

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 木島 靖文  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 890 号  
学位授与の日付 令和元年 9 月 20 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
博士論文名 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

論文審査委員 主査 教授 味岡 洋一  
副査 教授 曾根 博仁  
副査 准教授 川島 寛之

### 博士論文の要旨

#### 【背景】

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。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。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。しかしながら、MPP7 がいかん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。

本研究において申請者は MPP7 遺伝子のノックアウトマウス及びノックダウン細胞を樹立し、MPP7 の生体内機能を解析した。

#### 【方法及び結果】

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。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、*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。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。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。

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。3つの細胞株 (MG63, Saos2, U2OS) 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骨肉腫細胞株 U2OS を用いて、MPP7 のノックダウン (MPP7-KD-A または MPP7-KD-C) 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。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。以上より、U2OS 細胞が MPP7 蛋白を発現しており、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。

野生型 U2OS 細胞と MPP7-KD 細胞を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) 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。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。以上の結果は、MPP7 が、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。

#### 【考察及び結論】

本研究では、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少ないことが示された。また、この低体重は、*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、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。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関与することが知られている。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。

MPP7 は複数の骨肉腫由来の細胞株に発現していた。MPP7 をノックダウンした、U2OS 細胞では、DLG1 蛋白の発現が低下した。MPP7 と DLG1 は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が示されている。*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。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 のノックダウンは骨肉腫細胞株 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。

#### 審査結果の要旨

骨粗鬆症の分子機構については不明な点が多い。ヒトゲノムワイド関連解析では membrane palmitoylated protein 7 (MPP7) 遺伝子が骨密度に関与することが示されている。申請者は MPP7 遺伝子のノックアウトマウス及びノックダウン細胞を樹立し、MPP7 の生体内機能を解析した。

5-8 週齢の雌 MPP7 ヘテロノックアウトマウスは、野生型マウスに比べ体重が有意に少なかった。一方、

雄 *Mpp7*-KO マウスと野生型マウスの体重には有意差はなく、MPP7 は性により異なる活性を示すことが推定された。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関係することが知られていることから、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示唆された。

ヒト骨肉腫由来の細胞株 U2OS を用いた MPP7 のノックダウン (MPP7-KD-A または MPP7-KD-C) 細胞では、MPP7-KD-C 細胞において、MPP7 蛋白発現量と DLG1 蛋白発現量の有意な低下がみられた。*Dlg1* 遺伝子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。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 を介する可能性が示唆される。骨芽細胞の分化能を比較検討したところ、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) を示していたことから、MPP7 は骨形成には関与せず、破骨細胞による骨吸収に関与していることが推定された。

以上より本研究は、MPP7 が体重と骨密度および骨吸収に関連しており、その関連メカニズムを解析することが骨粗鬆症の発症分子機構解明に繋がる可能性を示した点で、学位論文としての価値を認める。