

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19700607

研究課題名（和文） カルシウム摂取制限モデルマウスにおける骨代謝調節機構の解析

研究課題名（英文） Bone metabolism in the pregnant and lactate mouse fed calcium depleted diets

研究代表者

猪塚 倫代（IZUKA MITIYO）

武庫川女子大学・生活環境学部・助手

研究者番号 40441232

研究成果の概要：近年、若年者の骨密度は低下傾向を示し幼少期の骨折率も増加傾向にある。この背景には妊娠可能な18～49歳女性のCa摂取量が所要量の約8割と不十分であることが挙げられる。このようなCa摂取不足下での妊娠・出産中の骨量消費は、将来の骨粗鬆症発症に関与するだけでなく、子の成長へ影響することが危惧される。そこで本研究は妊娠・出産時のCa摂取と骨粗鬆症との関連性を解明するために、ICRマウスを用いてCa制限下における妊娠・授乳期の骨代謝およびCa動態について検討した。授乳期Ca制限によって母仔ともに骨密度が低下し仔マウスは成長障害を示したことから、特に授乳期での積極的なCa摂取が重要であることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	330,000	2,630,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：骨代謝、Ca代謝、周産期、骨粗鬆症、予防医学、予防栄養

## 1. 研究開始当初の背景

骨は生体の支持組織であるとともに、カルシウム(Ca)の貯蔵庫として重要な役割を果たしている。Caは体内において様々な生理活性を有するため、血液中のCa濃度は副甲状腺ホルモン(PTH: Parathyroid hormone)やカルシトニン、活性型ビタミンDによる骨吸収や骨形成、腎臓からのCa排泄および再吸収を調節することで、厳密に一定レベルに保たれている。骨組織は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成によって動的な平衡状態に

あり、絶えず再構築(リモデリング)が行われている。骨のリモデリングは海綿骨で盛んであり、骨代謝の影響は海綿骨におこりやすい。加齢や閉経、Ca摂取不足、運動不足などから骨形成より骨吸収が大となると、負のCaバランスが長期続くこととなり、骨粗鬆症が発症する。現在、日本における骨粗鬆症人口は、予備軍を含め約1100万人と推定されており、そのうち女性が80%以上占め、50歳以上であれば4分の1が「骨粗鬆症」とされ、その病態の解明は不十分

であり効果的な予防法、治療法は未だ確立されていない。現在の予防法としては、高齢期の骨量低下を抑えると同時に骨量の最も多い若いころから正しい食生活と適度な運動による骨量の維持に取り組むことが重要とされている。ところが、わが国の若年女性においては、過剰なダイエットや食生活の乱れによって Ca 摂取量の低下による骨量減少傾向がみられ、骨粗鬆症予備軍として危惧されている。さらに女性では妊娠・出産を経ることで骨代謝に変化が生じる。日本人成人の Ca 所要量は 600mg/日であるが、妊娠期は 150mg/日の Ca が母体から胎盤に移行し、妊娠中に血中 PTH は上昇する。これは胎児の骨格の発育に必要な生理的現象と考えられており、疫学調査において将来の骨粗鬆症の原因として直接的な関与はないとされている。しかし、胎児への Ca 供給源は母体であるため、妊娠時の母体の Ca 代謝が大きな影響を受ける。このため、近年の若年女性の Ca 摂取不足が、妊娠に大きな影響を与える可能性が予想される。欧米と比較して日本人の Ca 摂取量は低く、とくに妊娠可能な 18~49 歳女性の Ca 摂取量は所要量の約 8 割と不十分であり、幼少期の骨折率も増加傾向にある。十分な Ca 摂取があれば、母体の Ca 環境は胎児に影響がないと考えられているものの、それを証明する実験データはほとんどなく未解明のままである。これまでに骨粗鬆症モデル動物として、マウス・ラットの卵巣を摘出しエストロゲン分泌を抑えるという内因的な骨粗鬆症のモデル（閉経後骨粗鬆症モデル）が確立されているが、このモデル系は閉経時のエストロゲン分泌低下による影響を反映するものである。このため Ca 摂取不足による妊娠・授乳による骨代謝および Ca 代謝と骨粗鬆症の関連性と、骨粗鬆症発症に有効な予防策の検討に適した新たなモデル系の確立が必要と考えられる。

## 2. 研究の目的

骨粗鬆症の病態の解明と若年期からの効果的な予防法、治療法の検討を行うためのモデル系として妊娠期・授乳期の Ca 摂取を制限した食餌依存的骨粗鬆症マウスモデルの確立と母体と胎仔の骨代謝および Ca 代謝を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 動物飼育；10 週齢 ICR マウス妊娠 1 日目を 4 群に分けて飼育した。飼料は日本クレア CE-2 に準拠し Ca 含有率のみを 0.5%、0.3%、0.1%、0.005% に調製したものをそれぞれ供餌し、母体マウスおよび乳仔マウスの体重・体長（乳仔マウスのみ）・CT 撮影を経時

的に測定した。出産後 1 日目（13 週齢）と授乳 3 週間後（16 週齢・離乳後 1 日目）に解剖し血漿採血と腎臓・小腸上皮組織を採取した。

(2) X線 CT による解析；アバーチンによる腹腔麻酔後、ラシータ 100（アロカ社）にて骨盤から脛骨部位までを撮影、解析を行った。骨の立体再構成には、Vgstagiomax1.2 (Volum Graphics 社)を用いた。

(3) 血中 Ca・リン (P) 濃度測定；ジエチルエーテルによる安楽死後、ヘパリン酸ナトリウムを用いて後大静脈から採血して遠心分離にて得た血漿を測定に用いた。血中 Ca、P、PTH 濃度の測定には、カルシウム E テストワコー (WAK437-58201)、ホスファ C テストワコー (WAK270-49801)、Mouse Intact PTH ELISA Kit (Immutopics, #60-2300) を利用し、マイクロプレートリーダー (Spectra Fluor Plus, TECAN 社, LS-plate manager 2004) を用いて測定した。

(4) リアルタイム PCR (RT-PCR)；腎臓・十二指腸・空腸・回腸を摘出し、小腸は粘膜上皮をスライドガラスでそぎ取るように上皮組織を採取した。採取した組織を TRIzol (Invitrogen, 15596-018) を用いてプロトコールに従って RNA の単離を行い、total RNA 1.0µg/µl を Oligo(dT) (Invitrogen, 18418-012) と Super Script II (Invitrogen, 18064-071) を用いて cDNA 合成を行った。得られた cDNA を 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) にて mTRPV5、mTRPV6、mI $\alpha$ -OHase、mGAPDH などの mRNA 発現量を解析した。

(5) 免疫染色法による解析；腎臓、小腸（十二指腸、空腸、回腸）を摘出し 4%PFA/TBS で固定し OCT Compound (サクラ精機株式会社) にて包埋後、0.8µm に薄層凍結切片 (クリオスタット LeicaCM 3050S) を作成した。rabbit 抗 rat TRPV5 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, INC, sc-30187)、rabbit 抗 human TRPV6 抗体 (Santa Cruz Biotechnology INC, sc-28763) を一次抗体として反応後、二次抗体として抗 rabbit IgG HRP 抗体 (CHEMICON) を用いて DNP Amplification Kit (PerkinElmer, NEL747A) を利用して DAB により発色させて、顕微鏡にて観察した。

(6) 統計的処理；Excel (マイクロソフト社) を用いて統計解析を行った。

## 4. 研究成果

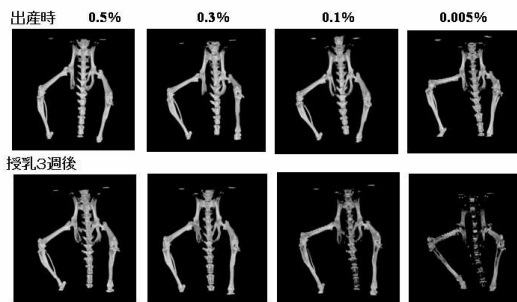
### (1) 母体における Ca 制限の影響

出産 1 日目と授乳 3 週後の X線 CT による骨密度と立体画像を比較した結果、骨消費量は比較的軽微であり、Ca 制限があったとしても大きな変動は起こらないと判断された。一方、授乳 3 週間には全群で骨吸収が進み、特に 0.1%以下の Ca 制限で骨吸収が顕著であった(研究結果①)。この期間、コントロール群

と各 Ca 制限群の親マウスの体重変化には有意な差は認められなかった (データ示さず)。

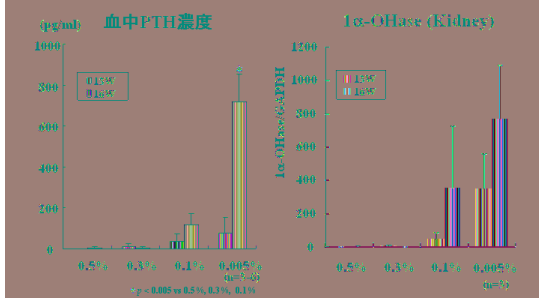
また、出産直後の血中 Ca 濃度は Ca 制限の影響を受けず、どの群も正常範囲に保たれていたが、離乳直後では 0.005%Ca 群で有意に低下していた(データ示さず)。これは母体に貯蔵されていた Ca の消費が激しいために、母体内のホメオスタシスバランスが崩れてしまった可能性が考えられた。一方、血中の P 濃度は、ほぼ正常範囲に保たれていた(データ示さず)。

### 研究結果① 母体のCT骨密度解析



妊娠・授乳という急激な Ca 需要の上昇に対して骨吸収を促進する PTH 値は、餌の Ca 含有量が 0.3%以上であれば、その分泌はごく微量であるが、Ca 制限が 0.1%以下になると妊娠中により PTH 分泌量の増加が見られるようになり、授乳ではさらに劇的な増加が認められた。また、ビタミン D 最終活性化酵素である腎臓の 1 $\alpha$ -OHase の RT-PCR 評価では PTH の分泌量と同様に 0.1%以下の Ca 制限で強い発現を示した(研究結果②)。

### 研究結果② 母体のPTH、ビタミンDの変化

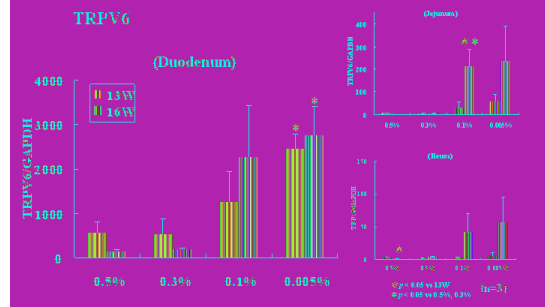


Ca チャネル TRPV5、TRPV6 は腎臓および粘膜上皮管腔面に発現し、Ca の吸収・再吸収に関与している。妊娠・授乳期の Ca 需要の増加に伴い、この機構の亢進が起こると言われている。しかし腎臓において Ca 再吸収を主に担う TRPV5、TRPV6 は Ca 制限の程度によらずほぼ同じレベルの発現が認められたことから(データ示さず)、この期間の腎臓の Ca 再吸収亢進には能動輸送ではなく受動輸

送の亢進あるいは Ca 細胞内輸送の上昇が考えられた。

これに対して小腸の Ca 吸収に関わるとされる TRPV6 の十二指腸での発現は、Ca 摂取量が 0.3%以上で離乳後よりも出産後に発現が高くなっており、妊娠中のホルモン環境による誘導が示唆された(研究結果③)。一方、0.1%以下の群では Ca 需要の高まりに応じて劇的な発現誘導が見られ、PTH による制御が示唆された。また、Ca が受動的に吸収するとされる空腸や回腸でも発現量は少ないものの同様の傾向が認められ、組織の免疫染色でも RT-PCR の結果と同様の傾向が認められた (データ示さず)。

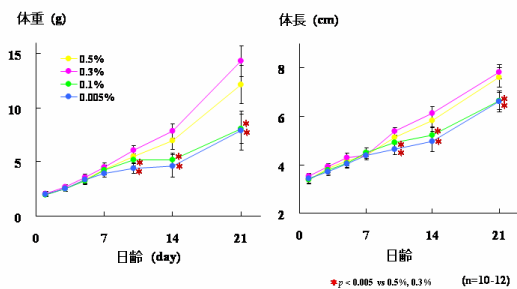
### 研究結果③ 母体の小腸Caチャネルの発現量



### (2) 胎仔・乳仔の Ca 代謝の影響

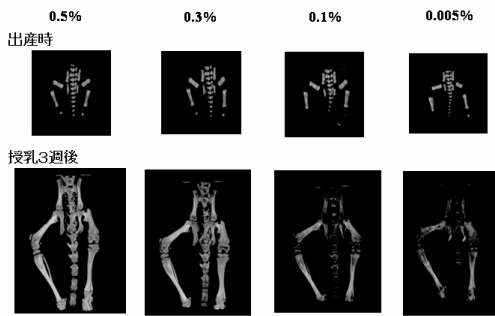
仔マウスの体重・体長は、出生直後において各群間に差はなく、妊娠中の母体 Ca 制限の影響は受けていないことが示された (研究結果④)。しかし、授乳期に母体の Ca 制限が 0.1%以下となると体重・体長ともに 10 日齢前後から成長障害が見られた。

### 研究結果④ 乳仔の体重・体長変化



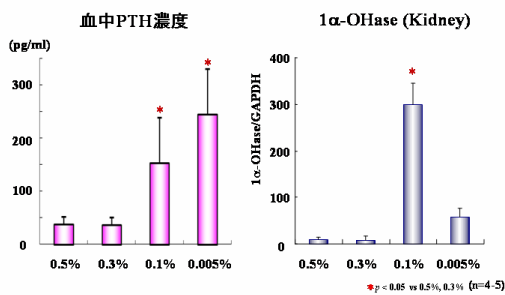
出生 1 日齢と 21 日齢の X 線 CT による骨密度を比較した結果、妊娠期間中の母体 Ca 制限による影響を示す出生時の骨の形態には、各群間で明らかな差異は認められなかった。しかし、授乳期間中の母体 Ca 制限による影響を示す離乳時の骨形態は、0.1%Ca 群以下で骨密度は出生時からほぼ同じで、Ca の不足による明らかな骨形成障害が認められた (研究結果⑤)。

### 研究結果⑤ 乳仔のCT骨密度解析



授乳3週後(21日齢)の血中Ca濃度はCa制限の程度が厳しくなるにつれて低下傾向を示すようになり、0.1%以下の群では正常範囲に維持できなくなっていた(データ示さず)。乳仔マウスの授乳期の成長は著しく、この成長を支えるためのCa需要は大きいと考えられる。0.1%以下のCa制限で成長障害が生じ、血中Ca濃度が正常範囲を保てなくなっていることから、その調節に関わるPTHの分泌量を測定した(研究結果⑥)。この結果、Ca含有量が0.3%以上であれば、その分泌は一定であるが、制限が0.1%以下となるとPTH分泌量の著しい増加が認められた。さらに、PTHで活性化される $1\alpha$ -OHaseのmRNA発現量はPTHの分泌量と同様に0.1%Ca制限で強い発現を示したが、0.005%群ではその上昇は0.1%群に比べて低く、十分な発現応答ができなくなっている可能性が示唆された(研究結果⑥)

### 研究結果⑥ 乳仔のPTH、ビタミンDの変化



一方、21日齢における腎臓では、TRPV5の発現レベルよりも、TRPV6の発現レベルが若干高く(データ示さず)、Ca需要の上昇に対してTRPV6の応答がより大きいことが示唆された。また、十二指腸粘膜におけるTRPV6 mRNAの発現は成長期を反映して極めて亢進しており、母体のCa代謝にほとんど影響がないと思われた0.3%群でも0.5%群に比べ著しい亢進が認められた(データ示さず)。このことから、授乳期の仔マウスの成長のためには母体の骨量維持する以上のCa

摂取が重要であることが示唆される。空腸・回腸においても少量ではあるが十二指腸と同様の発現傾向が認められた(データ示さず)。妊娠中の胎仔へのCa供給は胎盤を通じて行われるが、授乳期間中はすべて乳汁中から供給されるため、乳仔の骨形成に伴うCa需要の増加に対してCa吸収・再吸収に関わる分子の発現は高くなり、さらに乳汁からのCa供給不足の影響によるものと考えられた。

#### (3) 考察と今後の展開

本研究において、母体の骨からのCa供給は妊娠期(出産直後)よりも授乳期における著しいCa制限に従って母体の骨吸収の進行が明らかに認められた。これは不足した食餌からのCa供給を母体の骨に蓄えられていたCaを動員して血中Ca濃度を維持するとともに乳児の成長に必要なCaを供給していると考えられる。母体からのCa供給により乳仔マウスの出生時の骨密度は各群間で有意差は見られなかったが、授乳期の盛んな骨形成には十分なCa供給が必要である。事実、0.1%以下のCa群では出生時より著しい骨形成障害と骨密度低下が見られ、生後3週齢までに死亡するものも見られた。以上のことから、ヒトの授乳期においても母体でのCa摂取が乳児の成長に重要であることが示唆された。

今回の妊娠・授乳期Ca制限によるマウスモデル系において、0.3%Ca群では母体の骨強度と仔の成長に影響が見られなかったことから、0.3%Ca食はマウスにおけるCa摂取基準量と考えられる。しかしながら、0.3%Ca群での乳仔マウスの骨強度が0.5%Ca群に及ばないことから母体の骨強度を基準とするだけでなく仔の成長に配慮してCa必要量を検討する必要がある。

母体のCa環境に関わらず母体Caは胎児へと蓄積され、妊娠・授乳に伴う母体のCa消費は避けられない。疫学調査においては妊娠・授乳による骨代謝の変化は将来の骨粗鬆症の原因として直接的な関与はないとされているが、近年、若年女性のCa摂取は不足傾向にあり、その状況下での妊娠・授乳に対する母体と胎児・乳児への影響は懸念せざるをえない。実際に、幼少期の骨折率は増加傾向にあり、若年女性のCa摂取不足による妊娠・授乳期の食事と骨粗鬆症の明確な関連性の解明、予防が必要である。本モデル系は、現在の妊娠可能な女性のCa摂取不足が妊娠・授乳に与える影響のさらなる解析に有効である。今後の課題として、本モデル系による妊娠・授乳によるCa消費量測定を行い、実験に必要なCaの推定を行うとともに、これに伴うホルモン動態と細胞レベルでのさらなる骨代謝解析が期待される。

## 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)

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 松井麻侑：授乳中の母体マウスのカルシウム欠乏が乳仔の骨代謝に与える影響；第 31 回 日本分子生物学会年会・第 81 回 日本生化学大会合同大会、2008.12.9、神戸ポートアイランド
- (2) 木村みどり：食餌中 Ca 含有率の制限が妊娠・授乳期の母体の骨代謝に与える影響の検討；第 31 回 日本分子生物学会年会・第 81 回 日本生化学大会合同大会、2008.12.9、神戸ポートアイランド
- (3) 猪塚倫代：妊娠・授乳期におけるカルシウム摂取制限の骨代謝への影響；第 62 回 日本栄養・食糧学会大会、2008.5.3、女子栄養大学
- (4) 猪塚倫代：Regulation of the TRPV5 and TRPV6 in the intestinal epithelium during pregnancy and lactation；第 30 回 日本分子生物学会年会・第 80 回 日本生化学大会合同大会、2007.12.11、パシフィコ横浜
- (5) 松井麻侑：Bone metabolism of fetus and/or infant mouse under the calcium-deficient condition；第 30 回 日本分子生物学会年会・第 80 回 日本生化学大会合同大会、2007.12.11、パシフィコ横浜
- (6) 木村みどり：Bone metabolism of pregnant and lactate mouse fed calcium depleted diets；第 30 回 日本分子生物学会年会・第 80 回 日本生化学大会合同大会、2007.12.11、パシフィコ横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

猪塚 倫代 (IZUKA MICHIO)

武庫川女子大学・生活環境学部・助手

研究者番号：4 0 4 4 1 2 3 2