

表題

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

著者名

木島 靖文

所属機関名

新潟大学・大学院医歯学総合研究科・機能再建医学講座・整形外科学分野
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・ウイルス学分野

Key words

MPP7、骨粗鬆症、DLG1

Reprint requests to

木島 靖文

別刷請求先

〒951-8510 新潟県新潟市中央区旭町通り 1-757

新潟大学・大学院医歯学総合研究科・機能再建医学講座・整形外科学分野

要旨

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。MPP7 欠損マウスは野生型マウスと同頻度で生まれた。雌の MPP7 欠損マウスは野生型マウスよりも低い体重を示した。この体重の差は、雄のマウスでは観察されなかった。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。ヒト細胞株を用いて、MPP7 の蛋白の発現を調べたところ、MPP7 は複数の骨肉腫由来の細胞株に発現していることが示された。以上の結果は、MPP7 が生体内において体重の制御に関与すること、および樹立した 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。

はじめに

骨粗鬆症は、骨密度と骨質の低下により、骨折が起こりやすくなり、日常生活動作や生活の質が著しく低下する疾患である[1]。国内の骨粗鬆症患者は約 1300 万人である。近年の高齢化により、骨粗鬆症の予防と治療法の確立は、緊急に解決すべき医学的課題である。骨密度、骨質あるいは骨細胞の分化を制御する遺伝子としては Runx2、RANKL などが知られている [2, 3]。しかしながら、骨粗鬆症の分子機構については依然として不明な点が多い。

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[4]。その際、MPP7 の発現低下を伴う遺伝子アレルが骨密度の低下と相関し

た。MPP7は、L27、PDZ、SH3 および GuKc(guanylate kinase homologue)という4つのドメインを持ち、類似した7つの遺伝子 (MPP1-MPP7) から構成される関連遺伝子群を形成している。MPP7は多くの組織由来の細胞の細胞質に発現しており、上皮系細胞ではタイトジャンクションに局在し、細胞接着を制御していることが示唆されている[5]。しかしながら、MPP7がいかんにして骨密度を制御するのかについては明らかにされていない。

ヒトT細胞白血病ウイルス1型(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[6, 7]。HTLV-1は関節症(HTLV-1-associated arthropathy ; HAAP)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がコードするTax蛋白が深く関与する[7]。筆者らの研究室では、HTLV-1のTaxに結合する宿主因子としてMPP7を同定し、HTLV-1の病原性におけるMPP7の機能を解析してきた。本研究において、筆者は、*Mpp7* 遺伝子のノックアウトマウスを樹立し、MPP7の生体内機能を解析した。

材料と方法

Mpp7-KO マウスの樹立 (図1)

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>)。

Mpp7-KO マウスの作製と解析については、新潟大学遺伝子組換え実験安全委員会、動物実験倫理委員会および理研動物実験委員会(BDR LARGE)による承認の元で実施した。

Mpp7 遺伝子の条件付きノックアウトマウス (conditional knockout mice) を樹立するために、*Mpp7* ターゲティングベクターを以下のように作製した。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た(図1)。このターゲティングベクター構築用プラスミドは、遺伝子組換え細胞を選択するために、2つの構造を含む。1つ目は、ネオマイシン耐性遺伝子カセット (Neo) である。このNeo遺伝子の両端にFLPリコンビナーゼ (FLPe) の組換え標的配列(FRT)を導入した(図1)。2つめは、遺伝子組換えが起こっていない細胞を死滅させるための、ジフテリアトキシンAサブユニット (DT-A) の発現カセットである。この*Mpp7* ターゲティングベクターを胚性幹細胞株 (TT2) に遺伝子導入し、ネオマイシン (G-418) で選択した。選択した細胞の中から、相同組換え細胞をスクリーニングし、MPP7ターゲティング遺伝子が導入された、組換え細胞を樹立した(図1)。この組換え細胞を用いて、キメラマウス (*Mpp7*-flox-Neoキメラ+) を作製した。このキメラマウスを交配し、ヘテロ組換えマウス (*Mpp7*-flox-Neo/+) (図1) を樹立した。このマウスを、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[8]、Neoカセットを除去したマウス (*Mpp7*-flox/+) を樹立した。次に、*Mpp7*-flox/+マウスを、TLCN-Creマウスと交配した。TLCN-Creマウスは**テレンセファリン** (telencephalin; TLCN)遺伝子のプロモーターによって発現誘導されるCreリコンビナーゼ遺伝子を保有する[9]。TLCN-Creマウスでは、Creリコンビナーゼが着床後の胚で発現し、生殖細胞においてDNA断片を除去できる。TLCN-Creマウスとの交配により、*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*(-/+)) を樹立した。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。マウスは通常の12時間の明暗サイクルのもとで飼育され、食事は自由に摂取可能とした。

Mpp7 遺伝子のDNAレベルでの欠損は、下記のプライマーを用いてpolymerase chain reaction (PCR) 法により確認した。野生型では1377塩基対のPCR産物が検出され、*Mpp7*-KOおよび*Mpp7*ヘテロ

ノックアウトマウスでは、499 塩基対の産物が検出される。

Upper primer: TGTCGCCCTCTAGCATCTCATTCT

Lower primer: CTAGTGGCTGATGGTTCTCGTGGTG

細胞株の培養

U2OS, HOS, NOS10, NOS1, MG63, OST および Saos2 はヒトの骨肉腫由来の細胞株である。これらの細胞は、10%牛胎児血清 (FBS)、1% PSG (ペニシリン、ストレプトマイシン、L-グルタミンの混合液, Life technologies 社) および 1% MEM 非必須アミノ酸 (MEM Non-Essential Amino Acids, Life technologies 社) を含むダルベッコ変法イーグル培地で培養した。

プラスミド

レンチウイルス発現ベクターを用いて、MPP7 遺伝子の恒常的なノックダウン細胞を樹立した。レンチウイルスベクターの作製は Yoshida らの方法に準じた[10]。CS-CP-sh-hMPP7-A および CS-CP-sh-hMPP7-C は MPP7-RNA に対する short-hairpin RNA (shRNA) を発現するレンチウイルス遺伝子発現プラスミドである。CS-CP-sh-Control はこれらのコントロールである。shRNA 配列として下記のオリゴヌクレオチドを用いた。配列中の小文字部分は標的配列である。大文字部分は左からループ配列と終始シグナルである。

MPP7-A: ggataccagtggaggataaTTCAAGAGAttatcctccactggtatccTTTTT

MPP7-C: gtgatggtgtgaatacatTTCAAGAGAatgtattcaacaccatcacTTTTT

Control: gcaacaagatgaagagcacTTCAAGAGAggtctctcatcttgttgcTTTTT

pCAG-HIVgp と pCMV-VSV-G-RSV-Rev はレンチウイルス作製プラスミドである。

MPP7 ノックダウン細胞の樹立

U2OS 細胞を用いて、MPP7 のノックダウン細胞を樹立した。MPP7-RNA を標的とする、2 種類の shRNA (CS-CP-sh-hMPP7-A、CS-CP-sh-hMPP7-C) あるいはコントロール (CS-CP-sh-Control) を発現するレンチウイルス発現プラスミドとレンチウイルス作製プラスミド(pCAG-HIVgp, pCMV-VSV-G-RSV-Rev)を、293T 細胞に FuGENE 6 (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) を用いて遺伝子導入した。培養上清中のレンチウイルスを U2OS 細胞に感染させ、ピューロマイシン存在下で培養し、shRNA 発現細胞を選択した。選択された細胞における MPP7 蛋白の発現量はウエスタンブロット法および免疫沈降法で解析した。

ウエスタンブロット法

細胞にドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate; SDS) サンプルバッファー (2% SDS, 62.5mM Tris-HCl (pH6.8), 50mM DTT, 10% グリセロール) を加え、溶解し、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液 (10–15µg) を 95°C で 5 分間加熱し、遠心後、その上清中の蛋白質を、10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。分離したタンパク質を含むゲルを、セミドライ法により PVDF メンブレンに転写した。メンブレンを 1 次抗体と 4°C で一晩反応させ、続いて 2 次抗体と室温で 1 時間反応させた。蛋白質と抗体との結合を検出するために、ECL Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences) を用いた。1 次抗体として、抗 MPP7 抗体 1 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 MPP7 抗体 2 (Dr. Alan Hall より分与)[5]、抗 DLG1 抗体 (BD Transduction Laboratories)、抗 α -tubulin 抗体 (Calbiochem) および抗 β -actin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。2 次抗体として、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase) で標識された mouse anti-goat IgG (Santa

Cruz Biotechnology)、rat anti-mouse Ig kappa light chain (BD Biosciences) および goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad) を用いた。

免疫沈降実験

100mm ディッシュで培養したセミコンフルエントの細胞に、1ml の氷冷した Nonidet P-40 (NP-40) 細胞溶解液(1% NP-40, プロテアーゼ阻害剤(Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail , Thermo Fisher SCIENTIFIC)を加え、細胞を溶解した。この細胞溶解液を、15K-rpm、4 で 20 分間遠心し、不溶性画分を除き、上清の一部を「Input」として回収した。残りの上清に、10 μ l の Protein G ビーズ (Protein G Sepharose 4 Fast Flow beads の 50% 懸濁液 ; GE healthcare) を加え、4 で 1 時間緩やかに混合した。遠心によりビーズを沈殿させ、上清を回収した。回収した上清 (500 μ l) に、Protein G ビーズ (20 μ l) と抗 MPP7 抗体あるいは抗 goat-IgG 抗体を加え、再び 4 で 1 時間緩やかに混合した。Protein G ビーズを遠心で沈殿させ、沈殿したビーズを NP-40 細胞溶解液で 5 回洗浄した後、SDS サンプルバッファーに再懸濁した。Protein G ビーズに結合した蛋白質をウエスタンブロット法により解析した。

骨肉腫細胞株の分化誘導活性

U2OS 細胞を、24 ウエルプレートに、1 ウエル当たり 2×10^5 個の細胞濃度で播種し、48 時間培養した。これらの細胞を骨分化誘導剤 (50 μ g/ml アスコルビン酸リン酸、1.8mM リン酸二水素カリウム、100nM デキサメサゾン) の存在下で 4 週間培養した。この間、2、3 日毎に新鮮な分化誘導培地に交換した。分化誘導後、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、1%アリザリンレッド (カルシウム結合色素) で染色し、10% 塩化セチルピリジニウム(cetylpyridinium) (1ml) で溶出した。培養液の 570nm の吸光度を、吸光度計を用いて計測した。

結果

Mpp7-KO マウスの樹立

マウス *Mpp7* 遺伝子のエクソン 3 の前後に loxP 配列を組み込んだ、*Mpp7* 遺伝子の条件付きノックアウトマウス (*Mpp7*-flox マウス) を樹立した (図 1)。次に、生殖細胞系列で発現する Cre リコンビナーゼ (TLCN-Cre) を用いて[9]、*Mpp7* 遺伝子のエクソン 3 を全身で欠損させた (*Mpp7*-KO) マウスを樹立した。このマウスでは、エクソン 3 の欠損によりフレームシフトが起こり、MPP7 の N 末 12 アミノ酸に無関係な 2 アミノ酸が付加された蛋白が翻訳される。このマウスを C57BL/6 マウスと 5 回以上戻し交配し、遺伝背景を C57BL/6 に純化した。

マウスの脾臓から脾臓細胞を調製し、MPP7 蛋白の発現をウエスタンブロット法により調べた (図 1c)。野生型マウスの脾臓細胞では MPP7 蛋白の発現が検出されたが、*Mpp7*-KO マウスでは検出されなかった。CTLL-2 細胞は IL-2 依存性の T 細胞株である。野生型マウスの脾臓細胞の MPP7 蛋白量は CTLL-2 とほぼ同レベルであった。MPP7 蛋白は DLG1 蛋白に結合し、DLG1 蛋白の発現量を増加させる[5]。DLG1 は *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。本研究では MPP7 と DLG1 との関係についても解析した。

マウスは通常の 12 時間の明暗サイクル条件下で飼育され、食事は自由に摂取可能とした。*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。しかしながら、その後の 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軽いことが示された (図 2)。この低体重は、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。この体重差は、*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。一方で、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、この体重差には有意差は示されなかった。体重以外には、*Mpp7*-KO マウスと野生型マウスとの間に違いは観察されなかった。

骨肉腫細胞における MPP7 の発現と機能

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 細胞において、MPP7 蛋白と推定される、約 66kD のバンドが検出された。

次に、MPP7 蛋白の発現が検出された 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。MPP7-KD-C 細胞において、MPP7 蛋白発現量の有意な低下が観察された(図3) MPP7-KD-C 細胞では、DLG1 蛋白の発現量の低下も観察された。MPP7-KD-A 細胞においても MPP7 蛋白量は低下していたが、この発現低下は MPP7-KD-C 細胞よりも少なかった。MPP7 蛋白の発現をさらに確認するために、免疫沈降実験を実施した。MPP7-KD 細胞から細胞抽出液を調製し、MPP7 抗体 (Santa Cruz 社) を用いて MPP7 蛋白を免疫沈降した。免疫沈降産物に含まれる MPP7 蛋白を、同じ MPP7 抗体を用いてウエスタンブロット法により検出した。MPP7 抗体特異的に、MPP7 蛋白が2つのコントロール細胞(control, 親株(-))で検出された。一方で、MPP7-KD-C 細胞では MPP7 蛋白は検出されなかった。また、MPP7 蛋白は MPP7-KD-A 細胞においても検出されたが、その量はコントロール細胞よりも低かった(図3)。以上より、U2OS 細胞が MPP7 蛋白を発現していることが確認された。また、MPP7-KD-C 細胞において、MPP7 蛋白の発現が顕著に低下していることが示された。

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-KD 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。以上の結果は、MPP7 が、用いた骨芽細胞分化誘導剤による、U2OS 細胞の分化に関与しないことを示唆した。

考察

骨粗鬆症は、骨折リスクを高めることから、高齢化が加速する先進国において緊急の医療課題である。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。しかしながら、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*-flox 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[11] [12] [13] [14]。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 がいかん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[5]。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。筆者の研究グループは、MPP7 および DLG1 を Tax の結合因子として同定した[15]。HTLV-1 の病原性における MPP7 の役割は不明であり、*Mpp7-flox* 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

本研究において筆者らは、*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。

謝辞

稿を終えるに当たり、本研究において御指導を賜りました新潟大学医歯学総合研究科・ウイルス学分野の藤井雅寛教授、高橋雅彦准教授、葛城美德助教をはじめとしたウイルス学分野の皆様、新潟大学医歯学総合研究科・整形外科学分野の遠藤直人教授、近藤直樹講師、新潟大学医歯学総合研究科・硬組織形態学分野の大島勇人教授および金沢医科大学微生物学の樋口雅也教授に深謝申し上げます。本研究の一部は科学研究費(18K09057)の支援を受けて実施した。

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

- 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。
- 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。
- Mpp7-KO* マウスから脾臓細胞を調製し、MPP7、DLG1 および α -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

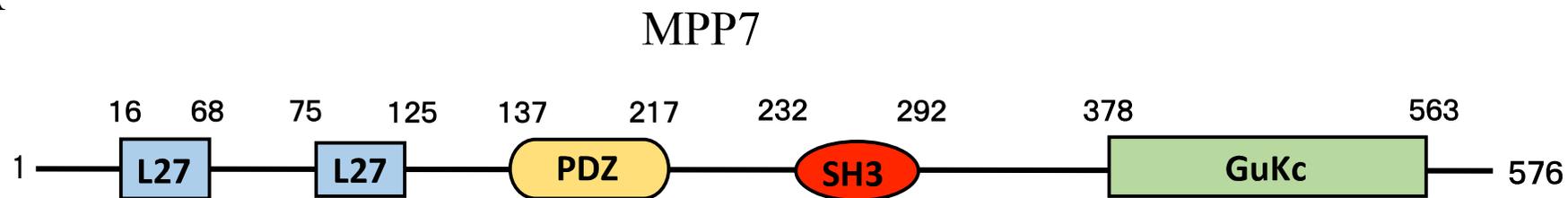
参考文献

1. Pouresmaeili F, Kamalidehghan B, Kamarehei M and Goh YM: A comprehensive overview on osteoporosis and its risk factors. *Ther Clin Risk Manag* 14: 2029-2049. 2018.
2. Frenkel B, Hong A, Baniwal SK, Coetzee GA, Ohlsson C, Khalid O and Gabet Y: Regulation of adult bone turnover by sex steroids. *J Cell Physiol* 224(2): 305-10. 2010.
3. An J, Yang H, Zhang Q, Liu C, Zhao J, Zhang L and Chen B: Natural products for treatment of osteoporosis: The effects and mechanisms on promoting osteoblast-mediated bone formation. *Life Sci* 147: 46-58. 2016.
4. Xiao SM, Kung AW, Gao Y, Lau KS, Ma A, Zhang ZL, Liu JM, Xia W, He JW, Zhao L, Nie M, Fu WZ, Zhang MJ, Sun J, Kwan JS, Tso GH, Dai ZJ, Cheung CL, Bow CH, Leung AY, Tan KC and Sham PC: Post-genome wide association studies and functional analyses identify association of MPP7 gene variants with site-specific bone mineral density. *Hum Mol Genet* 21(7): 1648-57. 2012.
5. Stucke VM, Timmerman E, Vandekerckhove J, Gevaert K and Hall A: The MAGUK protein MPP7 binds to the polarity protein hDlg1 and facilitates epithelial tight junction formation. *Mol Biol Cell* 18(5): 1744-55. 2007.
6. Bangham CRM and Matsuoka M: Human T-cell leukaemia virus type 1: parasitism and pathogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372(1732). 2017.
7. Higuchi M and Fujii M: Distinct functions of HTLV-1 Tax1 from HTLV-2 Tax2 contribute key roles to viral pathogenesis. *Retrovirology* 6: 117. 2009.
8. Kanki H, Suzuki H and Itohara S: High-efficiency CAG-FLPe deleter mice in C57BL/6J background.

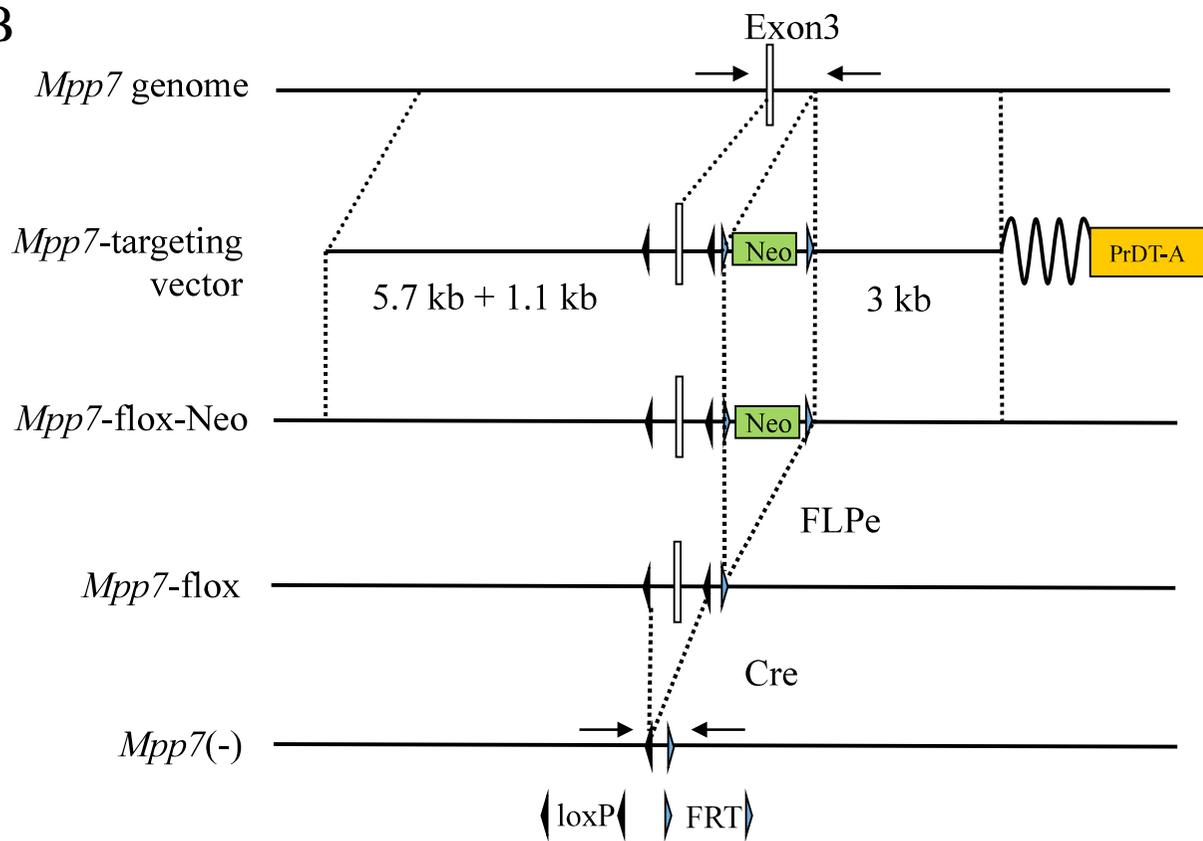
Exp Anim 55(2): 137-41. 2006.

9. Fuse T, Kanai Y, Kanai-Azuma M, Suzuki M, Nakamura K, Mori H, Hayashi Y and Mishina M: Conditional activation of RhoA suppresses the epithelial to mesenchymal transition at the primitive streak during mouse gastrulation. *Biochem Biophys Res Commun* 318(3): 665-72. 2004.
10. Yoshida S, Higuchi M, Shoji T, Yoshita M, Ishioka K, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Uchiyama M and Fujii M: Knockdown of synapse-associated protein Dlg1 reduces syncytium formation induced by human T-cell leukemia virus type 1. *Virus Genes* 37(1): 9-15. 2008.
11. Rubinow KB: Estrogens and Body Weight Regulation in Men. *Adv Exp Med Biol* 1043: 285-313. 2017.
12. Cauley JA: Estrogen and bone health in men and women. *Steroids* 99(Pt A): 11-5. 2015.
13. 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.
14. Mosekilde L, Vestergaard P and Rejnmark L: The pathogenesis, treatment and prevention of osteoporosis in men. *Drugs* 73(1): 15-29. 2013.
15. Hirata A, Higuchi M, Niinuma A, Ohashi M, Fukushi M, Oie M, Akiyama T, Tanaka Y, Gejyo F and Fujii M: PDZ domain-binding motif of human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein augments the transforming activity in a rat fibroblast cell line. *Virology* 318(1): 327-36. 2004.

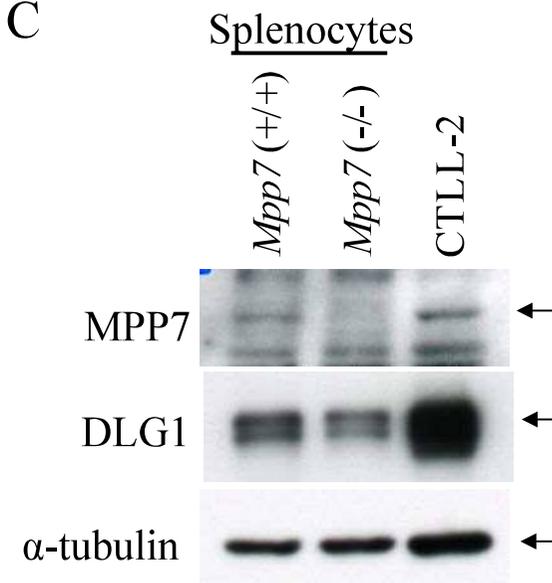
A



B

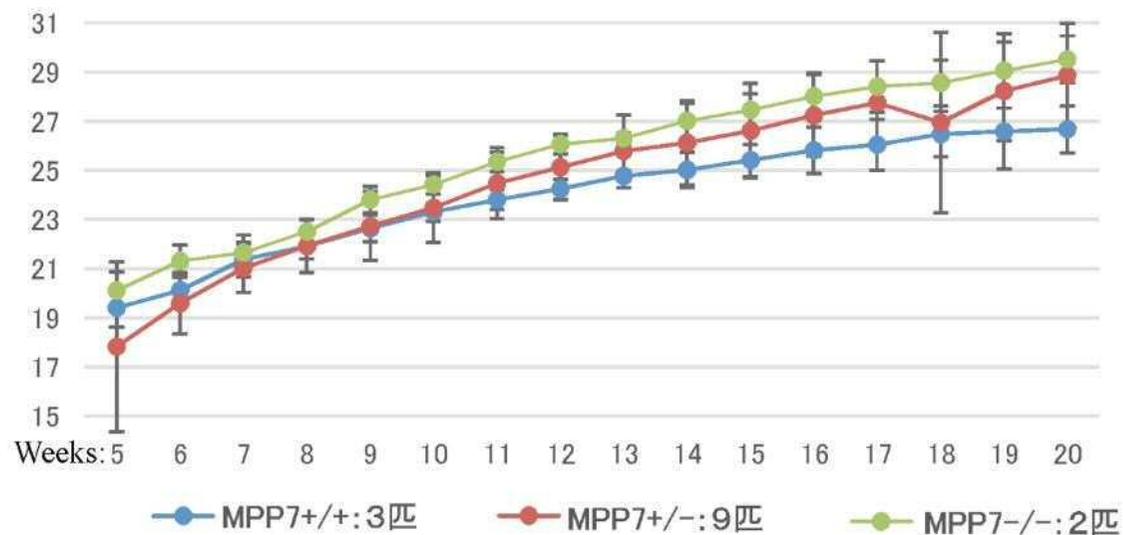


C



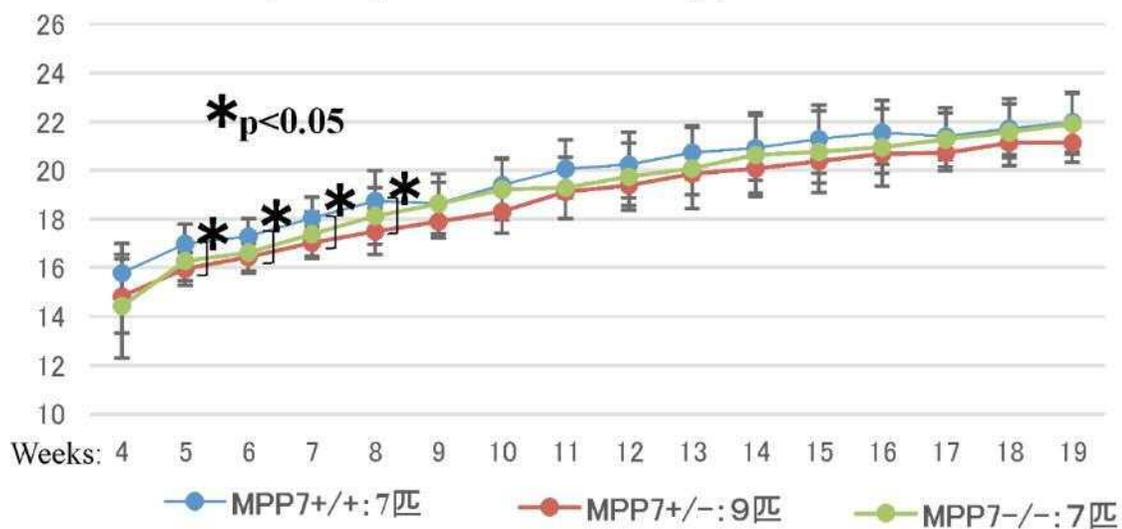
A

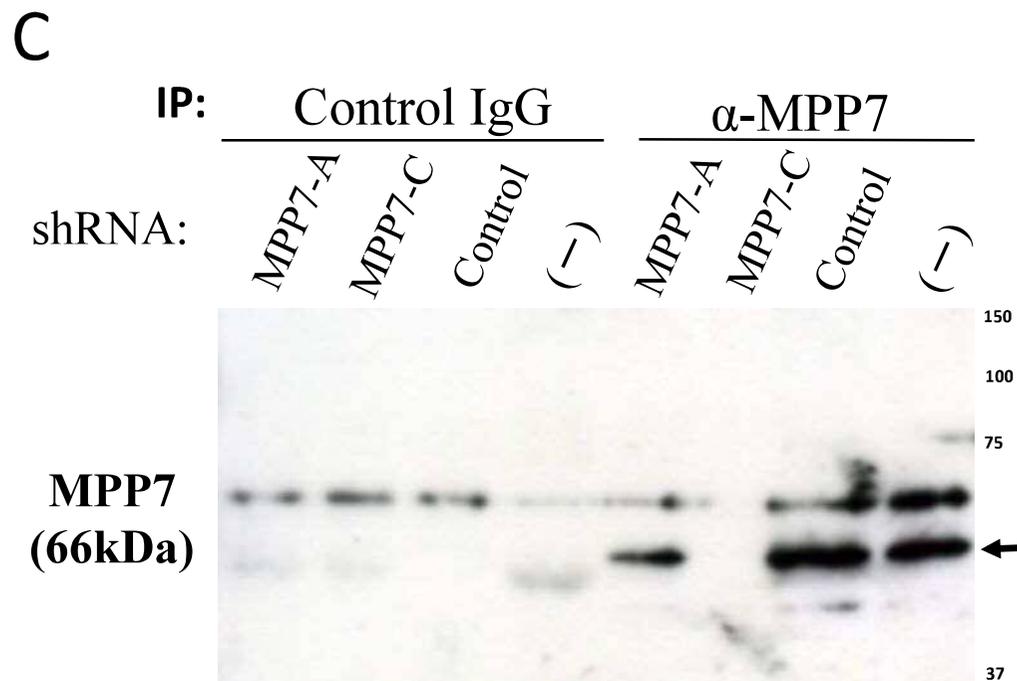
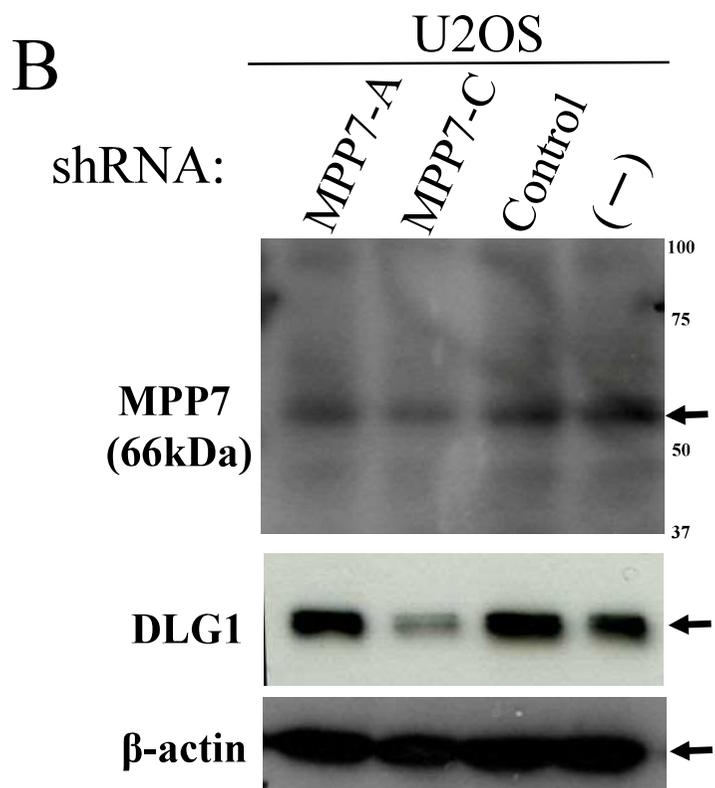
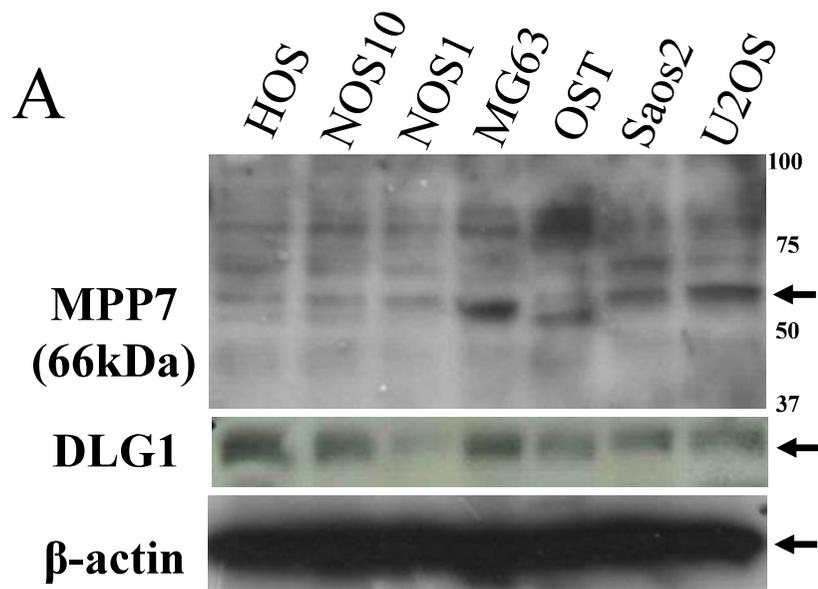
Body weights of male *Mpp7*-KO mice



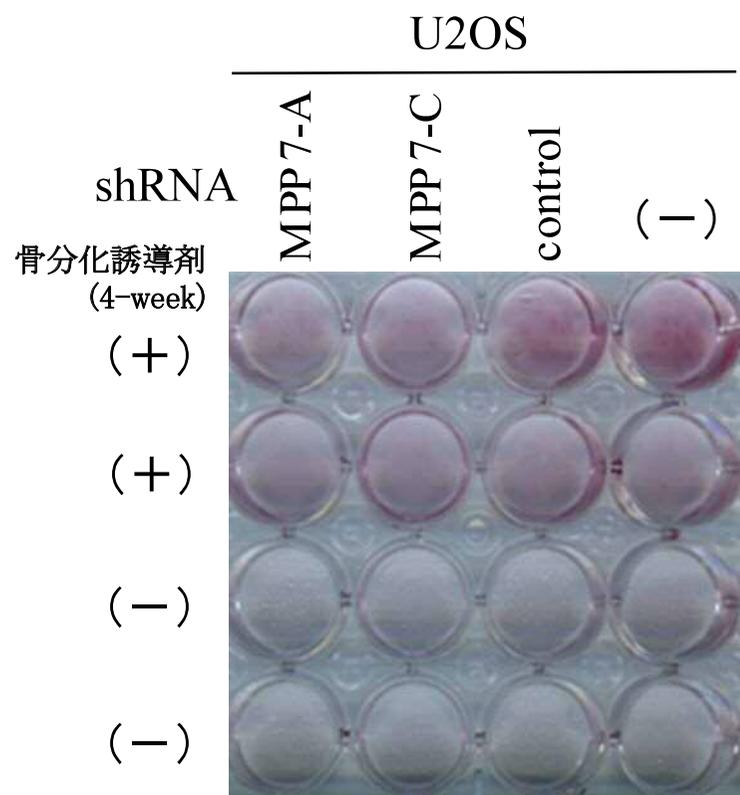
B

Body weights of female *Mpp7*-KO mice





A



B

