

は、PTH分泌亢進に基づく高Ca血症におけるCaSR異常について検討を加えた。

【研究方法】

① CaSR遺伝子変異の検討：患者白血球よりDNAを抽出し、8組のプライマーを用いてCaSRの全翻訳領域をPCRにより増幅した。Single-strand conformational polymorphism (SSCP)解析とPCR産物のdirect sequenceにより、CaSR遺伝子変異を検討した。さらに変異CaSRを発現する発現ベクターをin vitro mutagenesisにより作成し、HEK 293細胞に導入した。細胞外イオン化Ca濃度の上昇に対する細胞内イオン化Ca濃度の変化をfura-2/AMを用いて測定することにより、変異受容体の機能を解析した。

② CaSRプロモーターの検討：既報のヒトCaSR cDNA配列をもとにゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、CaSR遺伝子の5'端をクローニングした。得られたDNAをルシフェラーゼリポーターベクターにサブクローニングし、プロモーター活性を検討した。また原発性副甲状腺機能亢進症惹起腺腫におけるCaSR遺伝子の発現をNorthern blot解析により検討した。

【結果と考察】

① CaSR遺伝子変異の検討：原発性副甲状腺機能亢進症として手術されたものの、副甲状腺は全腺過形成を示し、術後も軽度の高Ca血症が持続した2症例において、CaSR遺伝子Q27R、およびP55L変異を検出した。これらの変異受容体をHEK 293に発現させ、細胞外イオン化Caの上昇に対する細胞内イオン化Ca濃度変化のEC50を測定した。野生型受容体ではEC50は3.7 mMであったのに対し、Q27R変異受容体では5.2 mM、P55L変異受容体では7.4 mMとそれぞれ上昇が認められ、これらの変異が不活性型変異であることが明らかとなった。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、CaSRは細胞外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する可能性が考えられた。

② CaSR遺伝子プロモーターの検討：遺伝子クローニングにより、ヒトCaSR遺伝子は少なくとも二つの5'非翻訳エクソン(エクソン1a、1b)を有することが明らかとなった。エクソン1a、1bの上流を組み込んだルシフェラーゼリポーターベクターを用いた検討から、それぞれの領域(1A、1B)がプロモーター活

性を有することが明らかとなった。原発性副甲状腺機能亢進症惹起腺腫においては、プロモーター1Bにより産生されるmRNAの発現量は正常腺と異ならなかったのに対し、プロモーター1Aにより産生されるmRNA発現の低下が認められた。従って今後プロモーター1Aの活性を調節する因子を明らかにすることが、原発性副甲状腺機能亢進症の病因の解明につながるものと考えられた。

【結論】

- ① CaSRの不活性型変異は、PTH分泌過剰から高Ca血症の原因となるばかりではなく、副甲状腺細胞の増殖促進、過形成の発症にも寄与する可能性がある。
- ② ヒトCaSRは少なくとも二つのプロモーターを有し、原発性副甲状腺機能亢進症惹起腺腫ではその中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。

【参考文献】

- 1) Brown EM, Gamba G, Riccardi D, et al: Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993; 366: 575-580.
- 2) Kifor O, Moore Fd Jr, Wang P, et al: Reduced immunostaining for the extracellular Ca²⁺-sensing receptor in primary and uremic secondary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1598-1606
- 3) Gogusev J, Duchambon P, Hory B, et al: Depressed expression of calcium receptor in parathyroid gland tissue of patients with hyperparathyroidism. *Kidney Int* 1997; 51: 328-336

Ca 受容体発現と PTH 分泌異常の関係について

東北大学第二内科

水梨一利

[研究要旨]

原発性副甲状腺機能亢進症は、sigmoid 曲線の変移、血清 PTH の最大値及び最小値、血清 PTH の基礎値/最大値比により、sigmoid 曲線が右上方に変移している群、曲線の右方への変移のみ認められ血清 PTH の基礎値/最大値比の上昇が認められない群、曲線の右方への変移と血清 PTH の基礎値/最大値比の上昇が認められる群に分類し得ることが明らかとなった。副甲状腺組織における Ca 受容体の発現は、sigmoid 曲線の変移、血清 PTH の最大値、血清 PTH の血清 PTH の基礎値/最大値比のいずれとも単独では明らかな相関関係は認められなかったが、血清 PTH の最大値あるいは血清 PTH の基礎値/最大値比のいずれかが上昇している症例において、その発現が低下していることが明らかとなった。以上より、血清 PTH の最大値に対する基礎値の比は、Ca 受容機構の異常の新たな指標として PTH 分泌能の評価に有用と考えられる。

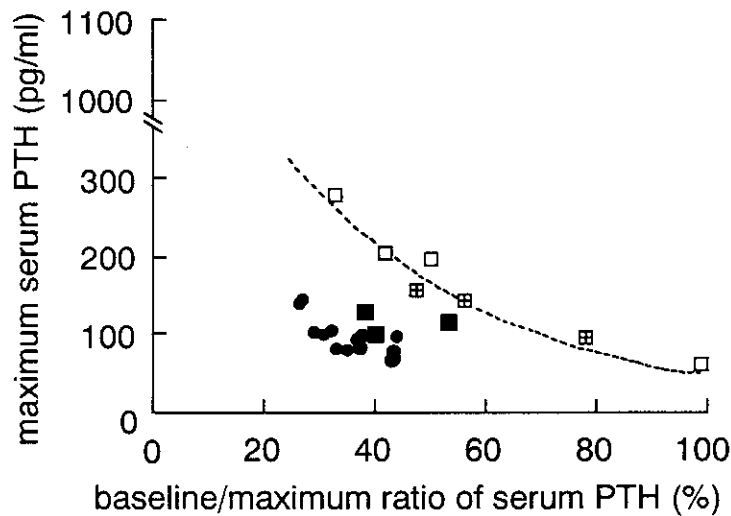
[研究目的] 血清 Ca と血清 PTH の関係を示す sigmoid 曲線の左方への変移は、原発性副甲状腺機能亢進症においては右方へ変移し、PTH 分泌低下による特発性副甲状腺機能低下症と PTH 不応により PTH 分泌亢進を示す偽性副甲状腺機能低下症においては左方に変移していた。特発性副甲状腺機能低下症と偽性副甲状腺機能低下症においては、ビタミン D 投与後に sigmoid 曲線が右方に変移し、血清 Ca の基礎値と set-point の間には正の相関関係が認められ。以上の結果より、ビタミン D が直接あるいは細胞外 Ca の上昇を介して、PTH 分泌と細胞外 Ca の関係を reset したと考えられ¹⁾。また、特発性副甲状腺機能低下症と偽性副甲状腺機能低下症いずれにおいても、血清 PTH の基礎値/最大値比は高値を示し、1, 25 (OH) 2D 投与後、曲線の下方変移とともに血清 PTH の基礎値/最大値比も低下した²⁾。そこで、細胞外 Ca に対する感受性が低下していると考えられている原発性副甲状腺機能亢進症患者から摘出された副甲状腺腺腫における細胞外 Ca 受容体の

発現異常と術前に得られた sigmoid 曲線の変移の関係を検討するとともに、副甲状腺の細胞外 Ca に対する感受性の指標として我々が新たに提唱している血清 PTH の基礎値と最大値の比の有用性を検討した。

[研究方法] 原発性副甲状腺機能亢進症患者において、クエン酸を持続静脈注射し、その投与量を段階的に増加させる (0.75~5.25 mg Ca/kg/hour) ことによる低 Ca 刺激およびグルコン酸 Ca の持続静脈注射 (11~88 mg citrate/kg/hour) による高 Ca 刺激に伴う血中イオン化 Ca 濃度と血清 intact PTH 値の変動を測定する。これによって得られた sigmoid 曲線を従来の 4 パラメーター法を用いた解析とともに、血清 PTH の基礎値/最大値比を用いて分析し、本症患者における細胞外 Ca 依存性の PTH 分泌異常を解析した。

更に摘出された副甲状腺腺腫における細胞外 Ca 受容体を、Allen Spiegel と Paul Goldsmith (NIDDK, NIH) より供与された mouse monoclonal anti-human CaR antibody (ADD) を用いて、免疫染色した。受容体染色陽性の細胞の割合を計測し、これと B/M 比を含む sigmoid 曲線の各パラメーターとの関係を検討した。

[結果と考察] 副甲状腺機能亢進症においては、sigmoid 曲線の変移、血清 PTH の最大値及び最小値、血清 PTH の基礎値/最大値比により、sigmoid 曲線が右上方に変移している群、曲線の右方への変移のみ認められ血清 PTH の基礎値/最大値比の上昇が認められない群、曲線の右方への変移と血清 PTH の基礎値/最大値比の上昇が認められる群に分類し得ることが明らかとなった²⁾。副甲状腺腺腫における Ca 受容体の発現は、sigmoid 曲線の変移、血清 PTH の最大値、血清 PTH の血清 PTH の基礎値/最大値比のいずれとも単独では明らかな相関関係は認められなかったが、血清 PTH の最大値あるいは血清 PTH の基礎値/最大値比のいずれかが上昇している症例において低下していることが明らかとなった³⁾。



副甲状腺腺腫における受容体染色陽性の細胞： □ 25 % 以下、⊠ 25-45%、■ 45 %.
 Maximum serum PTH (pg/ ml) = 607 x exp [-0.0256 x baseline level/ maximum level ratio of serum PTH (%)], $r=0.706$, $P<0.02$. ● 正常者.

[結論] Ca 受容機構の異常は、PTH の最大分泌あるいは最大分泌に対する基礎分泌の比の異常のいずれかに関与している可能性が示唆された。更に、血清 PTH の最大値に対する基礎値の比は、PTH 分泌機能評価に有用な新たな指標と考えられる。

[参考文献]

1. Mizunashi K et al. Sigmoidal curve shift in idiopathic hypoparathyroidism and pseudohypoparathyroidism *Calcif Tissue Int* 62:290-294.1998
2. Mizunashi K et al. The ratio of baseline level / maximum level of serum PTH in pseudohypoparathyroidism and primary hyperparathyroidism. *Calcif Tissue Int* 62:99-103.1998
3. Mizunashi K et al. Relationship between Ca-dependent change of serum PTH and extracellular Ca²⁺-sensing receptor expression in parathyroid adenoma *Calcif Tissue Int* 1998 (in press)

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

神戸大学医学部第三内科

金谷 政則、杉本 利嗣、千原 和夫

[目的] 偽性副甲状腺機能低下症(PHP)はPTHに対し腎臓が抵抗性を示すことを特徴とする(1,2)。当初、PHP症例の骨もPTHに対し抵抗性を示すと考えられたが、臨床的に骨がPTHに反応することを示唆する症例が存在することが報告されてきた(3-9)。更に最近では、過剰のPTHに骨が反応していると考えられるPHP症例の骨芽細胞様細胞が実際にin vitroでPTHに反応を示すことが報告された(10,11)。このようにPHP症例の骨はPTHに反応性を有することが示されてきているが、PHPにおいて骨密度、骨代謝マーカーの観点から、PTHに対する骨の反応性の有無を詳細に検討した報告はない。今回、この点を明らかにする目的で、PHP、特発性(IHP)あるいは術後性副甲状腺機能低下症(OHP)の骨密度、骨代謝マーカーを測定し、内因性PTHとの関係を詳細に比較検討した。

[方法] 対象はPHP患者10例[Ia型2例(Albright's Hereditary Osteodystrophy(AHO)(+)、Gs活性低下)、Ib型8例](44.1±5.1歳)、IHP患者5例(50.2±5.6歳)、OHP患者14例(49.9±4.6歳)である。ビタミンD[1 α (OH)D₃]投与量はPHP 1.90±0.16、IHP 2.80±0.25 μ g/day、血中1,25(OH)₂D₃レベルはPHP 17±4、IHP 48±17 pg/mlであり、両群間で有意差を認めず。腰椎および大腿骨頸部骨密度はDXA、前腕骨骨密度はSPAにて測定し年齢および性で補正したZ-scoreであらわした。骨代謝マーカーは血清オステオカルシン(BGP)、骨型ALP、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ(TRAP)活性、尿中ピリジノリン(pyr)、D-pyrを測定した。

[結果と考察] BGP、TRAP活性、pyr、D-pyrがPHP群でIHP+OHP群に比し有意に高値を示した。骨密度Z-scoreは大腿骨頸部でPHP群がIHP+OHP群に比し有意に低値を示し、他の部位でもPHP群の方が低値傾向を示した。以上のことから、PTHがほとんど存在しないIHP+OHP群とは異なり、PHP群ではPTHが骨代謝回転に促進的に作用し、その結果としてIHP+OHP群に比し骨量が低下していることが示唆された。副甲状腺機能低下症全例の検討において、intact PTH値とBGP、TRAP活性、D-pyrは有意の正の相関(それぞれ $r=0.471, 0.536, 0.533$)を示した。一方、intact PTH値と腰椎骨密度は有意の負の相関($r=-0.598$)を示し、他の部位においても負の相関傾向を示した。PHP群のみの検討においてもintact PTH値と腰椎骨密度は有意

の負の相関($r = -0.722$)を示した。 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ 投与量および血中Ca値を正常に保つための血中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 値はIHP群に比しPHP群で有意に低く、PHP群において $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ 投与量と骨代謝マーカーは負の相関傾向($r = -0.55$)を示したことから、骨反応性を有するPHP例ほど血中Ca濃度を維持するための活性型ビタミンD投与必要量が少ないと考えられた。以上のことから、PHPではheterogeneityは存在するが、活性型ビタミンD補充状態では、骨がPTHに対し反応性を有する例が多く、その結果、PTHは骨代謝回転に促進的に作用し、IHPやOHP群に比し骨量を低下させるものと考えられた。従来報告されているように(12,13)、IHP+OHP群では、いずれの測定部位においても骨密度Z-scoreが高かった。PHPではIHP+OHP群に比し大腿骨頸部骨密度Z-scoreが有意に低く、その他の部位でも同様の傾向を認めた。しかし、PHP群においても骨量が比較的維持されている理由として長年にわたるビタミンD治療が影響している可能性が考えられた。

1962年にKolbら(3)やSingletonら(4)によって生化学的にはPHPであるにもかかわらずosteitis fibrosaの所見を有する症例が報告されてから、同様の症例が続いて報告され(5-9)、PHPのなかで内因性PTHに骨が反応する症例が存在することが示唆されてきた。PTHに対し骨が反応していることを示唆する報告例ではAHOの所見を有さないものが多いが、AHOを有する症例も含まれている。1993年、1996年にそれぞれPHP Ib型、PHP Ia型症例の骨芽細胞様細胞がPTHに反応することがin vitroで示された(10,11)。Ia型の発症機序に関してはGs α 遺伝子の異常にもとづくGs蛋白活性低下が考えられてきた。Ia型で線維芽細胞でのGs α mRNA量が正常者の50%以下に低下している症例が存在するほか、その発現量には変化がないものの各種の点突然変異をもつ症例が報告されている(14,15)。今回の検討でIa型は2列のみであり、Ia型でのPTHに対する骨の反応性の有無を明らかにすることはできないが、骨代謝マーカーの検討から、1例はPTHに対し骨が反応性を有していることを示唆している一方で、もう1例は反応性が乏しいと考えられた。したがってPTHに対する骨の反応性という点でIa型にもheterogeneityが存在することが示唆された。Ia型の家族内にAHOを合併するもののCa代謝には異常を認めない偽性偽性副甲状腺機能低下症(pseudo PHP)の例が存在し、これらの例でもGs蛋白の低下が証明されている。このことは骨・軟骨細胞におけるGs蛋白の障害がAHOを惹起している可能性を示唆するとともに、Ca代謝異常の発症にはGs蛋白の異常のほかにさらになんらかの要因が存在することを示している。一方、Ia型の骨でもPTHに反応性を有する例が存在することから、このunknownのfactorがIa型での骨の反応性のheterogeneityに関わっている可能性があり、さらには、Gs蛋白の異常が腎などに特異的である可能性も否定できない。Gs蛋白に異常を認めないIb型ではAHOを有さず、

PTH/PTHrP受容体の異常が病因として想定されてきた。SuarezらはIb型患者の皮膚線維芽細胞中のPTH受容体mRNAの発現量を検討し、健常者の約20%にまで低下している例と変化が見られない例があることを示した(16)。このことからIb型にもheterogeneityが存在することが示唆された。一方、Schipani(17)やFukumotoら(18)によりIb型のPTH/PTHrP受容体遺伝子やmRNAの異常は否定された。PTHrP遺伝子あるいはPTH/PTHrP受容体遺伝子を破壊されたノックアウトマウスは発生過程で骨・軟骨の異常を呈することが示され(19,20)、PTH/PTHrP受容体を介する情報伝達が正常の骨・軟骨発生に必須であることが明らかにされた。PTH/PTHrP受容体あるいはPTHrPノックアウトマウスに認められる形態異常の一部はAHOに認められるものと類似することから、ヒトにおいても胎生期のPTH/PTHrP受容体を介する情報伝達は骨・軟骨発生に必須であり、Gs蛋白異常などを介する情報伝達の異常によりAHOがもたらされる可能性が考えられる。PTH/PTHrP受容体の異常として逆に活性型変異によるJansen型骨幹端軟骨異形成症が知られている(21)。一方、PTH/PTHrP受容体の機能消失によりBlomstrand chondrodysplasiaを生ずることが証明され(22)、骨・軟骨形成にPTH/PTHrP受容体が重要な役割を果たすことがさらに確かめられた。これらの報告はAHOを有さないPHP Ib型においてPTH/PTHrP受容体遺伝子に異常がないとの報告(17,18)と一致する。以上のことからIb型では骨においてPTH/PTHrP受容体を介した情報伝達が正常に機能し骨がPTHに対し反応性を有している可能性が高いことが示唆される。過去の報告でも、osteitis fibrosaを呈する症例はIb型に多く、今回の検討でもIb型症例はPTHに対しおおむね反応していると考えられた。しかし、2症例において骨の反応性が低かったことから、Ib型においてPTH受容体発現量に組織特異性が存在する可能性も考えられた。今回はIa型症例が少なくIa型とIb型の比較ができなかった。今後、さらに症例数を増やしIa型とIb型の骨の反応性の違いを明らかにしたい。最近、Ib型の遺伝的家系解析により、その原因遺伝子が染色体20qのtelomeric endにあること、遺伝様式はPHP Ia型と同様であることが見い出されている(23)。このように、PHPの遺伝形式や原因遺伝子が徐々に明らかにされつつあるが、未解決の点が多く、それぞれの病型とPTHに対する骨の反応性(組織特異性)との関係や、それぞれの病型と骨におけるPTHのシグナル伝達との関係については今後の課題である。

[結論] 今回の骨代謝マーカー、骨密度測定の詳細な検討より、PHPの多くの例では骨はPTHに反応性を有していること、IHPおよびOHPに比し少量のビタミンD補充で血中Ca濃度を維持できるのは活性型ビタミンD補充により腎遠位尿細管のみならず骨もPTHに反応性を有するためであるものと考えられた。

[文献]

- 1) Albright F, Burnett CH, Smith PH, et al : Pseudohypoparathyroidism: an example of "Seabright-Bantam syndrome." *Endocrinology* 1942;30 :922-932.
- 2) Breslau NA: Pseudohypoparathyroidism: current concepts. *Am J Med Sci* 1989; 298: 130-140.
- 3) Kolb FO, Steinbach HL: Pseudohypoparathyroidism with secondary hyperparathyroidism and osteitis fibrosa. *J Clin Endocrinol Metab* 1962; 22: 59-70.
- 4) Singleton EB, Teng CT: Pseudohypoparathyroidism with bone changes simulating hyperparathyroidism: report of a case. *Radiology* 1962; 78: 388-393.
- 5) Allen EH, Millard FJC, Nassim JR: Hypo-hyperparathyroidism. *Arch Dis Child* 1968; 43: 295-301.
- 6) Cohen RD, Vince FP: Pseudohypoparathyroidism with raised plasma alkaline phosphatase. *Arch Dis Child* 1969; 44: 96-101.
- 7) Frame B, Hanson CA, Frost HM, et al: Renal resistance to parathyroid hormone with osteitis fibrosa: "Pseudohypohyperparathyroidism." *Am J Med* 1972; 52: 311-321.
- 8) Kidd GS, Schaaf M, Adler RA, et al: Skeletal responsiveness in pseudohypoparathyroidism: A spectrum of clinical disease. *Am J Med* 1980; 68: 772-781.
- 9) Kruse K, Kracht U, Wohlfart K, et al: Biochemical markers of bone turnover, intact serum parathyroid hormone and renal calcium excretion in patients with pseudohypoparathyroidism and hypoparathyroidism before and during vitamin D treatment. *Eur J Pediatr* 1989; 148: 535-539.
- 10) Murray TM, Rao LG, Wong MM, et al: Pseudohypoparathyroidism with osteitis fibrosa cystica: direct demonstration of skeletal responsiveness to parathyroid hormone in cells cultured from bone. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 83-91.
- 11) Ish-Shalom S, Rao LG, Levine MA, et al: Normal parathyroid hormone responsiveness of bone-derived cells from a patient with pseudohypoparathyroidism. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 8-14.
- 12) Abugassa S, Nordenström J, Eriksson S, et al: Bone mineral density in patients with chronic hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 1617-1621.
- 13) Fujiyama K, Kiriya T, Ito M, et al: Attenuation of postmenopausal high turnover bone loss in patients with hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2135-2138.

- 14) Patten JL, Johns DR, Valle D, et al: Mutation in the gene encoding the stimulatory G protein of adenylate cyclase in Albright's hereditary osteodystrophy. *N Engl J Med* 1990; 322: 1412-1419.
- 15) Schwindinger WF, Miric A, Zimmerman D, et al: A novel Gs α mutant in a patient with Albright hereditary osteodystrophy uncouples cell surface receptors from adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1994; 269: 25387-25391.
- 16) Suarez F, Lebrun JJ, Lecossier D, et al: Expression and modulation of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acid in skin fibroblasts from patients with type Ib pseudohypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 965-970.
- 17) Schipani E, Weinstein LS, Bergwitz C, et al: Pseudohypoparathyroidism type Ib is not caused by mutations in the coding exons of the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1611-1621.
- 18) Fukumoto S, Suzawa M, Takeuchi Y, et al: Absence of mutations in parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor cDNA in patients with pseudohypoparathyroidism type Ib. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2554-2558.
- 19) Amizuka N, Warshawsky H, Henderson JE, et al: Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *J Cell Biol* 1994; 126: 1611-1623.
- 20) Lanske B, Karaplis AC, Lee k, et al: PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 1996; 273: 663-666.
- 21) Schipani E, Kruse K, Jüppner H: A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science* 1995; 268: 98-100.
- 22) Jobert AS, Zhang P, Couvineau A, et al: Absence of functional receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Blomstrand chondrodysplasia. *J Clin Invest* 1998; 102: 34-40.
- 23) Jüppner H, Schipani E, Cole DEC, et al: The gene responsible for pseudohypoparathyroidism type Ib is paternally imprinted and maps in four unrelated kindreds to chromosome 20q 13.3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11798-11803.

二次性腎性副甲状腺機能亢進症に影響する遺伝子多型

大阪市立大学医学部 第二内科

田原英樹、森井浩世

[研究要旨]

前年度、慢性腎不全に伴う二次性副甲状腺機能亢進症の腫瘍増殖度に VDR 遺伝子多型の BstI polymorphism が関与している可能性を報告したが、症例数が 37 名であったため、今回は症例数を 65 名まで増やして同様の検索を行った。やはり b allele を持つもののほど腫瘍の増殖度が高いことが示唆された。また、TaqI 及び ApaI polymorphism とは有意な関係は認められなかった。尚、腫瘍の大きさと血中 Intact-PTH 値とに相関が認められるという報告があるため、PTx をまだ行っていない男性透析患者 300 名の DNA を用いて PTH 値と BstI polymorphism との関係を検討した結果、有意差は認められなかったが、b allele を持つ患者では PTH 値が高い傾向を示した。同様にしてカルシウム感知受容体 (CASR) 遺伝子、及びエストロゲン受容体遺伝子の多型についても検討したが、これらの遺伝子多型と腫瘍の増殖度の間には有意な関係は認められなかった。

[研究目的]

長期透析患者において、二次性副甲状腺機能亢進症は重要な合併症の一つであるが、その副甲状腺過形成がどのような成因によって進展していくのかは全く不明である。また、近年問題になっている相対的副甲状腺機能低下症で見られるように、長期間透析を受けている患者においても、その血中 PTH レベルの動きは透析内容や原疾患に関わらず一定しない。また最近、長期透析患者の血中 PTH 値が副甲状腺の肥大度に関連しているという報告が散見されるが、それらの成因に関しても不明な点が多い。本研究では、これら長期透析患者における、血中 PTH 値や副甲状腺の腫大度が代謝面だけでなく、遺伝的に何か影響を受けていないか否かを検討するために、関連の深いホルモン受容体の遺伝子多型を検索した。

[研究方法]

PTx を受けていない男性透析患者 300 名、および PTx を受けた患者 65 名の末梢白血球より DNA を抽出し解析に用いた。候補遺伝子として、ビタミン D 受容体 (VDR)、カルシウム感知受容体 (CASR)、エストロゲン受容体 (ESTR) の遺伝子多型について検索をした。VDR に関しては、従来よりよく検討されている BstI, TaqI, ApaI 多型について PCR 法により解析を行った。CASR に関しては exon 6、および ESTR に関しては 5'-UTR 部分の polymorphism を PCR 法により検討した。

[結果と考察]

VDR に関しては、まず PTx を受けた患者で検討した結果、腫瘍の大きさ～重量は唯一 b allele に相関することが示唆された。b allele の数に比例して腫瘍の大きさ～重量が大きいことが示唆された(ANOVA; $p=0.023$)。但し、同群において透析期間、血中 Ca, P, PTH レベルには有意差は認められなかった。また、Taq I 及び Apa I polymorphism とは相関は認められなかった。尚、最近透析患者の血中 PTH 値が副甲状腺の肥大度と関連しているという報告があるため、PTx を受けていない患者でこの b allele と Intact-PTH の値を比較した結果、有意差は認めないものの b allele の数に相関して Intact-PTH 値が高くなる傾向を示した。

CASR 及び ESTR でも同様の検討を行ったが、腫瘍の進展度に関しては特に有意な相関は認められなかったが、血中 Intact-PTH 値に関しては有意差は認めないものの、これらの遺伝子の多型性によって影響を受けている可能性(傾向)が示唆された。

[結論]

慢性腎不全による透析患者では、その副甲状腺の肥大には遺伝的な影響が少なからず存在することが今回の研究にて判明した。特に VDR の Bst I polymorphism はその腫瘍の進展度(予後)を予想する上で、一つのマーカーになり得る可能性が示唆された。今後、症例数を増やし、他の遺伝子多型を用いてパネル化することにより、患者の合併症についての予後をもう少し正確に把握できる可能性が示唆された。

[参考文献]

- Imanishi Y and Tahara H et al, J Bone Miner Res. 12 (suppl 1) : S180, 1997
Imanishi Y and Tahara H et al, Endocrine Society (80th annual Meeting) P3-545, 1998
Palanisamy N and Tahara H et al, Bone 23 (suppl): S188, 1998
田原英樹 CLINICAL CALCIUM 8(5): 44-47, 1998

ビタミンD受容機構の性腺における役割に関する研究

清野佳紀
岡山大学小児科

研究要旨

性腺には古くよりビタミンD受容体の存在が確認されていたが、その意義については全く解明されていなかった。我々は、加藤らの作成したビタミンD受容体ノックアウトマウス(VDRKO)の子宮が萎縮していることに着目し、ビタミンDによるエストロゲン産生調節機構を明らかにすることを目的に、VDRKOマウスのアロマターゼ活性について検討した。この結果、VDRKOでは男女両性腺におけるアロマターゼ活性は著しく低下していること、このアロマターゼ活性低下はカルシウムの補正によっても完全には回復しないことを見出した。

研究目的

性腺には Stampf らの成績などからビタミンD受容体(VDR)の存在が確認されていた。しかしながら、このVDRの生理的意義は明らかにはされていない。

最近、我々は広範な腸管切除術のあと脂溶性ビタミンの吸収障害の結果、ビタミンDの著しい低下を思春期に來たした男性症例を経験した。本症例ではビタミンDの充足度をあらわすとされる25OHDの濃度は感度以下であり、1,25(OH)2Dも正常下限と著しいビタミンD欠乏状態であった。さらに、興味あることに22才という年齢であるにもかかわらず、骨X線写真では成長軟骨の存在が確認され、二次性徴も遅滞していた。血中のエストロゲンは測定感度以下であったのに対し、テストステロンは正常範囲にあった。その後活性型のビタミンDを投与することによって6ヶ月後には血中エストロゲン値は正常男性レベルに復した。ビタミンDと性腺機能の関連を示唆する重要な症例と考えられる。

さらに、加藤らによって作成されたVDRKOマウスは子宮の低形成をきたすと報告もまた、ビタミンDと性腺機能の関連を示唆する。

そこで、ビタミンDによるエストロゲン産生調節機構を明らかにすることを目的に、VDRKOマウスのアロマターゼ活性について検討した。

方法

加藤より供与されたVDRKOマウスを当施設において、系統維持した。マウスはヘテロで維持し実験にはヘテロ間の交配によって作出したVDRKOのホモの個体を生後数日のうちにPCR方により同定した。

マウスは生後4週齢で離乳し、以降MF-1(オリエンタル酵母)、蒸留水のad.lib摂取で飼育し実験に用いた。

カルシウムの補充はカルシウム2%リン1.25%ラクトース20%の食餌で飼育することにより行った。

アロマターゼ活性は卵巣、睪丸、精巣上体のホモゲネートを3H-androstenedioneとインキュベートし放出される水の放射活性を測定することにより行った。また同時にアロマターゼ遺伝子発現をRT-PCR方により検討した。

結果

図1に示すように卵巣におけるアロマターゼ活性はVDRKOではワイルドの約25%と著しい低下を示した。

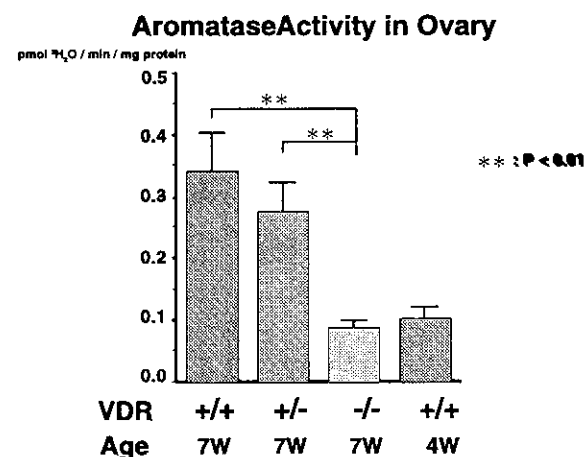


図1 卵巣におけるアロマターゼ活性

この活性は離乳直後の正常マウスのもと同程度である。さらに、RT-PCRではアロマターゼ遺伝子の発現はほとんど確認できなかった。

男性性腺における活性低下も図2に示すように明らかで、雌同様RT-PCRで遺伝子発現を確認することは

困難であった。

最近エストロゲン受容体ノックアウト雄マウスにて不妊が報告されており、エストロゲンの作用が精子形成にも重要であることが明らかとなっているので、本マウスにおいても精子形成能についても検討した。

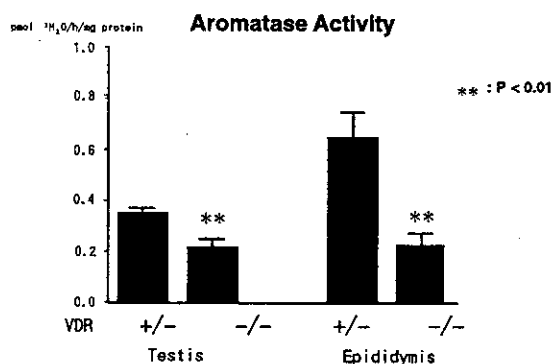


図2 男性性腺におけるアロマターゼ活性

図3に示すように VDRKO 雄の精子形成能は著しく低下しており、ERKO の場合と同様であることが確認された。

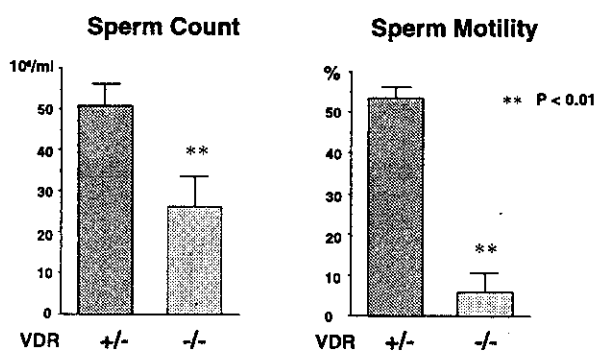


図3 精子形成能の検討

VDRKO マウスは著しい低カルシウム血症を離乳後に呈する。この低カルシウム血症がこのような変化をもたらしている可能性が考えられたため、血中カルシウム、リン濃度を食餌により正常化することを試みた。離乳後すぐに高カルシウム食により飼育すると血中のカルシウム、リン値は正常化しアロマターゼ活性の上昇を認めたが、図4に示すとおり完全に正常化するにはならず、高 LH 血症は通常食で飼育しているものと同程度であった。

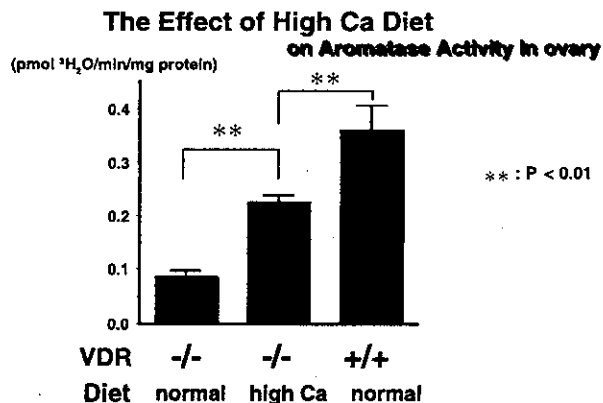


図4 カルシウム補充のアロマターゼ活性に及ぼす影響

以上の結果より、ビタミン D はエストロゲン生合成の重要な調節因子であり、その作用の一部はカルシウムを介して、また一部は直接の遺伝子発現調節を介して発揮されていることが明らかとなった。

最近、アロマターゼ遺伝子には VDRE の存在が確認されており、直接の遺伝子調節機構はこれを介しているものと考えられる。

一方、アロマターゼノックアウトマウスでは男性性腺は正常であるという報告があり、これは今回の報告と矛盾する。しかし、ヒトアロマターゼ欠損症では明らかに不妊、造精能の低下が認められることから、アロマターゼノックアウトマウスが真にアロマターゼ欠損となっているか疑問が残る。

結論

ビタミン D は両性腺におけるエストロゲン産生の重要な調節因子である。

参考文献

1. Stumpf WE. Histochemistry & Cell Biology. 104(6):417-27, 1995
2. Yoshizawa T. et al. Nature Genet 16:391-396, 1997
3. Hess RA et al. Nature 390: 509-512, 1997
4. Fisher CR. Et al. Proc Natl Acad Sci USA. 95(12):6965-70, 1998

TSH受容体異常症に関する研究

群馬大学医学部第一内科

森 昌朋, 村上正巳

研究要旨

近年、妊娠に伴いfetal-maternal cell tranlocationが起こり、産後でも母体にfetal cellが長期にわたって認められるmicrochimerismが生じ、ある種の膠原病の発症要因として注目を集めている。しかしながら、代表的な臓器特異的自己免疫疾患であり、抗TSH受容体抗体の認められるバセドウ病症例においてこの様なmicrochimerismが生じているかは不明である。また、近年TSH受容体の遺伝子異常により甲状腺機能異常が発症することが報告されているが、我が国におけるTSH受容体遺伝子異常症例についての報告は殆ど見られない。

今回、これらの知見に基づいて、男児を出産後に発症したバセドウ病症例における末梢血球中の胎児由来のY染色体遺伝子の検出、ならびに先天性甲状腺機能異常症例におけるTSH受容体遺伝子の解析を行う。

研究目的

本研究においては、TSH受容体病であるバセドウ病発症における妊娠に伴ったmicrochimerismの関与の検討ならびに先天性甲状腺機能異常症におけるTSH受容体遺伝子の解析を行うことを目的とする。

研究方法

i. バセドウ病発症におけるmicrochimerismの関与の検討

男児を出産後に母体にmicrochimerismが存在すると、胎児由来のY染色体遺伝子が母体に検出され得る可能性がある。男児を出産後にバセドウ病を発症した女性の末梢血球よりDNAを抽出し、Y染色体遺伝子のPCRによる増幅を試み、男児を出産していないバセドウ病患者あるいは男児を出産した対照者と比較検討する。

ii. TSH受容体遺伝子異常による先天性甲状腺機能異常症の解析

TSH不応症を含む先天性甲状腺機能低下症や先天性甲状腺機能亢進症の症例をスクリーニングし、TSH受容体遺伝子異常の有無について検討し、変異TSH受容体の機能を解析する。先天性甲状腺機能異常症例の末梢血球よりDNAを抽出し、PCRにてTSH受容体遺伝子を増幅後塩基配列を決定する。変異が認められたものについては変異受容体を培養細胞に発現させ、その機能を検討する。

結果と考察

i. バセドウ病発症におけるmicrochimerismの関与の検討

男児を出産後バセドウ病を発症した症例50症例および対照者について末梢血球からDNAを抽出し、その解析を行っている。女性の末梢血球からのY染色体関連遺伝子の増幅には少なからず偽陽性がみられることも報告されており、現在種々のY染色体関連遺伝子を対象としてPCRを行い、microchimerismの存在の可能性について検討している。

ii. TSH受容体遺伝子異常による先天性甲状腺機能異常症の解析

今回検討した症例のなかで先天性TSH不応症と考えられる症例においてTSH受容体遺伝子異常がその原因と思われる症例が存在した。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。

結論

バセドウ病症例のなかに妊娠に伴ったfetal-maternal cell translocationによるmicrochimerismがその発症に関与している症例が存在するか否かについては、バセドウ病の発症が男性に比べて女性に多いことを考慮すると重要な問題であり、症例を重ねた検討が必要と思われる。TSH受容体異常の検索により、我が国においてもTSH受容体遺伝子異常による先天性TSH不応症が存在する可能性が示唆され、今後の更なる検討が必要と考えられる。

参考文献

1. 村上正巳, 森昌朋: 甲状腺疾患の分子医学総論. 最新内科学体系, プロGRESS 2, 内分泌代謝疾患 (中山書店):272-278, 1997
2. Artlett,C.M., Smith,J.B. and Jimenez,S.A.: Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. N. Engl. J. Med. 338:1186-1191, 1998
3. Nelson,J.L., Furst,D.E., Maloney,S., Gooley,T., Evans,P.C., Smith,A., Bean,M.A., Ober,C. and Bianchi,D.W.: Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. Lancet 351:559-562, 1998
4. Tyndall,A. and Gratwohl,A.: Microchimerism: friend or foe? Nature Med. 4:386-388, 1998

TSH 受容体抗体病の動物モデルの作製

京都大学医学部臨床病態医科学, 同医化学*

赤水尚史, 西條美佐, 三浦晶子, 森山賢治, 松田文彦*, 本庶佑*, 中尾一和

目 的

バセドウ病は、TSH受容体自己抗体によつて引き起こされる臓器特異的自己免疫性疾患である。我々は同病の病因・発症機構・病態を明らかにするために、これまでに、自己抗原および自己抗体の両面から分子レベルで検討してきた(文献1)。すなわち、抗原であるTSH受容体の遺伝子、及び抗体であるTSH受容体抗体の遺伝子をそれぞれ自らクローニングし、それらの構造と機能を解析してきた。次なるステップとして、以下に述べるような同病のモデル動物の開発や病因遺伝子の同定などの課題がある。昨年度までに、我々はバセドウ病及び原発性甲状腺機能低下症患者リンパ球から単離された同遺伝子を利用してリコンビナントモノクローナル抗体の作製を行い(文献2-4)、同抗体の大量産生、**characterization**、エピトープの同定を行つた(文献5)。本年度は、同モノクローナル抗体の *in vivo* での活性検討、および抗体遺伝子トランスジェニックマウスのための DNA コンストラクトを作製とマウス受精卵への導入を行つた。また、自己免疫性甲状腺疾患遺伝因子の同定のために、TSH 受容体遺伝子や CTLA-4 遺伝子の候補遺伝子について、新たな日本人集団にて関連解析を行つた。

方 法

- 1)モノクローナル抗TSH受容体抗体の *in vivo* 投与：リコンビナント抗体産生骨髄腫細胞を同系マウスの腹腔内に投与し、マウス血中 **human IgG** の上昇を確認後、血中 T4、TSH を測定した。
- 2)抗体遺伝子トランスジェニックマウスの DNA コンストラクトの作製：抗TSH受容体抗体産生リンパ球のゲノム DNA から免疫グロブリン遺伝子を単離し、トランスジェニックマウス用 DNA コンストラクトを作製した。具体的には、プロモーターおよび 3'エンハンサー領域を含む **heavy chain** 遺伝子および **light**

chain 遺伝子をそれぞれ単離してベクターに組み込んだ後、両鎖遺伝子を tandem に連結した DNA コンストラクトを作製した。同 DNA コンストラクトを pre B cell line や myeloma cell line に導入し、human IgM の細胞表面への発現を FACS で、細胞外分泌を ELISA で確認した。

3) TSH 受容体遺伝子近傍に存在する(CA)_n マイクロサテライト多型(文献6)と(AT)_n (Mol Cell Endocrinol, 117:253-256, 1996)の2種類の多型マーカーを使用して、334名の日本人自己免疫性甲状腺疾患患者(AITD) (バセドウ病(G)180名、橋本病(H)99名、阻害型 TBII 陽性甲状腺機能低下症 31名(BM)、同陰性特発性粘液水腫(IM) 24名)について association study を行つた。また、CTLA-4 遺伝子の第3エクソン非コード領域のマイクロサテライト多型を用いて同様の検討を行つた。

結果と考察

1. 抗体遺伝子を用いた検討

1) モノクローナル抗 TSH 受容体抗体の *in vivo* 投与：バセドウ病患者リンパ球から得られたリコンビナント抗体 B6B7 を人工的に産生する骨髓腫細胞を同系マウスの腹腔内に投与したところ、血中 human IgG 濃度約 20 μ g/ml で有意の血中 T4 の上昇と TSH の下降を認めた。また、同様なモノクローナル抗体である 101-2 においても、同程度の血中 human IgG 濃度で有意の血中 T4 の上昇を認めた (TSH に関しては検討中) (未発表データ)。さらに、原発性甲状腺機能低下症患者リンパ球から単離されたリコンビナントモノクローナル抗体 32-5 産生の骨髓腫細胞を作製し (文献7)、マウスの腹腔内に投与したところ、有意の血中 TSH の下降を認めた (T4 に関しては検討中) (文献8)。

2) 抗体遺伝子トランスジェニックマウスの DNA コンストラクトの作製：モノクローナル抗 TSH 受容体抗体産生リンパ球 B6B7 のゲノム DNA から PCR 法によつて、プロモーターとエンハンサーを同時に含む重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子を単離した。次いで、これらを tandem につないだトランスジェニックマウス用 DNA コンストラクトを作製した (図1)。同 DNA コンストラクトを pre B cell line である K46 に stable に導入したところ、human IgM の細胞表面への発現と細胞外分泌を確認した。また、myeloma cell line である P3X63-Ag 8.653

に導入して human IgM の細胞外分泌を確認した。同 DNA コンストラクトを DNA コンストラクトを C3HBL/6 マウスの受精卵に microinject し、次いで偽妊娠 ICR マウスの卵管に卵を移植し（熊本大学・動物資源開発研究センター・鈴木操教授に依頼）、抗体遺伝子トランスジェニックマウスを作製中である。

2. 病因遺伝子の検討

TSH 受容体遺伝子(CA)_n 多型マーカーについては、113 名の正常者に比し、前回(文献 6)と同様にアレル 1 の出現頻度の有意な増加が、AITD, G, BM, IM 群において認められた(文献 9)。同(AT)_n 多型マーカーにおいても、アレル 5 と 6 の出現頻度の有意な増加が、それぞれ AITD, G, H 群と AITD, G, H, BM, IM 群とで認められ、両マーカー間の関連も示唆された。CTLA-4 遺伝子の第 3 エクソン非コード領域のマイクロサテライト多型マーカーの検討では、2 つのアレルにおいて自己免疫性甲状腺疾患での出現頻度の有意な増加を認めた。さらに興味深いことに、ある別のアレルでは同疾患およびバセドウ病での出現頻度の有意な低下を認め、疾患抵抗性を示唆した(文献 10)。

結 論

1. 3 つのリコンビナント・モノクローナル抗 TSH 受容体抗体（うち 2 つはバセドウ病患者リンパ球由来の刺激型抗体、他の一つは原発性甲状腺機能低下症患者リンパ球由来の阻害型抗体）において、*in vivo* での活性が示唆された。
2. 抗 TSH 受容体抗体遺伝子トランスジェニックマウス用 DNA コンストラクトを作製し、human IgM の細胞レベルでの発現を確認し、C3HBL6 マウス受精卵に導入した。今後、導入マウス仔のゲノム遺伝子におけるトランスジェンの存在を確認し、内分泌学および免疫学的機能解析を行う予定である。
3. 2 つの TSH 受容体マイクロサテライトや CTLA-4 において、あるアレルが日本人自己免疫性甲状腺疾患及びそのサブタイプに属する疾患の罹患感受性 locus と関連していることが示唆された。このことは、TSH 受容体や CTLA-4 が自己免疫性甲状腺疾患の病因遺伝子である可能性を示唆している。今後、同受容体遺伝子の変異の検索、さらにはゲノムスクリーニングも行う予定である。