

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09985

研究課題名(和文)疾患特異的iPS細胞を用いた骨伸長メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of the mechanism of bone elongation using disease-specific iPS cells

研究代表者

北中 幸子(Kitanaka, Sachiko)

東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：30431638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Kenny-Caffey症候群2型(KCS2)は、著明な低身長、副甲状腺機能低下症、長管骨の骨膜肥厚などを特徴とする症候群である。しかし、原因遺伝子FAM111Aの生体内における機能はほとんどわかっていない。本研究では、FAM111A変異による症状の発症メカニズムを、疾患特異的iPS細胞や変異導入軟骨細胞及びモデル動物を用いて解析した。培養軟骨細胞の解析で、変異体の発現により、軟骨細胞増殖と分化が障害されることが判明した。複数の家系から疾患特異的iPS細胞を樹立した。モデル動物においてFAM111Aは骨伸長に影響することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原因遺伝子として特定したにも関わらず、その機能や発症機序が不明であったFAM111Aが、軟骨分化増殖に影響することが初めて判明した。この研究をさらにすすめることにより、低身長の発症機序の解明が可能である。

研究成果の概要(英文)：Kenny-Caffey syndrome type 2 (KCS2) is characterized by short stature, cortical thickening and medullary stenosis of tubular bones, and hypoparathyroidism. However, the function of the responsible gene FAM111A is largely unknown. In this study, we analyzed the mechanism of FAM111A mutation, using cultured chondrocyte, model animals, and disease-specific induced pluripotent stem cells. Induction of the mutant FAM111A into the chondrocytes disturbed chondrocyte proliferation and differentiation. Several lines of disease-specific iPS cells were established. The mutant protein induced bone abnormality using model animals.

研究分野：小児科学

キーワード：Kenny-Caffey症候群 FAM111A 低身長

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Kenny-Caffey 症候群(KCS)は、著明な低身長、副甲状腺機能低下症、長管骨の骨膜肥厚と髄質の狭小化、大泉門の閉鎖遅延、目の異常を伴う症候群である。新生児期から低カルシウム血症によるけいれんを起こし、小児期からの著明な成長障害により成人身長が120-150cmの均整のとれた低身長となる。本症候群は2つの型があり、そのうち、精神発達正常の2型(KCS2)について当研究室で継続して研究してきた。我々はエクソーム解析により、KCS2の原因が *FAM111A* 遺伝子であることを同定した。さらに、変異を同定した日本人 KCS2 の異なる家系の4例では、全例同じミスセンス変異が *de novo* に生じており、R569H 変異が KCS2 のホットスポットであることを見出した。また、患者はヘテロ接合性変異で発症していることから、優性遺伝あるいは散発性に起こる疾患であることを証明した。海外の独立した研究でも同様の結果の報告があり、*FAM111A* が原因遺伝子であること、及び R569H 変異が KCS2 に特徴的な変異であることが結論づけられた。原因遺伝子の同定には成功したものの、*FAM111A* の機能はほとんどわかっていない。2014年に *FAM111A* は、プロテオミクスを用いた網羅的解析で、DNAの複製の際に増殖細胞核抗原と共に働き、細胞周期がS期に入るのに重要な蛋白質であることが報告されたが、この作用と低身長などの KCS2 の表現型の関連は全く不明である。さらに研究代表者らは、2014 - 2015 年度厚生労働科学研究事業で、KCS 関連疾患の全国調査を行った。その調査とこれまでの症例の検討の結果、KCS2 には、低身長や副甲状腺機能低下の他にも低マグネシウム血症、免疫異常、性腺機能異常を伴うことがあるということを見出した。ところが、このように多彩な症状をきたすメカニズムも、現在のところ、全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、*FAM111A* の変異によっておこる症状の発症メカニズムを解明することを目的とする。多彩な症状がある中で、まず特に骨伸長の障害による低身長の発症メカニズムを解析する。

3. 研究の方法

(1) *FAM111A* 変異導入モデルマウスの作出と解析

FAM111A 変異が *in vivo* での作用をみるため、変異を導入したトランスジェニックマウスを作出する。*FAM111A* 遺伝子野生型及び変異型導入マウスを作出する。遺伝子導入は Cre-LoxP システムを利用して、全身で発現する系統、四肢で発現する系統および軟骨特異的に発現する系統を作出する。

(2) *FAM111A* 導入の骨軟骨細胞の *in vitro* 解析

マウスの軟骨前駆細胞株 ATDC5 及び骨芽前駆細胞株 MC3T3-E1 を用い、*FAM111A* を強制発現させ、軟骨・骨分化過程への影響を検討する。

(3) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた骨軟骨分化増殖の解析

FAM111A 変異による骨軟骨細胞への影響をみるために、患者由来疾患特異的 iPS 細胞を用いて、骨軟骨分化を解析する。iPS 細胞を研究協力者が構築した方法により軟骨細胞へ分化させ、正常対照とその分化過程、発現遺伝子の解析を行う。

4. 研究成果

(1) *FAM111A* 変異導入モデルマウスの作出と解析

Microinjection により Cre-LoxP システムによる FAM111A 遺伝子野生型及び変異型導入 F0 マウスを作出した。その後の交配により解析マウスの親となる F1 以降の世代が得られた。共同研究先より CAG-Cre, Prx1-Cre, Col2-Cre マウスを取得し、交配した。

(a) 出生時の体格と生後の成長の検討

FAM111A 異常をもつヒトでは、均整のとれた低身長になる。マウスでこの表現型を確認するために、モデルマウスの出生時および生後の体格を野生型マウスと比較した。変異型発現マウスで長管骨の著明な短縮・大泉門閉鎖遅延などの表現型がみられ、野生型発現マウスでは軽度の骨短縮がみられた。

(b) 骨軟骨の組織学的解析

骨軟骨染色により、骨の形態や長さを検討した。また、骨軟骨の組織学的解析を行い、軟骨・骨細胞の形態、分化、大きさを検討した。組織学的には軟骨細胞数の減少と層構造の乱れがみられ、EdU 染色で細胞増殖が低下していた。TUNEL 染色では差が認められなかった。

(2) FAM111A 導入の骨軟骨細胞の *in vitro* 解析

マウスの軟骨前駆細胞株 ATDC5 及び骨芽前駆細胞株 MC3T3-E1 を用い、FAM111A を強制発現させ、軟骨・骨分化過程への影響を検討した。変異型発現 ATDC5 でトルイジンブルー染色の減弱と Col10a1 の発現低下がみられた。変異型発現 MC3T3-E1 で ALP 染色の減弱と Bglap の発現低下がみられた。それぞれ野生型発現株では変異型よりは軽度の影響が確認できた。

(3) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた骨軟骨分化増殖の解析

複数の家系から疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。現在、骨軟骨分化誘導を行っている。

以上のように、本研究では、FAM111A が骨・軟骨の分化増殖を抑制する作用を有することを初めて明らかにした。さらに、変異体は骨化抑制作用の機能亢進変異であるため、KCS2 を発症すると考えられた。本研究は、作用未知であった FAM111A が生体内で軟骨・骨の成長及び分化増殖に作用する事を世界で初めて示すものである。これにより、KCS2 の原因を確定し、治療法開発の第一歩となると考える。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Tamura M, Ishizawa M, Isojima T, Özen S, Makishima M, Oka A, Kitanaka S. Functional analyses of a novel missense and other mutations of the vitamin D receptor in association with alopecia. *Sci Rep*. 2017 Jul 11;7(1):5102. doi:10.1038/s41598-017-05081-x. 査読あり
2. Tamura M, Isojima T, Kasama T, Mafune R, Shimoda K, Yasudo H, Tanaka H, Takahashi C, Oka A, Kitanaka S. Novel DHCR7 mutation in a case of Smith-Lemli-Opitz syndrome, showing 46,XY disorder of sex development. *Hum Genome Var*. 2017 May 11;4:17015. doi: 10.1038/hgv.2017.15. eCollection 2017. 査読あり

〔学会発表〕(計8件)

1. 田中裕之、高橋千恵、Elham Al Amiri, 勝又規行、榊利之、岡明、北中幸子 . VDDR1 患者に認めた 1 水酸化酵素活性低下をきたす 5 種類の新規 CYP27B1 変異. 第 52

回日本小児内分泌学会 東京 2018.10.4 - 6 .

2. Hiroyuki Tanaka, Ayu Yoneda, Chie Takahashi, Yukiko Kuroda, Hiroki Takehara, Satoshi Okada, Akira Oka, Sachiko Kitanaka. The mechanism of genotype-phenotype correlation suggested from genetic analyses of GPS and SBBYSS patients. Pediatric Endocrine Society Meeting 2018, Toronto, 2018.5.5-8.
3. 田中裕之、田村麻由子、高橋千恵、武藤未来、木下祐加、伊東伸明、岡明、北中幸子. 低リン血症性くる病患者における FGF23 蛋白プロセッシング抵抗性をきたす新規変異 第 91 回日本内分泌学会学術総会 宮崎 2018.4.26 - 28 .
4. Tanaka H, Tamura M, Takahashi C, Muto M, Kinoshita Y, Ito N, Oka A, Kitanaka S. A novel mutation in fibroblast growth factor 23 identified in a patient with hypophosphatemic rickets prevents proteolytic cleavage. 第 51 回日本小児内分泌学会学術集会 2017/9/28-30 大阪
5. 田中裕之、田村麻由子、高橋千恵、磯島豪、齋藤琢、岡明、北中幸子. Kenny-Caffey 症候群 2 型の原因遺伝子である *FAM111A* の生体内での発現と軟骨分化への影響. 第 51 回日本小児内分泌学会学術集会 2017/9/28-30 大阪
6. Hiroyuki Tanaka, Mayuko Tamura, Chie Takahashi, Mirai Muto, Yuka Kinoshita, Nobuaki Ito, Akira Oka, Sachiko Kitanaka. A novel mutation in fibroblast growth factor 23 identified in a patient with hypophosphatemic rickets prevents proteolytic cleavage. 10th International meeting of Pediatric Endocrinology 2017/9/14-17, Washington.
7. Hiroyuki Tanaka, Mayuko Tamura, Chie Takahashi, Tsuyoshi Isojima, Nobuhiko Haga, Akira Oka, Sachiko Kitanaka. Analysis of *COL10A1* gene is useful to detect metaphyseal chondrodysplasia Schmid type for the differential diagnosis of bow-legs. The 9th Biennial Scientific Meeting of the Asia Pacific Paediatric Endocrine Society 2016/11/17-20, Tokyo.
8. Chie Takahashi, Akie Nakamura, Mayuko Tamura, Hiroyuki Tanaka, Tsuyoshi Isojima, Akira Oka, Masayo Kagami, Sachiko Kitanaka. A case with duplication of 20qter and deletion of 20pter due to maternal pericentric inversion, presenting with Silver-Russell syndrome-like phenotypes. The 9th Biennial Scientific Meeting of the Asia Pacific Paediatric Endocrine Society 2016/11/17-20, Tokyo.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：齋藤 琢

ローマ字氏名：Saito Taku

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実

施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。