

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430088

研究課題名(和文) 発光イメージング技術を利用した妊娠期における母体の骨調節機構の解析とその応用

研究課題名(英文) Analysis of bone formation activity during pregnancy by in vivo imaging

研究代表者

中西 友子 (NAKANISHI, Tomoko)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：10344863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトオステオカルシン(OC)プロモーター制御下でルシフェラーゼを発現する(OC-Luc)マウスでは、骨に由来する発光が妊娠前期と後期に二峰性に上昇した。発光上昇時における骨吸収活性および、エストロゲン・プロゲステロンの血中濃度は、妊娠0日目と比較して上昇していたが、発光上昇と直接的な関係は認められなかった。また、内在性マウスOCの発現は減少し、妊娠期におけるOC-Lucによる発光の上昇とは関連しなかった。OC-Lucマウスでは胎盤での発光が認められ、ヒトOCと同様に胎盤での発現が認められたことから、OC-Lucマウスでは妊娠期におけるヒト特異的な発現調節を追跡できていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In OC-Luc mice, expressing luciferase under the control human osteocalcin (OC) promoter, luminescence increased bimodally during pregnancy. TRAP activity and blood concentration of estrogen/progesterone showed positive correlation with luminescence increase during pregnancy. However, expression of endogenous mouse OC decreased and did not correlate with the rise of luminescence derived from OC-Luc during pregnancy. Luminescence derived from OC-Luc was also expressed in placenta, where no expression of mouse OC has been detected. These results show that human OC promoter was controlled differently from mouse OC promoter, suggesting that OC-Luc mice reflects the human OC expression during pregnancy.

研究分野：発生工学

キーワード：オステオカルシン 妊娠 ルシフェラーゼ 骨形成

## 1. 研究開始当初の背景

妊娠中の母体環境は胎児に大きな影響を与えるのみならず、生後の生活習慣病を含む様々な疾患の発症に影響を与えることが報告されている。反対に、妊娠は母体にも様々な変化をもたらす。妊娠すると母体は胎児に様々な物質を供給するようになる。中でも骨の維持等に必須なカルシウムは、ヒトの場合、総量 30g が移行すると言われる。また授乳期には母乳生産のために 160-300 mg/日のカルシウムが消費されるという。カルシウム供給に伴う母体の骨組織の変化は、授乳が終了した後速やかに元に戻ると言われているが、妊娠・出産に伴い骨粗鬆症を発症することがあることから、母体の骨量を最大に保っておくことは重要な課題となる。しかし、実際の骨量の増減や骨代謝の亢進の有無などについては、増加するという報告が多いものの不明な点が多く残されている。

骨は細胞と細胞外基質で構成され、ほとんどが細胞外基質という珍しい組織である。基質タンパク質には、I 型コラーゲンや非コラーゲン性タンパク質であるオステオカルシン、オステオポンチンやマトリクスグラブリン等が知られ、基質タンパク質にハイドロキシアパタイトが沈着して石灰化することで非常に硬い組織となる。骨構成細胞には、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞骨細胞があり、骨組織は成長が終わった後も、常に古い組織が吸収され、新しい骨が形成されてダイナミックに代謝されている。この骨吸収と骨形成を担うのが破骨細胞と骨芽細胞であり、バランスが崩れると様々な骨代謝疾患の原因となる。

我々はこれまでに、in vivo 発光・蛍光イメージング技術を用いて生体機能の変化をリアルタイムで追跡できるシステムを確立してきた( )。特に骨においては、骨芽細胞で発現し、骨形成マーカーとして知られるオステオカルシンの制御下でルシフェラーゼを発現するマウス(OC-Luc マウス)を作製しており、これまでに加齢に伴う骨形成活性の低下、骨折の治癒遅延の過程を明らかにしてきた( )。

最近我々は、OC-Luc マウスを用いて、妊娠および授乳期間中に骨形成活性が増加する過程を、発光の上昇を指標に感度良く捉えることに成功した。このことは、オステオカルシンが妊娠・授乳中においても母体の骨組織調節マーカーとして利用できることを示唆している。

## 2. 研究の目的

妊娠や閉経に伴う骨粗鬆症の予防・治療法の確立を目指し、In vivo で発光を指標に非侵襲的に骨形成をモニターできるマウスシステムを利用して、妊娠・授乳期における骨代謝の変化を詳細に解析するとともに、母体の骨組織制御のメカニズムやその意義を明らかにする。オステオカルシンを手掛かりとして、骨の妊娠における機能を明らかにすることで、骨組織の生体機能に関して新たな知見を得られると考える。

## 3. 研究の方法

### (1)動物

ヒトオステオカルシン(OC)プロモーターの下流でルシフェラーゼ(Luc)を発現する OC-Luc マウスを、HOS:HR-1 と交配させ、ヘアレス状態にしたマウスを実験に用いた。ジェノタイピングは、マウスの尾からゲノム DNA を単離し、トランスジーン特異的なプライマーを用いて PCR することにより行った。動物実験は、鳥取大学動物実験規則に従って行った。

### (2)In vivo イメージング

In vivo イメージングは、マウスをイソフルランで麻酔し、4 %ルシフェリン/PBS を 4 ul/g body weight になるように皮下投与した後、IVIS Lumina imaging system (Xenogen) により画像を取得した。発光強度の解析には In Vivo Imaging System ver.2.6 software を用いた。

### (3)妊娠マウス、偽妊娠マウスの作製

OC-Luc 雌マウスの in vivo イメージングを行った(-0.5 日)後、雄マウス(BDF1)もしくは精管結紮した雄マウス(ICR)と交配させ、膈栓が形成されたマウスを妊娠 0.5 日および偽妊娠 0.5 日とした。その後は 3 日おきに in vivo イメージングを行った。プラグがつかないマウスをコントロールマウスとした。

### (4)ELISA

マウス血中の OC、Estradiol、Progesterone の濃度は、Mouse Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (TaKaRa)、Mouse Glu-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (TaKaRa)、Estradiol EIA Kit (funakoshi)、Progesterone EIA Kit (funakoshi)を用い、ARVO™MX/Light 1420 Multilabel/Luminescence Counter (PerkinElmer)で吸光度を測定することで測定した。骨吸収活性に関しては、Mouse TRAP™ Assay

(immunodiagnostic systems)を用いた。

#### (5)リアルタイム PCR

RNA を単離した後、DNase 処理、逆転写反応を行い、cDNA を合成した。リアルタイム PCR は、ABI 7900HT (Applied Biosystems) により行い、各臓器での OC, Luc 遺伝子の発現量を算出した。

#### (6)卵巣切除

実験に用いた。

#### (7)Estradiol および Progesteron の投与

マウスに麻酔投与後、卵巣と卵管の間を外科用絹糸で結紮し卵巣を取り除いた。2 週間後に、プロギノン・デポー筋注 10mg (Fuji Pharma)を Corn oil に溶解したものを、週 1 回、20  $\mu$ l/Kg body weight を尾部皮下投与した。Progesterone (nacal tesque)は Corn oil に溶解し、毎日 1 回 1 mg/100  $\mu$ l/mouse を尾部皮下投与した。

### 4. 研究成果

#### (1)妊娠・授乳期の OC-Luc 発光変化

まずは母体における発光変化について詳細に解析した。その結果、発光強度は交配日と比べて妊娠前期に 1.5 倍、妊娠後期に 2 倍近くまで増加した。その後出産によりいったん減少したが、授乳開始から離乳までに約 3 倍にまで増加し、最高値を示した。その後発光強度は、仔マウスの離乳により急激に減少し、離乳後 1 ヶ月で妊娠前の値に戻った。この結果は、OC-Luc マウスを利用して母体における骨形成活性の変化を追跡できることを示唆している。

#### (2)妊娠期の内在性オステオカルシンの解析

内在性オステオカルシン (OC) の妊娠期間中における発現を解析するために、頭蓋骨の RT-PCR を行ったところ、オステオカルシンは、妊娠期に発現が減少していた。

近年、オステオカルシンは成熟骨芽細胞で発現し骨の構成成分として働くだけでなく、その非カルボキシ体が血中を巡り、隣細胞や筋肉、脂肪細胞に作用することでエネルギー代謝を調節しているなど、ホルモンとしての役割も果たすことが明らかとなってきた。そこで、ビタミン K 依存的に 3 つのグルタミン酸残基がカルボキシル化され、骨基質と高い結合性を持つ GlaOC と、非カルボキシル化のまま残り、血中に分泌される GluOC の 2 つのタイプの血中濃度を解析したところ、妊娠期にそれらの濃度はほとんど変化がなかった。また、骨形成活性を反映することが知られる GluOC/(GlaOC+GluOC) に関しても、妊娠中に大きな変化は見られなかった。

これらの結果から、妊娠期において、ヒトオステオカルシンプロモーターは、内在性マウスオステオカルシンプロモーターと異なる制御を受けることが示唆された。

#### (3)妊娠期の骨吸収活性の解析

妊娠期には骨代謝が亢進することで血中にカルシウムが放出されることが知られている。このことから、骨吸収の際に分泌される骨吸収マーカーとして知られる TRAP (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase) の血中濃度を測定した。その結果、TRAP は妊娠 0 日目と比較し、妊娠前期および後期には約 2 倍にまで上昇していた。オステオカルシンの結果と考え合わせると、妊娠期に骨形成活性が減少している状態にもかかわらず、骨吸収が亢進していることが示唆された。このことは、妊娠骨粗鬆症の主な原因の 1 つになると予想される。

#### (4)妊娠期の女性ホルモンの解析

妊娠期には様々なホルモンの血中濃度が変動することが知られる。そこで妊娠期に重要な役割を果たす、卵胞ホルモン (エストロゲン) と、黄体ホルモン (プロゲステロン) の血中濃度を測定したところ、妊娠前期および後期の発光が上昇する時期に、両方のホルモン量が約 1.5 倍に増加していた。これらのホルモンが OC-Luc マウスにおける妊娠中の発光変化に影響を及ぼすか検討するために、卵巣切除したマウスにそれぞれのホルモンを投与し発光変化を解析したが、発光に大きな変動は認められず、エストロゲンとプロゲステロンは OC-Luc による発光上昇に直接的な関係がないことが示唆された。

#### (5)マイクロアレイによる妊娠期の遺伝子発現変化の解析

妊娠 0 日目と 15 日目における遺伝子発現を、頭蓋骨の RNA を用いてマイクロアレイで比較した。その結果、細胞膜やシグナル伝達発現に関連する因子の発現に広く変化が見られ、妊娠により骨代謝に様々な変化が起きていることが示唆された。また、マウスオステオカルシンに関しては、リアルタイム RT-PCR の結果と同様に、妊娠期に減少していた。

#### (6)胎児および胎盤での発光解析

妊娠期での母体の発光変化と、胎児発生の関連性を調べるために、in vivo imaging 法を用い、胎児期における発光強度の変化を解析した。その結果、胎盤では胎生 12.5 日以降に弱い発光が見られ、胎児では胎生 15.5 日以降に頭部で強い発光が見られた。内在性マウスオステオカルシンの発現は胎盤では検出できなかったことから、胎盤においてもヒトオステオカルシンプロモーターは、内在性オステオカルシンと異なる発現制御を受けていることが示唆された。

初沢 清隆 (HATSUZAWA, Kiyotaka)  
鳥取大学・医学部・教授  
研究者番号：20256655

<引用文献>

Yasunaga, M., Oumi, N., Osaki, M., Kazuki, Y., Nakanishi, T., Oshimura, M., Sato, K. Establishment and characterization of a transgenic mouse model for in vivo imaging of Bmp4 expression in the pancreas. *PLoS One*. 6, 2011, e24956

Takahashi, Y., Tsuji, S., Kazuki, Y., Noguchi, M., Arifuku, I., Umebayashi, Y., Nakanishi, T., Oshimura, M., Sato, K. Development of evaluation system for bioactive substances using human artificial chromosome-mediated osteocalcin gene expression. *J. Biochem.* 148, 2010, 29-34

Nakanishi, T., Kokubun, K., Oda, H., Aoki, M., Soma, A., Taniguchi, M., Kazuki, Y., Oshimura, M., Sato, K. Bioluminescence imaging of bone formation using hairless osteocalcin-luciferase transgenic mice. *Bone* 51, 2012, 369-375

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

中西友子、発光イメージングを利用したマウスにおけるリアルタイム骨形成活性評価、2013年国際骨代謝学会・日本骨代謝学会 第2回合同国際会議(神戸)2013.5

田中佑佳、中西友子、堀直裕、初沢清隆、佐藤建三、In vivo imaging を用いた妊娠期における骨形成変化の解析、第36回日本分子生物学会年会(神戸)2013.12

〔その他〕

中西友子、Bioluminescence imaging of bone formation using hairless osteocalcin-luciferase transgenic mice、第8回 Bone Research Seminar (品川) 招待講演、2014.2

6. 研究組織

(1)研究代表者

中西 友子 (NAKANISHI, Tomoko)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：10344863

(2)研究分担者