

チルトランスフェラーゼ (CAT) 法で、取得した 1α (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。また、負のビタミンD応答領域を同定するため、様々なプロモーターのdeletion mutantを作製し、CAT法を行った。

- (2)ゲルシフト法を用いて、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に対する負の推定応答領域へのVDR/RXRの結合を検討した。
- (3) $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による転写抑制にヒストン脱アセチル化酵素が関与するか検討するため、ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤であるトリコスタチンAを用いたCAT法を行った。
- (4)負の応答領域に結合する転写因子を取得するため、MCT細胞株よりcDNAライブラリーを作製し、yeast one-hybrid法を用いた。

C. 研究結果

- (1)ヒト 1α (OH)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。また、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に対する負の応答はMCT細胞特異的であり、VDR、RXR存在下で明らかであった。そこで、このMCT細胞を用いて、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に対する負の応答領域を検討したところ、 1α (OH)ase遺伝子5'上流500bp近傍の23bpに存在することが明らかとなった。この配列には、既知のビタミンD応答配列は認められず、E-boxを二つ含むものであった。
- (2) $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に対する負の応答推定領域へのVDR/RXRの結合をゲルシフト法を用いて検討したが、VDR、RXRの直接の結合は認められなかった。
- (3)ヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤である

トリコスタチンAを処理することによって、この抑制が阻害されることが明らかになった。

- (4) 1α (OH)ase遺伝子プロモーターの負の応答領域にはbasic Helix-loop-Helix familyに属する転写因子が取得できた。

D. 研究考察

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による負の応答はMCT細胞特異的に認められ、VDRの存在が必須であること、しかし負のビタミンD応答配列には直接のVDR/RXRの結合はないことから、未知転写因子が $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的にVDRやRXRと複合体を形成し、 1α (OH)ase遺伝子の発現を抑制するという新たな抑制機構が推測された。また、近位尿管細胞特異的に発現している転写調節蛋白の関与や、ヒストン脱アセチル化酵素の関与も示唆された。現在、yeast one-hybrid法で取得した転写因子の詳細な解析を進めているところである。

E. 結論

1α (OH)ase遺伝子プロモーター解析により、負のビタミンD応答領域が5'上流500bp近傍の23bpに存在することが明らかとなった。さらに、この $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な抑制に関わる転写因子を取得した。

F. 研究発表

1. 発表論文 (原著)

1. Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J., Kato, S.: p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor α and β by interacting directly with the N-terminal

- A/B domains. *J. Biol. Chem.*, 2000 (in press).
2. Fuse, H., Kitagawa, H., Kato, S.: Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralo-corticoid receptor AF-1. *Mol. Endocrinol.*, 2000 (in press).
 3. Tai, H., Kubota, N., Kato, S.: Involvement of nuclear receptor coactivator SRC-1 in estrogen-dependent cell growth of MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000 (in press).
 4. Kinuta, K., Tanaka, H., Moriwake, T., Aya, K., Kato, S., Seino, Y.: Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology*, 2000 (in press).
 5. Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N., Kato, S.: FGF10 is essential for the limb and lung formation. *Nature Genetics*, 21, 138-141, 1999.
 6. Takeyama, K., Masuhiro, Y., Fuse, H., Endoh, H., Murayama, A., Kitanaka, S., Suzawa, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 1049-1055, 1999.
 7. Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S., Kato, S.: Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor α . *Mol. Cell. Biol.*, 19, 5363-5372, 1999.
 8. Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Toriyabe, T., Kashiwagi, K., Watanabe, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Kato, S.: Convergence of TGF β and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional co-activators. *Science*, 283, 1317-1321, 1999.
 9. Yanagi, Y., Suzawa, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Yanagisawa, J., Kato, S.: Positive and negative modulation of vitamin D receptor function by transforming growth factor- β signaling through Smad proteins. *J. Biol. Chem.*, 274, 12971-12974, 1999.
 10. Kato, S., Sekine, K.: FGF-FGFR signaling in vertebrate organogenesis. *Cell. Mol. Biol.*, 45, 631-638, 1999.
 11. Kitanaka, S., Murayama, A., Sakaki, T., Inoue, K., Seino, Y., Fukumoto, S., Shima, M., Yukizane, S., Takayanagi, M., Niimi, H., Takeyama, K., Kato, S.: No enzyme activity

- of 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene product in pseudovitamin D-deficiency rickets including that with mild clinical manifestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 4111-4117, 1999.
12. Murayama, A., Takeyama, K., Kitanaka, S., Kodaera, Y., Kawaguchi, Y., Hosoya, T., Kato, S.: Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1 α , 25(OH)₂D₃ in intact animals. *Endocrinology*, 140, 2224-2231, 1999.
 13. Suzawa, M., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Kato, S., Ueno, Naoto, Miyazono, K., Matsumoto, T., Fujita, T.: Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells in vitro. *Endocrinology*, 140, 2125-2133, 1999.
 14. Takeda, S., Yoshizawa, T., Nagai, Y., Yamato, H., Fukumoto, S., Sekine, K., Kato, S., Matsumoto, T., Fujita, T.: Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: Studies using VDR knockout mice. *Endocrinology*, 140, 1005-1008, 1999.
 15. Sawada, N., Sakaki, T., Kitanaka, S., Takeyama, K., Kato, S., Inouye, K.: Enzymatic properties of human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase coexpression with adrenodoxin and NADPH-adrenodoxin reductase in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 265, 950-956, 1999.
 16. Sakaki, T., Sawada, N., Takeyama, K., Kato, S., Inouye, K.: Enzymatic properties of mouse 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase expressed in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 259, 731-738, 1999.
 17. Kato, S., Takeyama, K., Kitanaka, S., Maruyama, A., Sekine, K., Yoshizawa, T.: In vivo function of VDR in gene expression-VDR knock-out mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 69, 247-251, 1999.
 18. Kato, S.: Genetic mutation in the human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene causes vitamin D-dependent rickets type I. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 156, 7-12, 1999.
 19. Sasaki-Iwaoka, H., Maruyama, K., Endoh, H., Komori, T., Kato, S., Kawashima, H.: A trans-acting enhancer modulates estrogen-mediated transcription of reporter genes in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.*, 14, 248-255, 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

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

主任研究者 清野佳紀 岡山大学医学部小児科教授
研究協力者 田中弘之、宮村能子、井上勝、一ノ瀬洋次郎

研究要旨

家族性低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病においてもそのマウスモデルであるHypマウスにおいても、原因遺伝子はPHEX/Phexであることが同定されているが、病態発生機序の詳細は不明である。Phex遺伝子が骨髄の細胞に発現していることから、Hypマウスにおいて骨髄移植を行い、疾患の表現型発現に対する影響を検討した。正常なマウスの骨髄細胞を移植されたHypマウスは移植骨髄の生着率に比例して、疾患表現型の改善が観察された。即ち、血清リン値の増加、腎リン輸送担体遺伝子発現の増加、ビタミンD24水酸化酵素遺伝子発現の低下である。一方、25水酸化ビタミンD1 α 水酸化酵素遺伝子の発現には大きな変化を認めなかった。以上より、骨髄移植によって正常Phex遺伝子の機能を導入する事が可能であること、低リンくる病におけるビタミンD抵抗性の原因は亢進した活性型ビタミンDの異化である事が示された。

A. 研究目的

家族性低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病（XLH）は、ビタミンD抵抗性を示す遺伝性くる病の中で最も頻度の高い疾患である。本疾患は、現在では大量の活性型ビタミンDとリン製剤の併用によって治療されているが、この治療法は時に高カルシウム尿症のため腎結石を合併したり、リンの投与によって二次性副甲状腺機能亢進症を合併する危険がある。また、成人の本症においては骨棘形成や後縦靭帯骨化症を合併するが、その機序は全く不明のままである。さらに、Positional cloningの結果、本疾患の原因遺伝子がPHEXとして同定されたが、その天然基質と考えられるリン利尿因子の本態や、病態機構も不明であり、病態に基づく新規の治療法開発は現時点ではまだ不可能である。本研

究では本疾患の病態機構を解明し、病態に基づく新規の治療法開発することを目的に、本症のモデル動物であるHypマウスに正常骨髄を移植しその効果を検討した。特に本年度は本疾患におけるビタミンD抵抗性の機序を明らかにすることに主眼を置いた。

B. 方法

実験は当教室で維持しているHyp/Hypのホモのマウスコロニーを用いて行った。生後24時間以内に新生仔雌マウスの腹腔内に8週齢の雄性野生型マウスおよびHypマウスより調整した骨髄細胞を投与し、8週間後に屠殺、血清にてカルシウム・リン濃度・ALP活性を測定するとともに、腎におけるNpt-2遺伝子発現、ビタミンD24水酸化酵素遺伝子発現をノーザンハイブリダイゼーションによって、1 α 水酸化酵素遺伝

子発現をcompetitive PCR法によって解析した。骨髄の生着はsry遺伝子を各臓器において検出することにより確認した。

C. 結果

図1に示すように野生型マウスの骨髄を移植されたマウス(WH)の腎Npt-2(NaPi-7)遺伝子発現は増加し、血清カルシウム値には変化を認めなかったが、血清のリン値は上昇した。同様に骨密度、ALP活性の改善も認められ、くる病は明らかに軽症化していた。さらに、血清リン値とsryで検討した移植骨髄の生着率の間には有意な正の相関が認められた(図2)。一方、従来Hypにおいては24位の水酸化による異化の亢進が報告されている。そこで、腎の24水酸化酵素遺伝子の発現を観察した。図3に示すように未処置のHypマウス(H)は野生型(W)に比し著しく高い遺伝子発現を示すが、野生型骨髄を移植されたHypマウスではその活性は野生型レベルまで低下していた。ところがビタミンDの活性化酵素である 1α 水酸化酵素遺伝子は、未処置、移植のいずれの群でも大きな差は認めな

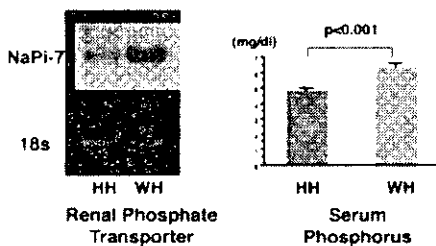


図1

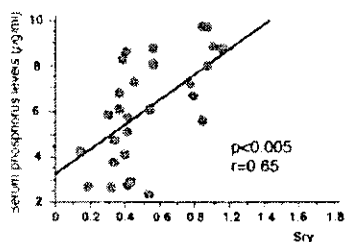


図2 sry遺伝子と血清リン値の関係

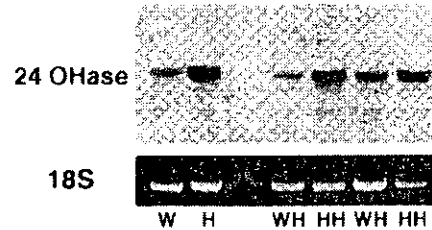


図3

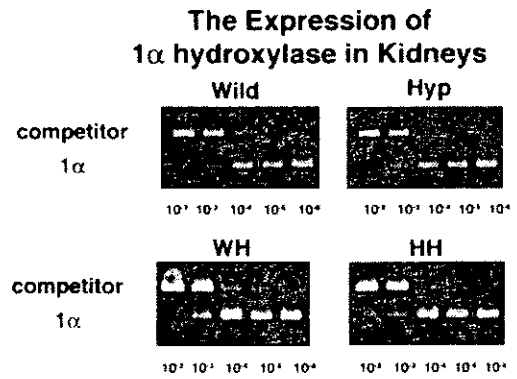


図4

った(図3)。

D. 考察

骨髄移植によって、Hypマウスの表現型が全て改善した。さらに、その効果は生着率に比例していた。Hypマウスの重症度はホモ接合体とヘテロ接合体、雌雄の間で差はないといわれており、この結果は一見矛盾しているように見える。しかし、骨髄移植本質的に異なるものと考えられ、Phex蛋白質が膜結合型のエンドペプチダーゼであることを機能的に裏付ける結果であると考えた。

また従来、ヒト、マウスの本疾患ではビタミンDに抵抗性を示すことから、ビタミンDの代謝異常が検討されてきたが、その十分な説明にはならなかった。今回直接的には証明できないが、骨髄移植によって24水酸化酵素遺伝子発現が野生型レベルまで低下したにもかかわらず、 1α 水酸化酵素遺伝子の発現には大きな変

化が認められなかったことから、HypマウスのビタミンD抵抗性の原因は異常に亢進した24水酸化が主体であり、この遺伝子の発現にもPhexまたはその天然基質が直接関与していることが考えられた。

E. 結 論

骨髄細胞を用いてHypマウスを治療することが出来た。HypマウスにおけるビタミンD抵抗性は24水酸化の亢進が主因であると考えられた。

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

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

分担研究者 松本 俊夫 徳島大学医学部第一内科教授

A. 研究目的

ビタミンD受容機構異常による骨・軟骨異常、骨髄間質細胞の分化障害、筋肉の機能障害の発現機構を明らかにすることにより、ビタミンD依存症II型などのビタミンD不応症や作用不全症に伴う運動機能障害の予防・治療法の確立を目指すと共に、骨髄間質細胞の異常による造血器障害に対するビタミンD治療の可能性を開く。

本年は特にビタミンD依存症II型の動物モデルであるビタミンD受容体(VDR)ノックアウトマウスの骨格筋障害を解析することにより、ビタミンD作用不全に伴う骨格筋異常の発症機序を解明することを目的に研究を行った。

B. 研究方法

VDRノックアウト(VDRKO)マウスの骨格筋の異常を解析するため、以下の検討を行った：

- 1)骨格筋の組織像（HE染色）の解析
- 2)筋細胞分化を制御する転写因子群（myf5, myogenin, myoD, E2F, myf6）のRNAレベル（RT-PCR）およびタンパクレベル（免疫染色）における発現解析
- 3)筋細胞分化段階の指標であるミオシン重鎖（MHC）の3つのアイソフォーム（胎児型、新生児型、成人型）のRNAレベル（RT-PCR）およびタンパクレベル（免疫染色）における発現解析
- 4)マウス筋芽細胞株C2C12におけるmyoDファ

ミリー転写因子の発現に対するビタミンDの効果に関するin vitroの検討

C. 研究結果

1)組織学的検討では、wild type littermatesに比してVDRKOマウス筋細胞は小径で大小不同が目立った。明らかな再生像などは認められなかった。

2)VDRKOマウスの筋細胞ではmyf5, myogenin, E2Fの発現が増加していた。

3)上記1), 2)異常はカルシウム代謝異常を全く来していない3週齢のマウスにおいても認められた。

4)VDRKOマウスの筋細胞では、3週齢では胎児型および新生児型の、8週齢では新生児型のMHCの発現が増加していた。

5)上記2), 4)の発現の変化はタンパクおよびRNAのレベルでともに認められた。

7)C2C12を10nMの活性型ビタミンDで48時間処理すると、myf5, myogenin, E2Fの発現の低下が認められた。

D. 考察

VDRKOマウスの筋細胞はほぼ正常に分化は遂げているものの、何らかの発育・成熟障害を来しているものと思われた。myoDファミリーの転写因子は筋細胞の限られた分化段階に発現され、相互に発現調節しながら筋細胞分化を制

御している。VDRKOマウスでは本来発現が消
失しているべき幾つかの因子の発現が残存して
おり、これにより何らかな機序を介して筋肉の
成熟障害をもたらしているものと考えられた。
実際、これらの因子の発現が抑制されるべき時
期は、VDRの発現時期と一致していることか
らこの抑制にVDRが必須であることが示唆さ
れる。これを支持する成績として、細胞株を用
いたin vitroの検討によりビタミンDがこれら
の因子の発現を抑制し得ることが直接示され
た。

E. 結 論

ビタミンDは筋細胞分化制御因子の発現抑制
に必須であり、VDRを介したこの作用を通じ
て筋肉の発達を制御する生理的因子である。し
たがって、この作用機序の解明は、ビタミンD
作用機構の異常に伴う筋力低下などの予防・治
療法の確立に貢献し得るものと思われる。

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

PTH/PTHrP 受容体遺伝子プロモーターAAAG反復配列多型の意義

分担研究者 安田 敏行 千葉大学医学部小児科講師

偽性副甲状腺機能低下症Ibの病因解明の目的で、ヒトPTH/PTHrP受容体P3プロモーターを解析中に発見したAAAG反復配列多型の意義について報告する。健常人で反復配列は3-8回であり、日本人の各アレル頻度は、5回6回の順であった。遺伝子型は5/6と5/5の組み合わせが多かった。機能的には反復配列数の増加でプロモーター活性が低下し、AAAG反復配列と身長に有意の関係を認めた。本多型は、PTH/PTHrP受容体の連鎖解析に有用であるとともに、偽性副甲状腺機能低下症の骨病変・発症年齢とも関与する可能性がある。

私どもは、新生児期に発見される、副甲状腺機能異常症の病因の同定のため、カルシウム感知受容体、PTH/PTHrP受容体について検討してきた。今回報告する、PTH/PTHrP受容体は、PTHを内分泌系のリガンド、PTHrPをparacrine系のリガンドとする受容体で、Gs α と共役し、Gs α 遺伝子は偽性副甲状腺機能低下症Iaの病因であることが明らかとなっている。ヒトPTH/PTHrP受容体のプロモーターは3個あり、ヒト特異的なP3 promoterがヒト腎臓・骨で有力なpromoterである。ヒトPTH/PTHrP受容体promoter部はGC richな塩基配列であり、この部位はメチル化により遺伝子機能が調節される事が想定される。私たちは、ヒトPTH/PTHrP受容体については本研究班の主要課題である偽性副甲状腺機能低下症Ibについてもメチル化が認められないこと、P3プロモーターのA-rich領域は機能を抑制する事をすでに報告した。PTH/PTHrP受容体P3 promoterのA rich 領域に新しく発見したAAAG反復配列多型について、頻度、promoter活性に及ぼす機能、

意義について現在までの検討を報告する。

【対象・方法】

1. DNA検体は文書同意を得て採取した。特に18-20歳の健常女性90名は、身長、体重、生化学検査値、血中PTH値を含め検討した。
2. PTH/PTHrP受容体P3 promoter部はnested PCRで増幅し、AAAG反復配列の多型は6%Acrylamide gel (一部は直接塩基配列決定)で解析。
3. AAAG反復配列3-8回のreporter plasmidを構築し、2種のヒト骨芽細胞由来株(HOS,SaOS2)を用い、Luciferase法による機能解析。
4. AAAG反復配列数と身体計測値との関係を検討。

【結果】

1. AAAG 反復配列遺伝子多型

健常人で3-8回のAAAG反復配列数を認めた。反復配列数が4回のは認めなかった。

2. AAAG反復配列遺伝子多型のpromoter活性に及ぼす影響

反復配列数が増加するとPTH/PTHrP受容体 promoter活性が低下した。

3.日本人におけるAAAG反復配列多型の頻度

反復数5回のアリルが多く、遺伝型としてはAAAG5回と6回の組み合わせが多かった。

表1

	AAAG3	AAAG5	AAAG6	AAAG7
AAAG3	0.5%			
AAAG5	1.5%	37.1%		
AAAG6	1.0%	43.9%	9.3%	
AAAG7	0%	4.4%	2.0%	0.5%
AAAG8	0%	0%	0.2%	0%

4.AAAG反復配列多型と身長

反復配列の増加とともに身長が高い傾向を示した (5回vs6回, $p < 0.05$).

【考案】

カルシウム代謝・軟骨細胞分化のキーとなるPTH/PTHrP受容体のヒト主要promoterに新規の遺伝子多型を見出した。このAAAG反復配列多型はpromoterの最小活性部位にあり、このA rich領域はpromoter活性を抑制する事が判明していた。現在まで206例512allelesを検討したところ、反復配列数は3-8回に及び、機能解析で反復配列数の増加でpromoter活性が低下する事が判明した。これはA rich領域の除去でpromoter活性が増加する事に合致する。

この反復配列多型は、3-8回に及びヒトPTH/PTHrP受容体遺伝子の最も有力な連鎖解析マーカーである。

PTH/PTHrP受容体は軟骨細胞の主として移行帯に発現し軟骨細胞の増殖分化のマスター遺伝子として機能する。偽性副甲状腺機能低下症Iaの低身長・第4指短縮等の骨病変は、PTH/PTHrP受容体と介在するGs α 遺伝子の機能低下によると考えられる。Blomstrand病

はPTH/PTHrP受容体の機能喪失型の変異で致死性の骨硬化を伴う四肢短縮型低身長をきたす。Jansen 病は、PTH/PTHrP受容体の機能亢進型の変異で高カルシウム血症を伴う骨石灰化障害・低身長をきたす。以上からPTH/PTHrP受容体の機能は骨発育に影響する。従って、今回示されたAAAG反復配列多型と身長の関係は今後さらに大規模に検討する必要があることを示しており、偽性副甲状腺機能低下症Iaの骨病変の理解にも必須である。さらに本多型が偽性副甲状腺機能低下症の発症年齢と関係する可能性もありさらに大規模に検討を予定している。

【文献】

1. 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.
2. 安田敏行、皆川真規. 医学のあゆみ2月号別冊 (松本俊夫編), 副甲状腺ホルモン (PTH) /PTHrPレセプターの活性型変異とJansen 軟骨異形性症., 医歯薬出版, 東京: 653-656, 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

ビタミンD受容体の細胞内動態に関する研究

研究協力者 大藪恵一 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部長

A. 研究目的

ビタミンD依存症II型(VDDRII)は、ビタミンD受容体(VDR)の機能異常によってもたらされる疾患である。VDDRIIは、従来、患者の線維芽細胞を用いた検討などからDNA結合、ホルモン結合、核局在に異常のある型に分類されていた。VDRのcDNAが明らかにされて、前二者の異常はVDR遺伝子の変異として同定されたが、核局在異常については不明である。VDRの細胞内分布・生成・崩壊については共通の理解が得られていない。本研究では、ビタミンD受容体異常症の病態の解明のため、VDRの可視化の技術を用いて、VDRの細胞内動態とその代謝を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

green fluorescent protein (GFP) にVDRをつないだ融合蛋白を用いてVDRの細胞内分布を検討し、さらに核局在シグナル(NLS)の同定を行った。具体的には、VDRの発現vector pSG5hVDRと、GIBCO社のGFP expression vector、pGreen Lanternを用い、GFPを野生型VDRのN端側につないだGFP-VDRと、C端側につないだVDR-GFPの2つの融合蛋白を作製し、その融合遺伝子をCOS7細胞に一過性に導入して、融合蛋白の局在を蛍光顕微鏡にて観察した。さらに、 10^{-8} Mの1,25-dihydroxy-vitamin D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$]の添加により、リガンドがVDRの細胞内分布にあたえる影響につい

ても検討した。

さらに、種々の欠失変異VDRとGFPとの融合蛋白を作製し、その細胞内分布を検討することで核移行シグナルの検討を行った。

C. 研究結果

GFPとの融合蛋白を用いた検討で、VDRはリガンドの非存在下においても核優位に存在したが、細胞質にも分布が認められること、また、リガンドの添加によって、核への局在性が高まることを見いだした。欠失変異VDRの細胞内分布の結果からヒンジ部の154-173のアミノ酸が核移行シグナルの候補と考えられたので、この配列を本来細胞質に局在する蛋白質であるアルカリフォスファターゼ(ALP)と結合したところ、ALPを核に移行させたことから、この領域がVDRの核移行シグナルとして働くことが証明された。

D. 考察

VDRに見いだした核移行シグナルはユニークなものであり、他の核内ホルモン受容体には存在しない。従って、この核移行シグナルと相互作用してVDRを核移行させる蛋白の異常はVDR異常症のみの症状を表す可能性があると思われる。

E. 結論

VDRのヒンジ領域にユニークな配列を持つシグナルを見いだした。VDRの細胞内動態をさらに解析することでビタミンD抵抗症の新た

な病型を見いだす可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Michigami T, Suga A, Yamazaki M, Shimizu C, Cai G, Okada S, Ozono K. Identification of amino acid sequence in the hinge region of human vitamin D receptor which transfers a cytosolic protein to the nucleus. *J Biol Chem*, 274: 33531-33538, 1999
2. Okano T, Nakagawa K, Kubodera N, Isaka A, Osawa A, Terada M, Ozono K, Mikami K. Catalytic asymmetric syntheses and biological activities of a series of singly dehydroxylated 19-nor-1 α ,25-dihydroxy-vitamin D3 A-ring analogs in cancer cell differentiation and apoptosis, *Chem Biol*, in press

2. 学会発表

平成11年度はなし。

G. 知的所有権の取得状況

特になし。

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

Ca感知受容体は破骨細胞分化、活性化抑制に関与する

研究協力者 杉本利嗣 神戸大学第三内科講師

研究要旨

破骨細胞前駆細胞および破骨細胞にCa感知受容体が存在し、細胞外Ca濃度上昇によりCa感知受容体を介してその分化や活性化が抑制されることを明らかにした。

A. 研究目的

特発性副甲状腺機能低下症の中にCa感知受容体(CaSR)の活性型変異が病因であるものがあり、治療にCaSR阻害薬の応用が考えられる。副甲状腺のみならず種々の骨組織の細胞においてもCaSRの存在が証明されつつあり、骨リモデリングにおけるCaSRの役割を明らかにすることは治療上重要である。そこで、破骨細胞分化、活性の調節におけるCaSRの役割について検討した。

B. 研究方法

①ウサギ長管骨の全骨細胞から単離した破骨細胞にCaSRアゴニストであるネオマイシン(Neo)、Calcimimetics(NPS,R-467)を作用させ24時間後、象牙片上に形成された吸収窩の数と面積を評価した。②5-FU処理マウス脾臓から得られた造血幹細胞にIL-3,IL-6を添加し未分化コロニーを形成させ、これをGM-CSF存在下で培養し破骨細胞前駆細胞を得た。破骨細胞前駆細胞のCaSRの有無をPCR法にてCaSR mRNAの発現、PCR産物の塩基配列、さらに抗CaSRモノクローナル抗体による免疫染色で検討した。また、この細胞を1,25(OH)₂D₃又はPTH-(1-34)と

共にNeo、NPS,R-467を添加し4日後に形成される酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ陽性多核細胞(MNC)数を求めた。

(倫理面への配慮)

ウサギおよびマウスには苦痛を与えないように頸椎脱臼にて安楽死させた。

C. 研究結果

単離破骨細胞は抗CaSR抗体で陽性に染色された。細胞外Ca濃度上昇(3mM,5mM)及びNeo(500 μM)、NPS,R-467 (100 μM)により単離破骨細胞の骨吸収活性は有意に抑制された。PCR法及び免疫染色から破骨細胞前駆細胞にCaSRの存在が示された。細胞外Ca濃度上昇(3mM-5mM)により1,25(OH)₂D₃又はPTH-(1-34)によるMNC形成促進作用は濃度依存性に抑制された。さらにNeo(100 μM,500 μM)及びNPS,R-467(1-100 μM)は濃度依存性に1,25(OH)₂D₃又はPTH-(1-34)によるMNC形成を抑制した。

D. 考察

単離破骨細胞の骨吸収活性が細胞外Ca濃度上昇のみならずNeo、NPS,R-467によって抑制されたことから、細胞外Ca濃度上昇による単

離破骨細胞の骨吸収活性抑制作用は単離破骨細胞に存在するCaSRを介した作用であると考えられた。一方、破骨細胞前駆細胞にもCaSRが存在し、細胞外Ca濃度上昇のみならずNeo、NPS,R-467が1,25(OH)₂D₃又はPTH-(1-34)によるMNC形成を抑制したことから、細胞外Ca濃度上昇によるMNC形成抑制作用の少なくとも一部はCaSRを介した作用であると考えられた。今回の検討から、骨吸収窩での微小環境下における細胞外Ca濃度上昇が破骨細胞や破骨細胞前駆細胞に存在するCaSRを介して、それぞれ破骨細胞活性や分化を抑制することにより、過剰の骨吸収にnegative feedbackをかける機序が存在することが示唆された。CaSRの活性型変異による副甲状腺機能低下症の治療にCaSR阻害薬そして副甲状腺機能亢進症の治療にCalcimimeticの臨床応用が考えられるが、骨リモデリングにおけるCaSRの役割を考慮することも必要と考えられた。

E. 結 論

破骨細胞のみならず、破骨細胞前駆細胞にもCaSRが存在し、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kanatani M, Sugimoto T, Kanzawa M, Yano S, Chihara K.

High extracellular calcium inhibits osteoclast-like cell formation by directly acting on the calcium-sensing receptor existing in osteoclast precursor cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun.261: 144-148, 1999

2. 学会発表

第17回日本骨代謝学会（大阪）1999年7月29日-31日

O-106 細胞外Ca濃度上昇の破骨細胞分化及び活性化に対する抑制作用におけるCa感知受容体の関与

金谷政則、杉本利嗣、神澤道子、矢野彰三、千原和夫

第21回米国骨代謝学会(セントルイス、USA)

1999年9月30日-10月4日

F030 High extracellular calcium inhibits osteoclast formation via calcium-sensing receptor existing in osteoclast precursor cells.

T. Sugimoto, M. Kanatani, M. Kanzawa, S. Yano, K. Chihara

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

カルシウム（Ca）感知受容体とCa代謝異常症

研究協力者 福本 誠二 東京大学医学部附属病院分院 検査部講師

研究要旨

Ca感知受容体遺伝子異常による疾患の病態、ヒトカルシウム(Ca)感知受容体プロモーター領域の構造等が明らかになった。

A. 研究目的

Ca感知受容体は、副甲状腺ホルモン(PTH)分泌調節に中心的役割をはたしている。本受容体の変異、あるいは発現異常は、PTH分泌障害から血中Ca濃度異常の原因となる可能性がある。そこで本研究では、Ca感知受容体遺伝子変異による疾患の病態、およびCaSR発現調節機序を解明することを目的とする。

B. 研究方法

Ca代謝異常を示す患者末梢血白血球よりDNAを抽出し、PCR産物の直接シーケンスによりCa感知受容体遺伝子変異を検索した。変異受容体をin vitroで発現させることにより、その機能を検討した。さらにヒトゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、Ca感知受容体遺伝子プロモーター領域をクローニングするとともに、副甲状腺腺腫におけるCa感知受容体の発現をNorthern blotにより解析した。

(倫理面への配慮)

臨床検体採取の際には、informed consentを得た。

C. 研究結果

Ca感知受容体の新たな変異を同定し、不活性型変異の場合には、変異受容体機能と病態との相関が認められることを明らかにした。またヒト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 mRNA発現が低下することを見いだした。

D. 考察

変異Ca感知受容体機能と病態との相関が認められたことから、本受容体が血中Ca濃度調節に決定的役割を果たしていることが明らかとなった。副甲状腺腺腫では本受容体の発現の低下が認められ、これがPTH分泌のセットポイントの上昇をもたらしている可能性がある。今後CaSR遺伝子プロモーター活性の調節機序の検討が必要である。

E. 結論

Ca感知受容体遺伝子変異や発現異常は、種々のCa代謝異常症の原因となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Chikatsu N et al. Clin Endocrinol 50:537-543,1999

Okazaki R et al. J Clin Endocrinol Metab 84:363-366,1999

Chikatsu N et al. J Biol Chem in press

2. 学会発表

第72回日本内分泌学会学術総会

福本誠二他 日本内分泌学会雑誌 75(1):33,1999

福本誠二他 日本内分泌学会雑誌
75(1):165,1999

第17回日本骨代謝学会

福本誠二他 日本骨代謝学会雑誌
17(2):272,1999

千勝典子他 日本骨代謝学会雑誌
17(2):273,1999

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

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

尿細管におけるホルモン依存性ライソゾーム酵素遊離の機序

研究協力者 水梨一利 東北大学医学部第二内科助手

研究要旨

近位曲尿細管に高い活性を示すN-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) などのライソゾーム酵素の尿中排泄量が、PTHやCalcitoninの投与後に増加し、尿細管のホルモンに対する反応性の指標として有用であることを報告してきたが、尿細管細胞におけるホルモン依存性ライソゾーム酵素遊離の機序を明らかにした。

A. 研究目的

腎尿細管のカルシウム調節ホルモンに対する反応性は、cyclic AMPとリン酸の尿中排泄量の増加と血中cyclic AMPと1,25(OH) $_2$ Dの上昇によって評価されてきた。ライソゾーム酵素の尿中排泄量が、PTHやCalcitoninの投与後に増加し、尿細管のホルモンに対する反応性の指標として有用であることを報告してきたが、本研究では、この反応の生理的意義を明らかにし、尿細管を標的としたホルモンに対する不応症の新たな診断法の開発を目的としている。

B. 研究方法

尿細管の培養細胞を用いて、Calcitonin, phorbol ester, Ca $^{++}$ -ionophore, forskolinのNAG遊離に対する作用を検討した。更に、protein kinase A (PKA), PKC, Ca $^{2+}$ -calmodulin kinaseII (CaMKII)の関与をそれぞれのinhibitorを用いて検討した。

C. 研究結果

尿細管細胞からのNAG遊離は、Calcitoninに

よって用量依存性に増加し、この反応は、phorbol esterとCa $^{++}$ -ionophoreによって再現された。さらに、これらの反応は、PKCのinhibitorであるcalphostin Cや、CaMKIIのinhibitorであるKN-93によって阻害された。CalcitoninによるNAG遊離促進作用は、Golgi complexを介する細胞内蛋白輸送のinhibitorであるbrefeldin Aによって阻害された。

D. 考察

これまでlysosomeは、細胞内蛋白輸送の終点と考えられていたが、繊維芽細胞や上皮細胞においては、lysosomeがCa $^{2+}$ 依存性分泌に関わっていることが示されている。本研究の結果から、尿細管細胞においても、ライソゾーム酵素がホルモン依存性に遊離され、これがPKC およびCa $^{2+}$ -calmodulin kinaseに依存性の反応であることが明らかとなった。

E. 結論

尿細管細胞におけるホルモン依存性ライソゾーム酵素遊離の機序を明らかとなり、ライソゾ

ーム酵素の尿中排泄量が、尿細管のホルモンに対する反応性の新たな指標として有用であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Goto M, Mizuhashi K. Calcitonin stimulates lysosomal enzyme release and uptake in LLC-PK1 cells. J Am Soc Nephrol 1999. 10: 1640-1648.

水梨一利, 古川洋太郎. 特発性およびその他の副甲状腺機能低下症. 日本内科学会雑誌 1999. 88:1233-1237. 内科学会雑誌 1999. 88:1233-1237.

IV. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覽

刊行書名又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
THE LANCET, 353:1274 A986S polymorphism of calcium-sensing receptor.	1999	Robquest Ltd.	H. Kanazawa, H. Tanaka, J. Shimizu, Y. Seino
THE LANCET, 353:1017 Achondroplasia associated with pelvic lipomatosis.	1999	Robquest Ltd.	T. Ono, H. Tanaka, T. Moriwake, S. Kanzaki, Y. Seino
J. CLIN. ENDOCRINOL. METAB., 84:82-89. Serum Free Insulin-Like Growth Factor [IGF-I], Total IGF-I, and IGF-Binding Protein-3 Concentrations in Normal Children and Children with Growth Hormone Deficiency.	1999	The Endocrine Society	N. Kawai, S. Kanzaki, S. Takano-Watou, C. Tada, Y. Yamanaka, Y. Seino et al.
KIDNEY INTERNATIONAL, 55:1696-1703. Expression of parathyroid hormone-related peptide messenger ribonucleic acid in developing kidney.	1999	International Society of Nephrology	K. Aya, H. Tanaka, Y. Ichinose, M. Kobayashi, Y. Seino
ENDOCRINE JOURNAL, 46:605-612. Pharmacokinetics and Metabolic Effects of High-Dose Growth Hormone Administration in Healthy Adult Men.	1999		T. Tanaka, Y. Seino, K. Fujieda, Y. Igarashi, S. Yokoya et al.
CLIN. PEDIATR. ENDOCRINOL., 8 Suppl:119-123. Growth Hormone Increases Bone Density of Children with Growth Hormone Deficiency -Three Year Longitudinal Study-	1999	Jpn. Society for Pediatr. Endocrinology	T. Moriwake, T. Ono, Y. Ichinose, C. Kawashima-Tada, M. Sato, H. Tanaka, S. Kanzaki, Y. Seino
ACTA PAEDIATR. SUPPL, 428:76-79. High-dose growth hormone(GH) treatment in prepubertal GH-deficient children.	1999	Scandinavian Univ. Press	S. Yokoya, K. Araki, Y. Igarashi, H. Kohno, Y. Nishi, Y. Hasegawa, K. Fujita, N. Iwatani, K. Tachibana, Y. Ohyama, Y. Seino, M. Satoh, K. Fujieda, T. Tanaka