

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09057

研究課題名(和文)骨密度を規定する候補遺伝子Mpp7の骨組織における役割の解明

研究課題名(英文)The clarification of the role of Mpp7 in bone tissue

研究代表者

近藤 直樹 (Kondo, Naoki)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：70543388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症は骨折のリスク因子であり、生活の質の低下に直結する疾患である。ヒトゲノムワイド関連解析によりmembrane palmitoylated protein 7(MPP7)遺伝子が骨密度に関与することが示された。その際、MPP7の発現低下が骨密度の低下と相関した。申請者らはMpp7遺伝子の欠損マウスを樹立し生体内におけるMPP7の機能を解析した。雌のMPP7欠損マウスは野生型マウスよりも有意に低い体重を示した。雄のマウスでは体重差は認めなかった。体重を除いては、Mpp7-KOマウスに特異的な異常は同定できなかった。MPP7蛋白は複数のヒト骨肉腫由来の細胞株に発現していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MPP7が生体内において体重制御に関与すること、樹立したMPP7欠損マウスがMPP7による骨密度の制御機構を解析する上で、有用なモデル動物になることを示した。HTLV-1は成人T細胞白血病およびHTLV-1関連脊髄症の原因ウイルスである。これらの病気の発症には、HTLV-1のTax蛋白が深く関与する。MPP7およびDLG1をTaxの結合因子として同定した。HTLV-1の病原性におけるMPP7の役割は不明であり、Mpp7-flloxマウスおよびMpp7-KOマウスはHTLV-1の病原性を解析する有用なツールになる。

研究成果の概要(英文)：Osteoporosis is main risk factor of fragility fractures and results in lower quality of life. Human genome wide associated analysis clarified that membrane palmitoylated protein 7(MPP7) gene is significantly associated with bone mineral density (BMD). The lower expression level in MPP7, the lower in BMD. We established MPP7 general knockout mice and analyzed the function of MPP7 in vivo. Statistically significant body weight loss was detected in female MPP7 knockout mice than in female wild type mice, but not in male MPP7 knock out mice. Except body weight, no difference such as bone histology, growth plate thickness was detected. In addition, MPP7 protein was expressed in several human osteosarcoma cell lines.

研究分野：骨代謝学

キーワード：Mpp7遺伝子 体重 ノックアウトマウス 骨密度

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は骨折のリスク因子であり、生活の質の低下に直結する疾患である。ヒトゲノムワイド関連解析により、membrane palmitoylated protein 7(MPP7)遺伝子が骨密度に関与することが示された。MPP7の発現低下が骨密度の低下と相関した。MPP7が生体内でどのような影響を及ぼすかは不明であった。申請者らは *Mpp7* 遺伝子の欠損マウスを樹立し、生体内における MPP7 の機能を解析した。

### 2. 研究の目的

申請者らは *Mpp7* 遺伝子の欠損マウスを樹立し、生体内における MPP7 の機能を解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

*Mpp7*-KO マウスは理化学研究所(BDR LARGE)との共同研究として作製された ( Accession No. CDB0578K: <http://www2.clst.riken.jp/arg/mutant%20mice%20list.html> )。

マウスの MPP7 遺伝子のエクソン 3 領域を loxP 部位によって挟んだ DNA フラグメントをターゲティングベクター構築用プラスミドに導入し(図 1)。キメラマウス (*Mpp7*-floxed-Neo キメラ/+ ) を作製したあとに交配し、ヘテロ組換えマウス (*Mpp7*-floxed-Neo/+ ) を樹立した。FLP リコンビナーゼ (FLPe) を発現するトランスジェニックマウス と交配し、Neo カセットを除去したマウス (*Mpp7*-floxed/+ ) を樹立した。次に、*Mpp7*-floxed/+ マウスを、テレンセファリン(telencephalin: TLCN)-Cre マウスと交配した。*Mpp7* 遺伝子のエクソン 3 を全身でヘテロに欠損したマウス (*Mpp7*(-/+ ) ) が樹立された。これらのマウスを 5 回以上 C57/BL6 ( B6 ) マウスに戻し交配した。B6 遺伝子背景を持つ *Mpp7* ヘテロノックアウトマウス (*Mpp7*(-/+ ) ) を交配し、全身性の *Mpp7*-KO マウスを樹立した ( 図 1 )

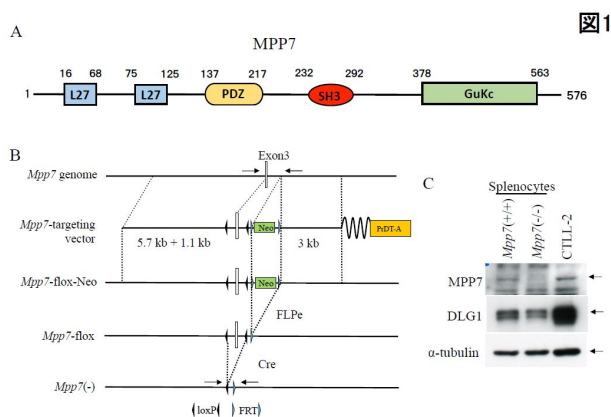


図1

MPP7 蛋白は DLG1 蛋白と結合することで、DLG1 蛋白の発現量を増加させる。*Mpp7*-KO 脾臓細胞では、DLG1 の発現低下が観察された。*Dlg1* 遺伝子の欠損マウスは、胎生致死であり、骨格の発達異常を発症する。MPP7 と DLG1 との関係について解析した。

次に、U2OS を用いて、MPP7 のノックダウン (MPP7-KD) 細胞を樹立した。U2OS 細胞にヒト MPP7-RNA に対する short-hairpin (shRNA) を発現するレンチウイルスを感染し、薬剤選択で MPP7-shRNA 発現細胞を選択した

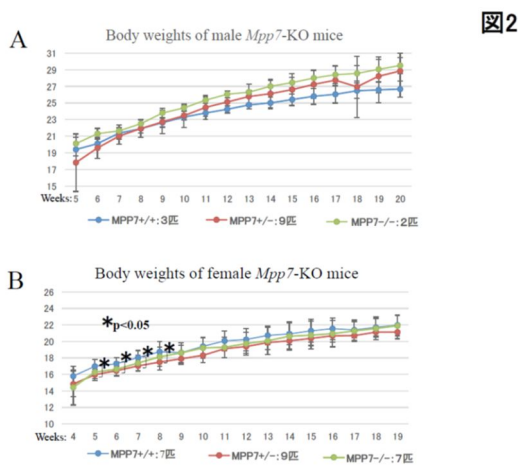
骨芽細胞分化誘導剤 (アスコルビン酸リン酸、リン酸二水素カリウム、デキサメサゾン) は骨芽細胞を分化させ石灰化を促進する薬剤である。野生型細胞と MPP7-KD 細胞を骨芽細胞分化誘導剤の存在下で 4 週間培養し、骨芽細胞の分化能を比較検討した

#### 4. 研究成果

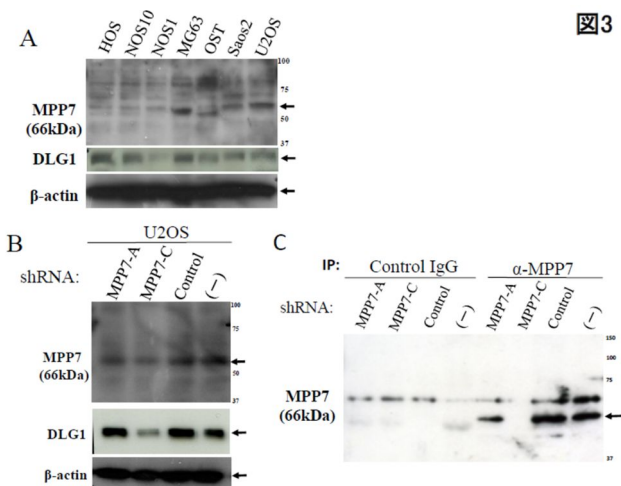
*Mpp7*-KO マウスは期待される頻度で正常に出生し、MPP7 はマウスの発生には関与しないことが示された。しかし 5-8 週齢において、雌の *Mpp7* ヘテロノックアウトマウスの体重が野生型マウスよりも有意に低いことが示された（図 2）。低体重は、9 週以降においても観察されたが、この差は有意にはならなかった。

体重差は、*Mpp7*-KO マウスと野生型マウスとの間においても観察されたが、有意差は検出されなかった。一方、雄の *Mpp7*-KO マウスは野生型マウスよりも体重が重いことが示唆されたが、有意差は認めなかった。体重以外には、長管骨や関節の組織像を含め *Mpp7*-KO マウスと野生型マウスとの間に違いは認めなかった。

7 つのヒト骨肉腫由来の細胞株における MPP7 蛋白の発現をウエスタンブロット法で検討した（図 3）。MG63, Saos2 および U2OS 細胞で、MPP7 蛋白（約 66kD）のバンドが検出された。

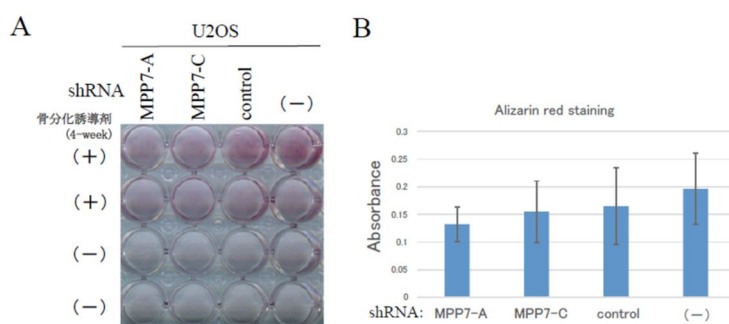


7 つのヒト骨肉腫由来の細胞株における MPP7 蛋白の発現をウエスタンブロット法で検討した（図 3）。MG63, Saos2 および U2OS 細胞で、MPP7 蛋白（約 66kD）のバンドが検出された。



骨芽細胞分化誘導剤（アスコルビン酸リン酸、リン酸二水素カリウム、デキサメサゾン）は骨芽細胞を分化させ石灰化を促進する薬剤である。野生型細胞と MPP7-KD 細胞を骨芽細胞分化誘導剤の存在下で 4 週間培養し、骨芽細胞の分化能を比較検討した（図 4）。*Mpp7*-KO 細胞はコントロール細胞と同程度の骨分化の誘導活性（石灰化能）を示したことから、MPP7 は U2OS 細胞において骨芽細胞、石灰化分化に関与しないことを示唆した。

図4



## 考察

ヒトゲノムワイド関連解析により、MPP7 が骨密度の制御に関与することが示された。MPP7 がいかなる分子機構を介して骨密度を制御するのかは不明である。本研究において筆者らは、*Mpp7*-KO マウスおよび *Mpp7*-flo<sub>x</sub> マウスを樹立し、その表現型の一部を明らかにした。本研究は、*Mpp7*-KO マウスが、MPP7 が関与する骨粗鬆症の発症機構を解析する上で、有用なモデル動物になりうることを示した。

雌の MPP7 ヘテロノックアウトマウスが野生型マウスよりも体重が軽いことが示された(図 2)。また、この低多重は、*Mpp7*-KO マウスよりも *Mpp7* ヘテロノックアウトマウスでより顕著に観察された。一方で、雌のマウスとは異なり、雄の *Mpp7*-KO マウスでは、野生型マウスよりも体重が重いことが示唆された。この違いには、有意差は認められなかった。これらの結果は、MPP7 が体重に関して 2 つの相反する作用を持ち、これらが性(雄と雌)によって異なる活性を示すことを示唆している。体重と骨密度にも性差が存在する。性ホルモンであるエストロゲンとテストステロンは体重と骨密度の制御にすることが知られている[1-4]。従って、MPP7 が骨密度と体重の両方を類似のメカニズムで制御している可能性がある。今後、MPP7 がいかにして体重を制御するのかを解明することが重要である。また、これらの解析が MPP7 による骨量の制御機構の解明へと繋がる可能性がある。

複数の骨肉腫細胞株が MPP7 蛋白を発現していることが示唆された(図 3)。また、U2OS 細胞において、MPP7 蛋白の発現が免疫沈降実験で確認された。U2OS 細胞において、MPP7 をノックダウンすると、DLG1 蛋白の発現が低下した。Stucke らは、MPP7 が DLG1 蛋白の発現を上皮系細胞株において制御すること、MPP7 と DLG1 がともに上皮系細胞株のタイトジャンクションの形成に関与することを明らかにした。従って、体重あるいは骨密度に対する MPP7 の機能の一部は DLG1 を介する可能性がある。MPP7 は骨肉腫細胞株 U2OS の分化誘導活性には影響を与えなかった。U2OS は骨芽細胞に分類される細胞株であるので、今後、破骨細胞などでの解析が重要である。

HTLV-1 は成人 T 細胞白血病および HTLV-1 関連脊髄症の原因ウイルスである。HTLV-1 は関節症(HTLV-1-associated arthropathy)の発症にも関与することが示唆されている。これらの病気の発症には、HTLV-1 の Tax 蛋白が深く関与する。申請者らは、MPP7 および DLG1 を Tax の結合因子として同定した。HTLV-1 の病原性における MPP7 の役割は不明であり、*Mpp7*-flo<sub>x</sub> マウスおよび *Mpp7*-KO マウスは HTLV-1 の病原性を解析する有用なツールになる可能性を持つ。

## 結論

本研究において申請者らは、*Mpp7* のノックアウトマウスを樹立し、MPP7 がマウスの体重

制御に関与することを示した。この *Mpp7*-KO マウスは、MPP7 による骨粗鬆症および体重制御の分子機構を解析するうえで有用なツールになることが期待される。

## 図の説明

### 図 1 MPP7 蛋白のドメイン構造とマウス *Mpp7* 遺伝子のターゲティングベクターの構造

- A. MPP7 は 4 つのドメインを持つ。これらは、L27, PDZ, SH3 および GuKc ドメインである。L27, PDZ, SH3 および GuKc ドメインは蛋白質と蛋白質との結合に関与することが示唆されている。
- B. Exon3 は *Mpp7* 遺伝子のエクソン 3 の位置を示す。Neo はネオマイシン薬剤耐性遺伝子発現カセットを示す。PrDT-A は、ジフテリアトキシンの A サブユニット (DT-A) の発現カセットを示す。LoxP と FRT は、Cre リコンビナーゼおよび FLP リコンビナーゼによる遺伝子組換えの標的配列を示す。矢印は、*Mpp7* 遺伝子の組換えを検出する際に用いた PCR のプライマーの位置を示す。
- C. *Mpp7*-KO マウスから脾臓細胞を調製し、MPP7、DLG1 および  $\alpha$ -tubulin 蛋白の発現をウエスタンブロット法により検出した。

### 図 2 *Mpp7*-KO マウスの週齢毎の体重曲線

- A. 雄マウスの体重の推移、野生型マウス(N=3)、*Mpp7* ヘテロノックアウトマウス(N=9)、*Mpp7*-KO マウス(N=2)。
- B. 雌マウスの体重の推移、野生型マウス(N=7)、*Mpp7* ヘテロノックアウトマウス(N=9)、*Mpp7*-KO マウス(N=7)。

### 図 3 MPP7 蛋白の発現

- A. 骨肉腫細胞株における MPP7 蛋白の発現。  
7 つの骨肉腫細胞株から細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロット法により、MPP7 蛋白の発現を解析した。
- B. MPP7-KD 細胞における MPP7 蛋白の発現。  
MPP7-KD-U2OS 細胞株から細胞抽出液を調整し、ウエスタンブロット法により、MPP7 蛋白の発現を解析した。
- C. MPP7-KD 細胞における MPP7 蛋白の発現  
各種 U2OS 細胞株から細胞抽出液を調整し、抗 MPP7 抗体により免疫沈降し、ウエスタンブロット法により、MPP7 蛋白の発現を解析した。

### 図 4 MPP7-KD 細胞の分化能の解析

- A. 野生型および MPP7-KD 細胞を骨分化誘導剤で処理し、4 週間後にアリザリンレッド染色により石灰化能を定量した。
- B. 吸光計による骨分化誘導能 (アリザリン染色) の定量

## 引用文献

1. Rubinow KB: Estrogens and Body Weight Regulation in Men. *Adv Exp Med Biol* 1043: 285-313. 2017.
2. Cauley JA: Estrogen and bone health in men and women. *Steroids* 99(Pt A): 11-5. 2015.
3. Saito K, Cao X, He Y and Xu Y: Progress in the molecular understanding of central regulation of body weight by estrogens. *Obesity (Silver Spring)* 23(5): 919-26. 2015.
4. Mosekilde L, Vestergaard P and Rejnmark L: The pathogenesis, treatment and prevention of osteoporosis in men. *Drugs* 73(1): 15-29. 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 木島靖文	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 ノックアウトマウスを用いた骨粗鬆症関連遺伝子MPP7の生体内機能の解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 新潟医学会誌	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	藤井 雅寛  (Fujii Masahiro)	新潟大学医学部・ウイルス学教室・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関