

令和 2 年 4 月 9 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11017

研究課題名(和文) 明らかな骨量増加を呈するTmem161a遺伝子欠損マウスの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of Tmem161a function in bone metabolism using the exchangeable gene trap mutagenesis

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は可変型遺伝子トラップ法により樹立したTmem161a遺伝子欠損トラップマウスを用いて、骨代謝における機能を解析した。Tmem161a欠損マウスでは、 $\mu$ CT、骨形態計測、骨力学試験にて有意に骨量、骨強度の増大を認めた。骨組織では1次海綿骨量の増加を認め、ALP活性が高かった。遺伝子発現解析では骨芽細胞関連の発現が増加傾向にあった。培養骨芽細胞では明らかに石灰化能が増加していた。MC3T3-e1 K0細胞株では、酸化ストレス、小胞体ストレス下での生存率が増加していた。したがってTmem161a遺伝子は細胞ストレスに関与し、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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は骨粗鬆症等のロコモティブシンドロームの病因病態解明の為に、可変型遺伝子トラップ法により樹立した変異マウス系統を用いて、骨軟骨代謝に関与する新規遺伝子群探索の効率的なスクリーニングを実施している。我々はそれらトラップクローンデータをEGTCデータベース(<http://egtc.jp>)に公開し、骨軟骨代謝に異常をきたす疾患モデルマウスライブラリーを構築している。そのライブラリーマウスの中で、Tmem161a遺伝子欠損マウスは、骨軟骨スクリーニングにおいて明らかな骨表現型異常を呈していた。これまでTmem161a遺伝子の骨代謝について報告例はない為、学術的社会的意義は非常に高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the bone phenotype of Transmembrane161a (Tmem161a) gene trap line produced by the exchangeable gene trap method. Tmem161a expression in femur was observed in articular cartilage, proliferative zone of growth plate and osteoblasts by X-gal staining. Compared with wild type, bone structure of trap mice femur was dense in  $\mu$ CT and there were significant differences in bone morphometric analysis. In biomechanical strength analysis, trap mice indicated significant strength. In HE staining, cortical bone thickness was thick and primary trabecular bone was also large. We performed realtime PCR and confirmed increased expression BMP4 and Runx2. Increased expression of Runx2 and Osterix and increased calcification were observed in primary osteoblast culture. Similar results were obtained in cell lines knocked out Tmem161a by CRISPR/Cas9 system. It seems that Tmem161a is involved in osteoblast function. There is a possibility that Tmem161a is a novel gene involved in bone metabolism.

研究分野：整形外科学

キーワード：Tmem161a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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 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、現代社会におい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、ミュー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、*Tmem161a* (Transmembrane protein 161a)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増加、骨強度増大、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、*Tmem161a*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*Tmem161a*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*Tmem161a*トラップクローンから*Tmem161a*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、各種細胞培養などを実施し、*Tmem161a*の骨代謝における機能解析を施行した。

### ・野生型マウスでの *Tmem161a* の発現解析：

骨軟骨組織中の *Tmem161a* 発現パターンを解析するため、野生型マウスでの骨軟骨組織標本作製し、免疫染色(Cell Signaling Technology 社製)で評価した。

・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上に設置し 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、トルイジンプルー染色、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。

・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。

・ *Tmem161a* ノックアウト細胞株作製・骨軟骨代謝関連遺伝子の発現解析：

MC3T3-e1 細胞を用いて CRISPR/Cas9 による *Tmem161a* ノックアウト細胞株を作製した。gRNA は Exon2 に設計。mRNA を抽出し、*Tmem161a* ならびに上記骨軟骨代謝に関連する遺伝子群の発現量をリアルタイム PCR にて定量した。

・ *Tmem161a* ノックアウト細胞株を用いた酸化細胞ストレス関連実験：

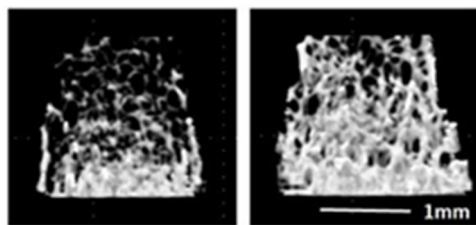
上記で作製した Knockout 細胞株を用いて、Dimethyl maleate および過酸化水素による酸化ストレス実験、Tunicamycin による小胞体ストレス実験を施行した。

#### 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 *Tmem161a* 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 (*Tmem161a*: bone 146, bone marrow 7, joint117) を示した為、*Tmem161a* 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。

*Tmem161a* 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 *Tmem161a* 遺伝子の発現解析 (X-gal 染色) から、*Tmem161a* は骨端線周囲海綿骨が染色され、骨組織における *Tmem161a* 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:2、ホモ型:1 であった。*Tmem161a* トラップマウスの体重は野生型と有意差は無かった。また、*Tmem161a* トラップマウスは短命ではなかった。

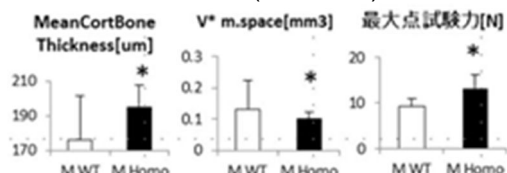
*Tmem161a* 欠損ホモマウスでは、 $\mu$ CT 解析、組織解析にて骨量増加を示す骨表現型を呈していた(下写真)。



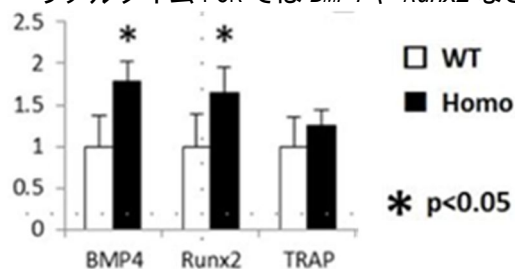
WT(8週齢)

Homo(8週齢)

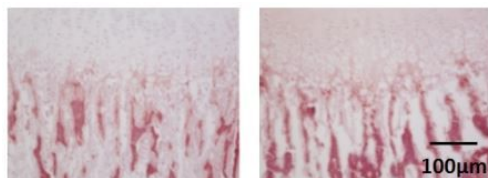
骨形態計測では皮質骨厚が有意に増加し、骨梁間隙の減少を認めた。骨力学試験でも有意に骨強度の増大を認めた(下グラフ)。



リアルタイム PCR では *BMP4* や *Runx2* などの発現が有意に高値であった(下グラフ)。



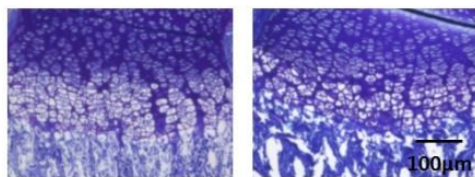
組織像ではホモマウスにおいてアリザリンレッド染色で 1 次海綿骨の増加を認め(下写真)、HE 染色でも 1 次海綿骨の増加を認めた。



WT(10日齢)

Homo(10日齢)

トルイジンブルー染色でも 1 次海綿骨の増加、肥大軟骨細胞異常を認めた (下写真)。



WT(10日齢)

Homo(10日齢)

骨芽細胞培養解析においては、4W 培養 mRNA では、*Runx2*, *Col1a1*, *ALP*, *OCN* の発現が増加傾向にあった。培養骨芽細胞のアリザリンレッド染色では、明らかに石灰化が増加していた(下写真)。



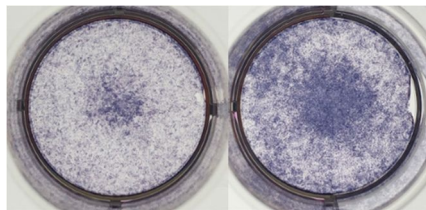
WT

Homo

MC3T3-e1 細胞を用いて CRISPR/Cas9 による *Tmem161a* ノックアウト細胞株を作製した。初代培

養と同様に K0 細胞株において、Real timePCR では、ALP、Runx2、Osterix などの発現が上昇していた。

このノックアウト細胞株を用いて、Dimethyl maleate による酸化ストレス実験を施行した。ストレス処理後 1 日目に PI による細胞死を確認したところ K0 細胞株で生存率が高値であった。過酸化水素を加えた酸化ストレス条件下でも K0 細胞株にて ALP 染色が濃染していた。さらに、K0 細胞において生存率が高値を示し、酸化ストレスに対する抗アポトーシスを有していた(下写真)。また、Tunicamycin による小胞体ストレス実験にても、K0 細胞株で生存率が高値だった。



WT

Homo

今回解析した *Tmem161a* はデータベース上、マウス 8 番染色体上に存在し、エクソンは 12 個で、分子量 54kDa、細胞膜に存在する 8 回膜貫通タンパクとされている。EST profile では骨や関節をはじめユビキタ스에 発現していた。*Tmem161a* は別名 AROS-29 と呼ばれ、2006 年に Montesano らが酸化ストレスやアポトーシスに関

係する遺伝子として報告したが、これまでに骨軟骨代謝に関する報告はない(Montesano, 2006)。

これまで *Tmem161a* 欠損ホモマウスの骨代謝に関する報告もなく、我々が可変型遺伝子トラップ法で作製した *Tmem161a* 欠損ホモマウスは成長は正常で、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、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。また、今回の *Tmem161a* 欠損マウスの解析により、*Tmem161a* 欠損による著明な骨量および骨強度の増加は、酸化ストレスに対する抗酸化作用などの細胞ストレス反応が関与していると考えられた。

したがって、今回の結果から、*Tmem161a* を阻害することで、酸化ストレスに対する抗酸化作用が期待され、*Tmem161a* は骨芽細胞機能の調節因子として重要な役割を担っている可能性が高いと考えられ、骨粗鬆症治療の可能性が考えられた。

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、*Tmem161a* 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られたマウスラインは、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パ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 *Tmem161a* 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、今後はロコモにおける病因・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

〔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 Syuji Kurogi, Tomohisa Sekimoto, Taro Funamoto, Tomomi Ohta, Shihoko Nakamura, Takuya Nagai, Mai Nakahara, Kumiko Yoshinobu, Kimi Araki, Masatake Araki, Etsuo Chosa	4. 巻 7
2. 論文標題 Development of an efficient screening system to identify novel bone metabolism-related genes using the exchangeable gene trap mutagenesis mouse models	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep40692.	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17件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 関本朝久
2. 発表標題 可変型遺伝子トラップ法を用いた骨に影響を及ぼす新規遺伝子群の網羅的機能解析
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会学術総会：神戸国際会議場
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永井琢哉 関本朝久
2. 発表標題 骨表現型スクリーニングで選別したTmem161a欠損トラップマウスは明らかな骨量増加を呈する
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会学術総会：神戸国際会議場
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永井琢哉 関本朝久
2. 発表標題 骨表現型スクリーニングで選別したTmem161a遺伝子トラップマウスは明らかな骨量増加を呈する
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会：長崎ブリックホール
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口洋一朗 関本朝久
2. 発表標題 可変型遺伝子トラップ法を用いた新規骨代謝関連遺伝子群の網羅的機能解析
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会：長崎ブリックホール
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagai T, Sekimoto T
2. 発表標題 Analyses of Tmem161a function in bone metabolism using the exchangeable gene trap mutagenesis show significant bone ingrowth
3. 学会等名 Australian New Zealand Bone & Mineral Society Annual Scientific Meeting 2018, New Zealand (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永井琢哉 関本朝久
2. 発表標題 骨表現型スクリーニングで選別したTransmembrane protein 161A遺伝子トラップマウスは明らかな骨量増加を呈する
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会：奈良春日野国際フォーラム～薔～
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口洋一朗 関本朝久
2. 発表標題 可変型遺伝子トラップ法を用いた新規骨代謝関連遺伝子群の網羅的機能解析
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会：奈良春日野国際フォーラム～薔～
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関本朝久
2. 発表標題 可変型遺伝子トラップ法を用いた効率的な新規骨代謝関連遺伝子の探索
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会：沖縄コンベンションセンター
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永井琢哉、関本朝久
2. 発表標題 骨表現型スクリーニングで選別したTmem161a欠損トラップマウスは明らかな骨量増加を呈する
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会：沖縄コンベンションセンター
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 船元太郎、関本朝久
2. 発表標題 可変型遺伝子トラップ法を用いたlamin B receptor 変異マウスの解析
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会：沖縄コンベンションセンター
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 関本朝久
2. 発表標題 可変型遺伝子トラップ法を用いた新規骨代謝関連遺伝子探索のための効率的なスクリーニングシステムの開発
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術総会：パシフィコ横浜
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 永井琢哉、関本朝久
2. 発表標題 骨表現型スクリーニングで選別したTmem161a欠損トラップマウスは酸化ストレスに関与し骨量増加を呈する
3. 学会等名 第92日本整形外科学会学術総会：パシフィコ横浜
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口洋一朗 関本朝久
2. 発表標題 可変型遺伝子トラップ法で作製したItpr1遺伝子欠損トラップマウスは著明な骨量減少を呈する
3. 学会等名 第92日本整形外科学会学術総会：パシフィコ横浜
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井琢哉、関本朝久
2. 発表標題 骨表現型スクリーニングで選別したTmem161a遺伝子トラップマウスは細胞ストレス応答に関与し骨量増加を呈する
3. 学会等名 第37日本骨代謝学会学術集会：神戸国際会議場
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口洋一朗 関本朝久
2. 発表標題 可変型遺伝子トラップ法で作製したItpr1遺伝子欠損マウスは著明な骨量減少を呈する
3. 学会等名 第37日本骨代謝学会学術集会：神戸国際会議場
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井琢哉、関本朝久
2. 発表標題 骨表型スクリーニングで選別したTmem161a欠損トラップマウスは細胞ストレス応答に関与し骨量増加を呈する
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会：パシフィコ横浜
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口洋一朗 関本朝久
2. 発表標題 可変型遺伝子トラップ法で作製したItpr1遺伝子欠損トラップマウスは著明な骨量減少を呈する
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会：パシフィコ横浜
4. 発表年 2019年

〔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 分担者	帖佐 悦男  (Chosa Etsuo)  (00236837)	宮崎大学・医学部・教授   (17601)	
研究 分担者	船元 太郎  (Funamoto Taro)  (20404452)	宮崎大学・医学部・講師   (17601)	
研究 分担者	荒木 正健  (Araki Masatake)  (80271609)	熊本大学・生命資源研究・支援センター・准教授   (17401)	

## 6. 研究組織 (つづき)

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	荒木 喜美  (Araki Kimi)  (90211705)	熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授    (17401)	