

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462304

研究課題名(和文) 著明な骨量減少をきたすNedd4遺伝子欠損マウスの機能解析

研究課題名(英文) Analyses of Nedd4 deficient mice showing significant bone loss

研究代表者

関本 朝久 (Sekimoto, Tomohisa)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：60305000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は骨粗鬆症などのロコモティブシンドロームの病因病態解明のために、可変型遺伝子トラップ法により樹立したNedd4遺伝子欠損トラップマウスを用いて、Nedd4の骨代謝における機能を解析した。

Nedd4欠損ホモマウスでは、 $\mu$ CT解析、骨形態計測、骨力学試験にて有意に骨量、骨強度の低下を認めた。骨組織像では1次海綿骨量の減少を認め、骨芽細胞は細胞質が少なく扁平な細胞形態を示し、ALP活性が低かった。遺伝子発現解析では骨芽細胞関連の発現が低下傾向にあった。培養骨芽細胞では、明らかに石灰化能が低下していた。したがって、Nedd4遺伝子は骨芽細胞機能制御において重要な機能を担っている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the bone phenotype of Nedd4 gene trap line produced by the exchangeable gene trap method. Nedd4 has not been previously reported enough on bone metabolism in vivo. We underwent micro-CT imaging, bone morphometry analysis (BMA), bone strength analysis (BSA), various staining of bone tissue specimens, microarray analysis, osteoblast culture and realtime PCR. Nedd4 trap mouse analysis confirmed loss of trabeculae on micro-CT images, significant decrease in bone volume for almost all parameters in BMD analysis, cortical bone analysis, and trabecular bone analysis in BMA, and also indicated significant bone fragility in BSA. Real-time PCR showed that expression of the osteoblast differentiation markers Col1a1 and ALP significantly decreased compared with WT. In microarray analysis, Col1a1 and Runx2 decreased compared with WT. In osteoblast culture, Col1a1, Runx2, OCN and ALP also decreased. From these results, it was suggested that Nedd4 is involved in the function of osteoblasts.

研究分野：整形外科学

キーワード：Nedd4遺伝子 骨代謝機能 骨芽細胞 可変型遺伝子トラップ法 ロコモティブシンドローム モデルマウス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、日本整形外科学会ではロコモティブシンドローム(運動器症候群:ロコモ)という新しい疾患概念が提唱され一般社会にも浸透しつつある。これは変形性関節症や骨粗鬆症などの「運動器の障害による移動機能の低下した状態」であり、本邦では4700万人以上の罹患が推計されている(Yoshimura, 2009)。その中で骨粗鬆症の患者は1200万人を超え、超高齢社会が進むにつれてその数は増加の一途をたどると予想される。骨粗鬆症などの疾患の病因には多数の因子が複合的に関与していることが推察されるが、その因子の一つと考えられている遺伝子については膨大な研究が行われているにもかかわらず、素因遺伝子として確立されたものは未だ見いだされていない。骨粗鬆症の病期が進行した場合は、骨折や痛みなどにより運動器全般の機能低下から寝たきり状態を余儀なくされ、患者本人およびその家族のみならず、医療経済にも多大な影響を及ぼしている。したがって、健康寿命の延伸の為に、ロコモの病因・病態解明は急務となっている。

ヒトゲノムプロジェクトの進展で、ヒトゲノムの構造解析はほぼ完了したが、ゲノムの塩基配列のみでは遺伝子機能に関する十分な情報は得られない。ポストゲノム時代になり、個体レベルでの遺伝子機能解析に適した遺伝子改変マウスはますますその重要性を増しており、ミュタジェネシスは新規遺伝子の発見、および既知遺伝子のそれまで知られていなかった機能の解明において非常に有力な手段である。

マウス ES 細胞を用いた効率の良い系統的な挿入変異体の形成とその遺伝子同定のための手法である遺伝子トラップ法は、プロモーターを持たないレポーター遺伝子を ES 細胞に導入し、それがゲノム上の遺伝子内に入るとレポーター遺伝子が発現することを指標に新規遺伝子を単離同定する方法である。

そのトラップクローンを用いてキメラマウスを作製することで個体レベルでの機能解析が同時に効率的に行える利点がある。

現在我々は骨粗鬆症などのロコモの病因・病態解明のために、可変型遺伝子トラップ法(Araki K, 1999, Taniwaki, 2005, Araki M, 2014)によって樹立されたトラップクローンを用いて、骨軟骨代謝に関与する新規遺伝子群の効率的なスクリーニングによる骨軟骨異常モデルマウスライブラリー構築に取り組んでいる。現在それぞれのラインの詳細な解析を遂行している(Kurogi, 2017)。

## 2. 研究の目的

今回、前述のライブラリーマウスの中で、*Nedd4* (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4) 遺伝子欠損マウスは、 $\mu$ CT撮影、骨形態計測、骨力学試験、骨軟骨組織解析などの骨軟骨スクリーニングにおいて著明な骨量減少、骨強度低下、骨軟骨組織異常など明らかな骨表現型異常を呈していた。したがって、*Nedd4*は骨代謝において重要な機能を担っている可能性が高いと推測されるが、これまでに *in vivo*での骨代謝における機能について報告例はない。そこで本研究では*Nedd4*遺伝子欠損トラップマウスを用いて、その骨代謝における機能を解析した。

## 3. 研究の方法

本研究では*Nedd4*トラップクローンから*Nedd4*遺伝子欠損マウスを作製し、詳細な骨形態計測、骨力学試験、骨軟骨代謝関連遺伝子発現解析、病理組織解析、骨芽細胞培養などを実施し、*Nedd4*の骨代謝における機能解析を施行した。

### ・成長曲線/血液検査:

生後定期的に体重測定を行い、トラップした遺伝子の成長に与える影響を評価する。また血液検査にてCa・IP・ALPなど骨代謝関連因子の定量を行った。

### ・3D-CT(マイクロフォーカスX線CTシステム L090H, Comscan):

サンプル大腿骨を撮影し、奇形や成長障害の評価を行う。また BMD 値に変換した画像で、全体的な骨表現型を評価した。

・**骨形態計測 (3D-Bon, Ratoc):**

BMD 解析 9 項目、皮質骨解析 11 項目、海綿骨解析 18 項目の合計 38 項目について統計学的解析を行い評価した。

・**骨力学試験 (小型卓上試験機 EZ Test-S, SHIMADZU):**

サンプル大腿骨を試験台に設置し 3 点曲げ試験を行い、試験力や応力、エネルギーなどを最大点と破断点で評価した。

・**組織学的解析:**

HE 染色、X-gal 染色、ALP 染色、トルイジンブルー染色、骨軟骨関連の免疫染色などの各種染色を行い、骨軟骨組織の形態観察とともに病理組織解析も施行した。

・**骨軟骨代謝関連遺伝子の詳細な解析:**

野生型およびトラップマウスの骨軟骨組織から mRNA を抽出し、骨軟骨代謝に関連する遺伝子群 (*BMP2*, *Runx2*, *Collagen 1/2/10*, *ALP*, *TRAP*, *SOX5/6/9* など) の発現量をリアルタイム PCR にて定量した。

・**マイクロアレイ解析:**

*Nedd4* 遺伝子がどのように骨代謝に関与しているか調べるために、マイクロアレイ解析を施行した。野生型、ホモ接合体の大腿骨から total RNA を調整し、SurePrint G3 mouse GE microarray 8x60K (Agilent Technology) を用いて解析を行った。

・**骨芽細胞培養および機能解析:**

トラップマウスの P4-5 頭蓋骨から初代骨芽細胞培養を行い、この培養細胞を用いて細胞形態の観察、特殊染色を用いた骨形成能や骨吸収能の評価を行った。また骨代謝関連遺伝子群をリアルタイム PCR にて定量し、培養細胞の機能を解析した。

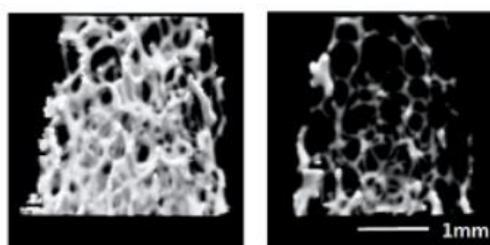
**4. 研究成果**

今回、我々の作成した EGTC データベース (<http://egtc.jp>) を利用して *Nedd4* 遺伝子

の骨/骨髄組織における発現を検索したところ、EST プロファイルが高スコア (*Nedd4* 835 : bone 557, bone marrow 278) を示した為、*Nedd4* 遺伝子トラップクローンからホモ・ヘテロ接合体マウスを作製した。

*Nedd4* 遺伝子の trap vector insertion point は 5' RACE 法、インバース PCR 法で解析を行い、第 1 イントロンであることを確認した。また、vector はゲノム上の 1 か所のみ挿入されていることを確認した。ヘテロマウスを用いた *Nedd4* 遺伝子の発現解析 (X-gal 染色) から、*Nedd4* は骨端線周囲海綿骨が染色され、骨組織における *Nedd4* の発現を確認した。遺伝子型を解析しえた個体の出生率は野生型 : 1、ヘテロ型 : 1.46、ホモ型 : 0.21 であった。*Nedd4* トラップマウスの体重は野生型の約 65% であり、その後の成長で追いつくことはなく成長障害を認めた。また *Nedd4* トラップマウスは短命であり、生存期間中央値は 26 日で、自然死亡例の最長生存期間は 33 日だった。

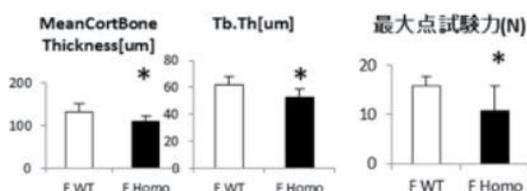
*Nedd4* 欠損ホモマウスは、 $\mu$ CT 解析にて骨量減少を示す骨表現型を呈していた (写真)。



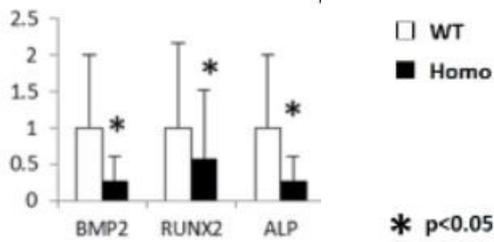
WT (14週齢)

Homo (14週齢)

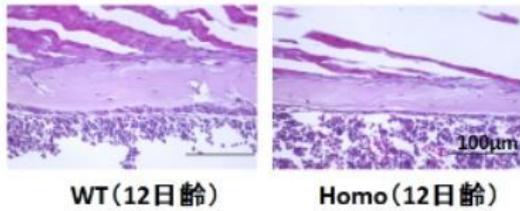
骨形態計測 (n=7) では皮質骨厚や海綿骨厚が有意に減少し、骨力学試験 (n=7) でも有意に骨強度の低下を認めた (下グラフ)。



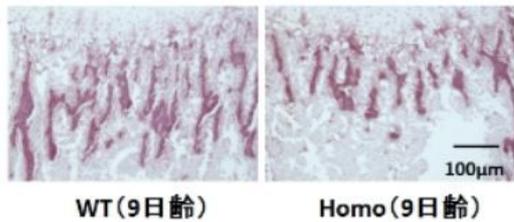
リアルタイム PCR (n=7) では *BMP2* や *Runx2*, *ALP* などの発現が有意に低値であった (下図)。



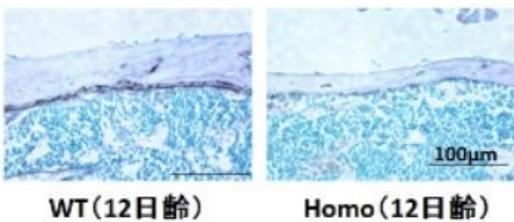
組織像では、ホモマウスにおける HE 染色で皮質骨が菲薄化しており、骨芽細胞はサイズが小さく扁平な細胞形態を呈し(下写真)、



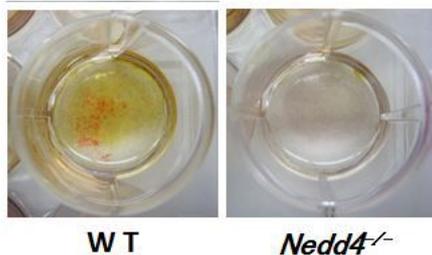
アリザリンレッド染色でも 1 次海綿骨の減少を認めた(下写真)。



ALP 染色にて ALP 活性が低かった(下写真)。



マイクロアレイ解析結果は、ホモで *Col1a1*、*Runx2* の発現が低下していた。骨芽細胞培養解析においては、4W 培養 mRNA では、*Runx2*、*Col1a1*、*ALP*、*OCN* の発現が低下傾向にあった。培養骨芽細胞のアリザリンレッド染色では、明らかに石灰化が低下していた(下写真)。



今回解析した *Nedd4* は E3 ユビキチンリガーゼのひとつであり、ユビキチンをミスフォー

ルディングタンパク質に付加する。ユビキチン化された異常または不要タンパク質はプロテアソームで分解されるため、*Nedd4* の機能として細胞内のタンパク質の品質管理という重要な役割があると考えられている。しかしながらこれまでに *Nedd4* の *in vivo* での骨代謝における機能についての報告例はない。ユビキチンリガーゼ *Nedd4* は多くの組織で発現し、これまで神経細胞、軟骨細胞の分化に関与していることが報告されており、運動器全般の細胞分化や機能制御に関わっている可能性がある。

またこれまでの報告では *Nedd4* 欠損ホモマウスは胚性致死であるが、我々が可変型遺伝子トラップ法で作製した *Nedd4* 欠損ホモマウスは体が小さく、短命ではあるものの生後一定期間生育可能である。したがってこのトラップマウスは、これまで不可能であったホモマウスの *in vivo* での機能解析を可能とする非常に有用で貴重なマウスラインである。さらに、今回の *Nedd4* 欠損マウスの解析により、*Nedd4* 欠損によるユビキチン化障害が骨芽細胞の分化に関与していると考えられた。したがって、*Nedd4* は骨芽細胞の機能制御において重要な働きを担っている可能性が高いと考えられた(平成 28 年 第 89 回日本整形外科学会学術総会 優秀ポスター賞受賞)。

近年、CRISPR/Cas9 システムの開発によりゲノム編集技術は大きく発展しているが、遺伝子トラップ技術の最大の利点は“未知遺伝子の発見・解析”である。我々は可変型遺伝子トラップ法を用いてノックアウトマウスライブラリーを作製しており、現在までに 1278 トラップ ES クローンを単離し、EGTC データベース (<http://egtc.jp>) に公開している。そして 490 マウスラインを樹立してきた。その中から EGTC を利用してこれまでに 52 骨軟骨関連候補遺伝子についてトラップクローンマウスを作製し骨軟骨スクリーニングを施行したところ、*Nedd4*、*Tmem161a*、*Lima1*、

*Pkig*, *Lbr*, *Itpr1* 遺伝子など 42 トラップマウス (80.8%) において骨軟骨表現型の異常を認めている。このように可変型遺伝子トラップ法により樹立されたトラップマウスを用いた骨軟骨代謝に関する新規遺伝子群のスクリーニングは非常に効率が良い (Kurogi, 2017)。引き続きこれらのトラップされた新規遺伝子群の単離同定、表現型スクリーニングを行う計画である。本スクリーニングで異常を認めたマウスラインは、骨軟骨代謝において重要な遺伝子をトラップしている可能性が非常に高いと考えられ、これら可変型遺伝子トラップマウスはバイオリソースとして様々な骨軟骨研究において有効活用が期待される。したがって、本プロジェクトによって骨軟骨疾患モデルマウスライブラリーの拡充が可能となり、今後はその中でより著明な骨軟骨代謝異常を呈するラインを詳細に解析する計画である。

今回の *Nedd4* 遺伝子の解析結果を持って、これまで構築してきた骨軟骨疾患モデルマウスライブラリーにおける他の個々のマウスラインの解析が可能となり、今後は口コモにおける病因・病態解明や創薬、新規治療法開発などへの多大な貢献が期待できる。

## 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)

### 〔雑誌論文〕(計 1 件) (査読 有)

Development of an efficient screening system to identify novel bone metabolism-related genes using the exchangeable gene trap mutagenesis mouse models. Syuji Kurogi, Tomohisa Sekimoto, Taro Funamoto, Tomomi Ohta, Shihoko Nakamura, Takuya Nagai, Mai Nakahara, Kumiko Yoshinobu, Kimi Araki, Masatake Araki, Etsuo Chosa. Scientific Reports 7: 40692, 2017.

### 〔学会発表〕(計 14 件)

#### 平成 28 年度

第 89 回日本整形外科学会学術総会: パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市): 2016 年 5 月 12-15 日:

可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨疾患に関する新規遺伝子群のライブラリー構築: 関本朝久、船元太郎、黒木修司、大田智美、中村志保子、永井琢哉、中原舞、吉信公美子、荒木喜美、荒木正健、帖佐悦男: 平成 28 年 第 89 回日本整形外科学会学術総会 優秀ポスター賞

第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会: 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市): 2016 年 10 月 13・14 日: 可変型遺伝子トラップ法で作製した *Tmem161a* 欠損マウスは明らかな骨量増加を呈する: 永井琢哉、関本朝久、船元太郎、黒木修司、大田智美、中村志保子、中原舞、吉信公美子、荒木喜美、荒木正健、帖佐悦男: 平成 28 年 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 優秀ポスター賞ノミネート

第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会: 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市): 2016 年 10 月 13・14 日: 可変型遺伝子トラップ法で作製した *Lima1/EPLIN* 欠損マウスは骨芽細胞間接着異常を認め骨量減少を呈する: 中村志保子、関本朝久、黒木修司、船元太郎、大田智美、永井琢哉、中原舞、吉信公美子、荒木喜美、荒木正健、帖佐悦男: 平成 28 年 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 優秀ポスター賞ノミネート

第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会: 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市): 2016 年 10 月 13・14 日: 可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨異常を来す新規遺伝子改変マウスライブラリー構築: 黒木修司、関本朝久、船元太郎、大田智美、中村志保子、永井琢哉、中原舞、吉信公美子、荒木喜美、荒木正健、帖佐悦男

#### 平成 27 年度

第 33 回日本骨代謝学会学術集会: 京王プラザホテル (東京都・新宿区): 2015 年 7 月 23-25 日: 可変型遺伝子トラップ法を用いた骨代謝異常をきたす新規遺伝子群のライブラリー構築: 中村志保子、関本朝久、船元太郎、黒木修司、大田智美、永井琢哉、帖佐悦男

産学・地域連携センター 第 22 回技術・研究発表交流会: 宮崎市民プラザ (宮崎県・宮崎市): 2015

年 9 月 30 日：可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨に異常をきたす新規遺伝子群の探索および機能解析：船元太郎、関本朝久、黒木修司、大田智美、中村志保子、永井琢哉、中原舞、吉信公美子、荒木喜美、荒木正健、帖佐悦男

第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会：富山市民プラザ(富山県・富山市)：2015 年 10 月 22・23 日：可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨異常を来す新規遺伝子群のライブラリー構築：永井琢哉、関本朝久、船元太郎、黒木修司、大田智美、中村志保子、中原舞、吉信公美子、荒木喜美、荒木正健、帖佐悦男

Australian New Zealand Bone & Mineral Society Annual Scientific Meeting 2015：Hotel Grand Chancellor Hobart (Tasmania, Australia)：1-4 November 2015：Construction of a novel gene library related to osteogenic disorder using exchangeable gene trap mutagenesis：Shihoko Nakamura, Tomohisa Sekimoto, Syuji Kurogi, Taro Funamoto, Tomomi Ota, Mai Nakahara, Kumiko Yoshinobu, Kimi Araki, Masatake Araki, Etsuo Chosa.：平成 27 年 第 33 回日本骨代謝学会 ANZBMS 2015 Travel Award 受賞

**都城地区整形外科医会学術講演会**：都城ロイヤルホテル(宮崎県・都城市)：2015 年 11 月 25 日：**「ロコモティブシンドローム - 病態解明への挑戦 - 」**関本朝久

## 平成 26 年度

第 87 回日本整形外科学会学術総会：神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)：2014 年 5 月 22-25 日：可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨疾患に関与する新規遺伝子群のスクリーニング：関本朝久、黒木修司、船元太郎、大田智美、中村志保子、濱田浩朗、山村研一、中原舞、荒木喜美、荒木正健、帖佐悦男

第 32 回日本骨代謝学会学術集会：大阪国際会議場(大阪府・大阪市)：2014 年 7 月 24-26 日：可変型遺伝子トラップ法を用いた骨代謝に関与する新規遺伝子群の効率的スクリーニング：黒木修

司、関本朝久、船元太郎、大田智美、中村志保子、帖佐悦男：平成 26 年 第 32 回日本骨代謝学会学術集会 優秀ポスター賞

第 32 回日本骨代謝学会学術集会：大阪国際会議場(大阪府・大阪市)：2014 年 7 月 24-26 日：可変型遺伝子トラップ法で作製した Nedd4 欠損マウスの骨表現型解析：船元太郎、関本朝久、黒木修司、大田智美、帖佐悦男

第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会：城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)：2014 年 10 月 9-10 日：可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨に異常をきたす新規遺伝子群の効率的スクリーニング：中村志保子、関本朝久、船元太郎、黒木修司、大田智美、中原舞、吉信公美子、荒木喜美、荒木正健、帖佐悦男：平成 26 年 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 優秀演題賞ノミネート

第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会：城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)：2014 年 10 月 9-10 日：Nedd4 欠損骨芽細胞の機能解析：船元太郎、関本朝久、黒木修司、大田智美、中村志保子、中原舞、荒木喜美、吉信公美子、荒木正健、帖佐悦男

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

関本 朝久 (Tomohisa Sekimoto)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：60305000

### (2) 研究分担者

帖佐 悦男 (Etsuo Chosa)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：00236837

黒木 修司 (Syuji Kurogi)

宮崎大学・医学部・医員

研究者番号：40418843

荒木 正健 (Masatake Araki)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・准教授

研究者番号：80271609

荒木 喜美 (Kimi Araki)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授

研究者番号：90211705