

令和 4 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：2019～2021

課題番号：19K08246

研究課題名(和文)新規骨成長因子FAM111Aによる骨・軟骨分化増殖機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of bone and cartilage proliferation by a novel bone elongation factor FAM111A

研究代表者

北中 幸子 (Kitanaka, Sachiko)

東京大学・医学部附属病院・病院診療医(出向)

研究者番号：30431638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Kenny-Caffey症候群2型(KCS2)は著明な低身長を特徴とし、我々はその原因遺伝子を同定したが、FAM111Aの骨軟骨への作用は不明である。この研究ではFAM111A遺伝子改変マウスを作出した。KCS2変異を強制発現させると、ヒト同様に四肢長管骨の短縮・大泉門閉鎖遅延を呈した。重症型の変異を強制発現させると、より重度の表現型が見られた。さらに、本蛋白が切断されること、切断の程度と重症度との相関を見出した。細胞アッセイの結果も含め、FAM111Aは軟骨内骨化および膜性骨化を抑制する作用をもち、変異により増加する断片の機能亢進作用により低身長・大泉門閉鎖遅延を来すと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能不明の原因遺伝子FAM111Aが、実際にKCS2の発症にかかわることを立証した。さらにFAM111Aが、骨軟骨の抑制に直接かかわることを初めて示した。低身長にかかわる新たな因子の機序解明、骨成長におけるネットワーク機構の解明につながる、重要な研究成果と考える。

研究成果の概要(英文)：Kenny-Caffey syndrome (KCS) is a syndrome characterized by severe short stature and delayed closure of the anterior fontanel. We previously identified that mutation in FAM111A is associated with KCS2, however, there is little knowledge of physiological function of FAM111A on skeletal tissue. We showed that overexpressing mutated human FAM111A in mice cause dramatic shortening of the limbs and delayed closure of the anterior fontanel. Furthermore, we found that FAM111A protein is processed to fragments and this processing fragments are markedly increased in the mutants. These results demonstrated that mutated FAM111A suppresses chondrocyte and osteoblast differential proliferation leading to KCS2 phenotype.

研究分野：小児科学

キーワード：Kenny-Caffey症候群 Osteocraniostenosis 軟骨内骨化 遺伝子改変マウス

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 という著明な低身長となる。本症候群は2つの型があり、我々は、精神発達正常の KCS2 型(KCS2)について継続して研究し、エクソーム解析により、KCS2 の原因が *FAM111A* であることを同定した。さらに、R569H のヘテロ変異が KCS2 に特徴的な変異であることを見出した。また、KCS2 より重症型で乳児期早期に死亡するタイプの Osteocraniosclerosis(OCS)が、同じ *FAM111A* の違う変異によることがわかった。

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。*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が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。さらに、同一変異を有する個体間でも、表現型の差があることがわかった。このように様々なことが明らかとなってきたにもかかわらず、*FAM111A* 変異による発症機序は全くわかっていない。そこで、*FAM111A* による多彩な症状の発症機序を解明することが急務である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*FAM111A* の変異による疾患の多彩な症状の中で、特に顕著な症状である低身長・成長障害に着目し、*FAM111A* 変異による骨・軟骨への影響、またその機序を解析することである。本疾患の低身長は、成長軟骨の異常を伴っており、軟骨細胞の分化増殖の異常をきたしている可能性が考えられる。複数家系で共通して認められた変異は、in silico 解析では蛋白の機能に影響があまりないと予測されている。さらに、当該アミノ酸は、種族間であまり保存されていない。OCS では、KCS2 とは異なる変異が検出されている。これらのことから、KCS2 と OCS で認められている *FAM111A* の変異は、それぞれ何らかの特異的な機能を獲得していると予想される。その機能異常を解析し、*FAM111A* による新たな骨伸長機構を解明する。また、エクソームシーケンスのみで同定されている原因遺伝子が、疾患発症に原因であることを確定することを目的とした。

3 . 研究の方法

FAM111A の *in vivo* 作用を解析するため、変異を導入したトランスジェニックマウスを作出した。これまでの遺伝子解析結果により、変異は機能亢進あるいは特殊な機能を有すると予想している。そのため、野生型 FAM111A、KCS2 をきたす変異、OCS をきたす変異をそれぞれ過剰発現させたマウスを作った。生命予後が悪く、胎生致死になる可能性を考えて、Cre-LoxP システムを用いて、全身に発現、四肢のみに発現、軟骨のみに発現するマウスを作出した。骨組織はレントゲン撮影と骨格二重染色による解析、骨軟骨組織染色による組織学的解析、骨軟骨特異的各種マーカーの免疫染色による解析、mRNA 発現解析を行った。さらに、マウスの軟骨前駆細胞株 ATDC5 及び骨芽前駆細胞株 MC3T3-E1 に FAM111A を強制発現させ、軟骨・骨分化過程への影響を検討した。生体内での強発現部位を検討するために、C57BL/6 マウスの mRNA を用いた定量 PCR と正常ヒト成長軟骨組織を用いた免疫染色により Fam111a 及び FAM111A の強発現部位を検討した。HEK297 を用いて免疫染色による FAM111A の細胞内局在と、ウエスタンブロットによる蛋白の解析を行った。

4 . 研究成果

FAM111A の変異による生体への影響をみるために、Cre 依存的に FAM111A(変異型、野生型)を発現する transgenic(Tg)マウスを作成した。FAM111A は全身に発現しているため、まず、CAG-Cre で全身に発現させたところ、FAM111A 発現マウスは出生せず、出産母胎内の死胎の残存も見られなかった。そこで、Prx1-Cre で四肢頭蓋特異的に発現させると、KCS2 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た。野生型発現マウスでは、同様の表現型が軽度のみられた。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。つまり、長管骨の短縮は、軟骨細胞増殖の抑制によるものと考えられた。さらに、OCS 変異型発現マウスでは、KCS2 と同様の表現型がより重度に見られた。

軟骨前駆細胞株と骨芽前駆細胞株に FAM111A を強制発現させたところ、KCS2 と OCS 変異型発現 ATDC5 では、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軽度の影響がみられた。つまり、FAM111A は骨軟骨細胞の増殖に影響し、変異型ではその影響が強くなることがわかった。生体内での強発現部位を検討するために、マウス mRNA を用いた定量 PCR と行ったところ、成長板において Fam111a が強発現していた。また、正常ヒト成長軟骨組織を用いた免疫染色では、肥大軟骨細胞終末から一次海綿骨骨芽細胞にかけて FAM111A が強発現していた。さらに、免疫染色による FAM111A の細胞内局在をみたところ、内因性 FAM111A は核小体内に点状に発現していた。ウエスタンブロットによる蛋白を解析したところ、野生型過剰発現株のウエスタンブロットでは全長の約 75kDa に加えて約 45kDa の断片がみられた。さらに、変異型過剰発現株ではこの断片が著明に増加しており、重症度と比例する断片化がみられた。

今回の結果から、FAM111A は、成長板の肥大軟骨と一次海綿骨に強く発現し、軟骨内骨化及び

膜性骨化を抑制する作用を有することを明らかにした。さらに、R569H 変異はこの骨化抑制作用が顕著に亢進する機能亢進変異のため、成長が障害されることを明らかにした。Tg マウスの組織学的解析により、骨化抑制の発症機序は細胞増殖の低下によることがわかった。これは、FAM111A が DNA 複製や細胞周期に影響するという報告と合致する。また、蛋白動態の解析により、FAM111A は核小体に存在すること、野生型で一部切断されること、変異 FAM111A は切断が明らかに亢進することが判明した。つまり、核小体に存在する切断蛋白が骨化抑制作用を有し、変異体では切断が亢進するため、FAM111A の機能亢進作用により成長障害をきたし、低身長になると考えられた。

FAM111A は軟骨内骨化および膜性骨化を抑制する作用をもち、変異で増加する断片の機能亢進作用により低身長・大泉門閉鎖遅延を来すと考えられた。このように本研究は、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ことを初めて示すものである。また、エクソームシーケンスで同定していた KCS2 の原因を、FAM111A と確定できた。さらに、この研究により、FAM111A が、新規の骨軟骨関連因子と同定できたことより、今後、FAM111A のネットワーク解明や、新規低身長治療薬の開発につながる重要な研究と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kato Hajime, Ansh Ananya J, Lester Ethan R, Kinoshita Yuka, Hidaka Naoko, Hoshino Yoshitomo, Koga Minae, Taniguchi Yuki, Uchida Taisuke, Yamaguchi Hideki, Niida Yo, Nakazato Masamitsu, Nangaku Masaomi, Makita Noriko, Takamura Toshinari, Saito Taku, Braddock Demetrios T, Ito Nobuaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of ENPP1 Haploinsufficiency in Patients With Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis and Early Onset Osteoporosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	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) 10.1002/jbmr.4550	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 該当する
1. 著者名 Watanabe Hisato, Okada Hiroyuki, Hirose Jun, Omata Yasunori, Matsumoto Takumi, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Saito Taku, Miyamoto Takeshi, Tanaka Sakae	4. 巻 6
2. 論文標題 Transcription Factor Hematopoietically Expressed Homeobox Protein (Hhex) Negatively Regulates Osteoclast Differentiation by Controlling Cyclin Dependent Kinase Inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JBMR Plus	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) 10.1002/jbm4.10608	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kaneko Taizo, Horiuchi Keisuke, Chijimatsu Ryota, Mori Daisuke, Nagata Kosei, Omata Yasunori, Yano Fumiko, Inui Hiroshi, Moro Toru, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 40
2. 論文標題 Regulation of osteoarthritis development by ADAM17/Tace in articular cartilage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 196 ~ 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-021-01278-3	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 -
1. 著者名 Chijimatsu Ryota, Miwa Satoshi, Okamura Gensuke, Miyahara Junya, Tachibana Naohiro, Ishikura Hisatoshi, Higuchi Junya, Maenohara Yuji, Tsuji Shinsaku, Sameshima Shin, Takagi Kentaro, Nakazato Keiu, Kawaguchi Kohei, Yamagami Ryota, Inui Hiroshi, Taketomi Shuji, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 12
2. 論文標題 Divergence in chondrogenic potential between in vitro and in vivo of adipose- and synovial-stem cells from mouse and human	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	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) 10.1186/s13287-021-02485-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Hiroyuki, Isojima Tsuyoshi, Kimura Yuki, Inuzuka Ryo, Kitanaka Sachiko	4. 巻 61
2. 論文標題 Novel de novo MYRF gene mutation: A possible cause for several clinically overlapping syndromes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 68 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12402	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Harita Yutaka, Urae Seiya, Akashio Riki, Isojima Tsuyoshi, Miura Kenichiro, Yamada Takeshi, Yamamoto Katsusuke, Miyasaka Yasunori, Furuyama Masayuki, Takemura Tsukasa, Gotoh Yoshimitsu, Takizawa Hideki, Tamagaki Keiichi, Ozawa Atsushi, Ashida Akira, Hattori Motoshi, Oka Akira, Kitanaka Sachiko	4. 巻 28
2. 論文標題 Clinical and genetic characterization of nephropathy in patients with nail-patella syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1414 ~ 1421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41431-020-0655-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Abali Saygin, Tamura Mayuko, Turan Serap, Atay Zeynep, Isguven Pinar, Giran Tilay, Haliloglu Belma, Bai Serpil, Isojima Tsuyoshi, Kitanaka Sachiko, Bereket Abdullah	4. 巻 33
2. 論文標題 Hereditary vitamin D-resistant rickets: a report of four cases with two novel variants in the VDR gene and successful use of intermittent intravenous calcium via a peripheral route	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 557 ~ 562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1515/jpem-2019-0466	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 -

1. 著者名 高橋千恵、北中幸子	4. 巻 395
2. 論文標題 思春期のからだの変化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 はげみ	6. 最初と最後の頁 4-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Oda Y, Tamura M, Kitanaka S	4. 巻 61
2. 論文標題 Familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia in a 12-year-old girl.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr Int.	6. 最初と最後の頁 520-522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13839.	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 -

1. 著者名 Okumura T, Horie Y, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Robust and highly efficient hiPSC generation from patient non-mobilized peripheral blood-derived CD34+ cells using the auto-erasable Sendai virus vector.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Res Ther.	6. 最初と最後の頁 185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-019-1273-2	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 -

1. 著者名 Abali S, Tamura M, et al	4. 巻 33
2. 論文標題 Hereditary vitamin D-resistant rickets: a report of four cases with two novel variants in the VDR gene and successful use of intermittent intravenous calcium via a peripheral route.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pediatr Endocrinol Metab	6. 最初と最後の頁 557-562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1515/jpem-2019-0466	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5件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 北中幸子
2. 発表標題 子どものビタミンD不足とその予防
3. 学会等名 第661回日本小児科学会東京都地方会講和会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重沢郁美, 永井聡, 半田喬久, 枝川幸子, 田中裕之, 北中幸子, 吉岡成人
2. 発表標題 副甲状腺機能低下症に発達障害と顔貌異常・眼の異常を合併した一例.
3. 学会等名 第92回内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中裕之, 田村麻由子, 藤澤佑介, 寺田有美子, 高橋千恵, 磯島豪, 岡明, 齋藤琢, 北中幸子
2. 発表標題 機能未知蛋白FAM111Aによる低身長発症機構の解明.
3. 学会等名 第53回小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺田有美子, 高橋千恵, 藤澤佑介, 田中裕之, 北中幸子
2. 発表標題 超低出生時のため早期から高Ca血症に気づかれた家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症(FHH)の一例
3. 学会等名 第53回小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤澤佑介, 田中裕之, 磯島豪, 野口篤子, 高橋郁子, 高橋勉, 北中幸子
2. 発表標題 Kenny-Caffey症候群2型のFAM111A新規変異I310Lの病原性解析
3. 学会等名 第53回小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 田中裕之	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 1010
3. 書名 今日の小児治療指針	

〔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	齋藤 琢 (Saito Taku) (30456107)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------