

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670494

研究課題名(和文) 低身長関連新規因子による成長の機序解析と治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of a novel factor associated with short stature and application to therapy

研究代表者

北中 幸子(Kitanaka, Sachiko)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30431638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：低身長は小児内分泌領域では最も多い症状である。我々は最近、著明な低身長をきたす疾患の原因として、新規因子の同定に成功した。そこで、本研究では、我々が新規に同定した因子の低身長発症機序の解析を行った。この遺伝子を培養細胞内に過剰発現させ、細胞の増殖、分化、蛋白誘導を検討した。その結果、この因子には軟骨細胞増殖・分化抑制作用があることがわかった。さらに、変異体はその作用が増強していた。また、本遺伝子の機能や変異による影響を個体レベルで観察するため、モデル動物の作成を行った。

研究成果の概要(英文)：Short stature is one of the most common symptoms in pediatric endocrine diseases. We recently found a novel factor responsible for a disease presenting with extreme short stature. In this study, we analyzed the mechanism of this factor related to bone growth. We overexpressed this factor in a cultured cell line and evaluated the cell growth, cell differentiation, and marker proteins. We found that this factor had a repressive effect on chondrocyte growth and differentiation. The repressive effect was increased in the mutants. Furthermore, we have created model animals to investigate the function of this factor in vivo.

研究分野：小児科学

キーワード：低身長 モデル動物 発症機序

1. 研究開始当初の背景

低身長は、成長が障害される様々の病態によって生じる小児内分泌領域では最も多い症状であり、骨端線閉鎖前の小児期に治療する必要がある。成長ホルモン分泌不全などごく一部の症例では成長ホルモン皮下注射による治療が可能であるが、大半の低身長小児には現在、低身長を治療する有効な薬剤はない。さらに、長期にわたる成長ホルモン連日注射は身体的・心理的負担となる上、薬剤が高価で治療に一人数千万円程度かかり、医療費の高騰につながっている。そのため、より負担がなく、安価な低身長治療薬の開発が強く望まれている。

我々は、これまでに著明な低身長をきたす疾患の原因究明の研究を行っており、その原因として新規因子を発見した¹⁾。このFAM111Aという因子は、その遺伝子変異によって、均整のとれた著明な低身長と副甲状腺機能低下症を特徴とするKenny-Caffey症候群(KCS)2型を引き起こす。本症の副甲状腺機能低下症については、カルシウムと活性型ビタミンDの内服治療が有効である。一方、低身長については有効な治療法がなく、成長ホルモン治療を行っても、成人身長が120cm - 140cmと著明な低身長となる。患者の生命予後や知能は良好であることから、この低身長を改善することができれば、患者の生涯にわたるQOLが著しく改善される。KCS2型における低身長の発症機序は全く不明である。しかし、一つの遺伝子変異によって著明な低身長となることから、FAM111Aが身長増加に重要な因子であることは明らかである。今までに判明した一般人の身長を規定する遺伝子多型の多くが、低身長をきたす疾患原因遺伝子内であることから、本遺伝子が、一般人の身長規定遺伝子の一つである可能性も十分推察される。本症の低身長が骨系統疾患と異なり、均整がとれていることから、本症が一般的な低身長の極型である可能性が十分ある。つまり、本症の低身長治療薬は、KCS2型にとどまらず、多くの一般的な低身長症の治療に使える可能性がある

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が新規に同定した因子FAM111Aの低身長の発症機序の解析を行うことである。FAM111Aによって、細胞増

殖、細胞分化、蛋白発現がどのように制御されているか、また、変異体にはどのような作用があるかを検討する。また、個体レベルでのFAM111Aの作用を検討するために、モデルマウスの作成を行う。最終的な目標は、これらの結果を利用して、低身長に有効な新規の治療薬を開発することである。

3. 研究の方法

FAM111Aを培養細胞内に過剰発現させ、細胞の増殖、分化、蛋白誘導を観察した。軟骨細胞系のセルラインであるATDC5に、FAM111Aを安定に発現するような株を作成した。さらに、FAM111Aの各種変異体を作成し、その細胞株を作成した。FAM111Aの過剰発現、あるいは、変異体の過剰発現により、軟骨細胞の増殖・分化・マーカー蛋白発現の変化を検討した。

生体内におけるFAM111Aの作用を解析するため、また治療薬の効果をみるためには、モデル動物が必要である。そこで、モデル動物の作成を行った。モデルマウスは、FAM111Aを過剰発現するもの、変異体FAM111Aを過剰発現するものを作成した。発現誘導が可能ないように、Cre-LoxPシステムを用いることにした。ヒトではヘテロ接合体でも発症していること、この変異によって機能が亢進することが予想されることから、野生型FAM111Aを過剰発現させたトランスジェニックマウスでも表現型が見られる可能性がある。このような優性遺伝疾患におけるトランスジェニックモデル動物の有用性は、いくつかの優性遺伝疾患ですでに確立されている。

トランスジェニックマウスができれば、まず、その表現型を詳細に解析する。特に、ヒトのKCS2型でみられる成長障害、副甲状腺機能、骨、眼に注目して観察を行う。また、成長障害は、出生後に顕著であることから、特に出生前・出生後の成長を比較し、成長障害の発生する時期を特定する。

4. 研究成果

我々が同定した変異は、全例で同一の変異がde novoに生じていたことから、これが疾患特異的変異と考えた。この変異は、特有の機能を獲得することが予想されたため、培養細胞ATDC5にFAM111Aとその変異体を過剰発現させ、細胞の増殖、分化、蛋白誘導を観察

した。その結果、この因子には細胞増殖抑制作用があることが予想された。さらに、変異体にはその抑制作用が増強していることがわかった。また軟骨分化が障害されていることがわかった。軟骨の分化を示すマーカーの発現を解析したところ、後期分化を示すマーカーが顕著に低下していることがわかった。

本遺伝子の機能及び変異による影響を個体レベルで観察するために、細胞実験で得られた結果から変異体を選び、モデルマウスの作成を行った。モデルマウスは、野生型と変異型それぞれで作成し、Cre-LoxP システムを利用して発現するように構築した。今後モデルマウスの表現型を解析する。特に、ヒトの KCS2 型でみられる成長障害、副甲状腺機能、骨、眼に注目して観察を行う。また、成長障害は、出生後に顕著であることから、特に出生前・出生後の成長を比較し、成長障害の発生する時期を特定する。

参考文献

1) Isojima T, Doi K, Mitsui J, Oda Y, Tokuhiko E, Yasoda A, Yorifuji T, Horikawa R, Yoshimura J, Ishiura H, Morishita S, Tsuji S, Kitanaka S. A recurrent de novo FAM111A mutation causes Kenny-Caffey syndrome type 2. *J Bone Miner Res.* 29:992-8, 2014.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Harita Y, Kitanaka S, Isojima T, Ashida A, Hattori M. Spectrum of LMX1B mutations: from nail-patella syndrome to isolated nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 2016 Jul 23. [Epub ahead of print] <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00467-016-3462-x>

Ohta S, Isojima T, Mizuno Y, Kato M, Mimaki M, Seki M, Sato Y, Ogawa S, Takita J, Kitanaka S, Oka A Partial monosomy of 10p and duplication of another chromosome in two patients.

Pediatr Int. 2017 Jan;59(1):99-102. doi: 10.1111/ped.13181.

北中幸子、張田豊 nail-patella 症候群 (爪膝蓋骨症候群). *小児の症候群 小児科診療* 79 増:309, 2016

北中幸子: カルシウムを多く摂取すると身長が伸びる? *小児内科* 48:918-919, 2016

北中幸子: ビタミン D 依存性くる病/骨軟化症 *最新医学* 72: 1943-1948, 2016

北中幸子: ビタミン D 依存症の病因と治療. *Clinical Calcium* 26: 277-283, 2016

[学会発表](計 4 件)

伊藤明子、富尾淳、田村麻由子、磯島豪、小林廉毅、北中幸子: レセプトデータによる小児ビタミン D 欠乏性くる病有病率の 10 年間の推移 第 89 回日本内分泌学会 2016/4/21-23 国立京都国際会館(京都府・京都市)

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 International Forum (Tokyo・Chiyoda -ku).

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 International Forum (Tokyo・Chiyoda-ku).

Sato N, Hosokawa A, Kitanaka S, Yoshizawa A, Noda M, Tanaka T. rFSH monotherapy prior to hCG-rFSH combination therapy is an effective new treatment to achieving future fertility in adolescent patients with congenital male hypogonadotropic hypogonadism. The 9th Biennial Scientific Meeting of the Asia Pacific Paediatric Endocrine Society 2016/11/17-20, Tokyo International Forum (Tokyo・Chiyoda -ku).

〔図書〕(計 1 件)

北中幸子 くる病 小児疾患ガイドライン - 最新の診療指針第 3 版 (編集 五十嵐隆) 総合医学社 東京 pp.451-454 (総 670) 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北中 幸子 (KITANAKA, Sachiko)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30431638

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()