

ンシ、ラット皮下に腫瘍を形成させたのちに¹²⁵Iを投与したところ放射性ヨードが腫瘍に集積することが確認された。これらの結果はNIS発現のためのプロモーターを適宜選択することにより、種々の癌転移巣の検出ならびにこれらの遺伝子治療に道を開くものと考えられた。

【結論】

バセドウ病におけるNIS発現の増強、NIS活性を阻害する抗NIS自己抗体の存在、乳頭癌におけるNISの発現など種々の甲状腺疾患とNISの関連を明らかにした。NIS遺伝子発現のさらなる詳細な解析、NIS活性の調節因子の検索がこれら疾患の病因・病態の解明に重要であり、NIS遺伝子の利用は種々の癌転移巣の検出ならびに治療等に新たな展開をもたらす可能性がある。

【参考文献】

1. Endo T, Kogai T, Nakazato M, Saito T, Kaneshige M, Onaya T, Autoantibody against Na⁺/I⁻ symporter in the sera of patients with autoimmune thyroid disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 224: 92-95, 1996.
2. Endo T, Kaneshige M, Nakazato M, Kogai T, Saito T, Onaya T. Autoantibody against thyroid iodide transporter in the sera from patients with Hashimoto's thyroiditis possesses iodide transport inhibitory activity. *Biochem Biophys Res Commun*: 228: 199-202, 1996.
3. Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A, Onaya T. Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology*, 138: 2227-2232, 1997.
4. Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Nakazato M, Kogai T, Onaya T. Increased expression of the Na⁺/I⁻ symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 3331-3336, 1997.
5. Endo T, Kaneshige M, Nakazato M, Ohmori M, Harii N, Onaya T. Thyroid transcription factor-1 activates the promoter activity of rat thyroid Na⁺/I⁻ symporter gene. *Mol Endocrinol*, 11: 1747-1755, 1997.
6. Kawaguchi A, Ikeda M, Endo T, Kogai T, Miyazaki A, Onaya T. Transforming growth factor β1 suppresses thyrotropin-induced Na⁺/I⁻ symporter mRNA and protein levels in FRTL-5 thyroid cells. *Thyroid*, 7: 789-794, 1997.
7. Shimura H, Haraguchi K, Miyazaki A, Endo T, Onaya T. Iodide uptake and experimental ¹³¹I therapy in transplanted undifferentiated thyroid cancer cells expressing the Na⁺/I⁻ symporter gene. *Endocrinology*, 138: 4493-4496, 1997.
8. Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Katoh R, Kawaoi A, Muramatsu A, Onaya T. Increased expression of the sodium/iodide symporter in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Invest*, 101: 1296-1300, 1998.
9. Ohmori M, Endo T, Harii N, Onaya T. A novel thyroid transcription factor is essential for thyrotropin-induced up-regulation of Na/I symporter gene expression. *Mol Endocrinol*, 12: 727-736, 1998.

バセドウ病甲状腺細胞における転写因子CIITAの発現

九大生医研・臨床免疫、*九大・三内、**野口病院

生山祥一郎、母 義明*、高柳涼一*、野口志郎**、名和田 新*

研究要旨

バセドウ病の甲状腺濾胞細胞には主要組織適合抗原(MHC) class II分子が異所性に発現し、自己免疫機序の引き金として、あるいは本症の増悪・進展に関与している。本研究では、バセドウ病の甲状腺濾胞細胞において、MHC class II遺伝子の発現に必須の転写因子であるCIITAの発現を検討し、CIITA遺伝子のどのpromoterが発現に関与しているかを検討した。バセドウ病甲状腺細胞ではCIITAの発現が認められ、interferon- γ (IFN γ)刺激により発現が増強した。また、発現にはCIITA 遺伝子のpromoter IVが関与することが明らかになった。さらにIFN γ に対するCIITA発現の増加に患者間で差が認められた。以上より、バセドウ病甲状腺細胞におけるCIITAの発現が疾患感受性にも影響している可能性が考えられた。

研究目的

バセドウ病などの自己免疫性甲状腺炎において甲状腺濾胞細胞には主要組織適合抗原(MHC) class II分子が異所性に発現され、これが自己免疫機序の引き金あるいは増悪・進展に関与すると考えられている。MHC class II遺伝子では、promoter上に存在するcis-acting element (X およびY box)とこれに結合する転写調節因子群がtrans-activatorCIITAを動員することによりその発現が制御されている¹⁾。CIITAには4つの異なるpromoterが存在することが知られており、発現する細胞や刺激によってそのusageが異なる²⁾。そこで、本研究ではバセドウ病甲状腺濾胞細胞におけるCIITA遺伝子の発現とpromoterのusage、とくにpromoter IIIとpromoter IVのusageについて検討した。

材料と方法

バセドウ病の手術時に得た甲状腺組織12例よりcollagenase/DNase処理により濾胞細胞を単離後、抗CD14抗体をコーティングした磁気ビーズ(Dynabeads M-450

CD14, Dynal, Norway)と混和して細胞浮遊液中の monocyte/macrophage を除去し、10 cm ディッシュで培養した。濾胞細胞の培養は、5%胎児ウシ血清を用いた以外はラット FRTL-5細胞の培養に準じて行った(6H medium)。培養24時間後以降にPBSで繰り返し洗浄して浮遊細胞をできる限り除去したのち、付着した甲状腺濾胞細胞をinterferon- γ (IFN γ)の非存在下または存在下(10、50、100 U/ml)で48時間培養した。この細胞よりtotal RNAを調整し、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)に供した。

CIITAのcoding regionに設定したprimerによりCIITA mRNAの発現を検討した。ついで、CIITAのpromoter IIIおよびpromoter IVから転写されるnon-coding exonに特異的な塩基配列を増幅するようにprimerを設定し、それぞれのpromoterのusageを検討した。また、陽性コントロールとして、promoter IIIによりconstitutiveにCIITAが発現しているRaji細胞、およびpromoter IVによりIFN γ でCIITAの発現が誘導されるTHP-1細胞からtotal RNAを調整して用いた。

結 果

CIITAのcoding regionを増幅するPCRにより、バセドウ病患者の甲状腺濾胞細胞ではCIITA mRNAの発現が認められ、その発現量はIFN γ 刺激により増加した。そこで、CIITA発現に関与しているpromoterを明らかにするため、promoter IIIとpromoter IVのusageを検討すると、いずれの甲状腺細胞においてもpromoter IVに特異的な配列の増幅反応のみでspecific productが得られ、promoter IIIに特異的な配列は増幅されなかった。したがって、バセドウ病甲状腺濾胞細胞におけるCIITAの発現はpromoter IVを介するものと考えられた。さらに、IFN γ で刺激した場合のCIITAの発現量の増加は甲状腺組織を得た患者間で異なる傾向があり、IFN γ に対する甲状腺組織の感受性の違いが存在する可能性が示唆された。

考 察

バセドウ病甲状腺濾胞細胞におけるMHC class II抗原の異所性発現の機序を明らかにするために、MHC class II遺伝子の転写調節に重要な役割を果たすと考えられている転写因子CIITAの発現を検討した。バセドウ病甲状腺細胞ではCIITAが発現されており、本症においてもCIITAがMHC class IIの発現に関与することは確実と

考えられる。CIITA 遺伝子には異なる 4 つの promoter が同定されている。その usage は細胞や刺激により異なるが、バセドウ病甲状腺細胞では promoter IV の使用が確認された。promoter IV は IFN γ による MHC class II 遺伝子の誘導の場合に作動する promoter であり、事実、甲状腺細胞においても IFN γ により promoter IV に特異的な exon の発現が増強した。この IFN γ による CIITA 発現増強効果には個体差があることが推察された。実際、MHC class II 抗原はバセドウ病甲状腺細胞においてより発現誘導を受けやすいことが報告されている³⁾。その原因は不明であるが、CIITA 遺伝子の promoter 領域に多型が存在する可能性も考えられる。このことがバセドウ病の疾患感受性に関連するかどうかは今後検討の余地があると考えられる。

参考文献

- 1) Abdulkadir SA, Ono SJ. How are class II MHC genes turned on and off? *FASEB J* 9:1429-1435, 1995.
- 2) Muhlethaler-Mottet A, Otten LA, Steimle V, Mach B. Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *EMBO J* 16:2851-2860, 1997.
- 3) Sospedra M, Obiols G, Babi LFS, Tolosa E, Vargas F, Roura-Mir C, Lucas-Martin A, Ercilla G, Pujol-Borrell P. Hyperinducibility of HLA class II expression of thyroid follicular cells from Graves' disease. A primary defect? *J Immunol* 154:4213-4222, 1995.

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

東京女子医科大学第二内科、*オリンピアクリニック井上眼科

磯崎 収、對馬敏夫(班員)、宮川めぐみ、出村 博、井上洋一*

[研究要旨]バセドウ病眼症病変部の線維芽細胞は機能的 TSH 受容体および sulfate transporter を発現し、特性は甲状腺細胞に類似した。sulfate 取り込みの抑制による増殖抑制と眼症治療の可能性が示唆される。

[目的]バセドウ病眼症の治療においては眼窩内組織の体積をコントロールすることが重要と考えられており、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されている。この GAG の産生は病変部で産生されるサイトカインが促進することより局所における自己免疫反応の結果と考えられ、TSH 受容体の遺伝子発現が後眼窩組織において報告されており、自己抗原および刺激抗体の標的としての TSH 受容体の重要性が諸家より指摘されている。われわれはバセドウ病眼症の手術時に得られた線維芽細胞が PPAR γ 受容体を有し、troglitazone が PPAR γ の受容体および TSH 受容体の mRNA を増加させることを発見したが、今回は眼症手術時に得られた線維芽細胞の TSH 受容体の機能的解析を行うとともに GAG の構造と機能に重要な sulfate transporter の活性と遺伝子発現を検討し、sulfation を介した GAG 産生と線維芽細胞増殖抑制による新しい治療法の開発を目的とした。

[方法]脂肪結合織および外眼筋組織はバセドウ病眼症患者の減圧術および複視矯正術時に採取した。一部の組織より線維芽細胞の培養を行った。残りの組織より RNA を抽出し、RT-PCR にて mRNA を測定した。眼症線維芽細胞における cyclic AMP 増加反応は笠木らの 1mM IBMX, 10 mM HEPES 添加低張ハंकス液で 2 時間刺激し cAMP を ELIA にて測定した。Sulfate の取り込みは既報のように 300 mM sucrose, 10 mM HEPES pH7.5 の sulfate uptake buffer にて preincubation の後に $^{35}\text{SO}_4$ を添加して 5 分間に

取り込まれた放射線量を測定した。

[結果]バセドウ病眼症の患者より得られた脂肪組織および外眼筋組織においては全例ではないが TSH 受容体の mRNA が RT-PCR で認められた。次に脂肪結合織より樹立した線維芽細胞において TSH 受容体の mRNA の発現を RT-PCR で測定したところ、10% FCS 存在下でも TSH 受容体の mRNA を発現するものも存在した。また、ラットの preadipocyte とは異なり troglitazone 添加後に mRNA が増加しない患者線維芽細胞も存在した。このように TSH 受容体遺伝子発現は線維芽細胞を樹立させた患者組織の状態が大きく影響すると考えられた。次に機能的 TSH 受容体が存在するか否かを TSH に対する cAMP 増加反応で検討したところ高濃度の TSH で cAMP が基礎値の約 10 倍に増加するものも認められたが、その ED50 は 1-10U/L と培養甲状腺細胞の約 1/100 であり諸家が脂肪細胞において報告している TSH による cAMP 増加反応とほぼ一致していた。次に sulfate transporter 活性を測定したが cAMP 増加反応が認められた細胞においては取り込みが多く、TSH へ対する反応性と GAG 産生との関連性が示唆され、cAMP に依存して GAG の産生がおこるとの報告とよく合致した。sulfate transporter は幾つかの種類が存在し、イオン感受特性および組織特異性が存在するため、各種の sulfate transporter に特異的な primer を用いて眼症線維芽細胞に発現する sulfate transporter を測定したところ軟骨をはじめとして多くの組織で発現する diastrophic dysplasia sulfate transporter(DTDST) が多く発現していた。甲状腺細胞に発現する Pendrin は眼症患者の線維芽細胞および脂肪組織と外眼筋組織に少量ながら発現を認めた。また眼症線維芽細胞および甲状腺細胞共に sulfate の取り込みはグルコン酸ナトリウムで抑制は軽度であり、NaCl 及び塩化コリンで著明に抑制され、Na 非依存性、Cl 依存性の sulfate/chloride antiporter と考えられた。しかし眼症線維芽細胞における sulfate の取込みは甲状腺細胞と比較すると多く、病変部における GAG 産生の亢進との関連が示唆された。

[考察および結論]バセドウ病眼症の線維芽細胞は特殊な条件で前脂肪細胞へ変換することが示されているが、Bahn らはバセドウ病眼症組織よ

り得られた線維芽細胞は前脂肪細胞であり TSH 受容体が発現しており、TSH の刺激により増加すること、継代により脂肪滴および TSH 受容体が消失することを報告している。今回我々の検討した cAMP の増加反応が認められた細胞は Bahn らの初期継代細胞に相当すると考えられたが、単なる継代の差のみでは説明不能であり、さらなる検討が必要とされる。また、TSH に対する反応は脂肪細胞と同様に高濃度の TSH を必要としたが、TSH 受容体を過剰発現させた骨髄腫細胞では TSH により cAMP 増加反応が認められないことより G 蛋白とのカップリングが効率的に行われていない可能性もある。甲状腺に発現する Pendrin は Pendred 症候群の原因遺伝子として positional cloning で同定され、患者においては遺伝子変異によりその機能が障害され、硫酸基の糖鎖を持つサイログロブリンを介して行われるヨードの有機化が障害されていると仮定されている。DTDST 遺伝子は軟骨異栄養症の一型の原因遺伝子の positional cloning により発見され、患者では遺伝子変異を有する。軟骨細胞においては培養液中より sulfate を除去したり sulfate の取込みの抑制する塩素酸ナトリウムを添加すると proteoglycan 自体の合成は阻害されないがその sulfation が阻害されるため、軟骨細胞の成長因子である basic FGF で刺激しても DNA 合成の促進がおこらないことが報告されており、DTD の患者でみとめられる軟骨の形成不全の臨床像と良く一致する。よって、人為的に眼症病変部における sulfate 取込みを抑制することにより、その細胞増殖および GAG 産生を抑制することにより眼症の進展を阻止する新しい治療法の開発が期待される。

[参考文献]

1. Bahn RS et al. J Clin Endocrinol Metab 83:998,1998
2. Hastbacka J et al. Cell 78:1073, 1994
3. Everett LA et al. Nature genet 17:411,1997
4. Satoh et al J Biol Chem 273:12307, 1988

バセドウ病眼症の予後と甲状腺刺激抗体 (TSAb) の関連性

長崎大学第一内科¹⁾, (財) 放射線影響研究所²⁾

横山直方¹⁾, 長瀧重信²⁾

【目的】

バセドウ病と眼症の共通抗原として TSH 受容体が候補に挙げられている。TSH 受容体が眼窩部球後組織である脂肪組織および線維芽細胞に存在することは種々の手法を用いて既に報告が数多くあり、特に眼症患者の球後組織においては RT-PCR 法、ノーザンブロット法はもとより、最近では蛋白レベルである免疫組織化学染色法にても同定されている。この様に、TSH 受容体が眼窩部球後組織に存在し、かつ機能も有していることが判明しており、特に眼症患者の球後組織で強く発現していることが確認されているが、依然として TSH 受容体が眼症における標的自己抗原となりうるかについての確証は得られていない。

臨床面における今までの報告の中で、TSH 受容体に対する自己抗体、とりわけ甲状腺刺激抗体 (TSAb) と眼症の関連性が示唆されている。甲状腺機能は正常で眼症のみを有する患者、いわゆる Euthyroid Graves 病において、TSAb 値が約 80%の症例で陽性を呈すること、また、眼症 (特に眼筋肥大型) を伴う未治療バセドウ病では眼症を伴わない症例に比して TSAb が有意に高値を示すことが報告されている。

今回、我々は内科的治療の前後における眼障害度と TSAb の推移について、その臨床的関連性を検討した。

【方法】

対象はバセドウ病眼症 17 名。眼症治療前、全例に MRI-T₁ 強調画像で外眼筋肥大、さらに MRI-T₂ 強調画像で外眼筋内に signal intensity 高値の領域 (active stage) を認めた。治療は従来からの治療プロトコールに従って、ステロイドパルス療法 (メチルプレドニゾン 1g×3 日間=3 クール施行)、引き続き放射線照射 (2Gy×10 日間=20Gy) を施行した。治療効果の評価時期は、眼症治療後平均 23 ヶ月 (23±5, mean±SD) であり、この時点での眼症活動性 (disease activity) は全例 inactive であった。一方、この時の甲状腺機能は全例 euthyroid であり、甲状腺に対する治療内訳は、抗甲状腺薬 (維持量) 投与継続中 7

名、甲状腺ホルモン剤補充中 2 名、休薬中 8 名であった。TSH 受容体抗体である TSAb (甲状腺刺激抗体) と TBIAb (TSH 結合阻害抗体) はそれぞれ 180%、10% をカットオフ値として判定した。眼症の客観的評価は、外眼筋肥大と眼症活動性は眼窩部 MRI、複視はヘスチャート (Hess chart)、外眼筋癒着は牽引試験 (forced duction test) にて行った。

【結果】

(1) 眼症治療後の TSAb 値

治療後 TSAb 値がカットオフ値 (180%) 以上の症例 (7 名) を Group A、180% 以下 (正常化) の症例 (10 名) を Group B の 2 群に分けて、以下の検討を行った。

Group A の治療後 TSAb 値は 1370 ± 1160 (mean \pm SD; 333~3600)%、Group B は 130 ± 24 (91~166)% であった。

(2) 眼症治療前指標の比較

眼症状に影響を与える可能性がある治療前指標として、発症から治療までの期間 (duration)、抗甲状腺薬の有無、甲状腺腫、TSAb、TBIAb、さらに眼症指標として外眼筋肥大度と眼球突出について、A、B 群間で比較した。

上記の指標の中で、duration、抗甲状腺薬使用症例数、甲状腺腫 (+) の症例数は両群間で有意差はなかった。TSH 受容体抗体価では TSAb 値は A 群; 1515 ± 790 (561~2720)%、B 群; 573 ± 594 (102~1895)% で有意差を認めた ($p < 0.02$)。一方、TBIAb 値は A 群; 34.5 ± 24.3 (8.5~68.5)%、B 群; 21.7 ± 13.9 (0.1~48.2)% と、A 群で高い傾向を示すも有意差は認めなかった。眼症指標では、外眼筋肥大 (四直筋総和; 対視神経比) は A 群; 5.8 ± 0.8 、B 群; 6.8 ± 1.4 ($p < 0.001$)、及び眼球突出 (mm) は A 群; 21.0 ± 1.3 、B 群; 22.2 ± 1.8 ($p < 0.05$) と、いずれも B 群で有意に眼障害の程度は強かった。

(3) 眼症治療による眼障害の変化

眼症治療前後における眼症状 (外眼筋肥大、眼球突出) の改善効果では、外眼筋肥大の改善度は A 群; $35 \pm 26\%$ 、B 群; $75 \pm 18\%$ ($p < 0.001$)、眼球突出 (mm) は A 群; 1.5 ± 0.5 、B 群; 4.1 ± 1.8 ($p < 0.001$) といずれも B 群で有意な改善を認めた。さらに、眼球運動障害 (複視) については、A 群では複視を認めた 4 例中寛解した症例はなく、一方 B 群では複視を有する 6 例中 4 例で治療後複視は消失した (完全寛解率; A 群 0%、B 群 67%)。

【考察】

治療前後における眼障害の改善度と TSH 受容体抗体の一つである TSAb の推移の関連性について検討した。今回の結果では、TSAb が眼症治療前から治療後にわたり持続的に高

値の症例は、眼症治療時における眼症状（外眼筋肥大、眼球突出）の重症度はむしろ TSAb 正常化群よりも低いにもかかわらず症状の改善率が低いこと、さらに複視を合併する場合も、TSAb 持続高値症例では治療後も全例複視が残存するという不可逆性変化を示した。一方、TBIAb では TSAb にみられた様な関連性は認めなかった。つまり、TSAb が甲状腺機能正常化後も持続的に高値を呈する眼症症例は内科的治療に抵抗性であること、言い換えればこの様な症例は眼症の病期の進行が早く、疾患活動性は早期に非活動性の状態（不可逆性変化）に進むことが推測される。

TSH 受容体抗体である TSAb が眼症の発症機序にどの様に関わっているか未だ不明であるが、臨床的にも眼症患者では TSAb 値と甲状腺ホルモンレベルが相関しないことより、TSAb の多様性 (heterogeneity) が存在する可能性が考えられる。つまり、眼症患者における TSAb が認識する TSH 受容体のエピトープが甲状腺の場合とは異なる可能性も推測される。今回の結果から言えることは、TSAb 値が高い眼症患者に対しては治療適応の時期を逃さないように特に早めの対応が必要であるということである。さらに、TSAb を早期に抑制することが眼症活動性を抑制して、眼症の重症度の進行を阻止することにつながるものならば、眼症患者に対するステロイドによる TSAb 抑制療法の有用性についても検討する必要性が考えられた。

【文献】

1. T.Kashiwai, et al: Significance of thyroid stimulating antibody and long term follow up in patients with euthyroid Graves' disease. *Endocr J.* 42: 405-412, 1995.
2. A.E.Heufelder: Involvement of orbital fibroblast and TSH receptor in the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *Thyroid* 5: 331-340, 1995.
3. S.Mori, et al: Studies of retroorbital tissue xenograft from patients with Graves' ophthalmopathy in severe combined immuno deficient (SCID) mice: detection of thyroid-stimulating antibody. *Thyroid* 6: 275-281, 1996.
4. W.Stadlmayr, et al: TSH receptor transcripts and TSH receptor-like immunoreactivity in orbital and pretibial fibroblasts of patients with Graves' ophthalmopathy and pretibial myxedema. *Thyroid* 7: 3-12, 1997.
5. R.S.Bahn, et al: Thyrotropin receptor expression in Graves' orbital adipose/connective tissues: potential autoantigen in Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 998-1002, 1998.

研究課題 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

研究者氏名 加藤茂明

研究要旨

ビタミンDは、カルシウム代謝調節、細胞の増殖抑制、分化誘導、免疫応答制御など多彩な生理作用を有している。このようなビタミンDの多彩な生理作用発現は、リガンド依存性転写調節因子であるビタミンDレセプターを介した遺伝子発現により調節される。また、ビタミンDの生合成は、ビタミンD 1 α -水酸化酵素によって厳密に制御されていることが知られている。我々は、昨年までにビタミンDレセプター遺伝子欠損マウスの作成、それをを用いた1 α -水酸化酵素のクローニングについて報告した。今回、VDR遺伝子欠損マウスを更に詳細に解析し、軟骨細胞および皮膚におけるVDRの直接的な働きを明確にした。また、1 α -水酸化酵素遺伝子のPTH、カルシトニン、1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ による発現制御機構について明らかにした。1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ による発現制御の抑制は細胞種特異的であり、ビタミンDの負の調節に関わる特異的な転写因子の存在が示唆された。

研究目的

ビタミンDは生体内のカルシウム代謝の中心的な役割を果たし、各種代謝疾患とも深く関わっている。本研究では、1)ビタミンDの高次生命現象への関わりを明らかにする目的で、ビタミンD受容体(VDR)の高次機能をVDR遺伝子欠損マウス¹⁾を用いて検討した。2)昨年度クローニングした25-水酸化ビタミンD-1 α 水酸化遺伝子²⁾を用いて、ビタミンD合成の調節機構について検討した。

研究方法

1)VDR遺伝子欠損(VDRKO)マウスの解析

[1]野性型とVDRKOマウスとの骨組織像を比較検討した。[2]野性型とVDRKOマウスの頭蓋骨から得られた骨芽細胞様細胞と、それぞれのひ臓細胞の共存培養系³⁾を用いて、TRAP陽性の破骨細胞数を計測し、破骨細胞形成能を検討した。また、骨組織切片をTRAP染色し、破骨細胞数を計測した。[3]骨芽細胞の機能を検討するため、各遺伝子型の新生仔マウス頭蓋冠より骨芽細胞様細胞を採取し、骨芽細胞分化マー

カーであるType I collagen遺伝子の発現量をノザンブロット法で検討した。[4]in situ hybridization法にて、前期肥大軟骨細胞で発現しているcollagen type X遺伝子および後期肥大軟骨細胞で発現しているosteopontin遺伝子の発現分布について検討した。[5]VDRKOマウスに現われた変異が直接的か間接的か区別するため、高カルシウム食（2%カルシウム、1.25%リン、20%Lactose）による血清カルシウム値の正常化を試み、表現型、組織像の変化を検討した。[6]各発生段階、各組織に現われた変異について、詳細に検討するため、Cre-loxPシステムにより発生段階、組織特異的なVDR遺伝子の欠失を試みた。

2) ヒト25-水酸化ビタミンD-1 α 水酸化遺伝子（1 α (OH)ase）の発現調節の解析

[1] 7週令のWistar ratに、それぞれ、副甲状腺ホルモン（PTH）、カルシトニン（CT）、1 α ,25(OH)₂D₃処理後に、腎臓を摘出し、ノザン解析にて1 α (OH)ase遺伝子の発現を検討した。また、アクチノマイシンD（ActD）およびシクロヘキシミド（CHX）で前処理後、同様の検討をおこなった。[2] 3週令のVDR-KOマウスおよび野生型マウスを用いて、また、[3]慢性腎不全モデルラットを作製し（5/6腎摘ラット）、PTH、CT、1 α ,25(OH)₂D₃処理を行い、ノザン解析にて、1 α (OH)ase遺伝子の発現を検討した。[4]ヒト1 α (OH)ase遺伝子プロモーターを取得し、primer extension法にて転写開始点を決めた。さらに、近位尿細管細胞株であるMCT細胞や数種類の細胞株を用いたクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）法で、取得した1 α (OH)aseプロモーターの各種ホルモンに対する転写活性の解析を行った。

結果と考察

1) VDR遺伝子欠損マウスの解析

[1] 3週齢までは野生型マウスの骨組織像との変化は認められないが、離乳後に脛骨・大腿骨は短くなり、骨端が肥大化する。組織学的には骨端では、成長板の肥大化、肥大軟骨細胞の規則的な整列の喪失、類骨量の増大、石灰化の障害が認められた。又、骨密度は、野生型の60%にまで減少していた。[2]共存培養系を用いた破骨細胞形成能において、遺伝子型による差は認められなかった。また、組織標本のTRAP染色による破骨細胞数の検討でも、野生型と比べ、顕著な差は認められなかった。[3]Type I collagen遺伝子の発現量は野生型と比べ変化なく、正常であった。

[4]collagen type Xの発現は野生型とほとんど変化は認められなかった。一方、VDR-KOのosteopontin遺伝子の発現は、野生型と比べ、均一でなく軟骨分化の異常を認めた。[5]血清カルシウム値の正常化によって、類骨の増加など石灰化障害と見られる変異は改善された。雌雄とも野生型と正常に交配し、仔を得られるようになった。軟骨の増加は部分的にしか改善されなかった。また、包囊のある毛包と脱毛の改善は認められなかった。[6]現在、Cre-loxPシステムにより発生段階、組織特異的なVDR遺伝子の欠失を試みるため、骨芽細胞、軟骨細胞、皮膚表皮細胞特異的に発現するベクターの構築をおこなっている。

以上の結果より、VDR-KO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、他の原因により骨組織の異常が引き起こされると考えられた。

また、血清カルシウム濃度正常化に伴い、骨組織像は改善されたにもかかわらず、軟骨および皮膚とくに毛根部における異常の改善が認められなかったことから、VDRが軟骨およ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。

2) ヒト25-水酸化ビタミンD-1 α 水酸化遺伝子の発現調節の解析

[1]1 α (OH)aseの発現はPTH投与およびCT投与により誘導され、1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ 投与により抑制された (Fig.1A)⁴⁾。PTHおよびCTによって促進した1 α (OH)aseの発現は、1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ 同時投与により抑制された。また、PTHおよびCTによる1 α (OH)aseの発現上昇は、ActDにより阻害され、CHXにより影響を受けなかった。[2]VDR-KOマウスでは野生型マウスに比べ、顕著な1 α (OH)aseの発現が認められた。一方、両群において、PTHおよびCTによる1 α (OH)aseの発現上昇を認めた。しかし、1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ による発現抑制効果は野生型にのみ認められ、VDR-KOマウスでは認められなかった (Fig.1B)。[3]慢性腎不全では、1 α (OH)ase遺伝子の発現は低下しており、PTHおよびCTによる発現上昇はわずかであった (Fig.1C)。[4]ヒト1 α (OH)aseのプロモーターの転写活性は、PTH、CTにより促進し、1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ により抑制された (Fig.2)⁵⁾。

以上の結果より、PTH、CT、1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ による1 α (OH)aseの活性化制御は、1 α (OH)ase遺伝子発現レベルで制御されていることを初めて明らかにした。また、1 α (OH)ase遺伝子の発現は、PTH、CTにより正に、1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ により負に制御されており、特に1 α (OH)ase遺伝子の発現抑制はVDRを介して強く抑制されていた。更に

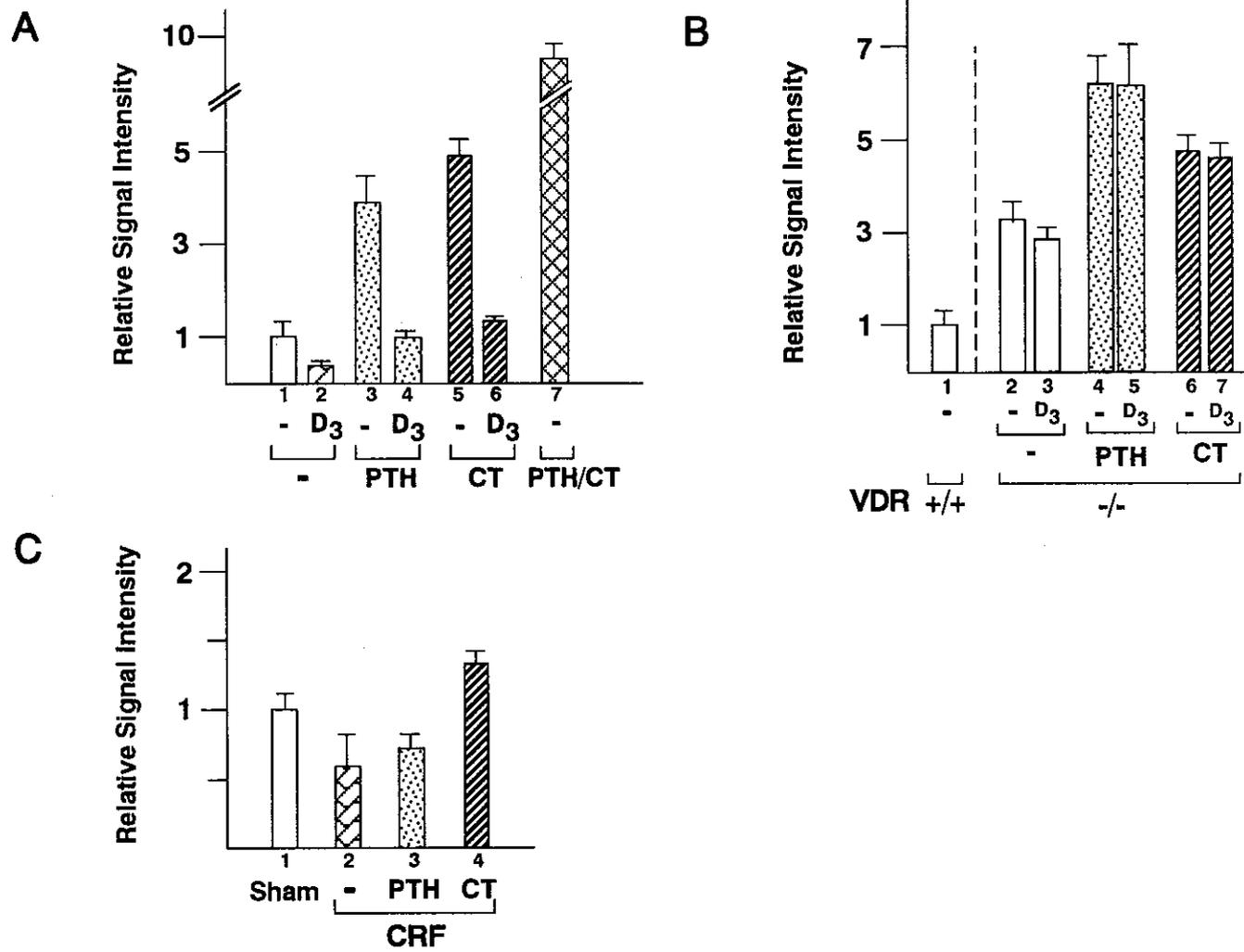
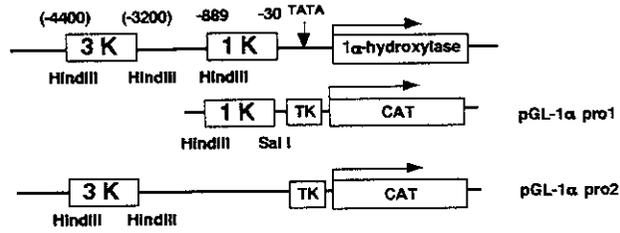


Fig. 1

A



B

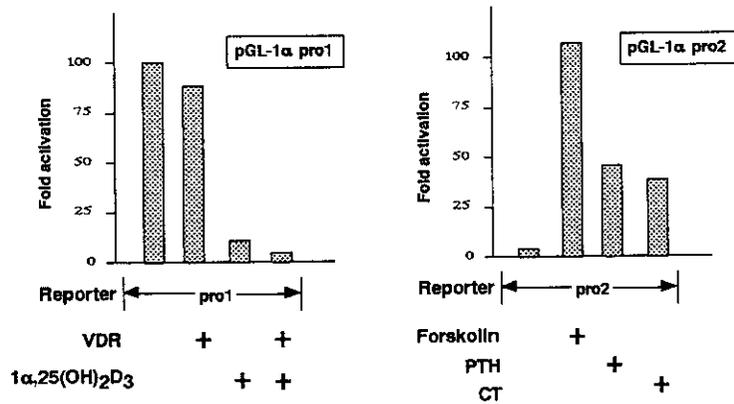


Fig. 2

ヒト $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子プロモーター解析にて、PTH、CTに対する正の応答領域と $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に対する負の応答領域とが存在することを確認した。一方、慢性腎不全では、 $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子の発現は低下しており、PTHやCTに対する反応性が低下していることが明らかになった。また、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に対する負の応答は細胞種特異的であったことから、組織特異的な転写制御因子の関与が考えられた。現在、負の応答の認められた細胞種を用いて、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の負の応答に関与する因子の取得を試みている。

結論

1) VDR 遺伝子欠損マウスに認められた骨組織の異常は、血清カルシウム濃度を正常化することによって改善された。つまり、骨の異常は血清カルシウム濃度を介した二次的なVDRの効果だったといえる。一方、VDRは軟骨およ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。今後、Cre-loxPシステムによる発生段階、組織特異的なVDR遺伝子の欠失によって、さらにVDRの詳細な機能が明らかになっていくものと期待される。

2) $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子発現レベルは、PTH、CT、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によって制御されていることが初めて明らかになった。また、 $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子プロモーターの $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に対する負の応答は細胞特異的であったことから、組織特異的な転写制御因子の関与が考えられた。

参考文献

- 1) Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, et al : Nat Genet 16 : 391-396, 1997
- 2) Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, et al : Science 277 : 1827-1830, 1997
- 3) Takahashi N, et al. : Endocrinology 128 : 1792-1796, 1991
- 4) Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, et al. : Endocrinology in press.
- 5) Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, et al : Biochem Biophys Res Commun 249 : 11-16, 1998

インスリン受容機構とその異常

神戸大学医学部第二内科

春日 雅人

〔目的〕インスリン受容機構に関しては、近年、急速に解明されつつある。すなわち、インスリン分子がインスリン受容体に結合すると、受容体に内在するチロシンキナーゼが IRS などのチロキシン残基を燐酸化する。するとその部位に燐酸化 PI 3-キナーゼ, Grb2・Sos 複合体、SHP-2 などの分子がそれぞれの SH2 ドメインを介して結合する。これらの分子の PI3-キナーゼがインスリンによる各種の代謝作用を伝達していることが明らかにされた。しかしながら、その下流の分子については不明である。これらの分子を明らかにすることが本研究の目的である。

〔方法〕PI3-キナーゼの下流の分子として想定されているセリン・スレオニンキナーゼである Akt(PKB)ならびに atypical PKC(PKC λ)について検討した。すなわち、Akt の燐酸化部位である 308 番目の Thr ならびに 473 番目の Ser の両者を Ala に置換した変異体 Akt-AA を作製し、HA の tag を添加した。この HA-Akt-AA をアデノウィルスベクターを用いて 3T3-L1 脂肪細胞へ発現した⁽¹⁾。一方、atypical PKC(PKC λ)については、N 端側を欠除し 273 番目の Lys を Glu に置換した変異体 PKC λ (Δ NKD)を作製した。これも同様にアデノウィルスベクターを用いて 3T3-L1 脂肪細胞へ発現した⁽¹⁾。

〔結果〕HA-Akt-AA ならびに PKC λ (Δ NKD)の内因性酵素活性への影響を検討した。すなわち、HA-Akt-AA を 3T3-L1 脂肪細胞へ発現し、細胞を可溶化して HA に対する抗体で HA-Akt-AA を除去した後、Akt を免疫沈降してインスリンによる活性化を検討した。その結果、HA-Akt-AA の発現の用量依存的に、インスリンによる内因性 Akt の活性化が阻害されることが明らかとなった⁽²⁾。一方、PKC λ (Δ NKD)を 3T3-L1 脂肪細胞へ発現し、内因性 PKC λ をその N 端に対する抗体で免疫沈降して、インスリンによる活性化を検討した。その結果、PKC λ (Δ NKD)の発現の用量依存的にインスリンによる内因性 PKC λ の活性化が阻害されることが明らかとなった⁽³⁾。次に、インスリンによる内因性酵素の活性化が十分に阻害され

るように、HA-Akt-AA あるいは PKC λ (Δ NKD)を発現し、その状態でのインスリンによる糖輸送を測定した。その結果、HA-Akt-AA は全く阻害しないが⁽²⁾、PKC λ (Δ NKD)はインスリンによる糖輸送の活性化を 50 %は阻害した⁽³⁾。インスリンによる糖輸送の活性化は、糖輸送担体(GLUT4)が細胞内プールから translocation するためと考えられているが、この translocation を plasma membrane lawn assay で検討したが、PKC λ (Δ NKD)は GLUT4 の translocation も抑制していた⁽³⁾。インスリンによる蛋白合成の促進、グリコーゲン合成酵素の活性化については、PKC λ (Δ NKD)の発現によっては阻害されなかったが HA-Akt-AA の発現によっては少なくとも一部は阻害された。一方、PEPCK の transcription へのインスリンの阻害作用は、HA-Akt-AA, PKC λ (Δ NKD)のいずれかによっても抑制されなかった。

[考察] インスリンによる糖輸送の活性化には PKC λ の活性が必要であるが Akt の活性は必要ないと考えられた。インスリンによる蛋白合成の促進ならびにグリコーゲン合成酵素の活性化には PKC λ の活性は必要ないが Akt の活性は必要と考えられた。インスリンによる PEPCK の transcription への阻害作用の発現には両者とも必要ないと考えられた。従って PI3-キナーゼの下流では Akt, PKC λ (atypical PKC)以外にさらに少なくとももう一つの分子によってインスリンの情報伝達が行われていると考えられた。これらの分子の異常が糖尿病の発症に関与している可能性がある。

[文献]

1. Sakaue, h., Ogawa, W., takata, M., Kuroda, S., Kotani, K., Matsumoto, M., Sakue, M., Nishino, S., Ueno, H. and Kasuga, M. Phosphoinositide 3-kinase is required for insulin-induced but not growth hormone or hyperosmolarity-induced glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. (1997) Mol. Endocrinol. 11: 1552-1562.
2. Kitamura, T., Ogawa, W., Sakaue, H., Hino, Y., Kuroda, S., Takata, M., Masumoto, M., Maeda, T., Konishi, H., Kikakawa, U. and Kasuga, M. Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. (1998) Mol. Cell. Biol. 18: 3708-3717.
3. Kotani, K., Ogawa, W., Matusumoto, M., Kitamura, T., Sakaue, H., Hino, Y., Miyake, K., Sano, W., Akimoto, K., Ohno, S. and Kasuga, M. Requirement of atypical PKC λ for insulin stimulation of glucose

uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. (1998) Mol. Cell. Biol. 18: 6971-6982.

研究成果の刊行に関する一覧表
(平成10年度)