

学会発表

thyroid hormone increases PPAR γ 2 gene expression by potentiation of CCAT enhancer binding protein-mediated transription. Ikeda M, Taki K, Endo T and Onaya T. 81st Annual Meeting of the Endocrine Society, San Diego, California, 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

バセドウ病アイソトープ治療後の患者の予後とTSH受容体抗体

分担研究者 小西淳二 京都大学核医学科教授
研究協力者 笠木寛治 京都大学核医学科助教授
御前 隆 京都大学核医学科講師

研究要旨

I-131治療を受けたバセドウ病患者において、TSH受容体抗体を測定したところ、①TBII、TSAbは、10年以上経過するとその活性が低下した。②TBII、TSAbは機能亢進、正常、低下症の順に検出率が低下した。③しかしながら、甲状腺機能が正常あるいは低下の状態でも長期間経過した患者においても、一部TBIIやTSAbの陽性例が認められた。④TBIIとTSAbの相関は良好であり、調べた限りTSAb活性は陰性であった。

A. 研究目的

バセドウ病に対してI-131治療を行うと高率に甲状腺機能低下症を発症することが知られている。私達はI-131治療を行った多数のバセドウ病症例においてTSH受容体抗体を測定し、甲状腺機能との関係につき検討した。

B. 研究方法

本院においてI-131治療を行ったバセドウ病患者において追跡調査を行い、来院時に血液を採取し、Free T4、TSH、TSH受容体抗体を測定した。TSH Binding Inhibitor Immunglobulin (TBII)はSmithのキットを用い測定した。Thyroid Stimulating Antibody (TSAb)およびThyroid Stimulation Blocking Antibody (TSBAb)はFRTL-5細胞を用い、cAMP産生を指標として測定した。

これらの検査に対する患者の経済的負担はなく、したがってこの研究はむしろ甲状腺機能が評価できた点で患者サービスにも貢献し、倫理

的には全く問題ないものと考えられた。

C. 研究結果

患者を甲状腺機能別と治療後の経過年数別に分け、それぞれの群におけるTBIIおよびTSAb活性を表1及び表2に示した。甲状腺機能亢進群においてもっとも高いTBII、TSAb活性が認められた。甲状腺機能正常群においては平均TBII、TSAb活性および検出率が低下し、機能低下群においては両活性とも検出率がさらに低下した。一方、治療経過年数との関係を見ると、両活性とも治療後10年以内に活性がもっとも高かったが、それ以降の経過年数の延長と活性および検出率との間には特に有意の関係は認められなかった。しかし甲状腺機能正常群や低下群において検出されたTBIIやTSAb活性は必ずしも低いものばかりではなく、高活性が長期間持続しているような症例も一部に認められた。

TBIIおよびTSAb活性の関係を見たところ、良好な相関関係が認められた($n=72$, $r=0.720$)。

表1 甲状腺機能とTBIIおよびTSAb活性との関係

甲状腺機能	TBII(%)(陽性者数/症例数；検出率%)	TSAb(%)(陽性者数/症例数；検出率%)
甲状腺機能亢進	46.9 ± 26.4 (16/16; 100.0)	1115 ± 1249 (12/12; 100.0)
甲状腺機能正常	9.8 ± 23.2 (24/73; 32.9)	418 ± 555 (30/53; 56.7)
甲状腺機能低下	8.2 ± 21.6 (22/80; 25.6)	454 ± 1124 (26/60; 43.3)

表2 I-131治療後の経過年数とTBIIおよびTSAb活性との関係

経過年数	TBII(%)(陽性者数/症例数；検出率%)	TSAb(%)(陽性者数/症例数；検出率%)
～10年	27.0 ± 35.6 (9/17; 52.9)	674 ± 965 (4/4; 100.0)
10～20年	-1.4 ± 6.9 (1/10; 10)	118 ± 36 (1/5; 20.0)
20～30年	3.9 ± 19.3 (7/38; 18.4)	218 ± 272 (6/14; 42.9)
30年～	0.8 ± 12.0 (3/34; 8.8)	253 ± 495 (5/27; 18.5)

阻害型TSH受容体抗体の存在を示唆するようなTBII / TSAb比の著しく高い症例は認められなかった。一部の症例においてTSAb活性を測定したところ、全例陰性であった。

甲状腺機能亢進症、正常、低下症の患者で、抗原感作ゼラチン粒子凝集反応により抗サイログロブリン抗体価（抗Tg）と抗マイクロゾーム抗体価（抗M）を測定し、3群間で比較したところ、有意差は認められなかった。一方甲状腺腫の大きさの比較では、亢進>正常>低下であり、3群間に有意差が認められた。低下症患者の甲状腺のサイズは健常人のそれよりも低値であった。

D. 考察

I-131治療後甲状腺機能が正常化し、さらに長年の経過とともに低下症となるにともないTBIIとTSAbの活性およびその検出率が低下した。甲状腺機能亢進症そのものが自己免疫異常を高めることが知られている。したがって、I-131による甲状腺の破壊により甲状腺機能が正常化し、そこで自己免疫異常の悪循環が断たれ、TSH受容体抗体の活性が低下する機序が考え

られた。しかしながらTSH受容体抗体が検出される低下症患者も少なからず認められ、これらの患者においては、刺激抗体に反応できないような破壊性病変が甲状腺に存在しているものと考えられた。しかし抗Tgや抗Mの測定結果からは、橋本病の発症や進行を支持することはできなかった。甲状腺機能低下症患者の甲状腺は亢進症患者、機能正常者や健常人に比べて明らかに小さく、I-131治療による甲状腺の萎縮が低下症発現の主な原因であると考えられた。I-131治療早期の甲状腺機能低下症患者の一部に阻害型TSH受容体抗体が検出されたという報告があるが、TSAbとTBIIとの相関は良好であり、かつTSAb活性は陰性であり、阻害型TSH受容体抗体の関与は否定的であった。

E. 結論

バセドウ病I-131治療後の甲状腺機能低下症の発症は、I-131による甲状腺の破壊と萎縮が主な原因であり、阻害型TSH受容体抗体の関与は否定的であった。

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

甲状腺構造蛋白とホルモン受容体との関連について

分担研究者 紫芝良昌 虎の門病院分院長

共同研究者 小澤安則（虎の門病院内分泌代謝科部長）、竹下章（同医員）、田口学（同医員）

研究要旨：バセドウ病眼症の成因研究のため、抗原となりうる外眼筋と甲状腺の共通蛋白として新たな甲状腺蛋白myocilinを同定し検討すると共に、甲状腺機能がバセドウ病眼症に影響を及ぼす現象を甲状腺ホルモンそのものの作用から検討し、甲状腺ホルモンが甲状腺ホルモン受容体を介し、CIITA存在のもとにHLAクラスII遺伝子発現への増強作用があることを見いだした。

A. 研究目的

バセドウ病眼症の成因研究のため、1) 抗原となりうる外眼筋と甲状腺の新たな共通蛋白を見つけ、甲状腺でのTSH 及びTSH受容体との関連、免疫機序との関連を追求するとともに、2) 甲状腺ホルモンそのものの免疫系への影響を明らかにする。

B. 研究方法

甲状腺と筋との共通抗原として候補の一つとわれわれが考えたmyocilinについて、1) ラットのmyocilinのcloning、2) 抗原としての血中抗体とmyocilin蛋白との反応性について検討した。また甲状腺ホルモンの免疫系への関与はHLAクラスII遺伝子発現への影響をreporter assayなどで検討した。

C. 研究結果

1) 約2 kbのラットのmyocilinのcDNAの配列を決定した。coding regionは1506 base, 502AA でhydrophobic region, myosin-like domain, olfactomedin-like domainを有した。ヒトとのAA 相同性は81%であった。full length cDNAを用いたNorthern blotting では網膜、筋、

甲状腺に特異的にmessageがみられ、甲状腺に存在することが明らかとなった。さらにヒト甲状腺でも発現していることを確認した。2) とGST-myocilin-Hisを大腸菌で作製し、自己免疫性甲状腺疾患血清を用いWestern blottingを行ったところ、バセドウ病、橋本病患者でかなりの頻度で陽性になった。3) 甲状腺ホルモンは甲状腺ホルモン受容体を介してCIITAによるHLAクラスIIの発現を促進することを見いだした。

D. 考察

56 kD 蛋白は甲状腺、外眼筋の共通蛋白として注目されていたが、myocilinが網膜以外で骨格筋、甲状腺に特異的に発現していることが判明し、共通の自己抗原として有力な候補として浮かび上がってきた。バセドウ病、慢性甲状腺炎患者血清でそれに対する抗体がWestern blottingで陽性であることは流血中抗体の存在、眼症への関与を示唆している。ヒトmyocilinはそのmutationがopen angle glaucomaに関連する事が知られているが、その機能については網膜、筋、甲状腺のいずれにおいても未だ全くわ

かっていない。われわれは今回の研究で得られた知見、probe、抗体を用い、甲状腺に於ける myocilin の機能について、細胞内局在、調節因子、ことにTSH作用の検討から追求する。

また甲状腺ホルモンがHLAクラスII の発現を増強するという今回のreporter assayの結果は甲状腺ホルモンの免疫系への関与を示す重要な知見であり、甲状腺機能の変化と眼症の悪化との関連を解明する糸口を与えるものである。

E. 結 論

myocilinは筋と甲状腺に共通に特異的に発現している56 kDの新たな蛋白でバセドウ病眼症に関与する自己抗原である可能性が高い。また甲状腺ホルモンそのものが免疫機序の基本的機構であるHLA の発現を介して免疫系に影響していることが考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) M.Taguchi, H. Kanno, R. Kubota, S. Miwa, Y. Shishiba, Y. Ozawa. Molecular cloning of rat myocilin and its expression profile. *Molecular Genetics and Metabolism*, submitted.
- 2) M.Taguchi, H. Kanno, R. Kubota, S. Miwa, Y. Shishiba, Y. Ozawa. Molecular cloning of cDNA for rat myocilin. DDBJ/EMBL/GenBank. AB0 19393.

2. 学会発表

- 1) A. Takeshita, Y. Shishiba, Y. Ozawa. Thyroid hormone potentiates expression of class II transactivator-mediated HLA-DRa gene. 72nd Annual meeting of the American thyroid association 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

甲状腺ホルモン不応症発症機序に関する研究

分担研究者 妹尾 久雄 名古屋大学環境医学研究所 内分泌・代謝分野教授

研究要旨 甲状腺ホルモン不応症の発症機序として、変異を有する β 型甲状腺ホルモン受容体(TR β)が正常の甲状腺ホルモン受容体(TR)の機能を抑制するドミナントネガティブ作用が重要とされている。このドミナントネガティブ作用が正常TR β の機能のみを抑制するのか、或いはもう一つのアイソフォーム、TR α の機能をも抑制するのことはこれまで明らかにされていない。本研究では、遺伝相同組み換えにより作成したTR α 或いはTR β 遺伝子のノックアウトマウスに甲状腺ホルモン不応症を発症する変異TR β を発現するアデノウイルスを投与し、変異TR β が α 、 β 両方の甲状腺ホルモン受容体機能を抑制することを初めて明らかにした。

研究協力者 林 良敬
名古屋大学環境医学研究所
研究支援推進員
武内 陽子
名古屋大学環境医学研究所
大学院生
Samuel Refetoff
シカゴ大学医学部教授
村田 善晴
名古屋大学環境医学研究所
教授

RTH家系は、通常、常染色体優性遺伝を示し、多くのTR β 遺伝子の点突然変異が同定されている。従って、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がその発症に重要とされている。しかしながら、変異TR β がドミナントネガティブ作用を発揮する際、正常TRの中、TR β の機能のみを抑制するのか、もう一つのTRであるTR α の機能をも抑制するか否かは明らかにされていない。事実、変異TR β を持つRTH患者では、頻拍など甲状腺機能亢進状態を示すことが多く、これは変異TR β が、心筋細胞に発現されているTR α の機能を抑制しない可能性も考えられる。そこで、TR β 或いはTR α ノックアウトマウスの肝臓にRTH引き起こす変異TR β 、G345R（345番目のアミノ酸グリシンがアルギニンに置換されたTR β ）をアデノウイルスベクターを用いて導入し、そのドミナントネガティブ作用を検討した。

A. 研究目的

甲状腺ホルモン不応症(Resistance to Thyroid Hormone = RTH)は、甲状腺ホルモンに対する反応性の低下した病態で、常染色体劣性遺伝形式をとる家系はRefetoffらによる1家系のみが報告され、 β 型甲状腺ホルモン受容体(thyroid hormone receptor = TR)遺伝子の広範な欠損が認められている。一方、その他の

B. 研究方法

TR α 、TR β 遺伝子のノックアウトマウスは、それぞれの遺伝子のDNA結合領域をコードする領域を遺伝子相同組み換えによりマーカー遺伝子に置換する事により作成した。TR β 、TR α のノックアウトマウスでは、それぞれのサブタイプTR β 1、 β 2 或いはTR α 1、TR α 2 の発現が全く無いことが確認されている。

変異TR β 、G345Rを発現するアデノウイルスベクターの構築は、pACプラスミドに変異TR β cDNAを組み込み、これとアデノウイルス遺伝子を持つpJM17プラスミドを293細胞にトランスフェクトし、相同組み換えにより生成したアデノウイルスを用いた。

実験は、wild type、或いは各々のTRノックアウトマウスに低ヨード、PTU含有飼料を10日間与え、甲状腺機能低下にした後、変異TR β を発現するアデノウイルス或いは変異TR β を発現しないコントロールアデノウイルスを 1.5×10^9 pfuを尾静脈より投与した。その12時間後より1群にはトリヨードサイロニン (T3)、25 μ gを4日間投与し、他の1群には溶媒のみを投与した。甲状腺ホルモンの作用は、血中TSH、コレステロールを測定すると共に、下垂体におけるTSH β mRNA、心臓におけるSERCA2 (Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2) mRNA、肝臓における5'-DI (5'-deiodinase) mRNA の発現を指標として用いた。血中TSHの測定はラジオイムノアッセイを用い、腫種々のmRNA発現の検討にはノーザンブロット法を用いた。

アデノウイルスを尾静脈に投与した場合、肝臓以外の臓器での発現が殆ど認められないことから、下垂体、心臓の検討では、ドミナントネガティブTR β を発現するアデノウイルスを投

与した群とコントロールウイルスを投与した群を併せてデータ処理した。

C. 研究結果

1. TR α 或いはTR β ノックアウトマウスの下垂体におけるTSH β mRNA および血中TSHのT3による調節

低ヨード、PTU含有飼料で飼育し、甲状腺機能低下にしたマウスではTSH β mRNAの著しい上昇がwild typeで認められ、T3投与により著明に低下した。TR β のみが存在するTR α ノックアウトマウスでは、wild typeと同様の変化が観察された。TR α しか存在しないTR β ノックアウトマウスでも甲状腺機能低下によりwild typeと同程度にTSH β mRNAが上昇し、T3により低下した。しかしながら、このノックアウトマウスではT3による抑制は、軽度であった。

血中のTSHレベルも下垂体におけるTSH β mRNAの発現を反映し、wild typeでは甲状腺機能低下により著明に増加し (mean \pm SE、16.83 \pm 2.2 ng/ml)、T3投与により0.018 \pm 0.01 ng/mlへと低下した。TR α ノックアウトマウスも同様に甲状腺機能低下により20.4 \pm 3.4 ng/mlの高値を示し、T3投与により0.02 \pm 0.004 ng/mlに低下した。甲状腺機能低下にしたTR β ノックアウトマウスでも、血中のTSHは20.1 \pm 7.6 ng/mlとwild typeと同様のレベルを示した。しかしながら、T3による抑制は0.18 \pm 0.005 ng/mlと軽度であった。

2. TR α 或いはTR β ノックアウトマウス的心臓におけるSERCA 2 mRNAのT3による調節
心臓において、T3により増加するSERCA 2 mRNAの発現を検討すると、wild type、TR β

ノックアウトマウスでは、T3によるSERCA 2 mRNAの有意な増加が認められた。しかしながら、TR β のみを発現する α ノックアウトマウスでは、甲状腺ホルモン欠乏状態でこのレベルが上昇するもののT3による増加は認められなかった。

3. TR α 、TR β ノックアウトマウスにドミナントネガティブ作用を示す変異TR β 、G345Rをアデノウイルスを用いて肝臓に導入した際のT3依存性の肝臓機能の変化

Wild type、TR β ノックアウト、TR α ノックアウト共に、コントロールウイルスを投与した群ではT3により血中コレステロールの有意の低下が認められた。一方、全ての群でドミナントネガティブ作用を示す変異TR β 、G345Rを投与した群では、このT3依存性の低下が認められなくなった。

5'-DI mRNAは、wild typeでは、T3により著明に増加し、ドミナントネガティブTR β の導入により、この増加が完全に抑制された。各々のノックアウトマウスではT3によるmRNAの増加の程度は減弱したが、有意の増加が認められ、この増加はやはりドミナントネガティブTR β 、G345Rの導入により完全に抑制された。

D. 考 察

TSHは、甲状腺ホルモンによりネガティブフィードバックを受けることがよく知られているが、その分子機構は未だ明らかにされていない。TR α およびTR β ノックアウトマウスを甲状腺機能低下状態にすると下垂体中TSH β mRNA および血中TSHは、wild typeとほぼ同レベルまで上昇し、甲状腺ホルモン受容体は、

このupregulationには関与しないことが示唆された。一方、T3連続投与により下垂体中TSH β mRNA および血中TSHはTR α ノックアウトマウスおよびwild typeにおいて著しく低下したが、TR β ノックアウトマウスではこの低下は軽度であり、T3によるTSHの完全なネガティブフィードバックにはTR β の存在が必要とされることが示唆された。

心臓におけるSERCA 2 mRNAのT3による増加は、wild type、TR β ノックアウトマウスのみに認められ、TR α ノックアウトマウスにおいては認められず、心筋細胞における主要な甲状腺ホルモン受容体がTR α 1であることが示唆された。

T3投与による血中のコレステロールの低下および肝臓5'-DI mRNAの増加は、wild type、TR α 、TR β ノックアウトマウス全てに認められ、肝細胞にはTR α 、TR β の両者が発現していること、またそれぞれが受容体機能を代換し得ることが示された。ドミナントネガティブ作用を発揮する変異TR β をアデノウイルスを用いて肝臓に発現させると、wild type、TR α 、TR β ノックアウトマウス全てにおいてT3によるコレステロールの低下、5'-DI mRNAの増加が著しく抑制され、変異TR β がTR α 、TR β 両方の受容体機能を抑制することが示された。これは、変異TR β のドミナントネガティブ作用にアイソフォーム特異性が無いことを*in vivo*示す初めての報告と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. T Nagaya, K-S Chen, M Fujieda, S. Ohmori, JJK Richer, KB Horwitz, JR Lupski, H Seo: Localization of the human

- nuclear receptor co-repressor (hN-CoR) gene between the CMT1A and SMS critical regions of chromosome 17p11.2. *Genomics* 59: 339-341, 1999.
2. S Yamaguchi, Y Murata, T Nagaya, Y Hayashi, S Ohmori, Y Nimura and H Seo: Glucocorticoids increases retinoid-X receptor alpha (RXR α) expression and enhance thyroid hormone action in primary cultured rat hepatocytes. *J Mol Endocrinol*, 22 (1): 81-90, 1999
 3. Y Nomura, T Nagaya, S Yamaguchi, N Katunuma and H Seo: Cleavage of RXR α by a lysosomal enzyme, cathepsin L-type protease. *Biochem Biophys Res Commun* 254 (2): 388-394, 1999.
 4. Y Hayashi, M Yamamoto, S Ohmori, T Kikumori, T Imai, H Funahashi and H Seo: Polymorphism of homopolymeric glutamines in coactivators for nuclear hormone receptors. *Endocrine J* 46 (2): 279-284, 1999.
 5. Y Nomura, T Nagaya, Y Hayashi, F Kambe, and H Seo: 9-cis-retinoic acid decreases the level of its cognate receptor, retinoid X receptor, through acceleration of the turnover. *Biochem Biophys Res Commun* 260: 729-733, 1999.
 6. 長屋 敬, 妹尾久雄: 甲状腺ホルモンの生理作用---最新知見に基づいた診療のために---. *Medical Practice*, 甲状腺疾患へのアプローチその3. 16: 6, 904-911, 1999.
 7. 野村由夫, 長屋 敬, 林 良敬, 神部福司, 妹尾久雄: 9-cisレチノイン酸受容体(RXR)のそのリガンドによる発現調節. *診療と新薬*. 36: 4, 1999.
 8. 林 良敬, 妹尾久雄: SRC-1の構造と機能: 核内受容体のコアクチベーター. *ホルモンと臨床* 47: 4, 45-51, 1999.
 9. 長屋 敬, 妹尾久雄: コリプレッサーと甲状腺ホルモン受容体機能. *ホルモンと臨床*. 47: 4, 61-69, 1999.
 10. 林 良敬, 妹尾久雄: 甲状腺ホルモンレセプターの生理機能---甲状腺ホルモン不応症とノックアウトマウス. *実験医学* 18 (2): 297-302, 2000.
2. 学会発表
 1. Y Hayashi, M Yamamoto, A Shibata, S Ohmori, T Kikumori, T Imai, H Funahashi and H Seo: Polymorphism of homopolymeric glutamines in coactivators for nuclear hormone receptors. Sixth International Symposium on Molecular Thyroidology, 1999, 3. (Maebashi)
 2. T Nagaya, Y Murata, S Yamaguchi, Y Nomura, S Ohmori, M Fujieda, N Katunuma, H Seo: Cathepsin L-type protease modulates thyroid hormone action through cleaving RXR α . 6th CGGH Symposium, Biological Roles of Proteolysis in Health and Disease. 1999, 5. (Tokushima)
 3. 林 良敬, 伊藤公人, 妹尾久雄: ステロイド受容体コアクチベーター-1(SRC-1)によるグルココルチコイド受容体(GR)、甲状腺ホルモン受容体(TR)、レチノイドX受容体(RXR)を介した転写調節の増強の解析. 第72回日本内分泌学会学術総会, 1999, 6. (横浜)
 4. 長屋 敬, K-S Cheng, 藤條美幸, 大森幸子, 大塚吾郎, KS Richer, KB Horwitz,

JR Lupuski, 妹尾久雄: Human nuclear receptor co-repressor (hN-CoR)の染色体上での局在とそのvariantの組織発現分布. 第72回日本内分泌学会学術総会, 1999, 6. (横浜)

5. 野村由夫, 長屋 敬, 林 良敬, 神部福司, 妹尾久雄: RXR(9-cisレチノイン酸受容体)のリガンドによる細胞内分解促進. 第72回日本内分泌学会学術総会, 1999, 6. (横浜)
6. Y Hayashi, H Seo: Polymorphism and splicing variants of the coactivator for thyroid hormone receptor. 4th International Workshop on Resistance to Thyroid Hormone, 1999, 6. (Sao Paulo, Brazil)
7. 林 良敬, 妹尾久雄: ステロイド受容体コアクティベーター-1 (SRC-1) のsplicing variantsと核内受容体の相互作用の解析. 日本内分泌学会第42回日本甲状腺学会, 1999, 11. (名古屋)
8. 武内陽子, D Win, 林 良敬, 妹尾久雄, RE Weiss, S Refetoff, BW O'Mally, 村田善晴: Steroid Receptor Coactivator-1 ノックアウトマウス(SRC-1 KO)における甲状腺ホルモン標的臓器でのT3作用. 日本内分泌学会第42回日本甲状腺学会, 1999, 11. (名古屋)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

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

**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**

分担研究者 對馬敏夫 東京女子医科大学第二内科教授
研究協力者 磯崎 収、宮川めぐみ、高野加寿恵、井上洋一*
東京女子医科大学第二内科、*オリンピアクリニック眼科

研究要旨：バセドウ病眼症組織においてはGlycosaminoglycan(GAG)のsulfation(S化)に關与するDTD-sulfate transporter(ST)、heparansulfate-sulfotransferase(STF)の発現が認められたが、眼症に特異的なchondroitin sulfate合成に關与するchondroitin -6-sulfotransferase(STF)の発現は極めて少ないことが判明した。しかし、病変部よりの線維芽細胞においてはTSHやbFGFによりその発現が誘導されることが判明した。またGAGのS化の阻害はbFGFおよびTSHによるDNA合成を抑制し、STやSTFを標的とした新しい眼症の治療の可能性が示唆された。

A. 研究目的

バセドウ病眼症は稀ではあるが時として治療に抵抗性を示し、失明にいたるような症例も存在する。このように眼症はバセドウ病の治療における最も大きな課題の一つとなっており新しい治療法の開発が望まれている。最近になり眼症の病変部で蓄積しているGAGはS化を受けているchondroitin sulfateが増加しており、その親水性が高いため組織の浮腫を増悪していると考えられている。また、細胞外マトリックスを形成するheparan sulfate proteoglycanもsulfationを受けており、sulfate transporter(ST)の遺伝的障害により高度な軟骨形成不全症がひき起こされることが判明している。このような事実より眼症におけるGAGの蓄積や組織の腫脹を阻止するため、STやSTFを標的とした新しい治療法の可能性について検討を行った。

B. 研究方法

バセドウ病眼症の手術において、病変部の切除および病変部へのアプローチのため摘出された組織のうち病理検査にて不要となった組織を患者および主治医の承諾のもとに用いた。遺伝子発現は組織よりRNAを抽出し、RT-PCRを用いてST、STFの遺伝子発現をRT-PCRを用いて測定した。また、一部の組織よりは線維芽細胞の培養を既報の方法で行った。培養線維芽細胞における³⁵S-sulfateの取込みおよび³H-thymidineの取り込みを既報の方法で測定した。

C. 結果

眼症患者の病変部の組織においてDTD-ST、heparansulfate STFのmRNAは検出可能であったが、chondroitin-6-STFのmRNAは検出不能であった。眼症組織より培養した線維芽細胞においてはDTD-STおよびHS-STFのmRNAは恒常

的に発現していた。しかし、Chondrotin-6-STFの遺伝子発現は高濃度のTSHおよびbFGFにて誘導された。このような誘導は正常皮膚線維芽細胞では認められなかった。³⁵S-sulfateの取込み実験では病変部線維芽細胞に存在するSTはsulfate-Cl antiporterであることが判明した。またSTを塩素酸Naにて抑制すると、bFGFおよび高濃度のTSHによるDNA合成が特異的に抑制された。このように高濃度のTSHはGOFにてDNA合成およびcAMP産生を促進したがdibutyryl cAMPはDNA合成は促進せず、その作用はcAMP以外の系を介するものと推測された。ヒアルロン酸合成酵素のmRNAについては眼症組織にて2型および3型の恒常的発現が認められたが、1型の発現は極めて少ないと考えられた。

D. 考 察

バセドウ病眼症の病変部におけるS化を受けるGAGの蓄積を阻止するためsulfate transporterの機能の抑制は細胞増殖をおよび外因性のsulfateを枯渇させることによりその病態形成に重要なchondrotin sulfateのS化を抑制するばかりでなく細胞増殖因子の受容体機構として機能しているheparan sulfate proteoglycanの機能も抑制し、細胞増殖を抑制することにより病変部のGAGの産生を抑制する可能性も示唆された。また、眼症の病変部におけるTSH受容体は甲状腺細胞の受容体とは異なる特性を有し、chondrotin-6-sulfotransferaseの遺伝子誘導を行うことより、眼症の進展に何らかの役割を果たしていることが示唆され、TSH受容体抗体と眼症との臨床的関連性を支持するものであった。このような事実はsulfate transporterおよびheparan sulfate sulfotransferase

およびchondrotin-6-sulfotransferaseを標的とするantisense療法や特異的拮抗剤は将来有望な治療法と成る可能性が示唆された。

E. 結 論

バセドウ病眼症においてsulfate transporterおよびsulfotransferase, core proteinを標的とする新しい治療法が有望であることが判明した。

F. 研究発表

1. 学会発表

バセドウ病眼症におけるsulfate transporterおよびsulfotransferase遺伝子発現および眼症病変部におけるsulfationの役割 第42回日本甲状腺学会(平成11年11月17日)

日本内分泌学会誌75巻2号277頁, 1999年

Sulfate transporter, sulfotransferase and sulfatase in orbital fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy.

7th international symposium on molecular thyroidology, March 24, 2000

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

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

分担研究者 中村浩淑 浜松医科大学第二内科 教授

研究要旨 異常甲状腺ホルモン受容体(TR)が正常TR機能を阻害するドミナントネガティブ(DN)作用は、甲状腺ホルモン不応症の病態上最も重要な因子である。ビタミンD3受容体(VDR)は、TRと構造的にも機能上も相同性が高いにもかかわらず、DN作用を持たない。この理由を検討することによって、DN作用機構を追求した。TRとVDRの種々のキメラ受容体を作成し機能を調べた結果、TRのヒンジ領域がDN作用に必要であり、特にコレプレッサーが結合する配列(Co-box)が重要であることが示された。キメラ受容体とコレプレッサーとの結合能をtwo hybrid assay system系で検討したところ、DN作用をもつ受容体のみコレプレッサーと高い結合能を有した。以上より、TRのDN作用にはコレプレッサーの関与が重要であり、VDRにDN作用がないのはコレプレッサーと結合しないためと考えられた。

A. 研究目的

甲状腺ホルモン不応症の発症には異常TRのDN作用が重要であるが、その機序は十分解明されていない。一方、VDRはTRと構造的にも機能的にも高い相同性を示すにもかかわらず、異常VDRはDN作用を発揮しない。DN作用におけるTRとVDRの違いを調べることにより、異常TRのもつDN作用の機序を追求する。

B. 研究方法

野生型VDRと野生型TRをもとに、VDRのA/B、C、D領域とTRのE/F領域からなるキメラ受容体DDDT、VDRのA/B、C領域とTRのD、E/F領域からなるDDTT、C蛋白11個のアミノ酸を欠失させたDDTT(F451X)、DDTTキメラ受容体のコレプレッサー結合部位(CoR-box)に2種類の変異を導入したDDTT(AHT)、DDTT(P214R)を作成した。野生型VDRとキメラ受容体をオステオポンチンレポーター(OP)遺伝子とともにCV1細胞に発現させ転写活性を調べた。

またGAL4のDNA結合領域とTRのホルモン結合領域の融合蛋白とVP16とコレプレッサーSMRTの融合蛋白とからなるtwo hybrid assay系を構築し、キメラ受容体のコレプレッサーSMRTに対する結合能をcompetition assayで求めた。

(倫理面への配慮)

In vitroの実験であり、倫理面では問題がない。

C. 研究結果

野生型VDRとキメラ受容体を等量発現させDN作用を調べたところ、DDTTはVDRの転写活性を40%減少させたが、DDDTには阻害効果がなかった。TRのD領域にはコレプレッサーが結合するCoR-box配列が含まれることから、DDTTキメラ受容体のCoR-box配列に変異を導入してコレプレッサーとの結合を阻止したときの影響を調べたところ、変異受容体はDDTTで認められていたDN作用を完全に消失した。ついでtwo hybrid assay系でキメラ受容体とコレ

プレッサー-SMRTとの結合を調べると、DN作用の強いDDTTおよびDDTT(F451X)はSMRTと強く結合するが、DN作用を持たない野生型VDR、DDDT、DDTT/CoR-box変異受容体はSMRTと結合しなかった。以上の結果から、DN作用には受容体にコレプレッサーが連関することが必要であることが示された。

D. 考 察

異常TRの持つDN作用の機序として、異常TRがパートナー蛋白であるレチノイドXレセプター(RXR)とヘテロダイマーを作り、標的遺伝子のプロモーター上に存在するT3レスポンスエレメント(TRE)を占有するためと想定されているが、異常TRのCoR-boxに変異を導入するとDN作用が見られなくなることや、異常TRのDN作用とSMRTとの結合能が非常によい相関を示すという我々の以前の成績から、DN作用にコレプレッサーが関与している可能性が考えられている。TRとVDRのキメラ受容体およびその変異体を作成しDN作用を検討したところ、TRのコレプレッサー結合部位が重要であり、SMRTとの結合能とDN作用発現が一致する結果が得られた。このことはDN作用にコレプレッサーが重要因子であることを示すものである。したがってDN作用機序として、異常TR/RXR複合体はTRE上で正常TR/RXRと競合し、同時にコレプレッサーを呼び込んで転写を抑制するものと考えられる。

E. 結 論

甲状腺ホルモン不応症の発症に重要な異常TRのドミナントネガティブ作用には、コレプレッサーが関与する。

F. 研究発表

1. 論文発表

How does not vitamin D3 receptor express silencing and dominant negative activities? Analysis by chimeric receptors between thyroid hormone receptor and vitamin D3 receptor H.

Natsume, H. Nakamura et al.
投稿準備中

2. 学会発表

サイレンシング作用、ドミナントネガティブ作用のメカニズム：キメラレセプターを用いての検討 (浜松医科大学第二内科 夏目宏子、中村浩淑、他)

第72回日本内分泌学会総会 1999年6月2日
(日本内分泌学会雑誌 75 (1): 116, 1999)

How does not vitamin D3 receptor express silencing and dominant negative activities? Analysis by chimeric receptors between thyroid hormone receptor and vitamin D3 receptor (H. Natsume, H. Nakamura et al.)

第72回米国甲状腺学会 1999年10月2日
(Proceedings of the 72nd Annual Meeting of the American Thyroid Association p120, 1999)

ビタミンD3レセプターは甲状腺ホルモンレセプターに見られるドミナントネガティブ作用をなぜ示さないか (浜松医科大学第二内科 夏目宏子、中村浩淑、他)

第42回日本甲状腺学会 1999年11月17日
(日本内分泌学会雑誌 75 (2): 270, 1999)

CoR-box of thyroid hormone receptor (TR) is essential to the dominant negative effect of chimeric receptors between vitamin D3 receptor and TR

(H. Natsume, H. Nakamura et al.)

第7回分子甲状腺シンポジウム 2000年3月24日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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

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

分担研究者 森 昌朋 群馬大学医学部第一内科 教授

研究要旨 核内ホルモン受容体コアクチベーターp120のPPAR γ に対する
作用機構等が明らかとなった。

A. 研究の目的

近年、核内ホルモン受容体の遺伝子制御機構における共役因子の重要性が明らかとなりつつある。また、共役因子と疾患との関連も注目されている。しかし、その詳細な作用機構、疾患との関連が明らかとなっている共役因子は少数である。我々は、新たな核内ホルモン受容体共役因子としてクローニングしたp120についてその作用機構を解析し、疾患との関連を検討することを目的とした。本研究により核内ホルモン受容体の遺伝子制御機構における共役因子の詳細な作用機構が明らかとなるばかりでなく、共役因子の異常に基づく新たな疾患概念が確立されることが期待される。

B. 研究方法

- 1, CV-1細胞にp120と共に各種核内受容体を遺伝子導入し、p120の作用を検討した。
- 2, P120と種々の核内受容体との相互作用を酵母Two hybrid 法、Three hybrid法、EMSA法などを用いて検討した

C. 研究結果

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ていることが判明した。さらにその作用機構は他の核内ホルモン受容体に対するものと異なり、RXRのリガンド依存性（9-cis RA）にRXRを介するものであることが明らかとなった。

D. 考察

核内受容体は種々のコアクチベーター群によって受容体特異的に制御されていると考えられるが、その機構の詳細は不明である。P120は甲状腺ホルモン受容体に直接結合するコアクチベーターとしてクローニングされたが、PPAR γ とは直接結合せず、RXRを介して作用していることが明らかとなり、コアクチベーターの核内受容体特異性を解析するモデルとなり得る。

E. 結論

p120は、PPAR γ /RXRヘテロダイマーのRXRを介してコアクチベーターとして機能している。

F. 研究発表

1、論文発表

T. Monden, M. Kishi, T. Hosoya, T. Satoh, FE.

Wondisford, AN Hollenberg, M. Yamada and M. Mori. P120 acts as a specific coactivator for 9-cis-retinoic acid receptor (RXR) on peroxisome proliferator-activated receptor- γ /RXR heterodimers. *Mol. Endocrinology* 13:1695-1703, 1999

2、学会発表

1、第42回日本甲状腺学会、1999年11月18日
甲状腺ホルモンレセプターコアクチベータ p120は異なる結合部位及び作用機構により他の核内レセプターに作用する
門伝 剛、細谷 剛、佐藤哲郎、山田正信、森 昌朋

2、第81回アメリカ内分泌学会1999年6月13日
9-cis retinoic acid dependent interaction of p120, a nuclear receptor co-activator, with RXR on PPAR γ /RXR heterodimers.
T. Monden, T. Hosoya, A. Ozawa, T. Satoh, F.E. Wondisford, A.N. Hollenberg, M. Yamada, M. Mori

3、第72回日本内分泌学会1999年5月31日
核内レセプターコアクチベータ p120は PPAR γ /RXRヘテロダイマーのRXRにリガンド依存性に作用し転写活性を惹起する
門伝 剛、岸 美紀子、細谷 剛、小澤厚志、渋谷信行、佐藤哲郎、山田正信、森 昌朋

4、第6回アジア、オセアニア甲状腺学会
1997年11月12日
A novel co-activator p120 which interacts with the thyroid hormone receptor, androgen receptor and PPAR γ in a ligand-dependent manner has a unique sequence motif LXXLL in its interacting region. T. Monden, M. Yamada, T. Satoh, M. Shitara, S. Konaka, M. Mori

G. 知的所得権の取得状況

- 1、特許取得 なし
- 2、実用新案登録 なし
- 3、その他

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**

研究協力者 赤水尚史 京都大学医学部臨床病態医科学 助手

研究要旨：バセドウ病のモデル動物の開発のために、抗TSH受容体抗体トランスジェニックマウスを作製した。1系統のトランスジェニックマウスにおいて、有意なヒトIgMの発現を認め、今後の機能解析に供することが可能となった。また、バセドウ病の遺伝因子に関する研究では、候補遺伝子間の相互作用について検討したが、有意な作用を認めなかつた。

A. 研究目的

バセドウ病は、TSH受容体自己抗体によって引き起こされる臓器特異的自己免疫性疾患である。我々は同病のモデル動物を作製して病因・発症機構・病態を明らかにし、新たな治療法開発を期している。本年度は、抗TSH受容体抗体トランスジェニックマウスを作製した。また、バセドウ病の遺伝因子の研究として、候補遺伝子間の相互作用について検討した。

B. 研究方法

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。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た。DNAコンストラクトは、刺激型抗TSH受容体抗体産生B細胞クローンであるB6B7クローンのリンパ球ゲノム遺伝子から、プロモーターおよびイントロンエンハンサー領域を含むheavy chain遺伝子とlight chain遺伝子をそれぞれ単

離し、両鎖遺伝子をtandemに連結した。仔のゲノム遺伝子におけるトランスジーン存在をヒト免疫グロブリン遺伝子をprobeとしてPCRやSouthern blot解析で確認した。

候補遺伝子間の相互作用については、TSH-AT, TSHR-CA, CTLA4の各多型マーカーうち、任意の2つについて2X2分割表を作製し、危険率(odds ratio:OR)を計算してカイ2乗検定を行った。

C. 研究結果

抗体遺伝子トランスジェニックマウスのDNAコンストラクトをC3HBL/6マウスの受精卵にmicroinjectし、サザンブロット解析にて、コピー数の異なるマウスを5系統得た。うち1系統では、B6B7マウスの1系統において分泌型ヒトIgMの発現と膜型ヒトIgMの発現を確認した。また、同系統では、マウスB細胞数の減少が見られた。

候補遺伝子間の相互作用については、1) TSH-CAのアリル1を有する人がTSHR-ATのアリル5を有する時の危険率上昇(OR=3.0)は、逆の場合より高かつた(OR=1.6)。2) TSHR-AT

アレル5と CTLA-4 アレル2との間には、上記のような危険率上昇は観察されなかつた(OR≒1)。

D. 考察

1系統のマウスにおいて、マウスB細胞数の減少が見られたことは、(1) clonal deletion、(2) B cell receptorのdown modulation あるいは allelic exclusion、の可能性が示唆された。また、同マウスにおいて、分泌型ヒトIgMの発現と膜型ヒトIgMの発現を確認されたことは、TSH受容体抗体が有意に発現されていることを示している。今後、同マウスのライン樹立と内分泌学的機能解析を行う予定である。

候補遺伝子間の相互作用については、TSHR-ATのアレル5の方がTSH-CAのアレル1より強く疾患感受性に関連していること、また、TSHR-ATと CTLA-4ローカスとが独立していることが示唆された。

E. 結論

- ①. コピー数の異なるマウスを5系統得た。
- ②. うち1系統では、B6B7マウスの1系統において分泌型ヒトIgMの発現と膜型ヒトIgMの発現を確認した。
- ③. また、同系統では、マウスB細胞数の減少が見られ、(1) clonal deletion、(2) B cell receptorのdown modulation あるいは allelic exclusionが示唆された。
- ④. バセドウ病候補遺伝子であるTSHレセプターとCTLA-4との間には、有意な相互作用を認めなかつた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Akamizu T, Moriyama K, Miura M, Saijo M, Matusda F, Nakao K: Characterization of recombinant monoclonal anti-thyrotropin receptor antibodies (TSHRABs)

derived from lymphocytes of patients with Graves' disease: Epitope and binding study of two stimulatory TSHRABs. Endocrinology, 140:1594-1601, 1999

- ② Moriyama K, Akamizu T, Umemoto M, Miura M, Saijo M, Taniguchi K, Nakao K. A case of Hashimoto's thyroiditis with markedly elevated serum thyroglobulin and evidence of its influence on the measurement of anti-thyroglobulin antibody by highly sensitive assays. Endocrine J, 46:687-693, 1999
- ③ Shintani M, Nishimura H, Akamizu T, Yonemitsu S, Masuzaki H, Ogawa Y, Hosoda K, Inoue G, Yoshimasa Y and Nakao K. Thyrotropin decreases leptin production in rat adipocytes. Metabolism, 48: 1570-1574, 1999
- ④ Koshiyama H, Sellitti DF, Doi SQ, Akamizu T, Nakao K. Comment on Thyrotropin Receptor Gene and Mitral Valve Prolapse. J Clin Endocrinol Metab 84: 3404-3405, 1999
- ⑤ 赤水尚史：バセドウ病・橋本病の病因遺伝子はどこまで明らかになつたか。Medical Practice. 16: 980-982, 1999
- ⑥ 赤水尚史：概論-遺伝性素因と環境因子。特集「自己免疫性甲状腺疾患」日本臨床、57:1697-1702, 1999

2. 学会発表

- ①. Misa Saijo, Takashi Akamizu, Kenji Moriyama, Masako Miura, Yoshiuki Hattori, Kazuwa Nakao. Saijo In vivo bioactivities of recombinant monoclonal thyroid stimulating antibodies derived from lymphocytes of patients with Graves'

- disease. The 81th Annual Meeting of The Endocrine Society, San Diego, California, # P1-353(P09-2110), 1999
- ②. Marie Seo, Okazaki T, Toshiro Fujita, Takashi Akamizu, Yuji Tanaka. Blocking type monoclonal antibodies (TSBAb) established from patients with Graves' disease stimulating growth of FRTL-5 cells. The 81th Annual Meeting of The Endocrine Society, San Diego, California, OR36-4(p112), 1999
- ①. Akamizu T, Sale MM, Rich SS, Hiratani H, Yoshimura Noh J, Miura M, Saijo M, Moriyama K, Nakao K, Bowden DW. Association and interactions between TSH receptor and CTLA-4 polymorphisms and susceptibility to autoimmune thyroid diseases (AITD) in the Japanese population. 26th Meeting of European Thyroid Association, Milano, Italy, 1999, 210
- ④. Y. Hattori, T. Akamizu, M. Saijo, K. Moriyama, N. Ito, K. Nakao. Secretion of ectodomain of TSH receptor by insect cells using a recombinant baculovirus system. The 72th meeting of the American Thyroid Association, Palm Beach, Florida, #251 (p81), 1999
- ⑤. Sellitti DF, Akamizu T, Doi SQ, Kim GH, Kariyil J, Kopchik JJ, Koshiyama H. Renal expression of the thyroid-specific genes: Thyrotropin receptor and thyroglobulin. 15th International Congress of Nephrology. 11th Latin American Kidney Congress of Nephrology Buenos Aires, Argentina, 2-6 May 1999
- ⑥. 赤水尚史、平谷仁美、M Sale、D Bowden、吉村弘、中尾一和。自己免疫性甲状腺疾患の病因候補遺伝子間の相互作用。第36日本臨床分子医学会。1999.4.23-24.
- ⑦. 西條美佐、赤水尚史、森山賢治、三浦晶子、平谷仁美、服部喜之、松田文彦、中尾一和。Recombinant human TSAb のin vivo における生物学的活性の検討。第72回日本内分泌学会学術総会、1998.6.12-15、横浜
- ⑧. 永野良子、高松順太、柳川達生、平谷仁美、赤水尚史、伊藤 充、北岡治子、大澤伸昭。CTLA 4遺伝子多型と日本人トリヨードサイロニン優位型バセドウ病との関連性。第72回日本内分泌学会学術総会、1998.6.12-15、横浜
- ⑨. 森山賢治、赤水尚史、奥田譲治、西條美佐、服部善之、三浦晶子、松田文彦、森徹、中尾一和。リコンビナント・モノクローナル阻害型抗TSHレセプター抗体のin vivoにおける機能的解析。第42回 日本甲状腺学会 1999.11.16-18 名古屋
- ⑩. 服部喜之、赤水尚史、西條美佐、森山賢治、中尾一和。バキュロウイルス昆虫細胞発現系による可溶性TSHレセプターの大量発現の検討。第42回 日本甲状腺学会 1999.11.16-18.名古屋
- ⑪. 瀬尾麻理、田中祐司、岡崎具樹、桑原公一郎、藤田敏郎、西條美佐、赤水尚史。バセドウ病患者IgGが活性化するFRTL-5細胞増殖刺激経路の解析：TSBAb活性を示すモノクローナル抗体による細胞増殖刺激。第42回 日本甲状腺学会 1999.11.16-18.名古屋

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

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
—ビタミンD₃ 1 α -水酸化酵素遺伝子のビタミンDによる転写抑制—

分担研究者 加藤 茂明 東京大学分子細胞生物学研究所・教授

研究要旨

核内レセプターの転写制御機能を分子レベルで理解する目的に、ビタミンDレセプターを介したリガンド依存的な転写抑制機構について、検討した。

ビタミンD₃ 1 α -水酸化酵素[1 α (OH)ase]は、活性型ビタミンD₃ [1 α ,25(OH)₂D₃]産生を制御する鍵酵素である。我々は、昨年までに、1 α (OH)ase遺伝子の発現が1 α ,25(OH)₂D₃により強く抑制されていることを明らかにした。今回、1 α (OH)ase遺伝子プロモーター解析により、負のビタミンD応答領域を同定した。さらに、この1 α ,25(OH)₂D₃依存的な抑制に関わる転写因子を取得した。

A. 研究目的

脂溶性ビタミンであるビタミンDは、従来より知られているカルシウム代謝調節だけでなく、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、ステロイド、甲状腺ホルモン核内レセプター群に属し、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（VDR）を介した遺伝子発現により調節される。

一方、ビタミンDは、生体内で数段階の水酸化過程を経て、作用発現に至ることが知られている。皮膚で紫外線により合成あるいは食餌から吸収されたビタミンDは、まず肝臓で25位水酸化酵素により水酸化され、25(OH)Dとなる。さらに、腎臓の近位尿細管で、1 α (OH)aseにより活性型の1 α ,25(OH)₂Dに、あるいは、24水酸化酵素により24,25(OH)₂Dになる。したがって、活性型ビタミンDの生合成過程において腎臓に

局在する1 α (OH)aseはビタミンD生合成の鍵酵素となる。

我々は、以前からビタミンDの様々な生理作用について分子生物学的視点より探究してきた。昨年までに、1 α (OH)ase遺伝子のクローニングを行い、この遺伝子発現が副甲状腺ホルモンやカルシトニンにより正に、1 α ,25(OH)₂D₃によって負に調節されていることを明らかにした。また、VDR欠損マウスの検討から、この遺伝子の発現が1 α ,25(OH)₂D₃によって強く負に調節されていることが明らかになった。そこで、本研究では、ビタミンD生合成の鍵酵素である1 α (OH)ase遺伝子の1 α ,25(OH)₂D₃依存的な転写抑制機構について検討し、リガンド依存的なVDRによる転写抑制の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

(1)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