

審査の結果の要旨

氏名 田中 裕之

本研究は、いまだ生理的作用の大部分が未知であった **FAM111A** の生体内での作用と、**FAM111A** 変異により **Kenny-Caffey 症候群 2 型 (KCS2)** と **Osteocraniostenosis (OCS)** を発症する機序を明らかにするために、モデルマウスを用いた実験系と細胞株を用いた実験系で、**FAM111A** の軟骨・骨分化を中心とした骨格形成への影響とタンパク質動態の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. **C57BL/6** マウスの組織から抽出した **mRNA** を用いて、リアルタイム **RT-PCR** を行った結果、**Fam111a** が成長板において強発現していることが明らかとなった。さらに、ヒト成長板組織を用いた免疫染色を行ったところ、**FAM111A** が肥大軟骨細胞終末から一次海綿骨骨芽細胞に強発現していることが明らかとなった。
2. 四肢頭蓋特異的にヒト **FAM111A** を過剰発現するマウスを作製した結果、変異型 **FAM111A** 発現マウスで長管骨の著明な短縮・大泉門閉鎖遅延が認められ、野生型 **FAM111A** 発現マウスで軽度の骨短縮が認められた。さらに組織学的にみると、変異型 **FAM111A** 発現マウスの脛骨近位端では、軟骨細胞数の減少と成長板層構造の乱れが認められた。**TUNEL** 染色では明らかな差異は認められなかったが、**EdU** 染色で細胞増殖が低下していることが明らかとなった。
3. マウスの軟骨前駆細胞株 **ATDC5** 及び骨芽前駆細胞株 **MC3T3-E1** に野生型または変異型ヒト **FAM111A** を強制発現させ、それぞれ軟骨分化・石灰化誘導と骨分化誘導を行った。その結果 **ATDC5** ではヒト **FAM111A** 発現により軟骨基質を染色するトルイジンブルー染色の減弱と、軟骨分化後期マーカーである *Col10a1* の **mRNA** 発現低下が認められ、これらの変化は変異型で強く、野生型で軽度のみられることが明らかとなった。**MC3T3-E1** ではヒト **FAM111A** 発現により骨芽細胞が生成する **ALP** の染色の減弱と、骨分化後期マーカーである *Bglap* の **mRNA** 発現低下が認められ、これらの変化は **ATDC5** と同様に変異型で強く、野生型で軽度のみられることが明らかとなった。
4. ウェスタンブロッティングによる強制発現 **FAM111A** タンパク質の確認と、免疫染色による内在性 **FAM111A** の細胞内局在の検証を行った。**HEK293** に野生型または変異型 **FAM111A** を強制発現させウェスタンブロッティングを行ったところ、野生型発現株で全長の **75kDa** に加えて約 **45kDa** の断片が認められ、変異型発現株でこの断片が著明に増加していることが明らかとなった。断片の増加量は **KCS2** の既報変異より **OCS** の既報変異の方が多傾向にあった。**FAM111A** の **252-356** アミノ酸配列を抗原として作製された

ポリクローナル抗体と、全長配列を抗原として作製されたポリクローナル抗体の二種類を用いて免疫染色によりHEK293内在性FAM111Aを検出した結果、全長とN末端側の断片は間期の核小体内に顆粒状に局在が認められ、一方でC末端側の断片は細胞周期を通して、核内、核小体内及び細胞質内に顆粒状に局在が認められた。野生型と変異型の強制発現FAM111Aでは細胞内局在に明らかな差異は認められなかった。

以上、本論文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抑制作用を有することを世界で初めて示した。さらに FAM111A が変異によりこの機能が亢進することで KCS2 の原因となることを明らかにした。本研究は KCS2 における低身長発症機構の解明のみならず、骨格形成の新たな制御機構の発見と考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。