

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12年度 研究報告書

平成 13 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いでから既に2年が経過し、最終年度となりました。

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。過去2年間に3年間の目標に対するほぼ全ての活動を開始致しました。その中でも、特定疾患の疫学に関する研究班との共同調査である「家族性バセドウ病の疫学的調査」は重要な研究と考えております。本研究班では、特定疾患対策研究事業の中では先端的研究を行う研究班として位置づけられているものの、厚生科学研究としての役割を認識し、治療研究に役立つものにしたいと思えます。そのために、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、厚生労働省健康局疾病対策課には、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12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13年3月

清野佳紀

目 次

I. 序 文

II. 平成12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

III. 分担研究報告

1. 副甲状腺機能異常症の病因解析：臓器発生からホルモン不応症まで..... 5

千葉大学医学部小児科 安田 敏行

2. Ca 感知受容体変異による病態の解析に関する研究 9

東京大学医学部附属病院分院検査部 福本 誠二

3. ライソゾーム酵素のホルモン依存性遊離の機序と臨床応用.....11

東北大学医学部腎高血圧内分泌科 水梨 一利

4. 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.....13

— ビタミンD₃1 α -水酸化酵素遺伝子のビタミンDによる転写抑制 —

東京大学分子細胞生物学研究所 加藤 茂明

5. 骨形成におけるビタミンD受容体の役割17

岡山大学医学部小児科 清野 佳紀

6. 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に関する研究.....20

徳島大学医学部第1内科 松本 俊夫

7. ビタミンD受容機構の解明.....22

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

8. 骨代謝調節における細胞外リン濃度の役割：

低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病におけるリン補充の意義.....26

神戸大学医学部第3内科 杉本 利嗣

9. ラジオレセプターアッセイによる阻害型抗体のバセドウ病における出現頻度について……………	28
大阪大学大学院医学系研究科生体情報医学 網野 信行	
10. TSH 結合阻害性イムノグロブリンの高感度測定法の臨床応用について ……………	31
京都大学核医学科 小西 淳二	
11. 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 ……………	36
京都大学医学部臨床病態医科学 赤水 尚史	
12. 甲状腺ホルモン不応症の成立機序に関する研究……………	40
(2) T3/甲状腺ホルモン受容体によるTSH 遺伝子転写抑制機構	
浜松医科大学第2内科 中村 浩淑	
13. 甲状腺ホルモン不応症発症機序に関する研究……………	44
名古屋大学環境医学研究所 妹尾 久雄	
14. 核内受容体コアクチベーターp120 β の臨床的意義 ……………	50
群馬大学医学部第1内科 森 昌朋	
15. バセドウ病眼症の成因の研究：甲状腺と外眼筋の共通蛋白 myocilin について ……………	52
虎の門病院分院 紫芝 良昌	
16. バセドウ病眼症病変部線維芽細胞増殖におけるsulfate transporter および somatostatin受容体の役割と病変部線維芽細胞におけるサイトカイン遺伝子発現 ……………	55
東京女子医科大学第2内科 對馬 敏夫	
17. Na ⁺ /I ⁻ symporter (NIS) 遺伝子を利用した甲状腺癌の治療の試み……………	59
山梨医科大学第3内科 女屋 敏正	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	63
V. 班構成員名簿……………	93

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

本研究の目的は、ホルモン作用機構の異常に起因すると考えられる疾患について、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機構異常を中心に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 とバセドウ病などの甲状腺機能異常によ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 によって研究を行った。研究成果は多岐にわたり、各々疾患の診断治療予防に新しい光を投げかけるであろう。

分担研究者

女屋 敏正	山梨医科大学第三内科教授
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	虎ノ門病院分院長
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
對馬 敏夫	東京女子医科大学第二内科内分泌代謝学教授
網野 信行	大阪大学医学系研究科生体情報医学臨床内分泌学教授
松本 俊夫	徳島大学医学部第一内科教授
加藤 茂明	東京大学分子細胞生物学研究所教授
中村 浩淑	浜松医科大学第二内科教授
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

A. 研究目的

本研究の目標は、ホルモン作用機能異常に起因すると推測される原因不明で、治療法が未確立で、かつ有効な治療を行うことによって後遺障害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機能異常である偽性副甲状腺機能低下症、ビタミンD受容機能異常であるビタミンD依存性くる病II型などを中心として、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、甲状腺ホルモンの受容体機能異常である甲状腺ホルモン不応症、TSH受容体に対する自己抗体による甲状腺機能異常症であるバセドウ病を中心とする甲状腺機能異常全般の発症機序の解明と、診断予防治療法の開発を行う subgroup の 2 つで研究を行った。

B. 研究の概要

副甲状腺・カルシウム代謝異常

偽性副甲状腺機能低下症 (PHP) の診断は腎の副甲状腺ホルモン反応性を評価 (Ellsworth Howard test) の適正化のために尿細管の副甲状腺ホルモンの反応の詳細を明らかにする必要がある。このため、尿細管細胞のライソゾーム酵素遊離機序を検討し、PHPでは遠位尿細管のPTH感受性も低下していることが明らかになった。

PHPIIbについては大家系を用い原因検討を行っている。

さらに、PHPを含むPTHの作用異常症の数多く同定された原因遺伝子の内、①カルシウム感知受容体遺伝子異常に基づくPTH分泌不全の特殊な病態 (バーター症候群様の症状) ②カルシウム感知受容体の機能喪失に基づく副甲状腺機能亢進症の副甲状腺はlipohypertrophyと呼ぶ特殊な変化を示すこと ③副甲状腺低形成の原因のひとつであるGATA3遺伝子変異の実態を明らかにした。

ビタミンDは治療の中心であるため、その受容機構、生物効果などを明らかにする必要があり、本年度は①ビタミンD受容体の核移行シグナルの同定とそれに作用する因子を同定するためにtwo hybrid法で候補遺伝子を数種選択したこと② 1α 水酸化酵素遺伝子を負に制御する因子がE-boxに結合するbHLH構造を持つ新しい蛋白であること、さらに班員である加藤が作出したVDRKOを用いて③ビタミンDは筋細胞分化を正に制御していること④骨移植を用いた実験からビタミンDは過剰な骨形成を負に制御しており、これはcbfalの発現抑制によることを明らかにした。

さらに、ビタミンD抵抗性を示す代表的な疾

患である低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病においては、リン補充の意義を細胞培養で検討し細胞外のリン濃度が細胞増殖に重要であり、IGFBP-5の増加を介していることを示した。

甲状腺

甲状腺ホルモン不応症の発症機序を明らかにする目的で① $TR\alpha$ の機能 ②TRによるTSH遺伝子転写抑制機構 ③核内受容体共役因子p120 β の臨床的意義について検討を加えた。①においては $TR\alpha$ の発現を完全に阻止したマウスを作成したところ、 $TR\beta$ が主に発現している臓器ではホルモン感受性が増大することからホルモン結合型 $TR\alpha$ がドミナントネガティブ作用を有していることが明らかになった。②ではT3/TRによるTSH遺伝子発現制御を観察する系を作成し、TSH β 遺伝子に対する負の制御は正の制御機構とは全く異なること、TSH産生制御には $TR\beta$ が主に働いていることを明らかにした。③ではp120のsplicing variantであるp120 β がアンドロゲン受容体特異的転写共役因子であり、前立腺疾患で発現が変化することを明らかにした。

また、バセドウ病の診断・治療において重要な阻害型抗体の新規の測定方法の臨床的意義と有用性について検討し、euthyroid Graves病において有用性が高く、弱い活性の抗体も検出できることを示した。また、別の方法による抗体の測定ではバセドウ病の30%に阻害型抗体を認め、この抗体の共存下では、治療に早く反応することが明らかになった。

バセドウ病治療で最も困難である眼症の成因については①sulfate transporter, サイトカインの病変部分における発現状況②共通抗原Myopocilinの2面から検討を行った。

さらにバセドウ病の成因を明らかにするため TSH 受容体抗体遺伝子導入マウスを用いて自己寛容の成立と LPS 刺激によるその破綻を再現した。また、ヒトにおける遺伝素因の検討のため予備的に行った連鎖解析では 5q31-33 に連鎖する領域が認められた。この研究を更に進めるため、家族性バセドウ病全国調査の準備を行った。一方、甲状腺疾患の中で比較的頻度の高い甲状腺癌の新規の治療法（NIS 遺伝子導入による放射性ヨード取り込みの促進）についても検討した。

C. 総 括

両グループの研究よりカルシウム代謝異常症や甲状腺機能異常の日常診療に有用な情報が集積された。

カルシウム代謝異常に関しては、副甲状腺機能低下症の全容が原因レベルで明らかになりつつあり、効率的な診断と治療のために、診断手順を解説する冊子作成に向け、十分な準備状態にあると考える。

また、甲状腺機能異常症においては最も多い疾患であるバセドウ病の遺伝的素因の同定のための準備である全国調査の準備が整い、バセドウ病発症予防の戦略が具体化することが期待される。

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

副甲状腺機能異常症の病因解析：臓器発生からホルモン不応症まで

分担研究者 安山 敏行 千葉大学小児科講師
研究協力者 渡辺 智之、南谷 幹史、皆川 真規

研究要旨

副甲状腺機能低下症の病因解析について、(1)感音性難聴を伴う家族性副甲状腺機能低下症、(2)腎臓特異的な異常を伴う偽性副甲状腺機能低下症1bについて検討した。(1)については、GATA3の異常を新たに同定した。(2)については、偽性副甲状腺機能低下症1bの病因を、DNAのメチル化病（genomic imprinting disease）との作業仮説をたて、PTH/PTHrP受容体・GNAS1遺伝子近傍のメチル化の有無で検討し、NESP promoterのメチル化が病因に結びつく可能性のあることを見出した。

A. 研究目的

私どもは、副甲状腺機能低下症の病因解析について、(1)感音性難聴を伴う家族性副甲状腺機能低下症、(2)カルシウム感受性異常症、(3)腎臓特異的な異常を伴う偽性副甲状腺機能低下症1bについて検討してきた。(1)については、家族性副甲状腺機能低下症を来たすHDR症候群（hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia）家系の連鎖解析の結果、染色体10番短腕にある転写因子GATA3の異常によることが昨年報告された¹⁾。ヒト副甲状腺臓器発生に関与する遺伝子と疾患として初めて明らかとなったものであり、我々の腎臓異形成を伴わない家系の異常がGATA3遺伝子異常で説明されるかは臓器発生の理解・副甲状腺機能低下症の病因から興味のあるところである。(3)は本研究班の主要課題の1つである腎臓特異的PTH不応症である偽性副甲状腺機能低下症1bの病因を、DNAのメチル化病（genomic imprinting disease）との作業仮説をたて、PTH/PTHrP受

容体・GNAS1遺伝子近傍のメチル化の有無で検討した。この根拠は、PTH/PTHrP受容体の腎臓主要プロモーターP3は、メチル化による制御を受ける可能性のあるCpG islandにあり、PHP1bの病態もプロモーター部のメチル化によるプロモーター活性の低下によるPTH/PTHrP受容体の低下で説明出来ること、またPTH/PTHrP受容体mRNA発現量の差・低下を示唆する報告があることによる。GNAS1遺伝子に関しては家族性のPHP1bの責任遺伝子がGNAS1遺伝子近傍であることが判明し、本遺伝子はメチル化による制御を受けることで知られている事による^{2,3)}。

B. 研究方法

以下の検討は、全て患者または両親の文書同意を得た後に行い、その結果の説明は、原則として臨床心理士の同席で行った。

GATA3遺伝子

感音性難聴を伴い腎異形成を欠く副甲状腺機能低下症 1 家系 6 名について検討した。GATA3 遺伝子の構造は、2 個の活性部位と 2 個の DNA 結合部位よりなり、6 エクソンで構成される、この各コードエクソンに対応する合成 DNA を作製し、PCR 直接塩基配列決定を行った。発端者と正常コントロールは、単球から RNA を抽出、RT-PCR 法で cDNA を単離した。

PTH/PTHrP 受容体と GNAS1 遺伝子

PHP1b 症例 8 例（全て孤発例）とコントロールを対象とした。ゲノム DNA を同一部位を認識するがメチル化感受性の異なる 2 つの制限酵素で消化後サザン解析で解析した。

C. 結果と考察

GATA3 遺伝子：

3 世代 6 例の家系の臨床像は、血中 Ca^{4.9-9.4}mg/dl、血中 PTH 値正常下限、全症例で感音性難聴を示し、副甲状腺機能低下症としては血中 PTH 値が比較的高値で血中カルシウムも正常値を呈する例がありことである。また家族全例で尿中 NAG、 β 2 排泄、腎臓超音波等で腎臓に異常を認めない。この家系で、コドン 249 にヘテロのナンセンス変異が認められ、GATA3 遺伝子の 2 つの転写活性部位は保たれるものの、2 つの DNA 結合部位が欠ける蛋白ができると考えられた。この異常は cDNA でもヘテロで確認された。昨年 の Nature の論文¹⁾との比較では、GATA3 haploinsufficiency 症候群は HDR 症候群と呼ばれるように、多くは hypoparathyroidism/ deafness/renal dysplasia を全てともなっているが、我々の例を含む 2 家系で 2 つの DNA 結合部位を欠く異常があり、この 2 家系と

も腎臓異形成ないことが明らかとなった。また我々の家系の解析で副甲状腺機能低下症としては軽度の症例が多いことが明らかとなり、感音性難聴のみを呈する例の中に、GATA3 haploinsufficiency 症候群が存在する可能性が示唆された。

PTH・PTHrP 受容体：

PTH 受容体の腎臓主要プロモーターである P3 promoter 部のサザン解析を 8 例にふやし検討した。同一部位を認識しメチル化感受性の異なる制限酵素（HPA2 と MSP1）で消化したが、すべて HPA2/MSP1 と同様にて消化されており、この 8 例では同部のメチル化はなかった⁴⁾。但し本検討は血液を用いたもので、症例によっては腎臓近位尿細管特異的なメチル化の異常がある可能性はある。また本検討の過程で、P3 promoter A-rich 部位に AAAG 反復配列多型があることが判明し、この多型が骨成長に重要な意義を持つことが明らかとなった⁵⁾。

GNAS1 遺伝子：

GNAS 遺伝子上流に 3 個の exons (NESP55, XI α , Exon1A) がありそれぞれが父性・母性の選択的メチル化を受けることが判明している。今回は Gs α 遺伝子と同様に母系発現をする NESP 遺伝子のプロモーター部のサザン解析を行った。NESP 遺伝子は通常父由来 promoter DNA がメチル化を受け失活し、同遺伝子が母系発現を受ける原因であるが、PHP1b 8 例全員が同部の両アリルともメチル化を受けていることが判明した。調べたコントロールならびに血中 Ca と PTH 値が正常な PHP1b 家系では、片側のメチル化のみ認めた。Weinstein らは Exon 1a を GNAS1 遺伝子の Methylation imprint mark と

し、調べたPHP1b全例でメチル化の異常を認め、それ以外の部位（NESPを含む）ではメチル化の異常は全例に認めるものでないと報告した⁶⁾（我々の検討でもNESPを除きほぼ同様であった）。Weinsteinらの報告との差は選択した制限酵素とプローブの部位の違いによると考えられる。我々が発見した、NESP promoterのメチル化は、PHP1b全症例に認めた事、NESPがGNAS遺伝子と同様母系発現することから、病因に結びつく可能性があり、また現在までの検討でこの部位の両アリルのメチル化は偽性副甲状腺機能低下症1aでは認めず、偽性副甲状腺機能低下症1bの確定診断に適用できると現時点では判断され、今後本研究班の臨床研究に極めて有用なものと考えられる。我々は尿細管初代培養細胞を含めた検討を行っている。

緒言に述べた検討項目²⁾のカルシウム感受容体は治療との関係で重要でさらなる検討を行っている。

D. 結 論

感音性難聴を伴う家族性副甲状腺機能低下症の家系において、GATA3の異常を新たに同定した。我々の家系は腎臓異形成を伴わず副甲状腺機能低下症としては軽度の症例が多いことから、感音性難聴のみを呈する例の中に、GATA3 haplo-insufficiency症候群が存在する可能性が示唆された。

また、GNAS1遺伝子近傍のNESP promoterのメチル化が偽性副甲状腺機能低下症1bの病因に結びつく可能性がある。

参考文献

1) Van Esch H, Groenen P, Nesbit MA, Schuffenhauer S, Lichtner P, Vanderlinden

G, Harding B, Beetz R, Bilous RW, Holdaway I, Shaw NJ, Fryns JP, Van de Ven W, Thakker RV, Devriendt K. GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome. *Nature*. 406: 419-22, 2000.

- 2) Wroe SF, Kelsey G, Skinner JA, Bodle D, Ball ST, Beechey CV, Peters J, and Williamson CM. An imprinted transcript, antisense to Nesp, adds complexity to the cluster of imprinted genes at the mouse Gnaslocus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3342-3346, 2000.
- 3) Juppner H, Schipani E, Bastepe M, Cole DE, Lawson ML, Mannstadt M, Hendy GN, Plotkin H, Koshiyama H, Koh T, Crawford JD, Olsen BR, Vikkula M. The gene responsible for Pseudohypoparathyroidism type Ib is paternally imprinted and maps in four unrelated kindreds to chromosome 20q13.3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 11798-803, 1998.
- 4) Minagawa M, Watanabe T, Kohno Y, Mochizuki H, Hendy GN, Goltzman D, White JH, and Yasuda T. Analysis of the P3 promoter of the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene in pseudohypoparathyroidism Type 1b. *J Clin Endocrinol Metab* 86(3): in press, 2001.
- 5) Minagawa M, Watanabe T, Minamitani K, Takahashi Y, Kohno Y, Goltzman D, White JH, Hendy GN, and Yasuda T. Functional significance of the AAAG repeat polymorphism in the P3 promoter of the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related

peptide receptor gene. J Clin Endocrinol Metab submitted.

- 6) Liu J, Litman D, Rosenberg MJ, Yu S, Biesecker LG, and Weinstein LS. A GNAS-limprinting defect in pseudohypoparathyroidism type Ib. J. Clin. Invest. 106: 1167-1174, 2000.

E. 研究発表

1. 論文発表

Minagawa M, Watanabe T, Kohno Y, Mochizuki H, Hendy GN, Goltzman D, White

JH, and Yasuda T. Analysis of the P3 promoter of the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene in pseudohypoparathyroidism Type 1b. J Clin Endocrinol Metab 86(3): in press, 2001.

Minagawa M, Watanabe T, Minamitani K, Takahashi Y, Kohno Y, Goltzman D, White JH, Hendy GN, and Yasuda T. Functional significance of the AAAG repeat polymorphism in the P3 promoter of the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene. J Clin Endocrinol Metab submitted

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感知受容体変異による病態の解析に関する研究

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感知受容体不活性型変異は、特殊な副甲状腺組織像を惹起すること、逆に活性型変異は、Ca代謝以外の電解質代謝にも影響を及ぼすことが明らかとなった。

A. 研究目的

Ca感知受容体（Ca-sensing receptor: CaSR）は、副甲状腺ホルモン分泌調節に必須の受容体としてクローニングされた。Ca感知受容体の不活性型変異により家族性低Ca尿性高Ca血症（familial hypocalciuric hypercalcemia: FHH）が、逆に活性型変異により常染色体優性低Ca血症（autosomal dominant hypocalcemia: ADH）が惹起されることが明らかにされた。FHHは、最も頻度の高い高Ca血症の原因疾患である原発性副甲状腺機能亢進症と類似の病態を示し、これらの疾患の鑑別が問題となっている。一方ADHの報告例は少なく、本症の病態には不明な点が残されている。そこで本研究では、FHHと原発性副甲状腺機能亢進症患者の副甲状腺組織像に差異が存在するかどうかを検討すると共に、特異な症状を示した低Ca血症患者のCaSR遺伝子の検討から、ADHの病態を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

同意を得た後、末梢血白血球よりゲノムDNAを抽出し、PCR産物の直接シーケンス法により、CaSR遺伝子全翻訳領域の変異の有

無を検討した。塩基置換が認められた場合には、変異受容体をin vitro mutagenesisにより作成し、変異受容体機能をin vitroで解析、あるいはrestriction fragment length polymorphism解析により、多型であるのかどうかを検討した。

C. 研究結果

副甲状腺4腺の腫大を示し、副甲状腺摘除術を受けた2例の高Ca血症患者に、CaSR遺伝子変異を認めた。これらの変異受容体をヒト胎児腎細胞に発現させ、細胞外Caを上昇させた場合の細胞内Ca濃度の変化を検討することにより、これらが不活性型変異であ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副甲状腺過形成組織は、ほとんど副甲状腺実質細胞によって構成されるのに対し、これら2例の副甲状腺組織は、正常の副甲状腺同様、多量の脂肪細胞を含有しlipohyperplasiaとよばれる特異な組織像を示すことが明らかとなった。一方低Ca血症に加え、低カリウム血症、代謝性アルカローシスなどの症状を示す2症例に、CaSR遺伝子変異を認め、このうち一例の変異は活性型変異であることが確認された。

D. 考 察

CaSR遺伝子不活性型変異は、副甲状腺の肥大と特異な組織像を惹起することが明らかとなった。副甲状腺lipohyperplasiaの組織像は、正常副甲状腺に類似しており、CaSRを介する情報伝達系が、副甲状腺の大きさを規定する可能性が考えられる。一方CaSRは副甲状腺に加え、腎臓など種々の臓器にその発現が認められる。CaSR遺伝子活性型変異患者に認められた低カリウム血症などの異常は、腎臓でのCaSR活性化によって惹起される可能性がある。今後ADH症例の病態の検討は、副甲状腺以外の組織におけるCaSRの作用の解明に有用と考えられる。

E. 結 論

副甲状腺lipohyperplasiaの組織像を示す例では、CaSR遺伝子不活性型変異の存在が疑われる。またCaSR遺伝子活性型変異は、Ca代謝異常以外の病態を惹起する場合がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

N. Chikatsu, S. Fukumoto, Y. Takeuchi, M. Suzawa, T. Obara, T. Matsumoto, T. Fujita. Cloning and characterization of two promoters for human calcium-sensing receptor (CaSR) and changes of CaSR expression in parathyroid adenomas. *J. Biol. Chem.*, 275: 7553-7557, 2000.

S. Fukumoto, N. Chikatsu, R. Okazaki, Y. Takeuchi, Y. Tamura, T. Murakami, T. Obara, T. Fujita. Inactivating mutations of calcium-sensing receptor result in parathyroid lipohyperplasia. *Diagn. Mol. Pathol.*, in press.

2. 学会発表

福本誠二、千勝典子、竹内靖博、田村康博、藤田敏郎 カルシウム感知受容体 (CaSR) 遺伝子変異を伴う家族性高Ca血症 第73回日本内分泌学会学術総会 日本内分泌学会雑誌 76: 96, 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

ライソゾーム酵素のホルモン依存性遊離の機序と臨床応用

研究協力者 水梨一利 東北大学医学部腎高血圧内分泌科

研究要旨

ホルモン投与後のライソゾーム酵素の尿中排泄増加反応は、尿細管の反応性の指標として有用である。ライソゾーム酵素のひとつであるCathepsin DはHenleループの上行脚および遠位曲尿細管、遠位尿細管結合部、集合管に発現していることが確認された。Cathepsin Dの尿中排泄量はPTH投与後一過性に増加するが、偽性副甲状腺機能低下症においては、この増加反応が低下していた。したがって、偽性副甲状腺機能低下症においては、尿細管の遠位部においても、PTHに対する反応性が低下していると考えられた。

A. 研究目的

ライソゾーム酵素のひとつであるN-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG)の尿中排泄量は、PTHやカルシトニンの投与後に一過性に増加し、尿細管の反応性の指標として有用である。NAGは主に近位尿細管に発現しているが、ラット腎においてはCathepsin Dが遠位尿細管に特異的に発現していることが知られている。そこで、Cathepsin Dの遠位尿細管のPTHに対する反応性の指標としての有用性を検討した。

B. 研究方法

腎におけるCathepsin Dの発現部位を免疫染色により確認した。Cathepsin D陽性細胞は、近位尿細管および遠位尿細管の各部位に特異的に発現する蛋白の連続切片を用いた免疫染色により同定した。

特発性副甲状腺機能低下症患者、偽性副甲状腺機能低下症I型患者において、PTH投与前後のCathepsin Dの尿中排泄量の変動を検討した。

C. 研究結果

Cathepsin DはHenleループ上行脚および遠位曲尿細管、遠位尿細管結合部、集合管に発現していた。

特発性副甲状腺機能低下症において、Cathepsin Dの尿中排泄量はPTH投与後一過性に増加したが、偽性副甲状腺機能低下症I型においては、この増加反応が低下していた。

D. 考 察

偽性副甲状腺機能低下症Ia型はGs α 遺伝子の変異により発症するが、Ib型も腎におけるGsa遺伝子の発現異常がその発症原因である可能性が指摘されている。Gsa遺伝子は、近位尿細管のみならず腎皮質の遠位尿細管において父性刷り込みを受けることから、偽性副甲状腺機能低下症I型患者においては、尿細管遠位部のPTHに対する反応性が低下していると予想された。Cathepsin Dの尿中排泄増加反応の低下は、この仮説を指示する結果と考えられる。

E. 結 論

Cathepsin Dの尿中排泄は、遠位尿細管と集合管のPTHに対する反応性の指標として有用であり、偽性副甲状腺機能低下症においては、尿細管遠位部のPTHに対する反応性が低下していると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

水梨一利. 偽性副甲状腺機能低下症の診断と治療. ホルモンと臨床 2001.

Miura W, Mizunashi K, Kimura N, Koide Y,

Noshiro T, Miura Y, Furukawa Y, Nagura H. Expression of stanniocalcin in zona glomerulosa and medulla of normal human adrenal glands, and some adrenal tumors and cell lines. *APMIS* 2000; 108: 367-72.

Kimura N, Shiraishi S, Mizunashi K, Ohtsu H, Kimura I: Synaptotagmin I expression in mast cells of normal human tissues, systemic mast cell. disease, and a human mast cell leukemia cell line. *J Histochem Cytochem* 49: , 2001 (in press).

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

ビタミンDの生体内での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ビタミンDの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り、1 α ,25(OH)₂D₃によって1 α (OH)ase遺伝子の発現は負に制御される。我々は、昨年までに、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 (1 α -nVDRE) を同定した。今回、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。さらに、取得した転写因子の機能解析を行い、1 α , 25(OH)₂D₃依存的な転写抑制機構について詳細な検討を行った。

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によって負に制御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を明らかにした。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) 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法を行った。
- (2) 取得した転写因子 (VDIR) の機能解析をおこなうため、以下の検討を行った。
 - 1) gel mobility shift assayを用いて、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に対する負の応答領域へのVDIRの結合を検討した。
 - 2) 近位尿細管細胞株であるMCT細胞を用いたルシフェラーゼ (LUC) 法で、VDIRの転写活性化能および $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による転写抑制に及ぼす影響を検討した。
 - 3) GST-pulldown法を用いて、VDIRとVDRの結合を検討した。
 - 4) $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 非存在下でのVDIRの転写活性化能について検討するため、LUC法にてPKAによる転写活性化能への影響を検討し、mammalian two-hybrid法でp300との相互作用を検討した。
 - 5) 免疫沈降法を用いて、VDIRとVDRが同じ複合体に含まれるかを検討した。

C. 研究結果

- (1) 1α -nVDREに結合する650アミノ酸からなるbHLH familyに属する転写因子 (VDIR) を取得した。
- (2) VDIRは 1α -nVDREに強く結合することをgel mobility shift assayにて確認した。また、VDIRを強発現することによって、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な転写抑制能がより顕著に認められた。さらに、GST pull-down assayを用いて、VDIRとVDRとが結合することを明らかにした。
一方、PKAによりVDIRの転写活性化能は

上昇することが明らかとなった。in vitroの系でPKAがVDIRをリン酸化することを確認した。また、PKA存在下ではVDIRはp300と結合し、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下ではp300との結合が認められなくなった。

さらに、VDIR抗体で免疫沈降をおこなったところ、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下ではVDRが検出され、PKA存在下ではp300が検出された。

D. 研究考察

$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による負の応答領域に結合する転写因子はbasic Helix-loop-Helix familyに属する転写因子 (VDIR) であった。VDIRは $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的にVDR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明らかとなった。一方、昨年までの結果より、 1α (OH)ase遺伝子の発現はPTHによる刺激で上昇すること、PTHによる刺激はPKAを介していることが明らかになっている。今回、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 非存在下ではVDIRがPKAによるリン酸化を受け、p300と複合体を形成し転写活性化に働いていることが明らかになった。

以上の結果から、VDIRは正負のシグナルを受け、そのシグナルに応じた複合体が形成されることが示唆された。今後、それぞれの複合体に含まれるco-activatorやco-repressorに興味をもたれる。

現在、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によって負に制御される遺伝子である副甲状腺ホルモンや副甲状腺関連ホルモン遺伝子の発現制御にも同様の機構が存在するか、詳細な解析を進めているところである。

E. 結 論

1α (OH)ase遺伝子上流プロモーターに存在する負のビタミンD応答領域に結合する転写因子