果が得られている(図3)。この結果は、当初の予想通り、SF-1が脳の中樞制御に關与する可能性を示唆するものと考えられる。今後は、さらに例数を増やすこと、また生後の時期の違い、性差について計測を行なう予定である。

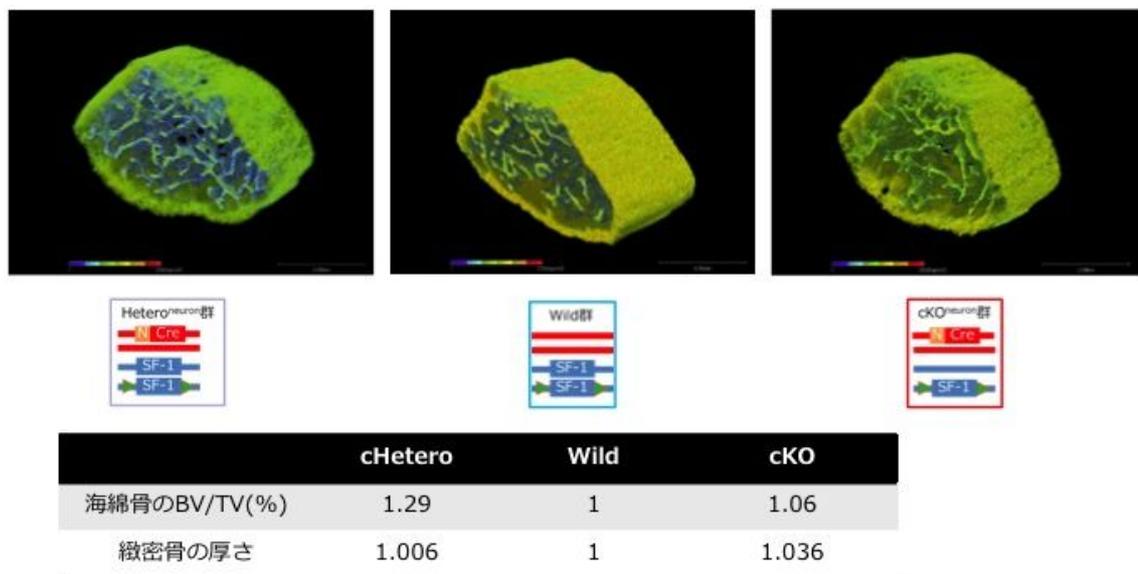


図3 マイクロCTによる骨の測定(生後12週齢オスマウス)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8件)

Ikeda Y, Kato-Inui T, Tagami A, Maekawa M. Expression of progesterone receptor, estrogen receptors and , and kisspeptin in the hypothalamus during perinatal development of gonad-lacking steroidogenic factor-1 knockout mice. *Brain Res*, 1712:167-179, 2019, 査読有, DOI: 10.1016/j.brainres.2019.02.016

Sakuma C, Imura H, Yamada T, Sugahara T, Hirata A, Ikeda Y, Natsume N. Cleft palate formation after palatal fusion occurs due to the rupture of epithelial basement membranes. *J Craniomaxillofac Surg*, 46(12):2027-2031, 2018, 査読有, DOI: 10.1016/j.jcms.2018.09.016

Ito T, Ikeda Y. A case of double inferior vena cava with renal, ovarian and iliac vein variation. *Anat Sci Int*, 93:139-143, 2017, 査読有, DOI: 10.1007/s12565-017-0397-7

Takahashi M, Komada M, Miyazawa K, Goto S, Ikeda Y. Bisphenol A exposure induces increased microglia and microglial related factors in the murine embryonic dorsal telencephalon and hypothalamus. *Toxicol Lett*, 284:113-119, 2017, 査読有, DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.12.010

高橋美文, 駒田致和, 田淵雅子, 宮澤健, 後藤滋巳, 池田やよい. 細胞増殖マーカーを用いた胎生期マウス視床下部発生解析. *愛知学院大学歯学会誌*, 55:311-321, 2017, 査読有

Komada M, Hara N, Kawachi S, Kawachi K, Kagawa N, Nagao T, Ikeda Y. Mechanisms

underlying neuro-inflammation and neurodevelopmental toxicity in the mouse neocortex following prenatal exposure to ethanol. Sci Rep, 7(1):4934, 2017, 査読有, DOI: 10.1038/s41598-017-04289-1

Ikeda Y, Tagami A, Komada M, Takahashi M. Expression of Kisspeptin in Gonadotrope Precursors in the Mouse Pituitary during Embryonic and Postnatal Development and in Adulthood. Neuroendocrinology. ;105(4):357-371, 2016, 査読有, DOI: 10.1159/000453398

Zhang K, Ikeda Y, Kasugai S, Ikeda MA. Extended Culture Conditions for Multipotent Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. J Stomatol Soci Japan 83(1):13-23, 2016, 査読有

[学会発表](計 13件)

前川眞見子, 田上文字, 池田やよい. マウス生殖腺の性分化過程における転写因子 SF-1 の役割 - 第 2 報 -. 第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2019.

Ikeda Y, Tagami A, Maekawa M, Progesterone receptor expression in the SF-1 knockout mouse brain during postnatal development. 北米神経科学会, 2018.

池田やよい. 性分化異常, 肥満, 骨粗鬆症になるマウス. 第 92 回愛知学院大学歯学会, 2018.

佐久間千里, 井村英人, 山田朋弘, 池田やよい, 菅原利夫, 夏目長門. 口唇蓋裂に関する実験的研究 口唇蓋裂に関する実験的研究 - 第 130 報 - TCDD 投与マウスにおける口蓋突起癒合後の離開による口蓋裂発生. 第 58 回日本先天異常学会学術集会, 2018.

前川眞見子, 田上文字, 池田やよい. マウス生殖腺の性分化過程における転写因子 SF-1 の役割. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2018.

高橋美文, 駒田致和, 田淵雅子, 宮澤健, 池田やよい, 後藤滋巳. 胎仔期低容量ビスフェノール A 暴露が視床下部形成に及ぼす影響. 第 76 回日本矯正歯科学会学術大会, 2017.

佐久間千里, 井村英人, 山田朋弘, 池田やよい, 菅原利夫, 夏目長門. 口唇口蓋裂に関する実験的研究(第 129 報) 口蓋突起癒合後の口蓋裂発生マウスに関する形態学的観察. 第 57 回日本先天異常学会学術集会, 2017.

佐久間千里, 井村英人, 山田朋弘, 池田やよい, 菅原利夫, 夏目長門. 口唇蓋裂に関する実験的研究(第 128 報) 口蓋突起癒合後の離解による裂発生について 口蓋突起癒合後の離解による裂発生について. 第 41 回日本口蓋裂学会総会・学術大会, 2017.

高橋美文, 駒田致和, 田上文字, 田淵雅子, 宮澤健, 後藤滋巳, 池田やよい. 胎仔期低用量 Bisphenol A 暴露が視床下部形成に及ぼす影響. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017.

駒田致和, 長尾哲二, 池田やよい. 胎仔期のエタノール曝露は大脳皮質の構造異常の原因となる脳内炎症とミクログリアの異常活性を誘発する. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017.

前川眞見子, 田上文字, 池田やよい. 遺伝子改変マウスを用いた生殖腺分化における SF-1 機能の解析. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017.

Ikeda Y, Tagami A, Immunohistochemical detection of kisspeptin in the mouse pituitary. 北米神経科学会, 2016.11.12-16.

Ikeda Y, Estrogen and alveolar bone, The 17th Scientific Meeting & Refresher Course in Dentistry (KPPIKG 2016), 2016.

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 池田 正明

ローマ字氏名: IKEDA, masaaki

所属研究機関名: 東京医科歯科大学

部局名: 歯学総合研究科

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 20193211

研究分担者氏名: 三谷 章雄

ローマ字氏名: MITANI, akio

所属研究機関名: 愛知学院大学

部局名: 歯学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：50329611

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。