

## 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 3月31日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592365

研究課題名（和文）生殖内分泌制御系を介した新規分子の骨代謝制御への関わり

研究課題名（英文）Involvement of a novel signaling molecule, PRIP in the regulation of bone metabolism through reproduction system

研究代表者

松田 美穂（MATSUDA MIHO）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：40291520

研究成果の概要（和文）：性周期制御における PRIP の機能解析とともに骨代謝制御への関わりを解明することを目的として本研究を遂行した。その結果、PRIP が性周期制御に関わるホルモンの分泌制御に関与し、そのことを介して、或いはさらに別の経路を介して、卵の成熟過程において PRIP がその制御に機能していることが明らかになった。また、PRIP ノックアウトマウス（PRIP-KO マウス）では、生殖系ホルモンのアンバランスによる骨量の減少が予想されたが、予想に反して骨密度や骨量の増加が認められ、これはホルモンによらない経路を介して PRIP が骨代謝制御に関与していることを示唆した。さらに解析を進めたところ、PRIP-KO マウスでは骨形成が亢進する一方で骨吸収が低下しているため、骨量の増加という表現型を呈することが判明した。これらのことから、PRIP は骨形成において抑制的に働くことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study revealed the following: (i) PRIP was involved in female reproductive system, especially in gonadotropins secretion and ovarian follicle maturation. (ii) The bone mineral density and trabecular bone volume were higher in PRIP-gene deficient mice due to enhanced bone formation and decreased bone resorption, indicating that PRIP is implicated in the negative regulation of bone formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1300000	390000	1690000
2010年度	1100000	330000	1430000
2011年度	1100000	330000	1430000
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

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：生殖・ホルモン・骨代謝

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、PRIP（PLC-related but catalytically inactive protein）分子を見いだし（*JBC*, 267, 6518, 1992）、Ins(1,4,5)<sub>P</sub><sub>3</sub>結合性であることに鑑みて Ca<sup>2+</sup>シグナリングにおける役割を解明する研究を行うとともに（*BJ*, 349, 357, 2000; *JCP*, 202, 422, 2005）、PRIP と結合する分子を探索し、PP1

（protein phosphatase-1）と GABARAP（GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein）の2分子を同定した。これらの結合分子が GABA<sub>A</sub>受容体機能への関わりを示唆したので PRIP-遺伝子欠損(KO)マウスを作製し、GABA<sub>A</sub>受容体機能に関わる PRIP の役割について検討してきた（*EMBO J*, 21, 1004, 2002; *JBC*, 281, 22180, 2006; *JNS*, 27, 1692, 2007）。また最近、PRIP

がイノシトールリン脂質との結合を通して開口分泌に関わることも分かってきた。

PRIP-KO マウスの表現型を観察していく過程で、野生型に比べて出産頻度や1回当たりの出産仔数、総出産仔数が少ない、などの生殖に関わる異常な表現型が明らかになってきた。そこで、野生型オス x PRIP-KO メス、野生型メス x PRIP-KO オスの掛け合わせを行ったところ、出産頻度や仔数は野生型メス x PRIP-KO オスの方が野生型どうしの掛け合わせに近い結果になった。つまり、PRIP-KO マウスにおける出産頻度や出産仔数の減少は、雌に起因する可能性が示唆された。そこで、雌において黄体形成ホルモン (luteinizing hormone, LH) 及び卵胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone, FSH) の血中濃度を調べたところ、PRIP-KO マウスでは LH サージがはっきりせず、LH, FSH ともに野生型に比べ恒常的に高濃度であった。また、エストロゲン、プロゲステロンの血中濃度については、PRIP-KO マウスで減少していた。雌の膈壁垢を採取し発情周期をみる smear test を行ったところ、PRIP-KO マウスでは稀発排卵もしくは無排卵を示唆する性周期の乱れがあった。

高 LH や性周期の乱れといった表現型は、多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) の症状にも類似している。また、高 FSH やエストロゲンの低下は骨粗鬆症の原因でもある (Cell, 125, 247, 2006; Cell, 130, 811, 2007)。これらの現象は、PRIP 欠損で生じた異常であり、PRIP が生殖機構の制御に関わること、更に骨代謝制御にも影響を及ぼす可能性が強く示唆された。

## 2. 研究の目的

性周期制御における PRIP の機能解析とともに骨代謝制御への関わりを解明する。

## 3. 研究の方法

### ① PRIP の有無によって生じる生殖に関わる器官及び骨への影響

・野生型、PRIP-KO マウスについて、体重および下垂体、子宮、卵巣、精巣、副腎などの生殖に関わる器官の大きさ、形態、重量等を計測し、比較検討する。またこれらの器官の組織切片を作製し、HE 染色や組織のマーカーとなる分子の抗体染色を行い、組織学的解析を行った。

・骨密度、骨質など骨の状態について、大腿骨または腰椎を用いて二重エネルギー X 線吸収測定法やマイクロ CT 等にて計測した。これを幾つかの週齢で比較検討した。

### ② 骨組織を用いた組織機能学的解析

・野生型および PRIP-KO マウスから摘出した大腿骨、腰椎について、1 次海綿骨周辺を酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色、

Von Kossa 染色し、破骨細胞や骨芽細胞の数や分布状況を検討する。また、HE 染色、骨代謝マーカー分子の免疫染色を行い、骨吸収や形成の具合を野生型と PRIP-KO マウスとで比較検討した。

### ③ 下垂体における PRIP の役割

・PRIP 遺伝子について RNA 干渉用のコンストラクトを作製し、この培養細胞において PRIP 遺伝子の RNA 干渉を行い、PRIP の発現を抑制した細胞株を構築した。また、PRIP を過剰発現させた細胞株も構築した。

・この変異細胞と野生型細胞において、各性腺刺激ホルモン (LH, FSH) の産生及び分泌量等における差異を、RT-PCR、ウエスタンブロッティング、ELISA 等の手法を用いて検討した。

・下垂体前葉細胞において、受容体への GnRH の結合が引き起こすシグナル伝達から性腺刺激ホルモン (LH, FSH) の分泌に至るまでの過程で、PRIP がどのステップに機能しているかを検討するために、ホルモン産生後の輸送や分泌過程に関わる種々の分子との相互作用を生化学的手法にて検討した。

### ④ 生殖腺への影響

卵巣、精巣への影響をみるために、野生型、PRIP-KO マウスの血中のエストロゲンやテストステロン等関与するホルモンの産生量や分泌量、或いは組織培養を用いて刺激の有無によるホルモン分泌量の変化等を ELISA 法などで測定し解析した。

・PMSG や HCG の投与により生体内のホルモン条件を一定にして、排卵数を計測した。

・性周期の各時期の卵巣の切片を作製し、卵巣の状態観察や性腺刺激ホルモン受容体などの免疫染色を行った。

### ⑤ 破骨細胞、骨芽細胞を用いた解析

・野生型及び PRIP-KO マウスから調製した骨芽細胞前駆細胞を用いて、骨芽細胞分化への PRIP の有無の影響を検討した (アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定、染色等)。また、同マウスから調製した骨髄細胞を用いて、破骨細胞分化への PRIP の有無の影響を計時的に検討した。

・上述の結果、各細胞分化において PRIP の有無が影響していたので、分化に関わる因子の発現量やリン酸化程度の解析を行った。

## 4. 研究成果

### ① PRIP の有無によって生じる生殖に関わる器官及び骨への影響

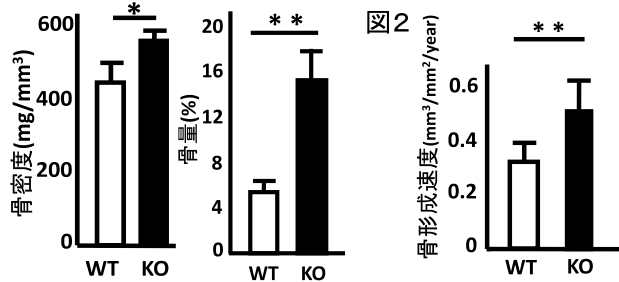
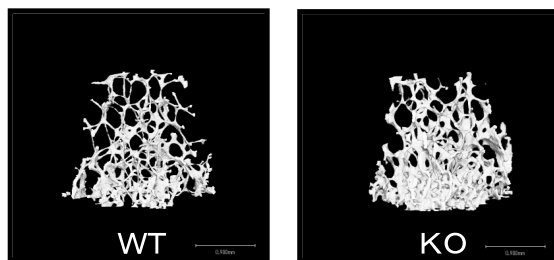
・野生型、PRIP-KO マウスについて、以前の結果から体重および生殖に関わる器官のうち下垂体、卵巣、精巣の大きさ、形態、重量においては差がなかったが、子宮では野生型に比べ PRIP-KO マウスで大きさや重量が小さかった。そこで子宮について週齢を追って比較したところ、少なくとも生後 3 ヶ月までは野生型と PRIP-KO マウスで有意差はなか

ったが、その後6ヶ月の頃には大きさに差が生じることが分かった。その子宮について各々組織切片を作製し、hematoxylin-eosin染色等による組織学的解析を行ったが、内膜や筋層、外膜などの厚さや形態に違いは見られなかった。子宮以外の上述の器官についても同様に組織学的解析を行ったが、顕著な差は見られなかった。

### ② 骨組織を用いた組織機能学的解析

- ・3, 6, 12ヶ月齢のメスの野生型およびPRIP-KO マウスより調製した大腿骨の組織学的解析を行ったところ、特に6ヶ月齢において野生型に比べてPRIP-KO マウスではTRAP染色陽性の破骨細胞数がやや多く、これは性腺刺激ホルモン・性ホルモンのアンバランスから想定された通りであった。しかし、ALP染色陽性の骨芽細胞数も多かった。更に、 $\mu$ CTを用いた3次元計測では、予想に反して骨密度及び海綿骨の骨量が増大していた(図1)。
- ・カルセイン2重標識による骨形成能の解析を行ったところ、PRIP-KOマウスにおいて骨形成速度の増加が見られた(図2)。

図1



### ③ 下垂体におけるPRIPの役割

- ・下垂体前葉から調製されたRNAおよび蛋白質を用いて性腺刺激ホルモンのqRT-PCRおよび蛋白質質量測定を行ったところ、転写レベルでのLH、FSH量は、野生型およびPRIP-KOマウス間で差はなく、蛋白質レベルで下垂体前葉内に残る性腺刺激ホルモン量に差があった(図3)。
- ・下垂体前葉の細胞株において、PRIPの発現を抑制した細胞株及びPRIPを過剰発現させた細胞株を構築し、LH、FSHの分泌量を野生型細胞と比較したところ、PRIPの発現を抑制した細胞では分泌亢進が見られなかったが、PRIP

過剰発現細胞では、分泌量が低下した。さらに、GnRHのアゴニストであるBuserelinで刺激したところ、野生型及び変異細胞株とも分泌量が増加したが、PRIP過剰発現細胞株ではその増加程度が少なかった。

これらのことから、個体や組織培養の結果と合わせて、PRIPが性腺刺激ホルモンの分泌抑制に関わっていることが示唆された。

図3

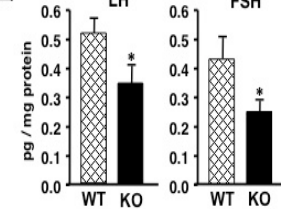
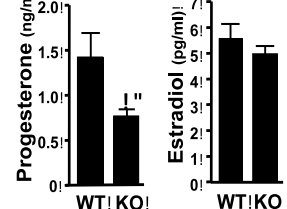


図4



### ④ 生殖腺への影響

- ・卵巣から分泌されるエストロゲン、プロゲステロンの血中濃度を測定したところ、KOマウスにおいてプロゲステロンが有意に減少していた(図4)。
- ・3週齢メスの野生型、PRIP-KOマウスにおいて薬剤投与によって性周期を合わせ、一定時間後に排卵誘発剤を投与したのち排卵数を計測したところ、野生型に比べPRIP-KOマウスでは1/5程度にまでに減少した(図5)。また、排卵後の卵巣における黄体数を計測したところ、PRIP-KOマウスにおいて減少していた(図6)。
- これらのことから、出産仔数の減少の原因は、排卵時もしくは排卵に至るまでの卵胞成熟の過程での何らかの異常によるものであることが示唆された。

図5

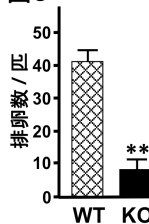
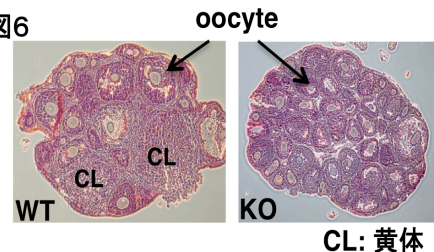
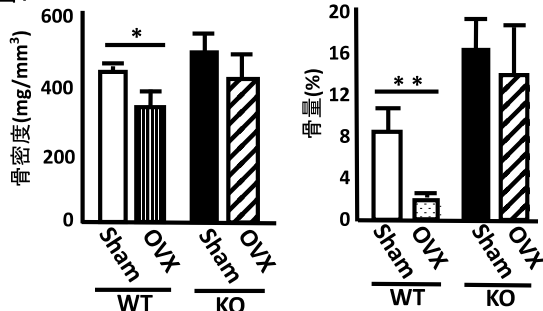


図6



- ・大腿骨を用いた $\mu$ CTによる解析において、野生型に比べPRIP-KOマウスで骨量増加が見られたので、生殖系ホルモンの影響を受けて生じた差なのかどうかを調べるために、卵巣摘出マウスを作製して骨量を測定した。その結果、ノックアウトマウスでは、卵巣を摘出しても骨量の減少が野生型ほど見られなかった(図7)。つまり、PRIP-KOマウスにおける骨量増加は、生殖系ホルモンが関与しない別の制御機構によるものと考えられた。

図7

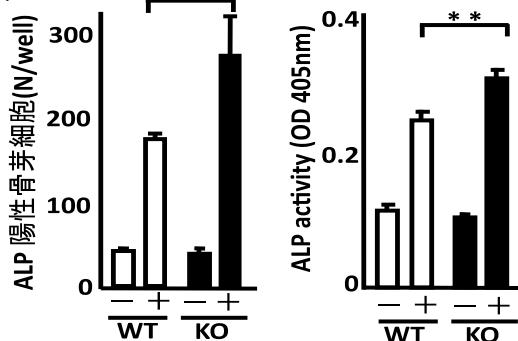


⑤ 破骨細胞、骨芽細胞を用いた解析

・野生型及びPRIP-KOマウスの頭蓋冠から調製した骨芽細胞前駆細胞に、BMP刺激を加え骨芽細胞への分化における両者の違いを検討した。PRIP-KOマウスではALP陽性の分化した骨芽細胞の数が多く、ALP活性も高く、また骨形成速度が亢進していた(図8)。

・PRIP-KOマウスでは骨芽細胞の分化能が高いことが予想されたので、骨芽細胞分化・骨形成に重要な転写因子 Smad のリン酸化レベルを計時的に追ったところ、リン酸化の延長が認められた。また、オステオカルシンやId1などの骨形成関連因子の発現を見たところ、いずれもPRIP-KOマウスで発現量が亢進していた。

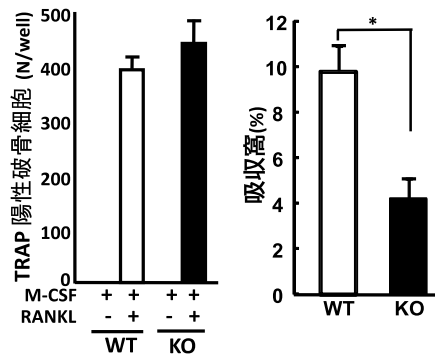
図8



・マウス大腿骨より調製した骨髓細胞を用いて破骨細胞への分化を検討したところ、野生型に比べPRIP-KOマウスで破骨細胞の細胞数がやや多い傾向にあり、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 活性も相応の値であったが、通常より核数の多い大きな破骨細胞が認められた。また、破骨細胞の初代培養を用いた pit assay では、野生型に比べPRIP-KOマウスでは分化した破骨細胞数はやや多い程度であったが、破骨細胞の吸収窩は野生型の半分以下だった(図9)。

これらのことから、PRIP-KOマウスでは、骨芽細胞への分化が促進しているために骨形成が亢進している一方、正常な機能を有する破骨細胞が少ないために骨吸収が低下しており、結果として骨量増加に至るものと考えられた。つまり、PRIPは骨形成に抑制的に働く分子であると結論した。

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 Matsuda, M., Tsutsumi, K., Kanematsu, T., Fukami, K., Terada, Y., Takenawa, T., Nakayama, K.I., Hirata, M.: Involvement of phospholipase C-related inactive protein in the mouse reproductive system through the regulation of gonadotropin levels. *Biol Reprod*, 81: 681-689, 2009 査読有

② Gao, J., Takeuchi, H., Umebayashi, H., Zhang, Z., Matsuda, M. and Hirata, M.: Assay of dense-core vesicle exocytosis using permeabilized PC12 cells. *Adv. Enz. Regul.*50, 237-246, 2010 査読有

③ Tsutsumi, K., Matsuda, M., Kotani, M., Murakami, A., Mizokami, A., Takahashi, I., Terada, Y., Kanematsu, T., Fukami, K., Takenawa, T., Jimi, E. and Hirata, M.: Involvement of PRIP, phospholipase C-related, but catalytically inactive protein, in bone formation. *J. Biol. Chem.* 286: 31032-31042, 2011 査読有

[学会発表] (計 15 件)

① 第21回 IUBMB & 第12回 FAOBMB (国際生化学分子生物学連合カンファレンス) (上海) 表題「Involvement of a novel inositol 1, 4, 5-trisphosphate binding protein, PRIP, in the reproductive system through the regulation of gonadotropin levels」松田美穂、平田雅人 2009, 8, 6

② 第51回歯科基礎医学会学術大会・総会 (新潟) 表題「PRIPの骨代謝における機能解析」堤康史郎、松田美穂、平田雅人 2009, 9, 10 最優秀ポスター賞受賞

③ 第32回 日本生化学会年会 (神戸) 表題「Involvement of PRIP in the regulation of bone metabolism」堤康史郎、松田美穂、平田雅人 2009, 10, 10

④ 第6回 Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists (佐世保) 表題「Involvement of PRIP in the reproduction system through the regulation

of gonadotropin levels」松田美穂、平田雅人 2009, 11, 24

⑤第32回 日本分子生物学会年会(横浜) 表題「Involvement of PRIP in the regulation of bone metabolism」松田美穂 2009, 12, 10

⑥ 第12回IUBMB & 第21回FAOBMB(国際生化学分子生物学連合カンファレンス)(メルボルン)表題「Pituitary and ovarian function in PRIP knockout mice」松田美穂、平田雅人 2010, 9, 29

⑦ 第12回IUBMB & 第21回FAOBMB(国際生化学分子生物学連合カンファレンス)(メルボルン)表題「The role of PRIP in the regulation of autophagy」梅林久範、松田美穂、兼松隆、平田雅人 2010, 9, 30

⑧ 第12回IUBMB & 第21回FAOBMB(国際生化学分子生物学連合カンファレンス)(メルボルン)表題「Regulatory role of PRIP in the bone formation」堤康史郎、松田美穂、自見英治郎、平田雅人 2010, 9, 30

⑨ 第52回歯科基礎医学会学術大会・総会(東京)表題「PRIPは骨形成の制御に関する」堤康史郎、松田美穂、平田雅人 2010, 9, 21

⑩ 第83回日本生化学会・第33回日本分子生物学会合同大会(神戸)表題「Involvement of PRIP in the regulation of bone metabolism」松田美穂、平田雅人 2010, 12, 9

⑪ 第84回日本生化学会大会(京都)表題「骨形成制御機構におけるPRIPの機能解析」小谷美穂、堤康史郎、松田美穂、平田雅人 2011, 9, 22

⑫ 第53回歯科基礎医学会学術大会(岐阜)表題「PRIPはautophagyを抑制的に制御する」梅林久範、松田美穂、兼松隆 他 2011, 9, 30

⑬ International Symposium, New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine 2011(福岡)表題「PRIP is implicated in the negative regulation of bone formation」小谷美穂、堤康史郎、松田美穂、平田雅人 2011, 11, 15

⑭ 第53回歯科基礎医学会学術大会(岐阜)表題「PRIP遺伝子欠損マウスで観察された骨の表現型の解析」堤康史郎、松田美穂、小谷美穂、平田雅人 他 2011, 9, 30

⑮ 第34回日本分子生物学会年会(横浜)「新規情報伝達分子 PRIP ノックアウトマウスにおける生殖制御の異常」松田美穂、平田雅人 2011, 12, 13

[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◇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

松田美穂 (MATSUDA MIHO)

歯学研究院・口腔細胞工学・助教

研究者番号: 40291520

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号:

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号: