

厚生省 厚生科学研究費補助金
特定疾患対策研究事業

ホルモン受容機構異常に関する研究班
平成11年度 研究報告書

平成 12 年 3 月

主任研究者 清 野 佳 紀

I. 序 文

序 文

平成8年に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分科会として春日雅人班長により引き継がれ、新体制での活動が始まりました。その後、平成11年に「厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 ホルモン受容機構異常に関する研究」として、小生が主任研究者を引き継ぎ、このたび初年度が終わりました。

このホルモン受容機構異常調査研究班が、ホルモン受容機構の解明やホルモン受容機構異常症という一群の難病の予防及び治療のために現在までに果たしてきた役割は非常に大きいものがあります。本年は新体制を引き継いだ発展の初年度と考えて、目標を明確に掲げ、その達成に向かって全員で更なる努力をしたいと考えております。分担研究者ならびに研究協力者各位の御協力を心よりお願い申し上げます。また、厚生省保険医療局エイズ疾病対策課には、引き続き暖かい御指導ならびに御支援を頂けるようお願い申し上げます。

ここに、平成11年度研究報告書がまとまりました。この報告書が今後ホルモン受容機構異常に関する研究班の活動に何らかの参考になることを心より希望するものであります。

平成12年3月

清野佳紀

目 次

I. 序 文

II. 平成11年度総括研究報告..... 1

岡山大学医学部小児科 主任研究者 清野 佳紀

持発性および偽性副甲状腺機能低下症の全国疫学調査結果報告..... 4

清野佳紀¹⁾、松本俊夫²⁾、中村好一³⁾、井上大輔²⁾、加藤修司²⁾

1) 岡山大学医学部小児科、2) 徳島大学医学部第一内科

3) 自治医科大学公衆衛生学

III. 分担研究報告

1. TSH受容体抗体産生機序に関する研究 9

大阪大学医学系研究科生体情報医学 網野 信行

2. バセドウ病眼症と脂肪細胞－脂肪細胞分化に及ぼす甲状腺ホルモンの影響.....11

山梨医科大学第三内科 女屋 敏正

3. バセドウ病アイソトープ治療後の患者の予後とTSH受容体抗体15

京都大学医学研究科放射線医学専攻核医学科 小西 淳二

4. 甲状腺構造蛋白とホルモン受容体との関連について.....17

虎の門病院分院長 紫芝 良昌

5. 甲状腺ホルモン不応症発症機序に関する研究.....19

名古屋大学環境医学研究所内分泌代謝分野 妹尾 久雄

6. Sulfate transporterおよびsulfotransferaseを標的とした新しいバセドウ病眼症治療法 開発への基礎的検討.....24

東京女子医科大学第二内科 對馬 敏夫

7. 甲状腺ホルモン不応症の成立機序に関する研究（1）ドミナントネガティブ作用機構.....26

浜松医科大学第二内科 中村 浩淑

8. 新たな核内ホルモン受容体共役因子のクローニングと疾患との関連に関する研究	28
群馬大学医学部第一内科 森 昌朋	
9. TSH受容体抗体トランスジェニックマウスとバセドウ病の遺伝因子に関する研究	30
京都大学医学部臨床病態医科学 赤水 尚史	
10. ビタミンD受容体を介したリガンド依存的な負の転写調節機構に関する研究	33
ービタミンD ₃ 1 α -水酸化酵素遺伝子のビタミンDによる転写抑制ー	
東京大学分子細胞生物学的研究所 加藤 茂明	
11. 家族性低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病における骨髄移植の効果	37
岡山大学医学部小児科 清野 佳紀	
12. ビタミンD受容体を介するホルモン受容機構とその異常	40
徳島大学医学部第一内科 松本 俊夫	
13. PTH/PTHrP受容体遺伝子プロモーターAAAG反復配列多型の意義	42
千葉大学医学部小児科 安田 敏行	
14. ビタミンD受容体の細胞内動態に関する研究	44
大阪府立母子保健総合医療センター研究所環境影響部門 大藪 恵一	
15. Ca感知受容体は破骨細胞分化、活性化抑制に関与する	46
神戸大学医学部第三内科 杉本 利嗣	
16. カルシウム(Ca)感知受容体とCa代謝異常症	48
東京大学医学部附属病院分院検査部 福本 誠二	
17. 尿細管におけるホルモン依存症ライソゾーム酵素遊離の機序	50
東北大学医学部第二内科 水梨 一利	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	53
V. 班構成員名簿	77

Ⅱ. 総括研究報告

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
総括研究報告書

ホルモン受容機構異常に関する研究

主任研究者 清野佳紀 岡山大学医学部小児科教授

研究要旨

本研究の目標は、ホルモン作用機構異常に起因すると推定される原因不明、治療法未確立で、かつ有効な治療によって後遺症を残す恐れのない疾患について、診断基準の作成、原因病態の解明、治療法の確立を行うことである。副甲状腺ホルモン受容体異常を中心とするカルシウム代謝異常症と甲状腺ホルモン不応症およびバセドウ病などの甲状腺疾患を対象疾患として研究を行った。カルシウム代謝異常については有病率の把握を始めとし、病態・治療に関して新しい有益な知見を多数集積することが出来た。同様に、甲状腺ホルモンについても、甲状腺ホルモンの作用発現機構や自己抗体病のモデル、バセドウ病眼症の病態に関し、多数の知見を得ることが出来た。これらの成果は世界的にも遜色のない成果であり、今後患者の診断治療に有益な情報となり得ると考える。

分担研究者

網野 信行 大阪大学医学部生体情報医学教授
女屋 敏正 山梨医科大学第三内科教授
加藤 茂明 東京大学分子細胞生物学研究所
教授
小西 淳二 京都大学医学研究科放射線科学核
医学教授
紫芝 良昌 虎の門病院分院長
妹尾 久雄 名古屋大学環境医学研究所教授
對馬 敏夫 東京女子医科大学第二内科教授
中村 浩淑 浜松医科大学第二内科教授
松本 俊夫 徳島大学医学部第一内科教授
森 昌朋 群馬大学医学部第一内科教授
安田 敏行 千葉大学医学部小児科講師

はじめに

本研究班は副甲状腺ホルモン受容体異常を中心とするカルシウム代謝異常症全体の発症機構を解明し、その診断・予防・治療法の開発を行う subgroup とバセドウ病など甲状腺機能異常におけるホルモン受容機構異常の病態を解明し、診断・予防・治療法の開発を行う subgroup よりなる。本年度の各 subgroup の研究成果は以下のとおりである。

研究成果

副甲状腺・カルシウム代謝異常

本研究班における研究対象疾患の中心は特発性及び偽性副甲状腺機能低下症であるが、本疾患は稀な疾患であり、本邦における疫学像は明らかではない。そこで、1997年より特定疾患の疫学に関する研究班との共同で全国疫学調査を

行い、二次調査結果を集計し次のような成果を得る事が出来た。①全国で、特発性副甲状腺機能低下症は900人、偽性副甲状腺機能低下症は430人の患者が存在すると推計された。②有病率に男女差は認めなかった。③自己免疫性疾患の合併は特発性副甲状腺機能低下症で7.6%に見られた。また、先天性疾患の合併も特発性副甲状腺機能低下症で14.7%に見られた。④特発性と偽性副甲状腺機能低下症はintact PTH 30pg/mlを境として明確に分離された(※)従来の診断基準から3例の偽性副甲状腺機能低下症II型症例が分離されたが、症例を検討した結果、独立疾患と考えるにはいくつかの問題があると考えられた。これらの成果は、副甲状腺ホルモン分泌の調節の中心であるカルシウム受容体(Casr)遺伝子異常による副甲状腺機能低下症の診断基準作成、偽性副甲状腺機能低下症亜型分類のための新しい診断基準の作成などに、利用される。

病態に対する研究はCasrを中心に進められ、①Casrは破骨細胞のみならず、破骨細胞前駆細胞にも存在し、細胞外Ca濃度上昇は少なくとも一部Casrを介し、破骨細胞の骨吸収活性のみならず、骨吸収因子による破骨細胞分化を抑制する ② Casr遺伝子プロモーター領域をクローニングし、ヒトCasr遺伝子は少なくとも二つのプロモーターを有し、副甲状腺腺腫ではこの内の一つのプロモーターにより産生されるCasrが低下することを見いだした。これらの成果は 副甲状腺ホルモン異常症における骨病変や副甲状腺の異常増殖の治療における重要な情報となる。

偽性副甲状腺機能低下症の診断には腎尿管の副甲状腺ホルモンに対する反応性の有無の検討が重要であり、腎尿管のホルモンに対する

応答性の機構を解明することが必要である。本年度はホルモン応答性の尿中ライソゾーム酵素遊離の情報伝達がPKC およびCa²⁺-calmodulin kinaseに依存性であることを明らかにした。また、ヒトPTH/PTHrP受容体P3プロモーター解析を行い連鎖解析に有用と考えられるAAAG反復配列遺伝子多型を発見した。

治療においては、ビタミンDの作用を十分に理解することが必須であり、本年度は①ビタミンD作用が筋細胞分化の制御に重要な役割を果たすこと ②低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病のビタミンD抵抗性は活性型ビタミンDの異化の亢進によること ③ビタミンD受容体の核への移行には154-173のアミノ酸が重要であること ④1 α (OH)ase遺伝子プロモーター解析により、負のビタミンD応答領域を同定し、この領域に働く腎特異的転写因子の存在を示したなどの成果が得られた。

甲状腺

甲状腺ホルモン不応症(RTH)は、甲状腺ホルモンに対する反応性の低下した病態で、 β 型甲状腺ホルモン受容体(TR)遺伝子の点突然変異が同定されている。従って、その発症には変異TR β が正常TRの機能を抑制するドミナントネガティブ作用(DNE)を解明することが重要で、その目的のため甲状腺ホルモンの核内動態を検討し ①変異TR β が α 、 β 両方のTR機能を抑制すること ②異常TRのDNE発現にはコレプレンサーの結合が必要要因であること ③新規に同定された転写共役因子p120は、甲状腺ホルモン受容体ばかりでなく、PPAR γ のコアクチベーターとしても機能し、ヘテロダイマーのRXRを介して結合する。甲状腺ホルモンの作用発現に重要な各種因子が同定され、ホルモン

応答性の機序がさらに明らかになった。

一方、甲状腺疾患の大半を占めるバセドウ病において、現在、診療上重要と考えられる諸問題の解決のため、これらの問題の根底にある病態機構の解明を行い以下の成果を得た。

バセドウ病においては自己抗体の産生が病態の中心であるが、①甲状腺内のリンパ球ではTh1/Th2バランスの明らかな偏りは見られずINF- γ とIL-4ともに産生するtype 0のリンパ球が甲状腺内でより増加している。②高感度のTBII測定開発によってバセドウ病甲状腺中毒症は全てTSH受容体抗体によって発生している。③刺激型抗TSH受容体抗体産生リンパ球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作成し、今後の機能解析に供することが可能となった。④バセドウ病I-131治療後の甲状腺機能低下症には、阻害型TSH受容体抗体の関与は否定的である。等の成果を得た。

バセドウ病眼症は治療上最も重要な合併症である。この発症機序における①細胞外基質を形成するGlycosaminoglycan(GAG)のsulfation(S化)の異常の詳細②外眼筋と甲状腺の共通蛋白としての新たな蛋白myocilinの自己抗原としての可能性を示すとともに、③T3は脂肪細胞の分化に重要な転写因子PPAR γ 2を転写レベルで増加させることにより脂肪細胞の分化に関与し、ひいては球後の脂肪組織の肥大、眼症の発症に関与していることが明らかとなった。これらの成果は、バセドウ病の新しい正確な診断・新しい治療法の開発に大きく貢献するものと考えられる。

結 論

副甲状腺subgroupより得られた成果のうち、疫学調査結果は日常診療に直接有益な情報となるものである。この成績をもとに、より正確な診断のための診断基準作成が可能となる。また、基礎的研究の成果は病態の正確な理解に重要であり、本年度の成果は、副甲状腺機能異常症の病態解明、ビタミンD抵抗性の病態理解に大きく貢献するものと考えられる。

甲状腺subgroupの研究によって、甲状腺ホルモンの核内動態に関わる諸因子が同定された。これは、甲状腺ホルモン不応症の病態を理解するうえで重要な情報であるとともに、ビタミンD受容体や甲状腺ホルモン受容体の機能異常に新たな共役因子異常症という疾患単位を同定するための第一歩となる。さらに、バセドウ病における研究成果は、病態の正確な理解のための病態モデル、病態に基づく正確な診断、病態に基づく新たな治療法の開発となって日常診療に貢献するものと期待される。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

特発性および偽性副甲状腺機能低下症の全国疫学調査結果報告

主任研究者 清野佳紀 岡山大学医学部小児科
分担研究者 松本俊夫 徳島大学医学部第一内科
中村好一 自治医科大学公衆衛生学
研究協力者 井上大輔 徳島大学医学部第一内科
加藤修司 徳島大学医学部第一内科

[目的] 本邦における特発性および偽性副甲状腺機能低下症の患者数を把握してその臨床疫学的特性を明らかにする。[対象と方法] 全国の小児科、内科、神経内科より抽出された2592診療科を対象に、1997年の1年間の受診患者について調査を行った。一次調査で回答が得られた特発性副甲状腺機能低下症390人、偽性副甲状腺機能低下症203人に対して二次調査票を送付し、合併症や生化学所見などについて解析を行った。[結果・考案] 前回調査（1984年）と同様、特発性に比して偽性では若年齢層の患者が多く、また女性に多い傾向が認められた。自己免疫疾患の合併は特発性の7.6%に認められた。両群間で血清カルシウム・リン値に有意差はなく、intact PTHは30 pg/mlを境界に分かれた。偽性のうちII型の診断基準を厳密にみたと考えられるものは3例のみであった。これらの例ではEllsworth-Howard試験における尿中cAMP反応はI型からは良く分離されたものの比較的基準境界値に近く、偽性副甲状腺機能低下症II型を独立した疾患単位として確立し、その病態を解析するためには、さらに多くの症例の積み重ねが必要であると思われた。

はじめに

特発性および偽性副甲状腺機能低下症は稀な疾患であり、本邦における疫学像（頻度・性差・年齢分布）は明らかでない。また、とりわけ偽性副甲状腺機能低下症の病態把握は不完全であり、その病型分類の方法や診断基準などにも検討の余地が残されている。そこで今回、厚生省による特定疾患の疫学に関する研究班およびホルモン受容機構異常調査研究班が共同で特発性副甲状腺機能低下症および偽性副甲状腺機能低下症に関する全国疫学調査を行ったので、主に二次調査結果についてその概要を報告す

る。なお、一次調査結果の詳細については疫学班の中村らにより別誌に報告される予定である（中村ら、投稿中）。

対象と方法

本調査は厚生省特定疾患難病の疫学調査研究班による“難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル”¹⁾に基づいて実施した。対象患者は1997年の一年間の受診者であり、小児科、内科、神経内科の3科を対象とした。層化無作為抽出により全国14,100診療科のうち抽出された2952診療科（20.9%）に診断

基準と調査票を送付した。このうち1,855診療科から回答が得られ、回答率は62.8%であった。一次調査で回答が得られた特発性副甲状腺機能低下症390人、偽性副甲状腺機能低下症203人に対して、既往歴、合併症（先天異常、自己免疫疾患など）血液生化学検査成績（カルシウム、リン、アルブミン、クレアチニン、BUN, ALP, PTH, 1,25-水酸化ビタミンD）、Ellsworth-Howard試験成績などを質問項目とした2次調査票を送付した。その回答をもとに特発性、偽性それぞれについて血中のカルシウム、リン、PTH濃度の分布および相互の関連性を解析し、さらにEllsworth-Howard試験が施行されている症例ではPTH負荷に対する尿中cAMP反応について検討を加えた。また、偽性副甲状腺機能低下症に関しては回答データを詳細に解析し、現行の診断基準に照らしてII型と診断し得る症例を同定した。

結果

2次調査票を送付した特発性副甲状腺機能低下症390人のうち 197人(50.5%)、偽性副甲状腺機能低下症203人のうち117人(57.6%)より回答が得られ、総回収率は52.9%であった。その内訳では特発性、偽性ともに男性症例でやや回答率が高い傾向があったが、大きな偏りは認められなかった（図-1）。

抽出サンプルより得られた数値を基に統計学的に推測した全国患者総数は特発性で900人

1次調査	593人			
2次調査	314人 回収率 52.9%			
	IHP		PHP	
1次調査	男 204人	女 186人	男 86人	女 117人
	計 390人		計 203人	
2次調査	男 112人	女 82人	男 54人	女 60人
	計 197人		計 117人	

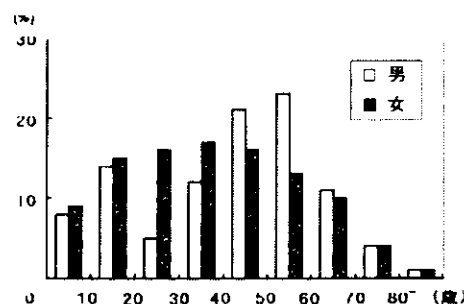
計には性別不明も含む

（95%信頼区間：690-1,100人）、偽性で430人（95%信頼区間：330-520人）であった。

性差については、特発性では男：女=1：0.91であり、前回(1984年)調査2の結果(男：女=1：1.16)を考え併せ、有意な性差はないものと考えられた。一方偽性では男：女=1：1.36と女性にやや多い傾向が前回(1984年)調査（男：女=1：1.43）に引き続き認められた（図-2）。

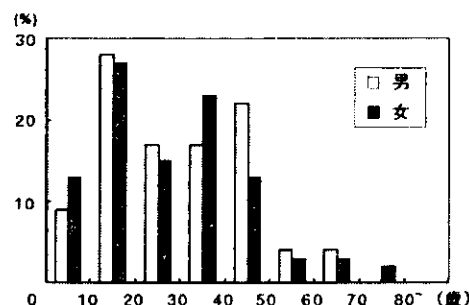
	'84年	'98年	患者総数(推計)
IHP (男:女)	164人 (1:1.16)	390人 (1:0.91)	900人
PHP (男:女)	209人 (1:1.43)	203人 (1:1.36)	430人

年齢分布は、特発性においては男性で40-50歳代にピークが認められたのに対し、女性は10歳代から50歳代を中心としたなだらかな分布を示した（図-3）。



一方、偽性では男女共に10歳代にピークを認め、約90%は50歳未満であり、特発性に比して明らかに若年層に集中する傾向があった（図-4）。

各種自己免疫疾患の合併は特発性においては15/197(7.6%)に認められ、その内訳は慢性甲状腺炎8例、甲状腺機能低下症（原因不明）1例、



Graves病2例、抗カルジオリピン抗体陽性例1例、SLE2例、特発性血小板減少性紫斑病1例であった。これに対して偽性においては慢性甲状腺炎の合併が117例中2例(1.7%)に認められたのみで、一般の有病率から考えて有意な自己免疫疾患の合併は無いと考えられた(図-5)。

	IHP	PHP	計
慢性甲状腺炎	8	2	10
甲状腺機能低下症	1		1
Basedow病	2		2
SLE	2		2
抗カルジオリピン抗体陽性	1		1
ITP	1		1
計	15/197 (7.6%)	2/117 (1.7%)	17/314 (5.4%)

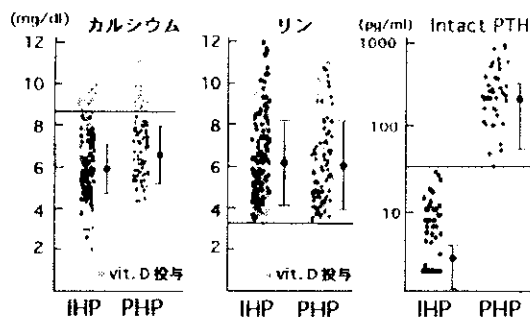
先天性疾患の合併は特発性では29/197(14.7%)に認められ、そのうち90%はいわゆるCATCH(cardiac defect, abnormal facies, thymic hyperplasia)22(染色体22q11.2欠失症候群)と呼ばれる複合奇形であった。これに対して偽性においては42/117(35%)に先天性異常の合併がみられたが、そのほとんどはAlbright遺伝性骨異形成(AHO; Albright's hereditary osteodystrophy)であった。AHOを合併した偽性のうち4例においてG蛋白活性の低下が明らかとなっている。特発性においても5/197にAHOが認められたが、これはその非特異性および診断基準の不明確さに起因するものと考えられた(図-6)。

血清カルシウムおよびリン濃度は特発性、偽性のいずれにおいても広範な分布が認められ

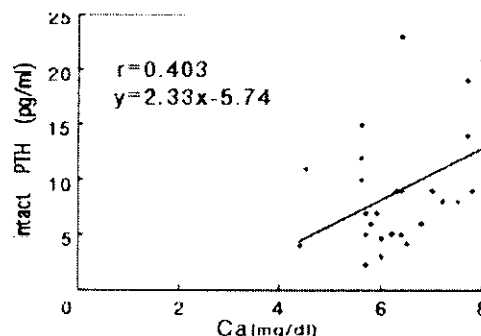
	IHP	PHP	計
Albright 遺伝性骨異形成	5	39*	44
CATCH 22	18		18
tetralogy of Fallot	2	1	3
先天性肥厚性幽門狭窄症	1		1
感音性難聴	1		1
mental retardation	1		1
ASD+PS		1	1
先天性甲状腺機能低下症		1	1
不明	1		1
計	29/197 (14.7%)	42/117 (35.9%)	71/314 (22.6%)

* PHP type I + AHOのうちGs蛋白の低下を認めるもの4例

た。血清カルシウム濃度の平均値は特発性で6.0 mg/dl, 偽性で6.5 mg/dlと偽性でやや高い傾向がみられたが、有意差は認められなかった。血漿intact PTH濃度は、30 pg/mlを境界として明確に特発性と偽性とが分離された(図-7)。



また、特発性副甲状腺機能低下症においては既に報告されているように³⁾血清カルシウム濃度と血漿intact PTH濃度との間に弱い正の相関関係が認められた(図-8)。

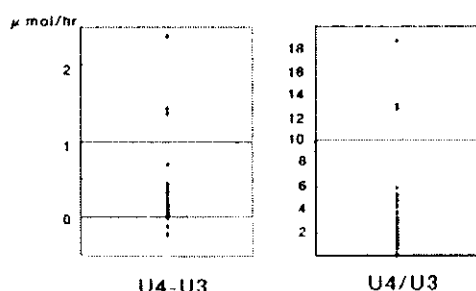


次に、二次調査票の回答を基に、厳格に偽性副甲状腺機能低下症II型と診断し得る症例3例を同定した。その詳細なデータを見ると、いずれの症例も腎機能正常、低カルシウム血症、正一高リン血症、intact PTHが30以上もしくは高感度PTHが高値であり、Ellsworth-Howard試験で尿中リン酸反応低下、cAMP反応陽性であった(図-9)。

ただし、今回の検討ではマグネシウムが検討項目に含まれていないため、低マグネシウム血症を除外し得ないことが問題点として残った。II型においてはcAMP尿中排泄の基礎値の増加

症例	年齢	Ca	P	Cr	PTH 1,25(OH) ₂ D	Eftworth-Howard 試験			
						尿Pi反応	尿cAMP反応		
						(0.44±0.55) (0.27±0.03) ≥ 3.0mg	U4-U3	U4/U3	
①	2	7.3	5.5	0.6 (HS)	720	-1	1.3	15.8	
②	57	5.4	5.4	0.8 (Int)	42	40	-1	2.4	18.7
③	62	7.3	3.7	0.7 (Int)	140	40.3	10.1	1.4	13.2

が期待される⁴⁾と言われているが、今回の3症例においては認められなかった。cAMP偽性副甲状腺機能低下症のPTHに対する尿中cAMP反応をプロットすると、上記の3例はPTH負荷前後の差においても、あるいは両者の比においても、I型とは比較的明確に分離されたので、従来の診断基準の設定⁴⁾は妥当なものと思われた(図-10)。



しかしながら逆に、これらの症例におけるcAMP反応増加反応は境界設定値からそれほどかけ離れてはいないことから、偽性副甲状腺機能低下症II型を独立したentityとして確立し、その病態を明らかにするためには、さらに多くの症例を積み重ねる必要があると考えられた。

考察・結論

特発性および偽性副甲状腺機能低下症は稀な疾患であり、その臨床疫学像には未だ不明な点が多い。今回の調査により本邦における患者数は特発性で900人、偽性で430人と推定された。偽性副甲状腺機能低下症患者数は前回に比して明らかに増加しているが、これが真の患者数の増加を反映しているかどうかは不明である。特発性副甲状腺機能低下症の発病率は、これに關

するイスラエルからの唯一の報告⁵⁾において7年間の検討により人口100万人あたり約1.2人/年とされている。本邦においても、これらの稀な疾患の発病率を明らかにするためにはさらに長期の検討を要すると思われる。

特発性副甲状腺機能低下症の病因は単一ではないが、近年、幾つかの分子学的機序が明らかにされた。近年クローニングされた細胞外Ca感受性受容体 (calcium-sensing receptor: CaSR) は、細胞外CaによるPTH産生・分泌の調節に最も重要な役割を果たしており、この活性化変異により常染色体優性の、あるいは散发性の副甲状腺機能低下症がもたらされる⁶⁾。この病態は副甲状腺の低形成などによる特発性副甲状腺機能低下症とは異なり、著しい高Ca尿症をきたしやすいことを特徴とする⁷⁾。治療に用いるビタミンDの用量などについても独立した症候群としての配慮が必要であることから、このような症例を同定することは臨床的に非常に重要であり、今後の課題となる。

一方、特発性副甲状腺機能低下症にはHAM (hypoparathyroid-Addison-Moniliasis)症候群に代表される他の自己免疫疾患などの合併から、自己免疫的機序が病因に大きく関与するものと考えられてきた。欧米においては成人発症の特発性副甲状腺機能低下症の約20%にHAMが合併するとの報告もあるが、本邦では比較的稀とされている。最近、このように自己免疫疾患を合併する成人発症の特発性副甲状腺機能低下症患者25例のうち14例(56%)の血清中に、CaSRの細胞外領域に対する抗体が検出されたとの報告がなされ、CaSRに対する自己抗体が本疾患の発症に関わっている可能性が示唆された⁸⁾。今回の我々の検討においては7.6%に何らかの自己免疫異常の合併が認められたが、今後、

これらの例におけるCaSRに対する抗体の有無を検索し、本邦におけるCaSR抗体陽性例の発生頻度をも明らかにしていく必要がある。

偽性副甲状腺機能低下症II型は極めて稀な疾患である。今回の検討においても、検索し得なかったMg欠乏の有無以外の条件を厳格にみたしてII型と考えられた症例は3例のみであった。Ellsworth-Howard試験において、II型の診断基準はcAMP反応正常でリン酸反応のみの低下であり、尿中リン酸反応の有無に完全に依存している。これはリン摂取量などによっても強く影響を受けることなどから現行の診断基準においても幾つかの付帯条件が課せられている4)。しかしながらリン酸利尿は他の多くの因子により影響を受けるため、反応の有無の分離は必ずしもclear-cutでない。これは基準値の変更のみでは解消し得ないと考えられ、腎におけるPTH作用の新たな生物学的指標の確立が最も望ましい。また、Mg欠乏はEllsworth-Howard試験においてII型と同様の結果を呈し得ること⁹⁾¹⁰⁾からその除外は必須であると共に、軽微なMg欠乏が判定にどの程度影響を及ぼすのかについてもさらに今後の検討を要する。偽性副甲状腺機能低下症の各病型を確立し、その病態を解明していくためには、これらの課題を解決していく必要がある。

文 献

- 1) 大野良之編, 難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル. 厚生省特定疾患難病の疫学調査班, 名古屋. 1994.
- 2) 山本通子, 多久和陽, 中川礼子, 他: わが国における副甲状腺機能低下症患者の実態調査のまとめ. 厚生省特定疾患ホルモン受容機構異常調査研究班昭和59年総括研究事業報告

書. 1984;225-228.

- 3) Mizunashi K, Furukawa Y, Abe K, et al: The relationship between serum intact parathyroid hormone and calcium in idiopathic hypoparathyroidism. *Calcif Tissue Int* 1993; 53:378-383.
- 4) 山本通子, 古川洋太郎, 田村泰, 他: 偽性副甲状腺機能低下症の各種病型および類縁疾患の診断基準. *日内会誌* 1982;58:1080-1094.
- 5) Zlotogora J, Cohen T: Idiopathic hypoparathyroidism in Israel. *Isr J Med Sci* 1981;17:53-54.
- 6) Chattopadhyay N, Mithal A, Brown EM: The calcium-sensing receptor: A window into the physiology and pathophysiology of mineral ion metabolism. *Endocrin Rev* 1996;17:289-307.
- 6) Pearce S, Williamson C, Kifor O, et al: A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalcemia due to mutations in the calcium-sensing receptor. *N Engl J Med* 1996;335:1115-1122.
- 7) Li Y, Song YH, Rais N, et al: Autoantibodies to the extracellular domain of the calcium sensing receptor in patients with acquired hypoparathyroidism. *J Clin Invest* 1996; 97:910-914.
- 8) Mihara M, Kamikubo K, Hiramatsu K, et al: Renal refractoriness to phosphaturic action of parathyroid hormone in a patient with hypomagnesia. *Intern Med* 1995;34:666-669.
- 9) Allgrove J, Adami S, Fraher L, et al: Hypomagnesia: studies of parathyroid hormone secretion and function. *Clin Endocrinol* 1984;21:45-449

Ⅲ. 分担研究報告

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

TSH受容体抗体産生機序に関する研究

分担研究者 網野 信行 大阪大学医学系研究科生体情報医学教授

研究要旨 TSH受容体抗体産生に甲状腺内CD30陽性リンパ球及びIL-12(Th1)が重要であることが示唆された。高感度TBII測定法が開発された。

A. 研究目的

刺激性のTSH受容体抗体によりバセドウ病の甲状腺中毒症が発生する。しかしどのような機序で受容体抗体が産生されるのか未だ不明である。今回バセドウ病における末梢血及び甲状腺内リンパ球にTSH受容体抗体産生に関わるTh2優位の病態が存在するか否か、さらに甲状腺内リンパ球に何か特異的な変化があるか否かを検索し、受容体抗体産生機序の解明を試みた。またバセドウ病の約10%の患者では従来法によるTSH受容体抗体、TBIIが陰性である。これらの患者では受容体抗体が関与せず甲状腺中毒症を起こすのかどうかを調べるため感度のよいTBII測定法を開発し検索を行った。

B. 研究方法

甲状腺内リンパ球の分析は、CD30に対する特異抗体を用いフローサイトメトリーで分析した。また甲状腺内リンパ球のサイトカイン産生にはPMA刺激培養後産生されたINF- γ 及びIL-4を調べTh1、Th2のバランスを検索した。末梢血ではTh1に関与するIL-12につき血中濃度を測定し各種病態との関係を分析した。高感

度でTBIIを測定するため従来のradioreceptor assayに工夫を加え培養液中に10%PEGを添加し感度上昇を検証した。

C. 研究結果

バセドウ病甲状腺内リンパ球では末梢血に比し、CD30陽性細胞が著明に増加をしていた。またINF- γ 及びIL-4産生リンパ球とも甲状腺内では上昇しておりTh1/Th2バランスの明らかな偏りは見られなかった。また末梢血に比べINF- γ とIL-4ともに産生するtype 0のリンパ球が甲状腺内でより増加していることが明らかになった。これらのことからバセドウ病における抗体産生ではCD30陽性リンパ球が甲状腺内で重要な働きをしているものと推測された。また末梢血中のIL-12ではバセドウ病の甲状腺中毒症および無痛性甲状腺炎ともに上昇を示しており、IL-12と関連するTh1細胞もある程度バセドウ病で活性化していることが推測された。PEG添加による高感度のTBII測定の検索では、従来法でTBII陰性のバセドウ病患者17例中14例(82%)で陽性化が見られた。以上のことからバセドウ病甲状腺中毒症は全てTSH受容体抗

体によって発生しているものと考えられた。

D. 考 察

Tリンパ球のうち、Th1リンパ球は細胞障害を中心とした細胞性免疫に関連し、一方Th2リンパ球は抗体産生により強く関与すると言われている。甲状腺自己免疫疾患のうちバセドウ病は刺激性自己抗体産生により中毒症が発生するものと考えられ、一方橋本病はリンパ球による組織障害により機能低下症が発生するものと推測されている。従ってバセドウ病ではTh2優位を、橋本病ではTh1優位であると仮定すると病態説明に都合がよい。しかし本当にそのようなバランスの変化があるのかどうかは分かっていない。そこで今回我々は甲状腺内リンパ球を取り出し、サイトカイン産生を検索したが、Th1/Th2バランスは特に明らかな偏りは見られなかった。しかしいずれのリンパ球も末梢血に比べより活性化されていることが示されバセドウ病ではTh1、Th2ともに重要であることが推測された。一方CD30陽性リンパ球は従来Th2と関連するリンパ球と考えられているが、甲状腺内で著明な増加が見られたことから、type 0リンパ球とともにTSH受容体抗体産生に関し重要な役割を持っているものと推測された。今後はCD30陽性リンパ球を取り出しin vitroで受容体抗体産生を調べて見る必要がある。

バセドウ病で約1割はTBII陰性であるが今回高感度測定法によりほぼ全例に陽性が見られたことから、やはりバセドウ病の病態にはTSH受容体抗体が非常に重要であることが改めて明らかにされた。今後この方法が治療寛解の指標となるかどうか検索する必要がある。

E. 結 論

TSH受容体抗体産生の見られるバセドウ病では、甲状腺内リンパ球のTh1/Th2バランスは特に大きな偏りが無いがCD30陽性リンパ球が抗体産生に重要であると推測された。高感度TBII測定法によりバセドウ病のほぼ全例がTBII陽性を示すことが明らかにされた。

F. 研究報告

1. 論文発表

- Okumura M, Hidaka Y, Matsuzuka F, Takeoka K, Tada H, Kuma K, Amino N: CD30 expression and IL-4 and IFN- γ production of intrathyroidal lymphocytes in Graves' disease. *Thyroid* 9: 333-339, 1999
- Hidaka Y, Okumura M, Fukata S, Shimaoka Y, Takeoka K, Tada H, Kuma K, Amino N: Increased serum concentration of interleukin-12 in patients with silent thyroiditis and Graves' disease. *Thyroid* 9: 149-153, 1999
- Watanabe Y, Tada H, Hidaka Y, Takano T, Takeoka K, Fukata S, Kuma K, Amino N: Polyethylene glycol increases the detection of anti-thyrotropin (TSH) receptor antibodies by a radioreceptor assay. *Clin Chem* 45: 407-409, 1999

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

バセドウ病眼症と脂肪細胞—脂肪細胞分化に及ぼす甲状腺ホルモンの影響

分担研究者 女屋敏正 山梨医科大学第三内科教授

研究要旨

バセドウ病眼症の病変は球後の脂肪組織を含む結合織と外眼筋にあるが、我々は脂肪細胞が分化・成熟に伴いTSH-Rを発現することを見出し、これらとバセドウ病患者血清中に認められるTSH-R抗体との反応が眼症の成因に中心的役割を果たすであろう事を提唱してきた。本研究では脂肪細胞の分化に及ぼす甲状腺ホルモン(T3)の影響を分子生物学的に検討した。その結果、①マウス前脂肪細胞Ob17においてT3は、脂肪特異的遺伝子であるPPAR γ 2とC/EBP β mRNAレベルおよびC/EBP β 蛋白質量を増加させた。② α PPAR γ 2プロモーター領域には明らかな甲状腺ホルモン応答配列(TRE)は存在しないが、Ob17細胞において、T3はPPAR γ 2プロモーター活性を増加させた。③CV-1細胞を用いた一過性過剰発現実験において、C/EBPは、T3非依存性にPPAR γ 2プロモーターの基礎活性を増加させた。④甲状腺ホルモン受容体(TR)単独では、T3はPPAR γ 2プロモーター活性を変化させないが、TRとC/EBPの同時添加した時のみ、T3依存性にプロモーター活性が増強された。このようにT3は脂肪細胞の分化に重要な転写因子PPAR γ 2を転写レベルで増加させることにより脂肪細胞の分化に関与することが示唆された。よってバセドウ病眼症の進行を阻止するためには、脂肪細胞の分化に伴うTSH受容体の発現を抑えるために甲状腺機能を正常に保つ必要があると考えられた。

A. 研究目的

バセドウ病眼症とりわけ悪性眼球突出症は従来原因不明とされ、患者の日常生活に多大な苦痛をもたらしており早期に有効な治療法の開発が必要である。バセドウ病眼症の病変は球後の脂肪組織を含む結合織と外眼筋にあるが、我々は脂肪細胞が分化・成熟に伴いTSH-Rを発現することを見出し、これらとバセドウ病患者血清中に認められるTSH-R抗体との反応が眼症の成因に中心的役割を果たすであろうことを提唱してきた。

そこで、本年度はバセドウ病眼症の病態にお

いて、脂肪組織に与える甲状腺機能の影響を調べるために、マウス前脂肪細胞Ob17において脂肪細胞の分化に及ぼす甲状腺ホルモン(T3)の影響を脂肪特異的遺伝子発現を中心に検討した。

B. 研究方法

- (1) マウス前脂肪細胞Ob17を10%FCS添加DMEM培地にて培養し、コンタクトインヒビションがかかった後、レジンで前処理した10%HypoFCS添加DMEM培地に転換し2nMT3または/かつ17nMインスリンを添加し9日間培養後、Total RNAまたは核

蛋白を抽出し、常法に従いNorthern blot, Western blot解析を行った。

- (2) Ob17前脂肪細胞に、PPAR γ 2プロモーターの-615から+32までの領域をルシフェレース遺伝子上流に挿入したレポーター遺伝子を安定に発現させ、100nMT3と170nMインスリンを添加して9日間培養後ルシフェレース活性を測定した。
- (3) 内因性のTRの少ないCV-1細胞を用いリン酸カルシウム法によりTRとC/EBPの発現ベクターを別々にPPAR γ 2レポーター遺伝子と一過性過剰発現させ、10%Hypo FCS添加DMEM培地にて100nMT3を24時間添加後ルシフェレース活性を測定した。

C. 研究結果

- (1) 脂肪の分化過程において2種類の転写因子群が重要な役割を果たしている。その中心を担っているのはペルオキシソーム増殖剤応答レセプターPPAR γ 2で、その発現を調節しているのが、CCAT box enhancer結合因子であるC/EBP α , β , δ の3種類のアイソフォームである。これら因子に対するT3の作用点は明らかになっていない。そこでまず最初に、コンタクトインヒビションのかかったOb17細胞にT3を添加することにより、脂肪細胞の分化に関与する転写因子群のmRNAレベルの変化をノーザンブロット法により解析した。T3添加により濃度依存性にPPAR γ 2と、脂肪細胞の分化のマーカであるaP2のmRNAレベルが上昇した。C/EBP β とC/EBP δ は分化前より一定量mRNAが発現しているが、T3はC/EBP β mRNAも添加前の約2倍に増加させた。この実験条件下ではC/EBP α とC/EBP δ には大きな変化はみられな

った。

抗C/EBP β 抗体を用いたウェスタンブロット解析で、T3はC/EBP β mRNAから翻訳される2種類の蛋白質LAPとLIPを増加させた。

以上よりT3は、少なくともC/EBP β を増加させることによりPPAR γ 2mRNAを増加させている可能性が示唆された。

- (2) つぎに、T3がPPAR γ 2遺伝子を転写レベルで調節しているか、Ob17細胞にレポーター遺伝子を安定発現させた系を用い検討した。T3はPPAR γ 2プロモーター活性を約1.5倍に増加させた。T3とインスリン同時添加においては約2倍に増加させた。

従って、T3によるPPAR γ 2mRNAの増加作用は、少なくともPPAR γ 2遺伝子を転写レベルで調節している事が示唆された。

- (3) マウスのPPAR γ 2遺伝子は、そのプロモーター領域がクローニングされており、-615ベースまでに二つのCCAATboxがあることが塩基配列上わかっている。またこの領域には明らかな甲状腺ホルモン応答配列(TRE)は存在しない。そこで、T3によるPPAR γ 2プロモーター活性化における甲状腺ホルモン受容体(TR)とC/EBPの役割を明らかにする為に、内因性TRの発現の少ないCV-1細胞を用いてTRとC/EBPの発現ベクターをPPAR γ 2レポーター遺伝子とコトランスフェクションした。

TR単独では、TRはPPAR γ 2プロモーター活性を変化させなかった。C/EBPは、T3の存在に関係無くPPAR γ 2プロモーターの基礎活性を増加させた。

TRとC/EBPの両者を同時添加すると、T3非存在下ではC/EBP単独の時よりペー

スの値が下がり、T3添加によりプロモーター活性がC/EBP単独の時よりさらに増強した。

以上より、-615ベースまでのPPAR γ 2プロモーターには、機能的なTREは存在しないと考えられる。

しかしTRとC/EBPの両者が存在する時、T3によるリガンド依存性のPPAR γ 2プロモーター活性化が起きうる。

D. 考 察

T3の脂肪分化における作用は長期効果と短期効果の2系統があると考えられる。長期効果として少なくともC/EBP β レベルを増加させることにより、PPAR γ 2の転写活性を上昇させる。特に、後者のT3によるTRE-非依存性の正の転写制御は全く新しい作用機構であり、今後T3の標的遺伝子を考える上で大変重要であると考えられた。以上のようにT3は脂肪細胞の分化に重要な転写因子PPAR γ 2を転写レベルで増加させることにより脂肪細胞分化に関与することが示唆された。

E. 結 論

バセドウ病眼症の発生機序において脂肪細胞の分化に伴うTSH受容体の発現が重要であるが、脂肪細胞の分化において、TSHやTSAbによるcAMP刺激のみならずT3による刺激が重要であることが示唆された。よって、バセドウ病眼症の進行を抑えるためには、甲状腺機能を正常に保つ必要があると考えられた。

F. 研究発表

論文発表

1. Ikeda M, Taki K, Endo T and Onaya T. (in

preparation) Transcriptional regulation of PPAR γ 2 gene expression by thyroid hormone requires synergistic action on the thyroid hormone receptor with CCAAT enhancer binding protein.

2. Haraguchi K, Shimura H, Kawaguchi A, Ikeda M, Endo T, Onaya T. Effect of thyrotropin on the proliferation and differentiation of cultured rat preadipocytes. *Thyroid* 9, 613-619, 1999
3. Miyazaki A, Shimura H, Haraguchi K, Endo T, Onaya T. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma suppress both gene expression and deoxyribonucleic acid-binding of TTF-2 in FRTL-5 cells. *Endocrinology*. 140:4214-4220, 1999
4. Ohmori M, Harii N, Endo T, Onaya T. Tumor necrosis factor-alpha regulation of thyroid transcription factor-1 and pax-8 in rat thyroid FRTL-5 cells. *Endocrinology* 140: 4651-4659, 1999
5. Harii N, Endo T, Ohmori M, Onaya T. Extracellular adenosine increases Na/I symporter gene expression in rat thyroid FRTL-5 cell. *Mol Cell Endocrinol* 157: 31-39, 1999.
6. Suzuki H, Shimura H, Haraguchi K, Harii N, Endo T, Hosoka S, Yoshii S, Tada Y, Onaya T. Exophthalmos pretibial myxedema, osteoarthropathy syndrome associated with papillary fibrosarcoma in the left ventricle. *Thyroid* 9, 1257-1260, 1999