

(VDIR) を取得した。VDIRはこの応答領域を介して、 $1\alpha$ (OH)ase遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 発表論文 (原著)

1. Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Arao, Y., Suzawa, M., Kobayashi, Y., Ogawa, S., Yano, T., Yoshikawa, H., Masuhiro, Y., Kato, S.: A subfamily of RNA binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor coactivator  $\alpha$  through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J.*, 20, No.6, pp.1-12, 2001.
2. Masuyama, R., Nakaya, Y., Tanaka, S., Tsurukami, H., Nakamura, T., Watanabe, S., Yoshizawa, T., Kato, S., Suzuki, K.: Dietary phosphorus restriction reverses the impaired bone mineralization in vitamin D receptor knockout mice. *Endocrinology*, 142, 494-497, 2001.
3. Sasagawa, S., Kato, S.: A nuclear receptor screening method using a steroid receptor coactivator-1 fragment in a yeast two-hybrid system. *Anal. Biochem.*, 289, 295-297, 2001.
4. Kato, S.: Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer*, 8, 3-9, 2001.
5. Li, M., Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Messaddeq, N., Kato, S., Metzger, D., Chambon, P.: Skin abnormalities generated by temporally-controlled RXR  $\alpha$  mutations in adult mouse epidermis. *Nature*, 407, 633-636, 2000.
6. Adachi, M., Takayanagi, R., Tomura, A., Imasaki, K., Kato, S., Goto, K., Yanase, T., Ikuyama, S., Nawata, H.: Androgen-insensitivity syndrome as a possible coactivator disease. *N. Engl. J. Med.*, 343, 856-862, 2000.
7. Koderu, Y., Takeyama, K., Murayama, A., Suzawa, M., Masuhiro, Y., Kato, S.: Ligand-type specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators. *J. Biol. Chem.*, 275, 33201-33204, 2000.
8. Suzuki, K., Yamanishi, K., Mori, O., Kamikawa, M., Andersen, B., Kato, S., Toyoda, T., Yamada, G.: Defective terminal differentiation and hypoplasia of the epidermis in mice lacking the Fgf 10 gene. *FEBS Lett.*, 481, 53-56, 2000.
9. Ohuchi, H., Hori, Y., Yamasaki, M., Harada, H., Sekine, K., Kato, S., Itoh, N.: FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 277, 643-649, 2000.
10. Yamamoto, A., Hashimoto, Y., Kohri, K., Ogata, E., Kato, S., Ikeda, K., Nakanishi, M.: Cyclin E as a coactivator of the androgen receptor. *J. Cell Biol.*, 150, 873-879, 2000.
11. Arao, Y., Kuriyama, R., Kayama, F., Kato, S.: A nuclear matrix-associated factor, SAF-B, interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D. *Arch. Biochem.*

- Biophys.*, 380, 228-236, 2000.
12. Kato, S., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kobayashi, Y., Takeyama, K., Endoh, H., Yanagisawa, J.: Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways. *Genes to Cells*, 5, 593-601, 2000.
  13. Kato, S.: The function of vitamin D receptor in vitamin D action. *J. Biochem.*, 127, 717-722, 2000.
  14. Haraguchi, R., Suzuki, K., Murakami, R., Sakai, M., Kamikawa, M., Kengaku, M., Sekine, K., Kawano, H., Kato, S., Ueno, N., Yamada, G.: Molecular analysis of external genitalia formation: the role of *fibroblast growth factor (Fgf)* genes during genital tubercle formation. *Development*, 127, 2471-2479, 2000.
  15. 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  $\alpha$  and  $\beta$  by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J. Biol. Chem.*, 275, 15645-15651, 2000.
  16. Fuse, H., Kitagawa, H., Kato, S.: Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor AF-1. *Mol. Endocrinol.*, 14, 889-899, 2000.
  17. 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*, 141, 1317-1324, 2000.
  18. Endre, B., Kato, S., DeLuca, H. F.: Metabolism of  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in vitamin D receptor-ablated mice in vivo. *Biochemistry*, 39, 2123-2129, 2000.
  19. Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Mori, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: p300/CBP Acts as a coactivator of the cone-rod homeobox transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 269, 410-414, 2000.
  20. 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.*, 267, 311-316, 2000.
  21. Hasegawa, Y., Fujii, K., Yamada, M., Igarashi, U., Tachibana, K., Tanaka, T., Onigata, K., Nishi, Y., Kato, S., Hasegawa, T.: Identification of novel human *GH-1* gene polymorphisms that are associated with growth hormone secretion and height. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 1290-1295, 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

骨形成におけるビタミンD受容体の役割

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 絹田 恵子 井上 勝

研究要旨

ビタミンD受容体KO (VDRKO) マウスの骨所見から、十分なカルシウムリンが存在すれば骨形成にビタミンDは必須ではないといわれるが、実際には骨特異的に遺伝子発現を欠失させない限り骨形成におけるビタミンDの役割についての評価は不可能である。そこで、VDRKOマウスの骨を野生型マウスに移植し、骨形成にどのような影響が見られるかを検討した。背部筋膜下に大腿骨、頭蓋骨を移植すると、VDRKOに由来する骨は野生型に由来する骨に比し著しい骨化の亢進が認められた。これらの事実は、VDRを介するビタミンDの作用は過剰な骨形成の抑制に働いていることを示唆する。

A. 研究目的

遺伝子操作技術の進歩によって、様々な遺伝子を欠失したマウスが作成され、その所見から当該遺伝子の生理的意味を考察する研究が数多く行われてきた。しかしながら、一個の遺伝子を臓器非特異的に欠失させる操作はしばしば全身的な環境を変化させる結果となり、症状が当該遺伝子の欠失のためなのか、全身因子の変化に伴う二次的な変化であるのか判断がつかないことも生じ得る。VDRKOマウスは離乳までは正常な骨を示し、離乳期以降もカルシウムリンの十分な補充によって、ほぼ正常な骨を呈する。しかしながら、胎内の骨発育も含め離乳期までの骨の詳細については不明であり、血中1,25(OH)<sub>2</sub>D濃度が高値であることなど、受容体を欠くことによって二次的な異常の影響で一見骨が正常に見えている可能性は否定できない。また、骨のように多種類の細胞によって構築さ

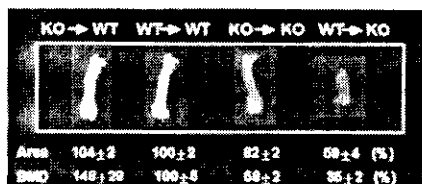
れる組織では骨特異的に受容体を欠失させることは非常に困難である。このような要因を排し、骨におけるVDRの役割を検討するために、VDRKO骨を正常な体液環境へ移植して骨組織の変化を検討した。

B. 研究方法

生後2週 of VDRKOと同腹の野生型マウスより大腿骨及び頭蓋骨を採取し、同じ親ペアより別時期に生まれた8週齢のVDRKO及び野生型マウスの背部筋膜下に移植を行い、2週、4週でマウスを屠殺、移植骨を回収した。移植骨はMMA包埋の後薄切し組織学的な検討を加えた。さらに、移植大腿骨はmicro focus X-ray撮影装置で撮影し、デンシトメトリーにて陰影の定量化を行うとともに、 $\mu$ CTによって骨構造の解析を行った。

### C. 研究結果

外見上、生後2週のVDRKOと野生型は区別できず、骨もx線写真上差は認めない。VDRKOをホストとして移植を行った場合、4週後では、VDRKOの骨ではより著しい類骨の蓄積をみとめたが、野生型の骨はVDRKOの高1,25(OH)<sub>2</sub>D環境のため著しい骨吸収のため、骨の形態すら



とどめない状態となった。一方、野生型マウスをホスト

にした場合には、VDRKO由来の骨のBMDは野生型由来の骨に比して、約1.5倍の増加を示した。この移植の期間中ホストの血清Ca、Pi値は正常範囲であった。Micro-CTで骨幹部を観察すると、野生型マウスに移植された各骨では外骨膜性骨形成が従来の皮質上に新しい骨を添加していることが確認され、VDRKO骨ではその反応がより強く生じていることが明らかとなった。同様の変化は頭蓋骨でも観察され、移植されたVDRKO骨の厚みは野生型骨の約3倍に肥厚していた。これらの反応に関与している細胞がドナー側の細胞であるか、ホスト側の細胞であるかを明らかにするために、蛍光標識されたneo gene及びVDR geneのプライマーを用いて、キメラの形成率をVDRKO骨で解析した所、移植後すでに新生骨形成が明らかとなっている2週目においてはホスト側の細胞は5%程度しか認めなかったが、3週以降ホスト側の細胞の割合は40%程度に増加していた。さらに、移植骨よりRNAを抽出し各種骨関連遺伝子発現をRT-PCR法により検討した所、VDRKOと野生型とで発現状態に差を認めたのはcbfal, BMP4, OPGのみであった。即ちVDRKO骨ではcbfal, BMP4, OPGは何れも増加していた。

### D. 考 察

VDRKO骨を正常な体液環境においた場合、野生型以上の骨形成を認めた。移植後すでに新生骨形成が明らかとなっている2週目においてはホスト側の細胞は5%程度しか認めなかったが、3週以降ホスト側の細胞の割合は40%程度に増加していたことから、急速な骨形成の促進の初期は、ドナー側の細胞に由来する反応であり、3週目以降はホスト側の細胞に由来する反応であることが考えられた。従って、ビタミンDのVDRを介する骨に対する作用は(1)本来骨形成を抑制する方向に働くこと(2)骨形成を促進する何らかの分泌性因子の産生を抑制していることの2つの可能性が考えられる。mRNAの発現レベルから考えると、(1)の作用はcbfalのビタミンDによる発現抑制、(2)の作用はBMP4, OPGの発現調節を介していると考えられた。

今後、ホスト側の細胞の影響を除去した状態での検討、cbfal, BMP4, OPGのダブルKOでの検討でメカニズムを明らかにしていく必要がある。

### E. 結 論

VDRシグナルはin vivoでは骨形成を抑制している。偽性副甲状腺機能低下症や低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病、二次性副甲状腺機能亢進症など、ビタミンD抵抗性をきたす疾患に見られる異所性骨化の原因の少なくとも一部は減弱したVDRシグナルであると考えられた。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

K.Kinuta et al. Vitamin D is a negative regulating factor in bone mineralization.

ASBMR 22<sup>nd</sup> Annual Meeting (Toronto,  
September 2000)

**H. 知的財産権の出願・登録状況**  
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

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

分担研究者 松本 俊夫 徳島大学医学部第一内科 教授

研究要旨

ビタミンD受容機構異常に基づく病や骨軟化症においては種々の程度の筋力低下・筋萎縮が認められる。本研究では、骨格筋の発育・代謝におけるビタミンD受容体（VDR）の役割を明らかにするため、ビタミンD依存症II型の動物モデルであるVDR遺伝子ノックアウトマウス（VDRKO）の骨格筋障害およびその機序の解析を行った。その結果、VDRKOの骨格筋細胞は正常な分化過程は終了しているものの、成熟障害により筋線維の小径化および大小不同が顕著であった。VDRKOにおいては正常ではすでに発現が消失しているはずのmyf5, myogenin, E2Fなどの筋分化制御因子および新生児型のMHC (myosin heavy chain) の発現がみられたことから、これらの制御因子およびそれに依存した機能分子の発現パターンの異常により筋障害が発症するものと考えられた。したがって、ビタミンDはVDRを介して筋分化制御因子の発現を適切な時期に抑制することにより、生理的な骨格筋の発達を制御していると考えられる。

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。
- (6)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。

## F. 研究発表

遠藤逸朗、三井貴夫、井上大輔、吉沢達也、加藤茂明、松本俊夫 骨格筋の分化に及ぼすビタミンDの作用 第18回日本骨代謝学会(広島、7/19-22/2000)

Endo I, Inoue D, Mitsui T, Umaki Y, Akaike M, Yoshizawa T, Kato S, Matsumoto T. Physiological roles of Vitamin D as a regulator of muscle development: downregulation of Myo D family of transcription factors via the vitamin D receptor (VDR). 22nd Annual Meeting of the American Society of Bone and Mineral Research (Toronto, Ontario, Canada, September 22-26)

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受容機構の解明

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

研究要旨

ビタミンDの作用機序の解明の一端として、リガンド依存性転写因子であるビタミンD受容体の核局在を担う分子の探索と悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症時の1位水酸化の低下原因の検討を行った。前者では、前年度に同定したビタミンD受容体核移行シグナルを認識する蛋白質のクローニングを酵母 two-hybrid法を利用して試みている。後者では、動物モデルを確立し、著しい高カルシウム血症時の1位水酸化酵素の発現低下を証明した。また、ビタミンD結合蛋白質であるメガリンの腎尿細管での発現低下も1位水酸化の低下の原因となるという新しいデータを得た。

1. ビタミンD受容体(VDR)の核局在を担う分子の探索

A. 研究目的

我々は、VDRの一次構造中に核移行シグナル(NLS)用の配列が存在することを見出し、これが実際にNLSとして機能し得ることを明らかにしてきた(J Biol Chem 274: 33531, 1999)。VDRはリガンド依存性転写因子であり、その機能は核内において発揮される。したがってVDRの核移行はビタミンDの作用発現において極めて重要なステップであると位置付けられる。そこで、VDRの核移行を担う分子の同定および核移行の分子機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

酵母two-hybrid法により、VDR中のNLSに相互作用する分子を探索した。ヒトVDRのDNA結合ドメインからヒンジ領域の部分(DBD/Hinge)、およびヒンジ領域からリガンド結合

ドメインの部分(Hinge/LBD)をbaitとして用いた。これらの領域をコードするcDNA断片を調製し、各々pAS2-1(Clontech)に組み込むことによってbait vectorを構築した。NLSはヒンジ領域に位置しているため、いずれかのbaitによってNLSに相互作用する分子が得られるものと期待された。各bait vectorを酵母株AH109に導入し、bait発現酵母株を樹立した。スクリーニングは、bait発現酵母株と、既にcDNAライブラリーで形質転換した酵母株Y187を接合させることによって行った。cDNAとしてヒト腎cDNAライブラリー(Pretransformed MATCH-MAKER cDNA Library, Clontech)を用いた。接合後、栄養要求性および $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標としてbaitと相互作用する蛋白質を発現しているクローンを選抜した。これらのクローンよりlibrary vectorを調製し、baitとの相互作用を確認した後に塩基配列を決定した。この配列を元に、データベース検索によって遺伝子を同定した。



## C. 研究結果

栄養要求性および $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標として、DBD/Hinge baitでは $2.9 \times 10^7$ クローンより300クローンが、Hinge/LBD baitでは $3.5 \times 10^7$ クローンより481クローンが、それぞれ陽性クローンとして得られた。塩基配列より7つの遺伝子が同定できたが、核移行に関与する分子ではなかった。現在さらに陽性クローンの解析を続行している。

## D. 考 察

さらに陽性クローンの解析数を増やし、蛋白質間相互作用を、GST-pull down法などで確認する必要がある。さらに、細胞内局在を確かめ、VDRの核移行を支持する蛋白質を同定する。

## E. 結 論

引き続き、遺伝子の同定を行う。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

本プロジェクトに関する論文はなし。他のVDR関連の論文は別紙記載。

### 2. 学会発表

平成12年度はなし。

## G. 知的所有権の取得状況

特になし。

## 2. 悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症時の ビタミンD代謝の検討

### A. 研究目的

Humoral Hypercalcemia of Malignancy (HHM) は、腫瘍が過剰産生するPTHrPにより惹起される腫瘍随伴症候群である。PTHrP は、

PTH と共通の受容体に結合し、骨吸収を亢進し、高Ca血症をきたすが、HHM においては、PTH の過剰状態である原発性副甲状腺機能亢進症とは異なり、血中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 値は低下する事が知られている。しかし、そのメカニズムについては、現在まで明らかではないので、適切な動物モデルを作製し、1位水酸化酵素の発現を含めて解析する。

## B. 研究方法

PTHrPを過剰産生するヒトのinfantile fibrosarcoma, OMC-1 tumorをヌードラットに移植した担癌動物モデルを作製した。このモデルを用いて、HHM時におけるビタミンD代謝について検討した。

OMC-1腫瘍をヌードラットに移植後、4週から8週で採血し、Ca値、PTHrP値および血中ビタミンD代謝物濃度を測定した。ビスフォスフォネート製剤の投与による各種パラメーターの変化も検討した。

## C. 研究結果

担癌ヌードラットの血中PTHrP値、血清Ca値の推移については、移植6週後かPTHrP値およびCa値が上昇した。担癌ラットにおいて、血清Ca値軽度上昇群と著明高値群とで、血中 $1,25\text{D}$ 値が異なる挙動を示したので、Ca値と $1,25\text{D}$ 値との関係について、それぞれの群に分けて検討した。まず、非担癌ラットと、担癌ラットCa値軽度上昇群におけるCa値と $1,25\text{D}$ 値との相関の検討では、血清Ca値と $1,25\text{D}$ 値との良好な相関が認められた ( $[1,25(\text{OH})_2\text{D}] = 21.0 \times [\text{Ca}] - 151.3$ ;  $R^2 = 0.778$ ,  $p < 0.005$ )。Ca値著明高値群においては $1,25\text{D}$ 値は、上記の相関直線より予想される値より著しく低下していた。次に、

担癌ラットが著明な高Ca血症を来した段階で、ビスフォスフォネート製剤YM529の投与を行った。YM529を投与した群では、血清Ca値が正常化し、血中1,25D値が著明な高値を示した。最後に、1,25D産生の鍵酵素である1位水酸化酵素の腎臓における発現をRT-PCRにより検討した。各群2個体ずつの腎臓から抽出したRNAをサンプルとして行ったRT-PCRの結果では、非担癌ラットおよび担癌ラットCa値軽度上昇群においては、1位水酸化酵素の弱いシグナルを認めたのに対し、Ca値著明高値群においては1位水酸化酵素の発現は低下していた。YM529投与群では本酵素の非常に強い発現が認められた。尿細管機能の検討では、抗DBP抗体を用いたWestern blot で、尿中へのビタミンD結合蛋白質（DBP）の漏出が担癌ラットで増加していることが示された。同時に、25OHDは、非担癌ラットの尿中では測定感度以下であったが、OMC-1担癌ラットでは25OHDが尿中に検出された。次に、腎臓におけるメガリンの発現をRT-PCRで検討したところ、担癌ラットCa値著明高値群においてメガリンの発現が低下しており、尿中への25OHDの漏出への関与が考えられた。さらに、この低下したメガリンの発現は、ビスフォスフォネートの投与により回復し、HHM時の1,25D値の低下にメガリンの発現の低下が関与するものと考えられた。

#### D. 考 察

過剰に存在するPTHrPはPTHと同様に、1位水酸化酵素の発現を誘導するが、高Ca血症が存在するとその誘導は抑制されるものと考えられた。また、DBPの再吸収の担い手であるメガリンの腎尿細管での発現低下も、1位水酸化の低下の原因となるというデータを得、HHM

時における1,25D値の低下にメガリンの発現の低下が関与するという新しい考えを提出した。

#### E. 結 論

HHM時における血中1,25D値の低下は、著しい高カルシウム血症と腎におけるメガリンの発現低下によってもたらされる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

本プロジェクトに関する論文は投稿中。他のVDR関連の論文は別紙記載。

##### 2. 学会発表

- i) Michigami T, Yamato H, Suzuki H, Nagai Y, Ozono K. Restoration of serum calcium with bisphosphonate leads to the enhanced expression of  $1\beta$ -hydroxylase in a rat model of humoral hypercalcemia of malignancy. 11th workshop on vitamin D. 2000. 5; USA
- ii) 道上敏美, 板垣 (永井) 由美子, 大和英之, 大藪恵一. 腫瘍随伴性高Ca血症と骨軟化症をともに呈するラットモデルの確立とビタミンD代謝異常の病態解析. 第18回日本骨代謝学会2000. 7; 広島
- iii) Michigami T, Yamato H, Nagai-Itagaki Y, Suzuki H, Ozono K. Nude rats bearing a mesenchymal tumor manifest both hypercalcemia and osteomalacia. 22nd annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2000. 9; USA
- iv) 道上敏美. 腫瘍随伴性高Ca血症におけるビタミンD代謝異常に対するビスフォスフォネートの効果. 第4回癌と骨病変研究会. 2000. 11; 東京

**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

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

研究協力者 杉本 利嗣 神戸大学第三内科 助教授

研究要旨

低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病において、骨芽細胞自身の機能異常とともに低リン血症が骨芽細胞の増殖、機能に影響を及ぼす可能性もある。細胞外リン濃度上昇は骨芽細胞に直接作用し、その増殖、機能を促進した。リン濃度上昇による増殖促進作用はIGF-I産生、分泌そしてIGF作用の亢進を介する機序が存在すると考えられた。細胞外リン濃度上昇による骨芽細胞へのこれらの直接作用を考慮すると低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病においてリン治療は意義のあるものと考えられた。

A. 研究目的

低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病において骨芽細胞自身の機能異常が存在すると考えられている。一方、低リン血症によって生じる骨形成の抑制がリン(P)補充により改善することも報告されている。しかしながら、その機序の詳細は不明である。そこで、P濃度上昇が直接、骨芽細胞に作用し、骨形成に関わる可能性を考え、細胞外P濃度上昇が骨芽細胞増殖、機能に及ぼす影響とその機序を詳細に検討した。

B. 研究方法

骨芽細胞増殖はMC3T3-E1細胞への[3H]thymidine incorporation(TdR)により求めた。ALP活性はp-Nitrophenol法により測定し、DNA量で補正した。タイプIプロコラーゲンmRNAおよびIGFBP-5 mRNAの発現をNorthern blot法にて検討した。  
(倫理面への配慮)

培養細胞を用いた実験であり倫理上問題はないと考えた。

C. 研究結果

培養液P濃度上昇(2~4mM)24時間処置により、control(P:1mM)に比し濃度依存性にTdR、ALP活性、タイプIプロコラーゲンmRNA発現が有意に上昇した。time courseの検討からPの骨芽細胞増殖促進作用は3時間で有意となり、以後24時間まで時間依存的に増強した。Pの増殖促進作用はcycloheximideで部分的ではあるが有意に抑制された。以上のことから、Pの増殖促進作用は少なくとも一部何らかの蛋白合成を介した機序が存在すると考えられた。そこで蛋白合成を介する機序におけるIGF-Iの関与を検討した。骨芽細胞のIGF-I mRNAの発現はP濃度上昇により、6時間で有意に増加し、濃度依存的(2.5~4mM)であった。培養上清中のIGF-I濃度はP濃度上昇によ

り24時間で有意に増加した。そこでIGF作用の増強とIGFとは独立して骨芽細胞増殖を促進することが報告されているIGF結合蛋白-5 (IGFBP-5) について検討を加えた。P濃度上昇(2.5~4mM)は骨芽細胞のIGFBP-5 mRNAの発現を促進した。最後にP濃度上昇による増殖促進作用に実際にIGF-Iが関わっているか否かを検討した。P濃度上昇による増殖促進作用はIGF-I抗血清(10000倍~100倍)およびIGF-I抗体(1, 10  $\mu$ g/ml)で部分的ではあるが、濃度依存的に有意に抑制された。IGF-I receptor抗体(1  $\mu$ g/ml)もP濃度上昇による増殖を有意に抑制した。

#### D. 考 察

P濃度上昇は直接、骨芽細胞に作用し、その増殖と機能を促進することが明らかとなった。P濃度上昇による細胞増殖促進作用はIGF-I産生、分泌そしてIGF作用の亢進を介する機序が存在すると考えられた。低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病の治療においてリン補充の際、PTH上昇によりリンの減量を余儀なくされることがしばしば経験されるが、骨芽細胞への増

殖および機能促進作用を考慮すると適切なリン補充は治療上、意義のあるものと考えられた。

#### E. 結 論

P濃度上昇による骨芽細胞の増殖および機能促進に対する直接作用を考慮すると、低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病においてリン治療は意義があると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### A. 論文発表

杉本利嗣：低リン血症、リウマチ病セミナー・七川歆次編 112-121, 2000 永井書店

##### B. 学会発表

金谷政則、杉本利嗣、加納純一、千原和夫 第18回日本骨代謝学会(広島)2000年7月19日-22日 PB-03 細胞外リン濃度上昇が骨芽細胞増殖および機能に及ぼす作用について：細胞増殖とIGF-Iとの関連

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

分担研究者 網野 信行 大阪大学大学院医学系研究科生体情報医学教授

**研究要旨**

新しく開発されたラジオレセプターアッセイによる阻害型抗体測定により、バセドウ病の30%でその存在が認められた。この抗体を有するバセドウ病では治療後、比較的早期に機能が正常化することが判明した。

**A. 研究目的**

TSH受容体抗体のうちバセドウ病における甲状腺中毒症の発症原因は、刺激型抗体によるものとされている。一方、阻害型TSH受容体抗体は萎縮性の甲状腺機能低下症の発生に重要と考えられている。阻害型TSH受容体抗体測定には、従来TSHによるサイクリックAMP上昇を阻害する活性を測るバイオアッセイが主として用いられてきた。しかし阻害型抗体と刺激型抗体が共存するときは正確に阻害型抗体の活性を測定することは不可能であった。最近、TSH受容体のアミノ酸90～163までをLH/CG受容体部分に置換したキメラ受容体を用い、刺激型抗体があまり働かない条件で阻害型抗体の活性を測定する方法が試みられている。しかし、なおこの方法でも、刺激型抗体の一部は受容体を刺激し、正確に共存する阻害型抗体を測定することは極めて難しかった。

最近我々はTSH受容体の存在様式により受容体抗体の作用がかなり異なることを見出した。TSH受容体を可溶化せずparticulate membrane fractionとして用いた場合には刺激

型TSH受容体抗体はTSH受容体結合に影響を与えず、阻害型抗体のみが結合し、TSH結合を阻害することが判明した。この方法を用いると刺激型抗体が共存していてもそれに関係なく特異的に阻害型抗体を測定することができる。そこで、この方法を用いバセドウ病における阻害型抗体の出現頻度を調べた。

**B. 研究方法**

ブタ甲状腺から、比較的温和な条件で膜分画を分離し、可溶化剤を加えずにそのままparticulate membrane fractionを取り出し、それを用いラジオリガンドアッセイを実施した。それと同時に得られた膜分画をさらに従来法に従いデタージェントで可溶化し、同様にラジオレセプターアッセイを行った。またTSH受容体抗体の生物活性を調べるためにFRTL-5細胞を用いTSAb及びTSBAb活性を測定した。

**C. 研究結果**

バセドウ病患者30例の血清を用い、可溶化TSH受容体を用いたラジオレセプターアッセ

イを行うと、従来のコンベンショナルなラジオレセプターアッセイと同様に患者の90%が陽性を示した。また、TSAb活性は83%が陽性であった。一方従来のコンベンショナルなバイオアッセイを用いるTSAb活性は6.7%とあまり検出されなかった。これらの症例を対象に上述の阻害型抗体特異的なラジオレセプターアッセイを用いると、バセドウ病の30%に阻害型活性が認められた。

この阻害型活性存在と臨床像及び各種検査との関連を分析した。抗甲状腺剤治療により血中甲状腺ホルモンが正常化する時期が阻害型抗体陽性例では、陰性例より短い傾向が認められた。

#### D. 考 察

従来の研究からTSH受容体抗体はかなりheterogeneousであることが言われている。我々の以前の研究からも、キメラTSH受容体を用いた検索から、少なくとも5種類の受容体抗体に分類することが可能であった。このうち甲状腺機能低下症の関連が注目される阻害型抗体は、バセドウ病ではあまり出現しないものと考えられていた。しかし、今回の研究からバセドウ病患者の30%に陽性が見られることが判明した。

従来バセドウ病患者では刺激型抗体のみが産生されると考えられていたが、阻害型抗体も同時に産生されることが証明された。TSH受容体抗体産生におけるその生物学的活性の特異性に新たな検索を加える必要があるものと考えられる。TSH受容体抗体産生はおそらくかなりの患者では刺激型及び阻害型両抗体共に産生されているのであり、その活性のうち刺激型抗体がより優位のものがバセドウ病の病形をとり、

阻害型活性が強いより優位の症例では表現型として甲状腺機能低下症になるものと考えられた。

これらの研究をもとに今後、刺激型抗体産生を何らかの工夫で阻害型抗体優位に変換させることによりバセドウ病の新たな治療法が開発されるものと期待される。

#### E. 結 論

新たに開発された阻害型抗体特異的なラジオレセプターアッセイにより、TSH受容体に対する阻害型抗体がバセドウ病の30%の患者に認められた。またこの抗体共存例では、治療により比較的早く甲状腺機能が正常化することが明らかとなった。

#### F. 研究報告

##### 1. 論文発表

Watanabe Y, Tahara K, Hirai A, Tada H, Kohn. LD, Amino N: Subtypes of anti-TSH receptor antibodies classified by various assays using CHO cells expressing wild type or chimeric human TSH receptor. *Thyroid* 7: 13-19, 1997.

Watanabe Y, Tada H, Hidaka Y, Takano T, Amino N: Effect of solubilization of porcine thyrotropin (TSH) receptor on TSH binding and on radio-receptor assay for anti-TSH receptor antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 110-114, 1998.

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.

Tada H, Izumi Y, Watanabe Y, Takano T,  
Fukata S, Kuma K, Hidaka Y, Amino N:

Blocking type anti-TSH receptor antibodies  
detected by radioreceptor assay in Graves'  
disease. (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

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

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 高松赤十字病院健診部

研究要旨

リコンビナントヒト TSH受容体を固相化して<sup>125</sup>I-TSHの結合阻害作用よりTSH受容体抗体を測定するTBIIアッセイの臨床応用を試みた。この方法はブタ甲状腺の細胞膜を用いる従来のTBIIアッセイや、さらにブタ甲状腺細胞を用いる越智法TSAbアッセイよりも高感度であった。アッセイの特異性も満足すべきものであった。本法はEuthyroid Graves病において有用性が高く、また弱い活性の阻害型 TSH受容体抗体を高感度に検出できる可能性があることが明らかとなった。さらにbTSH抗体の影響を受けない利点があり、臨床的有用性が高いものと考えられた。

研究目的

従来、TSH受容体抗体の測定には、豚やマウスの甲状腺細胞を用いるTSH結合阻害性イムノグロブリン (TSH Binding Inhibitor Immunoglobulin; TBII) アッセイや甲状腺刺激抗体 (thyroid stimulating antibody; TSAb) アッセイが行われているが、TSH受容体抗体は必ずしもバセドウ病患者の全例に検出されるわけではなく、また甲状腺機能との相関も良好ではない。用いる甲状腺細胞がヒト由来でないことが原因の一つである可能性もある。近年、リコンビナントヒトTSH (rhTSH) 受容体を用いるTBIIの高感度測定法が開発されたので<sup>1)</sup>、その臨床的有用性につき検討を加えた。

研究方法

STUDY 1

未治療バセドウ病27例、Euthyroid Graves病7例、陰性コントロール9例（無痛性甲状腺炎4

例；単純性甲状腺腫4例；プランマー病1例）、原発性甲状腺機能低下症18例の患者血清をドイツのブラームス社に送り、従来の可溶化ブタ甲状腺膜を用いるTRAK porcine キットとrhTSH受容体を用いるTRAK human キットを用いるTBII活性の測定を依頼した。活性は標識TSH結合阻害率(%)で表示した。

STUDY 2

活動性バセドウ病67例、治療中バセドウ病49例、陰性コントロール12例（破壊性甲状腺炎4例、寛解中6例、プランマー病2例）の血清中のTBII活性またはTSAb活性を①コスミック社の可溶化ブタ甲状腺膜を用いるSmith キット；②ブラームス社のTRAK human キット；③ヤマサ醤油社のブタ甲状腺細胞と高濃度ポリエチレングリコール (PEG) を用いる越智法高感度TSAb キットにより測定した<sup>2)</sup>。①は京大病院にて測定した。②③はヤマサ醤油社に測定を依

頼した。②の活性はU/mlで表示した。なお「活動性バセドウ病」は未治療バセドウ病あるいは抗甲状腺剤治療中でTSH値が測定感度以下を示すものと定義した。「治療中バセドウ病」は維持量の抗甲状腺剤治療中でTSH値が正常を数ヶ月間保っているものと定義した。

### TRAK human アッセイ

rhTSH受容体のC端に対するモノクローナル抗体を用いてrhTSH受容体を固相化した試験管に患者血清0.1mlを加え、室温で1時間インキュベートし、洗浄後<sup>125</sup>I-ウシTSH(bTSH)を加え、さらに室温で2時間インキュベートし、洗浄後試験管の放射能を測定した。

## 研究結果

### Study1

各種甲状腺疾患患者におけるTBIIの測定成績を表1に示す。

いずれもTRAK humanキットを用いた場合の測定値の方がTRAK porcine キットによるものよりも活性が高く、検出率の差は特にEuthyroid Graves病において顕著に認められた。

### Study2

活動性および治療中バセドウ病患者と陰性コントロール例において、Smithキット、TRAK humanキットにより測定したTBII活性およびTSAb活性の検出成績を表2に示す。活動性および治療中バセドウ病群における検出率は

表1. 各種疾患患者におけるTBIIの測定成績；

ブタ甲状腺膜を用いる従来法とリコンビナントヒト甲状腺TSH受容体を用いる新アッセイとの比較

病名	TRAK porcine キット		TRAK humanキット	
	TBII (%)	検出率	TBII (%)	検出率
未治療バセドウ病	49.0±25.3	24/27 (88.9%)	73.1±14.8	27/27 (100.0%)
euthyroid Graves病	3.1± 4.4	1/ 7 (14.3%)	23.4±12.1	6/ 7( 85.7%)
原発性甲状腺機能低下症	25.1±30.3	6/18 (33.3%)	32.2±31.3	9/18( 50.0%)

表2. バセドウ病患者におけるTSH受容体抗体；

Smith法とTRAK humanキットと高感度TSAbアッセイとの比較

	Smithキット	TRAK humanキット	TSAbキット
活動性バセドウ病	40/67；59.7%	61/67；91.0%	40/67；59.7%
治療性バセドウ病	14/49；28.6%	43/49；87.8%	22/49；44.9%
陰性コントロール	0/12； 0%	2/12；16.7%	0/12； 0%

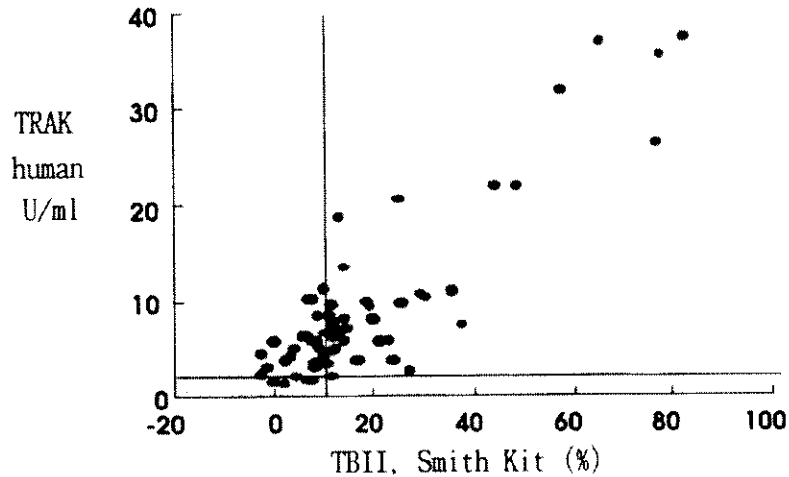


図1. 活動性バセドウ病患者におけるTBII活性。従来のブタ甲状腺細胞膜を用いるSmith法とリコンビナントヒト TSH受容体を用いる新法とで活性を比較した( $r=0.871$ )。

TRAK humanキット> TSAb アッセイ> Smithキットの順に高感度であった。陰性コントロール血清ではTRAK humanキットによる測定値12例のうち2例のみが弱陽性を示した。うちブランマー病の1例は2.5 U/ml (基準値2.24 U/ml以下)、寛解中のバセドウ病の1例は5.0 U/mlの値を示した。

活動性バセドウ病患者においてSmithキットとTRAK humanキットにより測定されたTBII活性の関係を図1に示す。67例中両者とも陽性39例、両者とも陰性5例、Smithキット陰性でTRAK humanキットで陽性を示したものが22例あった。Smithキットで陽性を、TRAK humanキットで陰性を示した症例が1例あった。両活性間には良好な相関関係が認められた( $r=0.881$ )。次にTRAK humanキットを用い測定したTBII活性とTSAb活性との関係を検討したところ、両活性とも陽性40例、両活性とも陰性6例、TBIIのみ陽性21例であり、TSAbのみ陽性は1例もなかった。

## 考 察

rhTSH受容体を用いるTBIIアッセイキットの臨床応用を試みた。このアッセイの測定成績をブタ甲状腺細胞膜を用いるSmithキットによる成績ならびにブタ甲状腺細胞を用いる越智法TSAbアッセイ<sup>2)</sup>によるものと比較した。治療中バセドウ病の症例で維持量の抗甲状腺剤投与が必要とされた群、さらにインビボにおける甲状腺刺激作用が確実な活動性バセドウ病群において、本アッセイがもっとも高感度であった。このように本アッセイはTSAbアッセイのように直接生物活性を測定しているものではないものの、測定されたTBIIが甲状腺刺激活性を鋭敏に反映していることが示唆された。

今回寛解中のバセドウ病の1例が5.0 U/mlと高値を示した。しかしTSH受容体抗体陽性にもかかわらず甲状腺側の反応性の低下のために寛解状態を保っている症例が決して少なくなく、事実、著者らが開発したFRTL-5細胞を用いる超高感度TSAbアッセイによると、バセドウ病寛解例の34例中23例(69.6%)が陽性を示

した<sup>3)</sup>。

Euthyroid Graves病においてはTSAbよりもTBIIの検出率が低く、診断におけるTBIIアッセイの有用性は低いものと考えられてきた<sup>4)</sup>。しかし本法によりTBIIを測定することによりその検出率は著しく上昇した。このように本疾患においてはTBII測定の臨床応用が高まることが期待される。

甲状腺の萎縮を伴う原発性甲状腺機能低下症の病因として阻害型TSH受容体抗体の役割が注目されている。このような症例においては、TBIIのみならず、TSH刺激による甲状腺細胞内cAMP産生を抑制する作用として検出されるTSBAb (thyroid stimulation blocking antibody) も活性化されているが、TBII陰性、TSBAb陽性の症例も少なからず存在することが知られている<sup>5)</sup>。TBIIアッセイがTSBAbアッセイよりも感度が低いことが、TBII陰性、TSBAb陽性の原因として考えられるが、事実今回の検討においても従来法に比べてrhTSH受容体を用いることによりTBIIの検出率が若干上昇した。今後多数例においてTSBAb活性測定を含めた検討が望まれる。

何故このアッセイが従来の方法に比べて高感度なのであろうか？その機序として①rhTSH受容体がブタ甲状腺膜分画に存在するTSH受容体に比べて構造上抗体に結合しやすいこと、②C端に対するモノクローナル抗体を固相化し、それにrhTSH受容体を結合させて、標識TSHと競合反応を行うことにより、非特異的結合を減少させることができること、③バセドウ病IgGがブタ甲状腺TSH受容体よりもヒト甲状腺受容体に結合しやすいこと、などが考えられる。③に関しては、TBIIアッセイにおいても、TSAbアッセイにおいても、豚甲状腺より

もヒト甲状腺に高感度に反応するバセドウ病IgGが存在するという報告は散見される<sup>6)-8)</sup>、一般に両活性の相関は良好であり ( $r=0.91-0.95$ )<sup>1)6)7)9)</sup>、その可能性は低いものと考えられる。

血清中にbTSHに対する抗体が存在する場合、従来法ではbTSH抗体と<sup>125</sup>I-bTSHとの結合体がTSH受容体と<sup>125</sup>I-bTSHとの結合分画に混入し、TBII活性は見かけ上異常低値を示す。しかし本法では標識bTSHを加えるまでに洗浄操作があることにより、bTSH抗体がアッセイ系から除外される。Akamizuら<sup>10)</sup>はバセドウ病患者では18%の症例にbTSH抗体が存在していることを明らかにし、さらに従来法のアッセイにおいてbTSH抗体の影響を取り除くために各検体について受容体分画を含まない非特異的結合を差し引いて計算したところ、従来法TBIIが陰性を示した活動性バセドウ病患者の79%が陽性を示したと報告した。したがって本アッセイが従来法より測定感度が高い理由としては一部の症例においてはbTSH抗体の影響も否定はできず、今後の多数例での解析が必要と思われる。

## 結 論

リコンビナントヒトTSH受容体を固相化させて行うTBIIアッセイの臨床応用を試みた。この方法は従来のTBIIアッセイよりも高感度であり、今後の臨床応用が期待される。

## 文 献

1. Costagliola S, Morgenthaler NG, Hoermann R, et al. Second generation assay for thyrotropin receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves'