

厚生省特定疾患

ホルモン受容機構異常分科会

# 平成10年度 総括研究事業報告書

分科会長 春日 雅人

厚生省特定疾患

ホルモン受容機構異常分科会

# 平成10年度 総括研究事業報告書

分科会長 春日 雅 人

# 序 文

厚生省特定疾患ホルモン受容機構異常調査研究班が、内分泌・代謝系疾患研究班の一分科会として引き継がれ新体制で活動をはじめてから3年間が経過しました。この3年間がひとつの区切りとなりますが、そのまとめの報告書がここに完成しました。本班の今後の発展のために率直な御批判，御助言を頂ければと考えております。

最後に、この3年間暖かい御指導ならびに御支援を頂きました厚生省保健医療局エイズ疾病対策課に感謝申し上げます。

平成 11 年 3 月

春 日 雅 人

# 平成10年度研究報告書

## 目次

I 序文		
II 班員名簿	1	
III 会議記録	2	
IV 総括研究報告	3	
V 総合研究報告	6	
VI 分担研究報告	10	
1. 副甲状腺機能異常症の病因解析：PTH/PTHrP受容体・副甲状腺カルシウム受容体の検討	10	
千葉大学小児科	安田敏行、渡辺智之 皆川真規、南谷幹史 新美仁男	
2. 副甲状腺機能異常症におけるカルシウム感知受容体の解析	14	
東京大学医学部附属病院分院内科	福本誠二、千勝典子 徳島大学第一内科	松本俊夫
3. Ca受容体発現とPTH分泌異常の関係について	17	
東北大学第二内科	水梨一利	
4. 偽性副甲状腺機能低下症におけるPTHに対する骨の反応性に関する検討	20	
神戸大学第三内科	金谷政則、杉本利嗣 千原和夫	
5. 二次性腎性副甲状腺機能亢進症に影響する遺伝子多型	25	
大阪市立大学第二内科	田原英樹、森井浩世	
6. ビタミンD受容機構の性腺における役割に関する研究	27	
岡山大学小児科	清野佳紀	
7. TSH受容体異常症に関する研究	29	
群馬大学第一内科	森昌朋、村上正巳	
8. TSH受容体抗体病の動物モデルの作製	32	
京都大学臨床病態医科学	赤水尚史、西條美佐 三浦晶子、森山賢治	

	中尾 一和	
	京都大学臨床病態医化学	松田文彦、本庶 佑
9. TSH受容体による甲状腺癌遠隔転移巣の増悪		37
	京都大学大学院医学研究科核医学・画像診断学	御前 隆、笠木寛治
		小西 淳二
10. 異常甲状腺ホルモン受容体の発現と機能に関する研究：ドミナントネガティブ作用の機序の解析		40
	浜松医科大学第二内科	中村浩淑、安藤 普一郎
		三沢 啓子、西山 孝三
		夏目 宏子、松下 明生
		佐々木 茂和
11. 甲状腺ホルモン不応症の発症におけるコリプレッサーの役割		46
	名古屋大学環境医学研究所	
	分子細胞適応部門、内分泌代謝分野	妹尾久雄、長屋 敬
12. 新たな自己抗原と考えられる甲状腺蛋白MYOCILIN		50
	虎の門病院	小澤 安則、田口 学
		紫芝良昌
13. ヨードトランスポーター遺伝子を用いた甲状腺疾患の新たな診断と治療の確立		53
	山梨医科大学第三内科	女屋敏正
14. バセドウ病甲状腺細胞における転写因子C I I T Aの発現		56
	九州大学生体防御医学研究所臨床免疫学	生山 祥一郎、
	九州大学第三内科	母 義明、高柳 涼一
		名和田 新
	野口病院	野口 志郎
15. バセドウ病眼症線維芽細胞における機能的TSH受容体およびsulfate transporterの解析とその抑制を利用した新しい眼症治療法の検討		59
	東京女子医科大学第二内科	磯崎 収、對馬敏夫
		宮川 めぐみ、出村 博
	オリンピアクリニック井上眼科	井上 洋一
16. バセドウ病眼症の予後と甲状腺刺激抗体(TSA b)の関連性		62
	長崎大学第一内科	横山 直方
	放射線影響研究所	長瀬 重信

17. 遺伝子発現制御におけるビタミンDレセプターの高次機能 .....	65
東京大学分子細胞生物学研究所	加藤 茂 明
18. インスリン受容機構とその異常 .....	71
神戸大学第二内科	春日 雅 人

# ホルモン受容機構異常分科会

## 分科会員名簿

### 分科会長

春日 雅人 神戸大学医学部第二内科 教授

### 分科会員

女屋 敏正 山梨医科大学第三内科 教授

小西 淳二 京都大学医学部核医学科 教授

紫芝 良昌 虎の門病院内分泌代謝科 分院長

妹尾 久雄 名古屋大学環境医学研究所  
内分泌代謝科 教授

對馬 敏夫 東京女子医科大学第二内科 教授

長瀧 重信 財団法人放射線影響研究所 理事長

安田 敏行 千葉大学医学部小児科 講師

松本 俊夫 徳島大学医学部第一内科 教授

水梨 一利 東北大学医学部第二内科 助手

加藤 茂明 東京大学医学部分子細胞  
生物学研究所 助教授

森井 浩世 大阪市立大学医学部第二内科 教授

中村 浩淑 浜松医科大学第二内科 教授

森 昌朋 群馬大学医学部第一内科 教授

### 監事

清野 佳紀 岡山大学医学部小児科 教授

### 研究協力者

生山 祥一郎 九州大学生体防御医学研究所  
臨床免疫学部門 助教授

杉本 利嗣 神戸大学医学部第三内科 助手

## 難病特別研究員

赤水 尚史

京都大学医学研究科臨床病態  
医科学第二内科 助手

## 評価委員

黒川 清

東海大学医学部 医学部長

猿田 享男

慶応義塾大学医学部 医学部長

貴邑 富久子

横浜市立大学生理学第二 教授

菅村 和夫

東北大学細菌学 教授

## 事務局

春日 雅人

神戸大学医学部附属病院第二内科

〒650-0017 神戸市中央区楠町7-5-2

TEL: (078) 382-5860

FAX: (078) 382-2080

## 会議記録

### 研究報告会

平成11年2月2日(火)

### 出席者

(分科会長) 春日 雅人

(事務担当) 岡林 克典

(評価委員4名、分科会員14名、研究協力者2名、難病特別研究員1名、  
その他25名)

# ホルモン受容機構異常分科会

分科会長 春日 雅人

神戸大学医学部第二内科

## 総括研究報告

### I 研究班の目標

本研究の目標は、ホルモン作用機構の異常に起因すると推定される原因不明、治療法未確立で、かつ後遺症を残すおそれの少なくない疾患について、診断基準の作製、治療法の確立、さらに原因の解明を行なうことである。(1) 偽性副甲状腺機能低下症, (2) ビタミンD受容機構異常症, (3) TSH受容体異常症, (4) 甲状腺ホルモン不応症を対象疾患として、本年度の研究目標は(A) 副甲状腺関連疾患では、(i) 偽性副甲状腺機能低下症1b型における副甲状腺ホルモン受容体遺伝子異常の解明, (ii) 偽性副甲状腺機能低下症における組織特異的副甲状腺ホルモン抵抗性の解明, (iii) 副甲状腺機能異常症における副甲状腺カルシウム感知受容体遺伝子異常の解明, (iv) ビタミンD受容機構の解明, (v) ビタミンD依存性くる病I型の原因遺伝子の解明, (B) 甲状腺関連疾患では、(i) TSH受容機構異常症における病因の解明, (ii) 甲状腺ホルモン不応症の発症機序の解明, (iii) バセドウ病眼症の病因とその予後の解明である。

### II 研究成果

本研究の成果は

#### (A) 副甲状腺関連疾患

##### (i) 偽性副甲状腺機能低下症1b型における副甲状腺受容体遺伝子異常の解明

Gs蛋白に異常を認めない偽性副甲状腺機能低下症1b型では副甲状腺ホルモン受容体の異常が想定され、その遺伝子のコーディングシーケンスに関して、現在迄に精神的に検討されたが、変異は認められなかった。更にその2つのプロモーター領域ならびに腎特異的プロモーターについても検討したが変異ならびにメチル化は認めなかった。本年度は、偽性副甲状腺機能低下症1b型の7例についてその腎特異的P3プロモーター領

域を更に詳細に検討した所、A-rich repeatの過剰を一例で認めた。この意義について現在検討中であるが、この異常によりプロモーター活性は減弱することを見い出している。

##### (ii) 偽性副甲状腺機能低下症における組織特異的副甲状腺ホルモン抵抗性の解明

偽性副甲状腺機能低下症は副甲状腺ホルモン(PTH)に対して腎臓が抵抗性を示すことを特徴とする疾患である。そこでPTHの標的臓器のひとつである骨もまたPTHに対して抵抗性があるか骨密度、骨代謝マーカーを測定して詳細に検討した。その結果PTHが骨代謝回転に促進的に作用し、特発性副甲状腺機能低下症や術後性副甲状腺機能低下症に比し骨量が低下していることが明らかとなった。従って偽性副甲状腺機能低下症の多くの例では骨がPTHに対する抵抗性を示す可能性は低く、反応性を有すると考えられた。このことにより、臨床的には他の副甲状腺機能低下症と比較し少量のビタミンD補充で血中Ca濃度を維持できると考えられた。(iii) 副甲状腺機能異常における副甲状腺カルシウム感知受容体遺伝子異常の解明

副甲状腺カルシウム感知受容体は、細胞外カルシウム濃度を感知し、副甲状腺ホルモン分泌の調節に重要な役割を果たしている。昨年度、我々は家族性副甲状腺機能低下症の2家系において788番目のPheがCysに変異していることを認め、「カルシウム感知受容体の機能亢進による副甲状腺機能低下症」という概念を提唱した。本年度、家族性副甲状腺機能低下症を呈する他の1家系で副甲状腺カルシウム感知受容体について検討したが遺伝子変異は認められず、この疾患の発症には他の要因も関与していると考えられた。

一方、家族性低Ca尿性高Ca血症を呈する2家系を解析し、220番目のArgがTrpに変異する異常ならびに592番目のThrがAspに変異する異常を認めたが、後者の変異は家族内での検討で高Ca血症と連鎖せず多型(polymorphism)と考えられた。従って、カルシウム感

知受容体の遺伝子変異により高Ca血症も低Ca血症も生じると考えられた。

また、原発性副甲状腺機能亢進症として手術されたものの、術後も高Ca血症が持続した2症例で27番目のGluがArgにあるいは55番目のProがLeuに変異する異常を認めた。この2種の変異を培養細胞に発現してその機能を検討した所、この異常によりカルシウム感知機能が低下することが明らかとなった。従ってこの遺伝子変異が高Ca血症の発現に関与している可能性が高いと考えられた。また、これらの症例の副甲状腺組織は、過形成を示したことからカルシウム感知受容体が細胞外Ca濃度の感知に加え、副甲状腺細胞の増殖の調節にも関与している可能性が示唆された。

#### (iv) ビタミンD受容機構の解明

ビタミンD受容機構を解明する目的でビタミンD受容体遺伝子欠損マウスを作製したことは一昨年報告した。本年度は、このマウスを詳細に解析し、このマウスの骨芽細胞および破骨細胞の機能は野生型と差がなく、血清カルシウム濃度の正常化に伴い骨組織像が改善することを見出した。従ってこのマウスにおける骨組織の異常はビタミンD受容体の直接作用とは考えられなかった。一方、軟骨および皮膚における異常は血中カルシウムの正常化にもかかわらず改善されなかったより、ビタミンD受容体が軟骨及び皮膚表皮に直接的に作用していることが明らかとなった。

また、この欠損マウスは子宮が萎縮しており、ビタミンD受容体の性腺機能における役割も示唆された。そこでこのマウスにおけるアロマターゼ活性について検討し、男女両性腺において著しく低下していることならびに、血中カルシウムの正常化によってもこれらの異常は完全には改善しないことを見出した。以上より、ビタミンD受容体はエストロゲン合成に少なくとも一部は直接的に関与していることが明らかとなった。

#### (v) ビタミンD依存性くる病I型の原因遺伝子の解明

ビタミンD依存性くる病I型は、遺伝子性偽性ビタミン欠乏性くる病とも呼ばれ、幼児早期にくる病に加え、筋緊張の低下、筋力の低下、成長障害、低カルシウム血症による痙攣などを呈する常染色体性遺伝疾患である。この疾患では、血中の25ヒドロオキシビタミンD<sub>3</sub>の濃度が正常であるにもかかわらず、1 $\alpha$ , 25ジヒドロオキシビタミンD<sub>3</sub>の濃度が低下しているの、前者から後者への変換に関与している25ヒドロオキシビタミンD<sub>3</sub>1 $\alpha$ 水酸化酵素の異常が想定されて

いた。そこでこの遺伝子のcDNAをクローニングし、ビタミンD依存性くる病I型患者4例についてその遺伝子の異常について検討した。その結果、各症例においてそれぞれ107番目のArgがHisに、125番目のGlyがGluへ、335番目のArgがProへ、382番目のProがSerに変異していることが明らかとなった<sup>2</sup>。次にこれらの変異1 $\alpha$ 水酸化酵素の活性25ヒドロオキシビタミンD<sub>3</sub>から1 $\alpha$ , 25ジヒドロオキシビタミンD<sub>3</sub>への変換で検討したが、いずれの変異もこの活性をもっていないことが明らかとなった<sup>2</sup>。従って、25ヒドロオキシビタミンD<sub>3</sub>1 $\alpha$ 水酸化酵素遺伝子の変異によりビタミンD依存性くる病I型が発症することが明らかとなった<sup>2</sup>。

#### (vi) その他

前年度、慢性腎不全に伴う二次性副甲状腺機能亢進症の副甲状腺過形成の増殖度にビタミンD受容体遺伝子多型のBst I多型が関与していることを報告したが、症例数を倍増(65名)して検討したが、同様にb alleleを持つものほど腫瘍(過形成)の増殖度が高いことを見出した。

#### (B) 甲状腺関連疾患

##### (i) TSH受容機構異常症における病因の解明

TSH受容体に対する抗体は、バセドウ病や一部の甲状腺機能低下症患者で認められ、その発症に関与していると考えられている。昨年迄に患者リンパ球からTSH受容体抗体遺伝子を単離し、リコンビナントモノクロナル抗体の産生に成功した。本年度は、リコンビナントモノクロナル抗体を人工的に産生する骨髓腫細胞をマウスの腹腔内に投与し、T<sub>4</sub>やTSHが変化することを見出した。これらの結果から、TSH受容体抗体病のモデル動物の作製が、現実のものとなってきたと言える。また、単離したTSH受容体抗体遺伝子の培養細胞系での発現を確認し、現在この遺伝子を受精卵に注入し、トランスジェニックマウスを作製中である。また、TSH受容体自己抗体を有する甲状腺疾患患者で、TSH受容体マイクロサテライトやCTLA-4の特定のアリルが有意に高頻度であることが認められた<sup>3</sup>。このことは、TSH受容体やCTL-4がこれらの疾患の病因遺伝子である可能性を示唆している。

また、バセドウ病で認められる自己抗体に対応する56kDaの甲状腺抗原として、myocilinを同定した。Myocilinがバセドウ病の発症にどのように関与しているか検討中である。

また、先天性TSH不応症と考えられる症例において

TSH受容体遺伝子を検討した所、その遺伝子変異が原因と思われる症例が存在し、現在同症例の詳細な遺伝子解析とともに変異受容体の機能について培養細胞を用いて解析を行っている。

#### (ii) 甲状腺ホルモン不応症の発症機序の解明

甲状腺ホルモン不応症は、甲状腺ホルモン受容体の遺伝子変異により生じる疾患であり、これまで2例のみがホモ接合体であり残りはすべてヘテロ接合体である。本症の第1例目は、甲状腺ホルモン受容体遺伝子 $\beta$ が欠損しているホモ接合体であったが、その両親は臨床的に正常であり不応症ではなかった。このことは正常の甲状腺ホルモン受容体が半減するだけでは甲状腺ホルモン不応症にはならず、異常甲状腺ホルモン受容体が存在し、これが正常甲状腺ホルモン受容体の機能を阻害するドミナントネガティブ作用が不応症の発現には重要であることを示唆している。このドミナントネガティブ作用の発現機序を解明するために、各種の変異甲状腺ホルモン受容体を発現して検討した結果、レンチノイドX受容体とのヘテロダイマーを形成しやすいこと、ならびにコリプレッサーを結合することがドミナントネガティブ作用発現のためには重要と考えられた。さらに、各種変異受容体とコリプレッサーの一つであるSMRTとの結合能とドミナントネガティブ作用との間に強い相関をみたが、別のコリプレッサーであるN-CORとの結合能の間には有意の相関をみなかった。従って、変異甲状腺ホルモン受容体がコリプレッサーの一つであるSMRTと結合することが、甲状腺ホルモン不応症を発現するために重要である可能性が示唆された。

#### (iii) バセドウ病眼症の病因とその予後の解明

バセドウ病眼症では外眼筋および眼窩内の脂肪結合織の腫大が眼窩内圧を増加し、眼球突出を生じる。このような組織においてはglycosaminoglycans (GAG)の蓄積を伴った線維芽細胞の増生を認め、GAGの蓄積が組織腫大の最も大きな原因と考えられている。本年度は、このGAGの産生に関連すると考えられているsulfate transporterについて解析し、眼窩線維芽細胞に発現するのは主にdiastrophic dysplasia sulfate transporter (DTDST)であり、Na非依存性、Cl依存性のsulfate/chloride antiporterであることを明らかにした。眼症線維芽細胞におけるsulfateの取り組みは亢進しており、GAG産生の亢進と関連している可能性があり、このことはsulfateの取り組み抑制がバセドウ病眼症の治療につながる可能性を示唆している。

一方、バセドウ病眼症の予後と甲状腺刺激抗体 (TSA b)の関連を臨床的に検討した所、TSA bが持続的に高値を示す眼症症例では内科的治療に抵抗性であり、眼症の進行が早いことが明らかとなった。従って、TSA b値が高い眼症患者に対しては治療適応の時期を見逃さないように特に早めの対応が必要であると考えられた。

### III 残された課題と目標

(i) 偽性副甲状腺機能低下症 I b 型の発症機序の解明  
腎特異的P3-プロモーターに認められたA-rich repeat過剰の発症における役割を解析するとともに、我国の偽性副甲状腺機能低下症Ib型の症例について、欧米の症例についての報告と同様に、染色体20qのテロメア領域に疾患責任遺伝子が存在するか検討する。

#### (ii) 副甲状腺機能異常における副甲状腺カルシウム感知受容体遺伝子変異の解明

家族性副甲状腺機能低下症ならびに家族性低Ca尿性高Ca血症の家系で、副甲状腺カルシウム感知受容体遺伝子の変異を見い出したが、これらの家系をさらに集積し解析するとともに、他のカルシウム・リン代謝異常を呈する遺伝性疾患についても検討する。

#### (iii) ビタミンD受容機構の解明

ビタミンD受容体欠損マウスを作製したが、Cre-loxPの系を用いて組織あるいは発生段階特異的ビタミンD受容体欠損マウスを作製して、ビタミンD受容機構を更に詳細に解析する。

#### (iv) TSH受容機構異常症における病因の解明

現在作製中のTSH受容体遺伝子トランスジェニックマウスを完成させ、継代可能なモデル動物とする。また抗myocilin自己抗体のバセドウ病発症における役割を解明する。さらに、先天性TSH不応症において見い出されたTSH受容体遺伝子の変異がその発症に関与しているかを明らかにする。

#### (v) 甲状腺ホルモン不応症の発症機序の解明

甲状腺ホルモン受容体遺伝子に変異のみられなかった甲状腺ホルモン不応症の一家系について、コリプレッサー、コアクチベーターなどの甲状腺ホルモン受容体共役因子の遺伝子に異常がないか検討する。

#### (vi) バセドウ病眼症の病因の解明

眼症後眼窩線維芽細胞を用いて、甲状腺刺激抗体 (TSA b)がこれらの細胞でsulfate取り込みあるいはglycosaminoglycan産生を促進するかを解析する。

# ホルモン受容機構異常分科会

分科会長 春日 雅人

神戸大学医学部第二内科

## 総合研究報告

[平成8年度から10年度における研究の概要及び成果]

### A) 副甲状腺関連疾患

#### (i) 偽性副甲状腺機能低下症Ib型における副甲状腺受容体遺伝子の解析

偽性副甲状腺機能低下症は、いくつかの病型に分類されるが、このうちGs蛋白に異常を認めないIb型では、副甲状腺ホルモン受容体遺伝子の異常が想定されてきた。そこで、本班においても精力的に副甲状腺ホルモン受容体遺伝子の変異について検索した。偽性副甲状腺機能低下症Ib型5例について、翻訳領域、プロモーター1、プロモーター2について検討したが有意な遺伝子変異は認められなかった。本疾患では腎臓における副甲状腺ホルモン抵抗性が認められるため、腎臓特異的プロモーター3をクローニングしその変異を検討したが、有意な変異は認められなかった。しかしながら、1例でA-rich repeatの過剰を認めた。この意義については今後の検討を要すると考えられる。以上より、偽性副甲状腺機能低下症Ib型は副甲状腺受容体遺伝子異常によりひきおこされる疾患でない可能性が高くなってきた。最近、この疾患の4家系を対象に全ゲノム解析を行った所、染色体20qのテロメア領域に責任遺伝子があるという報告がなされた。この部位には副甲状腺ホルモン受容体遺伝子は存在せず、この成績も偽性副甲状腺機能低下症Ib型の責任遺伝子は副甲状腺ホルモン受容体遺伝子ではないという考えを支持する。一方、骨幹端異形成、低身長、高Ca血症を伴う例で副甲状腺ホルモン受容体遺伝子の227番目のArgがHisへ変異しているのを見い出した。したがって副甲状腺ホルモン受容体の異常は骨格や軟骨の異常を伴う疾患に認められる可能性が高いと考えられる。

#### (ii) 副甲状腺機能異常におけるカルシウム感知受容体の役割の解明

副甲状腺カルシウム感知受容体は、細胞外カルシウ

ム濃度を感知し、副甲状腺ホルモン分泌の調節に重要な役割を果たしている。1993年にこの受容体のcDNAがクローニングされ、近年副甲状腺機能異常におけるこの受容体の遺伝子異常が注目されている。新生児低カルシウム血症より発見された家族性副甲状腺機能低下症の2家系で、この遺伝子の788番目のPheがCysに変化している変異を見い出した。この変異遺伝子を培養細胞に発現して検討した結果、この変異によりカルシウム感知受容体の機能が亢進していることが明らかとなった。すなわち、カルシウム受容体遺伝子の788番目のPheからCysへの変異は、受容体の膜貫通部位の変異であり、G蛋白との共役に変化を生じその機能が亢進し、重症(血中のCa濃度4.8-6.4mg/dl)の副甲状腺機能低下症を生じることが示唆された。一方、血中Caが上昇する新生児重症副甲状腺機能亢進症においては、185番目のArgがstop codonに、670番目のGlyがGluに変異している異常を見い出した。後者は膜貫通部位の変異であり、この変異遺伝子を培養細胞に発現して検討した結果、この変異によりカルシウム感知受容体は細胞外のカルシウム上昇を感知しえないことを見い出した。また、類縁疾患の家族性低Ca尿性高Ca血症の一家系で220番目のArgがTrpに変異するのを見い出し、この変異が家族内で高Ca血症と連鎖していることを見い出した。すなわち、カルシウム感知受容体遺伝子の変異により新生児重症副甲状腺機能亢進症ならびに、家族性低Ca尿性高Ca血症が生じると考えられた。また、原発性副甲状腺機能亢進症として手術されたものの、術後も高Ca血症が持続した2症例で27番目のGluがArgにあるいは55番目のProがLeuに変異する異常を認めた。この2種の変異を培養細胞に発現してその機能を検討した所、この異常によりカルシウム感知機能が低下することが明らかとなった。従って、この遺伝子変異が高Ca血症の発現に関与している可能性が高いと考えられた。また、これらの症例の副甲状腺組織は、過形成を示したことからカルシウム感知受容体が細胞外Ca濃度の感知に加え、副甲状腺細胞の増殖の調節にも関与

している可能性が示唆された。従って、カルシウム・リンの調節障害のみられる症例あるいは副甲状腺の過形成のみられる症例では、本遺伝子変異のスクリーニングが今後重要と考えられた。

#### (iii) ビタミンD受容機構の生体における役割の解明

ビタミンD受容機構ならびにその異常を明らかにするために、ビタミンD受容体欠損マウスを作製した。このマウスは正常に誕生するが、離乳時期である3週以後、低カルシウム血症ならびに顕著な成長障害がみられ8週から15週で死亡した。この時期の主な変化はクル病性骨変化、卵巣・子宮の萎縮、体毛の脱落であった。血清カルシウム値の正常化により、骨変化は正常化した。軟骨の変化、卵巣・子宮の変化、体毛の異常は完全には正常化せず、ビタミンD受容体が軟骨・皮膚・性腺で重要な働きをしていると考えられた。

#### (iv) ビタミンD受容体遺伝子多型の臨床的意義の解明

ビタミンD受容体遺伝子のイントロン8のBsm I多型と骨密度の関係については、多くの報告がなされているが相反する報告がなされ結論が出ていない。多くの報告の問題点として、年齢の多様性（閉経前後の集団の混在）や均一な人種集団でないことが指摘されている。そこで本邦の18-20才の健康な女性に限定して検討した所、この多型と腰椎骨密度の関係に有意な相関は認められなかった。従って、正常人においてイントロン8のBsm I多型が骨密度を決定する有力な因子とは考えられなかった。また、Bst I多型が慢性腎不全に伴う副甲状腺過形成（腫瘍サイズ）の程度に関与していることを見出した。一方、ビタミンD受容体遺伝子のエクソン2に認められる多型は、骨密度でなく身長と関係することが明らかとなった。

#### (v) ビタミンD依存性クル病I型の病因遺伝子の解明

ビタミンD依存性クル病I型は、遺伝性偽性ビタミン欠乏性クル病とも呼ばれ、幼児早期にクル病に加え、筋緊張の低下、筋力の低下、成長障害、低カルシウム血症による痙攣などを呈する常染色体劣性遺伝子疾患である。この疾患では、血中の25ヒドロオキシビタミンD<sub>3</sub>の濃度が正常であるにもかかわらず、1 $\alpha$ , 25ジヒドロオキシビタミンD<sub>3</sub>の濃度が低下している。従って、前者から後者への変換に関与している25ヒドロオキシビタミンD<sub>3</sub>1 $\alpha$ 水酸化酵素の異常が想定されていた。そこでこの遺伝子のcDNAをクローニングし、ビタミンD依存性クル病I型患者4例について1 $\alpha$ 水酸化酵素の遺伝子異常について検討した。その結果各症例においてそれぞれ107番目のArgがHisに、125番目の

GlyがGluへ、335番目のArgがProへ、382番目のProがSerに変異していることが明らかとなった。次にこれらの変異1 $\alpha$ 水酸化酵素の活性を25ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>から1 $\alpha$ , 25ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>への変換で検討したがいずれの変異も活性をもっていないことが明らかとなった。従って25ヒドロオキシビタミンD<sub>3</sub>1 $\alpha$ 水酸化酵素遺伝子の変異によりビタミンD依存性クル病I型が発症することを明らかにした。

## B) 甲状腺関連疾患

### (i) TSH受容機構異常症における病因の解明

TSH受容体に対する抗体は、バセドウ病や一部の甲状腺機能低下症患者で認められ、その発症に関与していると考えられている。これらの疾患の発症機構を解明するためにはモデル動物の作製が重要であるが、そのようなモデル動物はまだ確立されていない。そこで、TSH受容体抗体病モデル動物の作製を試みた。まず、バセドウ病及び原発性甲状腺機能低下症の患者リンパ球からTSH受容体抗体遺伝子を単離した。この遺伝子を利用してリコンビナントモノクロナル抗体を大量に生産し、そのエピトープを同定した。その結果、バセドウ病ならびに甲状腺機能低下症のいずれにおいてもそのエピトープは互いにわずかな相異を示しつつも、共に細胞外部に存在するN端側で、TSHの結合部位とも異なることが判明した。更に、このリコンビナントモノクロナル抗体を産生する骨髓腫細胞をマウスの腹腔内に投与し、マウスのT<sub>4</sub>やTSHの値が変化することを見出した。また、単離したTSH受容体抗体遺伝子の培養細胞系での発現を確認し、現在この遺伝子を受精卵に注入しトランスジェニックマウスを作製中であり、TSH受容体抗体モデル動物の確立も現実のものとなってきた。TSH受容体抗体以外にも、各種の甲状腺細胞膜自己抗体が血中に存在するが、病因論的に意義のある抗原としてバセドウ病における56kDa蛋白、萎縮性甲状腺炎における60kDa蛋白そして無痛性甲状腺炎における64kDa蛋白を新たに見出し、この中で56kDa蛋白はmyocilinであることを明らかにした。Myocilinがバセドウ病発症にどのように関与しているか今後の興味ある課題である。また、先天性TSH不応症と考えられる1症例においてTSH受容体遺伝子の変異を見出した。この変異がTSH不応症の発症にどのように関与しているか現在検討中である。

### (ii) 甲状腺ホルモン不応症における甲状腺ホルモン受容体異常の役割の解明

甲状腺ホルモン不応症は、十分量の甲状腺ホルモンが生体に存在するにもかかわらず、それに応じたホルモン効果が認められない疾患で、甲状腺ホルモン受容体遺伝子の異常による疾患と考えられており、我国でもこの疾患における甲状腺ホルモン受容体の遺伝子変異が報告されている。しかしながら、この遺伝子の異常が甲状腺ホルモン不応症をひきおこす機序については不明の点が多い。

機能的甲状腺ホルモン受容体には $\alpha 1$ と $\beta$ の2つのアイソフォームがあるが、甲状腺ホルモン不応症患者で見い出されたのは全て $\beta$ アイソフォームの異常である。そこで、C末端アミノ酸欠失を持つ変異甲状腺ホルモン受容体遺伝子 $\alpha 1$ を発現するトランスジェニックマウスを作製し、このアイソフォームの機能につき検討した。その結果、このようなマウスの出産率が高度に低下していること、出産してきたマウスも発育不良を示したことより、甲状腺ホルモン受容体遺伝子 $\alpha 1$ の異常は致命的となる可能性が高いと考えられた。このため、甲状腺ホルモン不応症で $\alpha 1$ アイソフォーム遺伝子の異常は未だ報告されていないと推測された。また、甲状腺ホルモン不応症で認められた甲状腺ホルモン受容体遺伝子 $\beta$ の変異は、これまで2例のみがホモ接合体であり残りはすべてヘテロ接合体であった。本症第1例目は甲状腺ホルモン受容体遺伝子 $\beta$ が欠損しているホモ接合体であったが、その両親は臨床的に正常であり不応症はなかった。このことは正常の甲状腺ホルモン受容体が半減するだけでは甲状腺ホルモン不応症にはならず、異常甲状腺ホルモン受容体が存在し、これが正常甲状腺ホルモン受容体の機能を阻害するドミナントネガティブ作用が不応症の発現には重要であることを示唆している。このドミナントネガティブ作用の発現機序を解明するために、各種の変異甲状腺ホルモン受容体を発現して検討した結果、レチノイドX受容体とのヘテロダイマーを形成しやすいこと、ならびにコリプレッサーを結合することがドミナントネガティブ作用発現のためには重要と考えられた。さらに、各種変異受容体とコリプレッサーの一つであるSMRTとの結合能とドミナントネガティブ作用との間に強い相関をみたが、別のコリプレッサーであるN-CORとの結合能との間には有意の相関をみなかった。従って、変異甲状腺ホルモン受容体がコリプレッサーの一つであるSMRTと結合することが、甲状腺ホルモン不応症を発現するために重要である可能性が示唆された。

甲状腺ホルモン不応症を呈するにもかかわらず甲

腺ホルモン受容体遺伝子 $\alpha$ 、 $\beta$ のいずれにも変異を認めない一家系を見い出した。この患者の皮膚線維芽細胞核抽出液中には、甲状腺ホルモン受容体遺伝子と結合する異なる移動度を持つ蛋白が認められ、コアクチベーターあるいはコリプレッサーの異常による甲状腺ホルモン不応症の可能性が示唆された。

### (iii) バセドウ病眼症の病因とその臨床指標の解明

バセドウ病眼症の病因はなお不明の点が多く根本的治療法も確立されていない。このような眼症患者では外眼筋および眼窩内の脂肪結合織の腫大が眼窩内圧を増加し、眼球突出を生じる。このような眼症患者の眼窩の線維芽細胞について検討した所、これらの細胞が前脂肪細胞の特徴を有しており、チアゾリシン誘導体処理にて脂肪細胞へ分化することを見い出した。また脂肪細胞にはTSH受容体遺伝子が発現しており、甲状腺細胞におけるTSH受容体遺伝子と同じプロモーターにより転写されるが、転写調節機構は両者で異なることを明らかにした。従って脂肪細胞に特異的な転写因子の同定がバセドウ病眼症の病因解明につながる可能性が示唆された。また、眼窩線維芽細胞にglycosaminoglycans (GAG) が蓄積することも組織腫大の大きな要因と考えられており、GAG産生と関連しているsulfateの取り込みがこのような線維芽細胞で亢進していることを見い出した。これらの細胞でsulfateの取り込みを荷うtransporterはNa非依存性、Cl依存性のsulfate/chloride antiporterであることを見い出した。Sulfateの取り込み抑制がバセドウ病眼症の治療につながる可能性があり、今後検討に値する。

一方、臨床的には、バセドウ病眼症患者の複視の可逆性がMRI画像によって予測できることを見い出した。すなわち、MRI-T<sub>2</sub>強調画像で外眼筋の高信号域(T<sub>2</sub>レベル高値)の中に低信号域(T<sub>2</sub>レベル低値)が斑状に混在しない場合は、全ての症例でステロイドパルス療法により複視の可逆的改善を認めた。また、甲状腺刺激抗体(TSAb)によりバセドウ病眼症の予後が予測できることも見い出した。すなわち、TSAbが持続的に高値を示す眼症症例では内科的治療に抵抗性であり眼症の進行が早いことが明らかになった。従ってTSAb値が高い眼症患者に対しては治療適応の時期を見逃さないように特に早めの対応が必要であると考えられた。

### [残された課題]

(i) 偽性副甲状腺機能低下症Ib型の責任遺伝子の解明

本疾患の責任遺伝子として、副甲状腺ホルモン受容体遺伝子が想定されていたが、本班の研究を含め多くの研究により、副甲状腺ホルモン受容体遺伝子の翻訳領域、プロモーター領域に変異は認められず、副甲状腺ホルモン受容体遺伝子は本疾患の責任遺伝子ではないと結論された。染色体20qのテロメア領域に責任遺伝子があるという報告がなされており、我国における症例を用いてこの領域に責任遺伝子が存在するか検討する。

(ii) 副甲状腺機能異常における副甲状腺カルシウム感知受容体の役割の解明

副甲状腺カルシウム感知受容体は、細胞外カルシウム濃度を感知し、副甲状腺ホルモン分泌の調節に重要な役割を果たしている。本班では家族性副甲状腺機能低下症、新生児重症副甲状腺機能亢進症、家族性低Ca尿症高Ca血症においてカルシウム感知受容体遺伝子に変異を見出し、この変異がカルシウム代謝異常の原因であることを明らかにしてきた。今後は、上記疾患について症例を増やすとともに他のカルシウム代謝異常をきたす疾患についてこの遺伝子の変異を検討する。

(iii) ビタミンD受容機構の解明

ビタミンD受容機構異常の機序を明らかにするために、本班ではビタミンD受容体欠損マウスを作製し検討したが、今後は更に詳細に解析するため、Cre-loxPの系を用いて発生段階あるいは、組織特異的欠損マウスを作製する。

(iv) TSH受容機構異常における病因の解明

現在、作製中であるTSH受容体抗体遺伝子トランスジェニックマウスを完成させ、継代可能なstrainを確立する。また、抗myocilin自己抗体のバセドウ病発症における役割を解明するとともに、先天性TSH不応症に認められたTSH受容体遺伝子の変異がその発症にどのように関与しているかを明らかにする。

(v) 甲状腺ホルモン不応症の発症機序の解明

甲状腺ホルモン受容体遺伝子 $\alpha_1$ 、 $\beta$ のいずれにも変異を認めなかったが甲状腺ホルモン不応症を呈する一家系について、コリプレッサー、コアクチベーターなどの共役因子の遺伝子に変異がないか検討する。

(vi) バセドウ病眼症の病因の解明

バセドウ病眼症の後眼窩線維芽細胞においてTSAbがsulfate取り込みやglycosaminoglycan産生へどのような効果をもつか検討する。また、バセドウ病眼症のモデル動物の作製も残された重要な課題であり、TSH受容体抗体トランスジェニックマウスを基礎としてモデ

ル動物の開発を試みる。

## 副甲状腺機能異常症の病因解析：PTH/PTHrP 受容体・副甲状腺カルシウム受容体の検討

千葉大学医学部小児科

安田 敏行, 渡辺 智之, 皆川 真規, 南谷 幹史, 新美 仁男

【要約】小児でカルシウム異常の病態・治療を考える上で重要な、PTH/PTHrP 受容体、副甲状腺・腎臓のカルシウム受容体の解析をおこなった。高カルシウム血症と骨幹端異形成を伴い副甲状腺ホルモンが抑制されている Jansen metaphyseal chondrodysplasia で PTH/PTHrP 受容体の His223Arg の変異を認めた。ゲノム DNA では heterozygous missense mutation であったが、皮膚線維芽細胞 mRNA ではほぼ異常 allele のみの発現でありこれにより PTH/PTHrP 受容体の自律機能亢進を来すことが示唆された。偽性副甲状腺機能低下症 Ib の 1 例で腎臓で有力な PTH/PTHrP 受容体の promoter 部で A-rich repeat の過剰を認めた。これにより promoter 活性は減弱するが、今後の検討に値する。家族性副甲状腺機能低下症・家族性低 Ca 尿性高 Ca 血症の各家系で、それぞれカルシウム受容体 Phe788Cys・Arg220Trp 変異を認め家系内疾患との連鎖があり前者は機能解析を終了した。しかし同じ病態を呈する症例でも、カルシウム受容体に異常を認めない症例がいた事は未知の因子を含めたさらなる検討が必要な事を示している。PTH/PTHrP 受容体・カルシウム受容体の解析結果は将来の研究につながるものである。

### 【緒言】

私どもは新生児期に発見される高ならびに低カルシウム(Ca)血症の病因に未知の因子があることを報告してきた(1)。また血液の Ca の恒常性は生命現象の基盤であるが、副甲状腺ならびに腎臓における Ca の感知ならびに副甲状腺ホルモン分泌並びにその作用がこの恒常性の維持を行う事が明らかとなった。これらの成因・病態を理解し治療管理を向上させる目的で副甲状腺ホルモン(PTH)受容体ならびに副甲状腺カルシウム受容体について症例からの検討を加えた。3年間の総括として報告する。

### 【対象・方法】

偽性副甲状腺機能低下症 Ib7 例、Ia5 例。主として新生時期に発見された、

副甲状腺機能低下症 3 家系 9 例、低 Ca 尿性高 Ca 血症の病態を呈する 2 家系 7 例、Jansen 骨幹端異形成症候群 1 例。cell line の作製。PTH/PTHrP 受容体については、(RT)-PCR-direct sequence 法、Southern blot。偽性副甲状腺機能低下症 Ib1 例で腎臓で有力な P3promoter に A-rich repeat の過剰増幅を認め、変異 promoter を luciferase reporter vector に組み込み活性を検討した。副甲状腺 Ca 受容体については全てのコード領域を含む exon2-6 を PCR 法で増幅し、塩基配列を調べた。家系内の塩基配列の linkage 解析は PCR-SSCP 法ならびに PCR-RFLP 法でおこなった。

#### 【結果・考案】

(PTH/PTHrP 受容体機能亢進症の同定) 新生児期より管理された、骨幹端異形成・低身長・高 Ca 血症を伴う例で RT-PCR -直接塩基配列法で Arg227His の変異を認めた。Jueppner らの報告と同一部位であったが、本例は mRNA から解析のなされた初例であり、ゲノム DNA では heterozygous 変異が mRNA では異常 allele の発現が多かった点が注目される (2)。後者については PTH 受容体の heterozygous な遺伝子異常で致死性の骨異形成症を呈する症例で、正常な PTH/PTHrP 受容体遺伝子が発現されておらず異常 allele のみ認めると最近 Silve らにより報告された (3)。この両報告が異常 allele expression のみの発現において一致することは今後検討すべき注目すべき所見と思われる。

#### (偽性副甲状腺機能低下症 Ib における PTH/PTHrP 受容体異常の検討)

偽性副甲状腺機能低下症 (PHP)Ib は、症状から腎臓特異的 PTH 受容体異常と考えられている (4)。昨年度は PTH 受容体の新しいプロモーター-3 に関しプロモーター活性を抑制すると考えられるメチル化の異常はないことを報告した。最小プロモーター活性に必要な同部の塩基配列は、1 例で A-rich repeat の過剰を homozygous で認めた。他の 6 例の PHPIb 並びにコントロールでは、この変異を認めなかった。本例の母にも homozygous の過剰配列があり母は血中 Ca は正常であるが血中 PTH は高値を呈した点は興味深い。A-rich repeat 過剰を伴う promoter と wild-type promoter を luciferase reporter vector に組み込み検討した。A-rich repeat の過剰により promoter 活性は約 85% に減弱した ( $p < 0.05$ .)。今後 A-rich repeat の過剰配列の意義の検討が必要である。

#### (副甲状腺・腎臓カルシウム受容体異常症)

## 1.低カルシウム血症

昨年度は家族性副甲状腺機能低下症の 1 家系においてカルシウム受容体第 5 膜貫通部位にあると考えられる Phe788Cys 変異を HEK293 を用いた発現実験で、機能亢進型の異常である事を確認し血中 Ca に対する感受性が亢進する事で重篤な高 Ca 尿症を伴う副甲状腺機能低下症を来す事を明らかにした(5)。著明な低 Ca 血症と高 Ca 尿症を伴いカルシウム受容体機能亢進型異常が想定された新生児期より診断された副甲状腺機能低下症の 1 家系でカルシウム受容体の塩基配列の異常は認めなかった。これらの事から新生時期に診断される重篤な高 Ca 尿症を伴う副甲状腺機能低下症の原因は Ca 受容体のコード領域の異常だけでなく、他の因子を考慮すべきことが示唆された。

## 2.家族性低 Ca 尿性高 Ca 血症

2 家系の本症を解析した。1 家系は 1 歳で高 Ca 血症で発見された発端者から見つかった 3 世代 6 例に及ぶ低 Ca 尿性高 Ca 血症の症例、他の 1 家系は乳児期より発達遅延で発見された例である。

カルシウム受容体 exon4 にある codon220 の Arg が Trp に変異する missense 変異ならびに exon7 の codon592 の Thr が Asp に変化する変異を家族例で見いだした。家族内の linkage 解析を PCR-SSCP ならびに oligonucleotide hybridization 法で家族解析を行ったところ、codon592 の変異は高 Ca 血症と連鎖せず、アミノ酸置換を伴う新しいカルシウム受容体の polymorphism と考えられた。Arg220Trp の変異は高 Ca 血症と連鎖しており機能解析を予定している。孤発例では異常がなかった。

### 【今後】

偽性副甲状腺機能低下症については P3 promoter の検討を継続するとともに、Jueppner らの責任遺伝子報告(6)を踏まえ本症の病因の解明に至ると考えられる。さらに、私どもが見出した、家族性副甲状腺機能低下症と感音性難聴を伴う家系は、cell-line も樹立され、責任遺伝子座に至る解析を予定している(7)。

【謝辞】本研究で検討した症例の一部は、長野県立須坂病院・新川一雄先生、埼玉寄居こども病院・松本生先生、埼玉医科大学・大竹明・佐々木望先生、横浜市立大学・菊地信行先生、熊本大学・西山宗六先生のご協力で検討したものである。

### 【文献】

1. Minagawa M, Yasuda T, Kobayashi Y, Niimi H. Transient neonatal hypoparathyroidism with elevated parathyroid hormone and normal cAMP production. *European J Endocrinology* 133: 151–155, 1995
2. Minagawa M, Arakawa K, Takeuchi S, Minamitani K, Yasuda T, Niimi H. Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia: analysis of the parathyroid Hormone (PTH)/PTH-related protein receptor messenger RNA by the reverse transcriptase-polymerase Chain Method. *Endocrine J* 44:493–496, 1997.
3. Jobert AS, Zhang P, and Silve C et al. Absence of functional receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Blomstrand chondrodysplasia. *J Clin Invest* 102: 34–40, 1998.
4. Bettoun JD, Minagawa M, Kwan MY, Lee HS, Yasuda T, Goltzman D, Hendy GN, White JH. Cloning and characterization of the promoter regions of the human parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTHrP) gene: Analysis of DNA from normals and patients with pseudohypoparathyroidism type Ib. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1031–1040, 1997.
5. Watanabe T, Bai M, Lai CR, Matsumoto S, Niimi H, Brown EM, Yasuda T. Familial hypoparathyroidism: Identification of a novel gain-of-function mutation in transmembrane domain 5 of the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2497–2502, 1998
6. Juppner H, Schipani E et al. The gene responsible for pseudohypoparathyroidism type Ib is paternally imprinted and maps in four unrelated kindreds to chromosome 20q13.3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 95(20):11798–11803, 1998.
7. Watanabe T, Mochizuki H, Kohda N, Minamitani K, Minagawa M, Yasuda T, Niimi H. Autosomal dominant familial hypoparathyroidism and sensorineural deafness without renal dysplasia. *European J Endocrinology* 139:631–634, 1998.

## 副甲状腺機能異常症におけるカルシウム感知受容体の解析

東京大学医学部附属病院分院内科1、徳島大学第一内科2

福本誠二1、千勝典子1、松本俊夫2

### 【研究要旨】

副甲状腺カルシウム感知受容体(calcium-sensing receptor: CaSR)は、副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone: PTH)分泌調節に必須の分子としてクローニングされた1)。CaSRの機能、あるいは発現の変化は、PTH分泌異常から種々のCa代謝異常症の原因となると考えられる。そこで本研究では、PTH分泌亢進に基づく高Ca血症において、CaSRの異常を検討した。まず原発性副甲状腺機能亢進症として手術されたものの、術後も高Ca血症が持続した2症例の白血球DNAを用い、PCR産物のdirect sequenceによりCaSR遺伝子の変異を検出した。この変異CaSRをin vitroで発現させることにより、これらが不活性型変異であることを証明した。またこれらの患者の副甲状腺組織は過形成を示したことから、CaSRは血中Ca濃度の感知に加え、副甲状腺細胞の増殖の調節にも作用していることが示唆された。一方原発性副甲状腺機能亢進症惹起腺腫においては、CaSR発現の低下が報告されている2,3)。そこでCaSR発現調節機序を明らかにするために、ヒトCaSR遺伝子5'端をクローニングした。その結果、CaSRは少なくとも2つのプロモーターを有し、副甲状腺腺腫においてはこのうちの一つのプロモーターにより産生されるmRNA発現の低下が認められることが明らかとなった。今後さらにこのプロモーター活性の調節因子の解明が必要であると考えられる。

### 【研究目的】

血中カルシウム(Ca)濃度は、PTHと1,25-水酸化ビタミンDの作用により厳密にコントロールされている。CaSRは、このPTH分泌調節に必須の分子としてクローニングされた。従ってCaSRの機能、あるいは発現の変化は、PTH分泌異常から種々のCa代謝異常症の原因となる。しかし変異CaSRの作用やCaSR遺伝子発現調節機序については、不明な点が残されている。そこで本研究で