

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13年度 研究報告書

平成14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3年が経過し、最終年度が終了しました。

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。本研究班は3年間を目途に研究を開始し、本年度が最終年度でありました。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」は最終年度の重要な研究であり、極めて重要な成果を得ました。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、臨床科学研究としての役割を認識し、治療研究に力を入れて参りました。重要な成果を出していただいた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も、暖かい御指導ならびに御支援を頂き、深謝に絶えません。

ここに、平成13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14年3月

清野佳紀

目 次

I. 序 文

II. 平成13年度総括研究報告…………… 1

岡山大学大学院医歯学総合研究科小児医科学 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・病態解析…………… 5

国立千葉病院小児科 安田 敏行

2. 偽性副甲状腺機能低下症(PHP)Ib型の原因遺伝子と遺伝様式に関する研究 …… 8

神戸大学大学院医学系研究科内分泌代謝・神経・血液腫瘍内科
杉本 利嗣

3. 副甲状腺ホルモンの骨形成促進作用およびその低下機序の解明……………11

徳島大学医学部内科学第一講座 松本 俊夫

4. Ca調節ホルモンとLysosomeの細胞内移動 ……14

東北大学医学部分子血管病態学 水梨 一利

5. 骨・カルシウム代謝異常症の病因に関する研究……………16

東京大学医学部附属病院検査部 福本 誠二

6. ホルモン受容機構異常に関する研究：ビタミンDの骨に対する直接作用 ……18

岡山大学大学院医歯学総合研究科小児医科学 清野 佳紀

7. 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 ……21

— 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

8. ビタミンD受容機構に関する研究 ……25

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 大藺 恵一

9. TSH受容体抗体病モデル動物の機能解析とバセドウ病の遺伝因子に関する研究	28
京都大学医学部附属病院探索医療センター	赤水 尚史
10. 抗甲状腺剤治療後のバセドウ病再発の季節変動およびTSH受容体抗体価の推移	33
京都大学医学研究科核医学画像診断学	小西 淳二
11. バセドウ病における抗TSH受容体抗体の性質と治療による甲状腺機能正常化および寛解との関係.....	35
大阪大学大学院医学系研究科生体情報医学	網野 信行
12. 甲状腺ホルモン不応症の成立機序に関する研究.....	38
(3) 不適切TSH分泌状態の発症機序： 甲状腺ホルモン受容体によるTSH遺伝子転写抑制	
浜松医科大学第二内科	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	42
名古屋大学環境医学研究所内分泌・代謝分野	妹尾 久雄
14. ホルモン受容機構異常に関する研究	50
群馬大学医学部第1内科	森 昌朋
15. 未分化甲状腺癌における甲状腺特異遺伝子の再発現誘導.....	56
塩山市民病院	女屋 敏正
16. 外眼筋と甲状腺の共通蛋白myocilinの甲状腺内局在とその変化	61
三宿病院	紫芝 良昌
17. 病変部線維芽細胞を標的としたバセドウ病眼症治療の基礎的検討.....	63
東京女子医科大学第二内科	對馬 敏夫

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

V. 班構成員名簿

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 岡山大学大学院医歯学総合研究科長

研究要旨

本研究の目的は、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った。しかし、研究の進歩に伴い新たな疾患病態が明らかとなり、これに対応して本研究班では、対象疾患を広く設定し、副甲状腺機能低下症にかかわる病態の解明、実態の把握、治療法の開発、甲状腺機能異常にかかわる病態の解明、実態の把握、治療法の開発を行うことを目的に研究を行った。具体的には 副甲状腺疾患では特発性副甲状腺機能低下症の診断の手引きの作成、偽性副甲状腺機能低下症Ib型の原因、病態の解明、ビタミンD受容体の機能解析、新規のリン調節因子の同定、甲状腺疾患ではTSH受容体抗体の新規の測定法の開発と臨床的意義の解明、甲状腺ホルモン受容体と転写共役因子の機能解析とそれに基づく甲状腺ホルモン不応症の病態解析、バセドウ病性眼症の治療法の開発、バセドウ病の疾患感受性決定因子同定のための家族性バセドウ病の全国アンケート調査 などを行った。まだ、研究途上のものもあるが、本研究の成果は、カルシウムリン代謝異常症、甲状腺機能異常症の診療に大きな貢献を果たすものと考えられる。

分担研究者

女屋 敏正	塩山市民病院名誉院長
小西 淳二	京都大学医学研究科放射線医学核医学画像診断学教授
紫芝 良昌	三宿病院院長
妹尾 久雄	名古屋大学環境医学研究所分子細胞適応部門教授
對馬 敏夫	東京女子医科大学内分泌疾患総合医療センター第2内科教授
網野 信行	大阪大学医学部生体情報医学教授
松本 俊夫	徳島大学医学部第1内科教授
加藤 茂明	東京大学分子細胞生物研究所教授
中村 浩淑	浜松医科大学第2内科教授
森 昌朋	群馬大学医学部第1内科教授
安田 敏行	国立千葉病院小児科医長

A 研究の目的

本研究の目的は、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った。しかし、分子生物学の進歩に伴い本研究班の研究対象疾患の原因となる遺伝子異常は大半は明らかとなってきたが、その病態発生機構については不明な点は数多く残されており、治療法についてもまだまだ不十分である。さらに、研究の進歩に伴いこれまで単一の疾患とされていた疾患も原因病態によって全く別個の疾患であるこ

とも明らかとなり、これらに対して新たに診断基準もしくは診断のための手順書などの作成が必要となってきた。このために、本研究班では、対象疾患を広く設定し、副甲状腺機能低下症にかかわる病態の解明、実態の把握、治療法の開発、甲状腺機能異常にかかわる病態の解明、実態の把握、治療法の開発を行うことを研究の目的とした。

B 研究方法

研究は副甲状腺疾患を扱う subgroup と甲状腺疾患をとりあつかう subgroup で独立して行われ、各 subgroup の情報は清野によって統括され、各 subgroup の研究に反映されるように努めた。さらに、全国調査に当たっては疫学研究班との共同で調査を行った。各々の subgroup においては、疾患家系における連鎖解析、臨床サンプルの解析、動物細胞培養を用いた実験、遺伝子改変マウスを用いた実験などにより研究を進めた。

(倫理面への配慮) ヒトにおける検討では、各施設の倫理委員会で承認された研究のみを行い、十分なインフォームドコンセントを得た後に行った。動物を用いた研究においても、動物実験倫理委員会で承認を受け施行した。

C 研究結果と考察

副甲状腺 subgroup

PTH や Calcitonin (CT) の投与後に見られる Lysosome 酵素の尿中排泄増加は、尿細管の反応性の指標として有用であり、腎の PTH に対する感受性を判断する指標の開発は偽性副甲状腺機能低下症の診断や病態の解明に重要である。新たな腎の PTH 感受性の指標を開発するため、PTH による Lysosome 酵素の尿中排泄増

加の機序を検討し、PTH による尿細管細胞の vesicle membrane の recycling を促進機序が明らかとなった。これによって、新たな指標の開発が可能となると考える。

一方、偽性副甲状腺機能低下症 Ia 型の責任遺伝子は GNAS-1 であることは既に明らかとなっているが、Ib 型の原因は未だに不明で、本研究班でも PTH/PTH r P 受容体のプロモーターなど腎特異的な PTH 反応性欠除の原因を検討してきた。そして、PHP Ib2 家系において連鎖解析を行い、原因遺伝子が 20q13.3 に存在し、父性刷り込みを受けること、さらに PHP Ib では exon A/B が特異的に Meth を受けていないことを見出し、これが病因に深く関わる可能性を明らかにした。

また、関連する疾患として、特発性副甲状腺機能低下症があるが、近年この疾患は原因の明らかでない 4 つのサブグループに分類することが出来ることが明らかとなってきている。特にカルシウム感知受容体の異常によって発症する特発性副甲状腺機能低下症は高 Ca 尿症を有するために早期の診断が必要で、それらの早期診断のための手引書を作成した。また治療法として、thiazide 利尿薬が有効であると考えられていたが、実際に治療を行った第 5 膜貫通部位に異常のある Phe788Cys 変異で 24 歳時に嚢胞腎を確認され、治療の再検討が必要であることが明らかとなった。

副甲状腺機能低下症の治療開発においては、カルシウムリン代謝ビタミン D 代謝の全容を把握することが必要である。この分野では、まずリン代謝においては腫瘍性低リン血症性骨軟化症の腫瘍から新たなリン調節因子 FGF23 を世界に先駆けて同定した。また、ビタミン D については、ビタミン D 受容体の核移行にかかわる可

能性のある新たな因子の同定、ビタミンDによる負の遺伝子制御の分子メカニズムの詳細を明らかにした、骨に対する活性型ビタミンDの直接作用は骨形成の抑制であることが判明したなどの成果があった。

また、PTHの骨に対する直接作用の分子機構についてもAP-1/IL-11カスケードがその骨形成促進作用の一部を担っていることを明らかにした。

甲状腺subgroup

甲状腺ホルモン不応症の病態に関する研究では、①甲状腺ホルモン受容体 (thyroid hormone receptor, TR) に変異を認めない家系が存在し、その病因として転写共役因子に異常が存在する可能性が考えられており、TR特異的な転写共役因子を同定する必要がある。酵母ツーハイブリット法を用いて、TRのDBDに結合し、TR特異的に機能する新たな転写共役因子の単離に成功し、疾患との関連を検討している。②TR特異的転写共役因子ではないがTRの転写制御に重要であると考えられている転写共役因子SRC-1について遺伝子欠損マウスを用いて検討したところ、本マウスはT4高値にも関わらずTSH高値を示す全身型RTHの特徴を示し、RC-1が下垂体、肝臓において甲状腺ホルモン受容体の特異的アイソフォームとの結合或いはホルモン応答性領域の特異的配列に結合する甲状腺ホルモン受容体以外の因子との相互反応により、甲状腺ホルモン依存性の負或いは正の転写制御に関わっていることが明らかとなった。また、CV1細胞にpit1 GATA-2を共発現させた系でTSH β 遺伝子のT3/TRによる負の制御メカニズムを検討し、TRのDNA結合領域が重要であること、TSH β 遺伝子の-80/-55の領域を除去すると基礎転写活性が著明に増大し、ここに

何らかの強力な転写抑制因子が関与している可能性があることを見出した。

一方、抗TSH受容体自己抗体による疾患はバセドウ病であり、頻度の高い疾患でありわが国における実態を明らかにすることは重要である。このため、疫学班との共同で家族性バセドウ病のアンケート調査を調査全国2367科を対象に行った。現在二次調査が集積中であり詳細は次年度以降に明らかに出来るが、全国の家族性バセドウ病の推計患者数は2800名であることが明らかとなった。病態に関しては、モデル動物として抗TSH受容体抗体トランスジェニックマウスが有用であることを示した。また、患者においては、治療効果判定の指標である受容体抗体測定について、新規の測定法を開発し、寛解導入困難症例や再発例の検出における有効性を示した。甲状腺機能亢進症については甲状腺機能の管理とともに眼症の治療も重要で、これについても、その病態にmyocilinが関与すること、眼症の治療にソマトスタチンアナログoctreotideが有効である可能性を細胞培養系を用いて証明した。

さらに、放射性ヨードを用いた治療の無効な未分化甲状腺癌に対して、甲状腺特異的遺伝子を発現させることによって、放射性ヨード治療を可能とする試みを行い、TTF-1遺伝子導入ないしはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は、甲状腺癌細胞の分化誘導による有機化能の誘導を伴った¹³¹I治療を可能にすることを示した。

E 結 論

副甲状腺・甲状腺において得られた成果は、疾患の正確な診断と適切な治療法選択に有用な情報となりうる。また、新規のリン調節系の発見やビタミンD受容機構の詳細の解明は、本分

野における新しい治療法開発に今後貢献していくものである。また、まだ解析の途中ではあるが家族性バセドウ病の全国アンケート調査の結果は、わが国における初めての実態調査であり、疾患発症の予防や早期発見に貢献することが期待される。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

英文原著 109編

H 知的財産の出願登録状況

特になし

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・病態解析

分担研究者 安田 敏行 国立千葉病院小児科医長

共同研究者 皆川真規、渡辺智之 千葉大学医学研究院小児病態学

研究要旨

新生児期に痙攣で発症した低Ca血症・高Ca尿症でCa感知受容体第6膜貫通部位Phe821Leuの新規変異を同定した。この変異はCaに対する親和性の亢進と最大抑制は弱い特徴があり、Ca感知受容体変異が最重篤な副甲状腺機能低下症を来すことがさらに確認された。さらに高Ca尿症是正のためthiazide利尿薬治療を受けた第5膜貫通部位に異常のあるPhe788Cys変異で24歳時に嚢胞腎を確認した。本症の治療の再検討を示唆すると考えられる。

腎臓特異的PTH不応症であるPHP1b8例全例にGNAS1遺伝子転写調節領域(NESP55・XI α ・1A)のメチル化の異常があり、母系メチル化を受けるエクソン1A promoterでの解除と父系メチル化を受けるNESP55での両アリルメチル化であった。しかし現段階の方法ではメチル化異常は腎臓近位尿細管でのGs α の転写低下・母系アリル発現低下と結びつかなかった。

A. 研究目的

私達は、副甲状腺機能異常症、特に低下症、の病因・病態解析について治療を含め包括的に、1) カルシウム感知受容体異常症、2) 腎臓特異的な異常を伴う偽性副甲状腺機能低下症1b、3) 臓器発生異常について検討してきた。今年度は、1) のカルシウム感知受容体活性型変異による副甲状腺機能低下症を新規例を含め検討し、治療を含めた臨床像をさらに明らかにする。2) については、腎臓特異的PTH不応症である偽性副甲状腺機能低下症1bは、未だ原因遺伝子（単独または複数）が同定されていない。昨年度は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。今年度はGNAS1遺伝

子上流のメチル化をさらに検討するとともに、初代近位尿細管由来細胞を用いGNAS1遺伝子エクソン5にあるFok1多型を利用して父・母由来のアリル発現を検討した。

B. 研究方法

（Ca感知受容体異常）新生児期の痙攣で発見された副甲状腺機能低下症2家系。1家系は既報告例で、Phe788Cys変異による家族性副甲状腺機能低下症、他の家系は新たにCa感知受容体第6膜貫通部位に変異を同定したCa感知受容体活性型変異による副甲状腺機能低下症の孤発例。機能解析はHarvard大学、Brown EMならびにBai M博士らにより行われた。（偽性副甲状腺機能低下症1b=PHP1b）PHP1b8例（全て孤発例）そのうち2例はGNAS1遺

伝子exon5のFok1部位がヘテロである。サザン解析、初代腎近位尿細管由来細胞を用いRT-PCR法にて解析した。

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。

C. 研究結果・考察

Ca感知受容体異常症

家系1：症例は新生児期に痙攣で発症。低Ca血症下の高Ca尿症を認め、PTH値はほぼ測定感度以下。両親は正常。この症例の血中Caと尿Caの対応関係は、血中Ca値とほぼ無関係に高Ca尿症を伴っていた。PCR-塩基配列解析の結果、5個の変異が認められ、うち2つはアミノ酸置換を伴い、このうち患児固有の変異は第6膜貫通部位Phe821Leu.、この変異はCa親和性の亢進はあるものの、最大抑制は弱いものであった。

家系2：我々が報告したPhe788Cysの症例は、高Ca尿是正のためthiazide治療を受けた。25歳時に多発性嚢胞腎が診断された。

カルシウム感知受容体活性型異常膜貫通部位が重症：膜貫通部位異常は変異が多い

細胞外部位

K47N	A116T	N118K	L125P	E127A
F128L	F128P	C129S	T151M	E191K
P221L	E228Q	Q245R	F612S	L616V
Q681H				

膜貫通部位またはループ領域

L773R	F788C	E799L	F806S	F821L
A824S	F832S	F835T	A843E	

細胞内部位

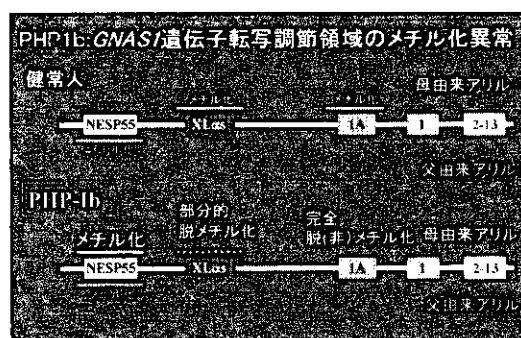
S895-V1075del

上図に本家系を含む既報告例をまとめる。下線の2例が私達が同定した膜貫通部位の活性型変異による本症の2家系例である。家族性の膜貫通部位変異は私達が報告したPhe788Cys変異のみで他は斜体で示す孤発例である。私達が予

見した様に、膜貫通部位のCa感知受容体機能亢進型異常は、最重症である。

偽性副甲状腺機能低下症1b

GNAS1遺伝子のプロモーターは複数あり、センスpromoterは4つから構成される。そのうちエクソン1AとXL α は父系、NESP55は母系の選択的メチル化を受け、Gs α はメチル化を受けていない。NESP55は母系・XL α は父系・1Aは父系・Gs α （腎臓近位尿細管を除く）は両allele発現する。Gs α は腎臓近位尿細管では母系発現するとされこれによりPHP1bの腎選択的PTH不応症が説明されている。NESP55、XL α 領域、exon 1Aのメチル化異常を検討すると、小児期診断PHP1b8例全例にGNAS1遺伝子転写調節領域のメチル化の異常があり、母系メチル化のエクソン1Aでの解除とNESP55での新たなメチル化であった（図）。



我々の結果はXL α の部分的脱メチル化の個体差がある例を除き、この部分の染色体が両アレルとも父由来であるpaternal disomyで説明される。しかし、この8例のPHP1bのうち2例はGNAS1遺伝子のヘテロのFok1多型を有するのでpaternal disomyは考え難い。また報告された染色体20qのpaternal disomy例は重篤な神経障害を呈する。体細胞におけるこのメチル化異常が近位尿細管特異的不応症を引き起こすかを知るため、GNAS1遺伝子exon 5のFok1多型を

利用して初代近位尿細管由来細胞のallele発現をみたところ、両アリル発現している結果であった。私達の検討で腎臓特異的PTH不応症であるPHP1bはGNAS1遺伝子メチル化異常によるepigenetic病であることがさらに確立したが、1) そのメチル化異常の原因と異常メチル化が腎臓近位尿細管でどの様にして選択的PTH不応症を引き起こすかは不明である。

D. 結 論

1. カルシウム感知受容体活性型変異、特に膜貫通部位の異常は最重篤な副甲状腺機能低下症(低Ca血症・高Ca尿症)を来す。本症の高Ca尿症を減弱させるためのthiazide治療の是非を含め治療法の再検討が必要である。

2. PHP1bはGNAS1遺伝子メチル化異常によるepigenetic病であることが確立したが、1) そのメチル化異常の原因と2) メチル化異常が腎臓近位尿細管でどの様にして選択的PTH不応症を引き起こすか不明である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe T, Bai M, Lane CR, Matsumoto S, Minamitani K, Minagawa M, Niimi H, Brown EM, Yasuda T. Familial hypoparathyroidism: Identification of a novel gain of function mutation in transmembrane domain 5 of the

calcium-sensing receptor. J Clin Endocrinol Metab 83: 2497-2502, 1998

2. 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 86:1374-1377, 2001.

3. Minagawa M, Watanabe T, Minamitani K, Takahashi Y, Kohno Y, Goltzman D, White JH, Hendy GN, and Yasuda T. Association between AAAG repeat polymorphism in the P3 promoter of the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene and adult height, urinary pyridinoline excretion, and promoter activity. J Clin Endocrinol Metab 86:, 2002.

2. 学会発表

Association of a polymorphism in the P3 promoter of the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene and adult height Minagawa M, Yasuda T, Watanabe T, Minamitani K, Kohno Y, White, JH Hendy GN, Goltzman D. International congress of Pediatric Endocrinology July 2002, Montreal

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

偽性副甲状腺機能低下症(PHP)Ib型の原因遺伝子と遺伝様式に関する研究

研究協力者 杉本利嗣 神戸大学大学院医学系研究科内分泌代謝・神経・血液腫瘍内科 助教授

研究要旨

PHP Ib型の原因遺伝子がGs α 遺伝子を含む20q13.3に存在しPHP Ia同様に刷り込みを受けると報告されている。私共は保因者とみられる女性が二度結婚し各配偶者との子すべてがPHP Ibを発症した貴重な2家系を経験した。この2家系のPHP Ib発症への第20染色体長腕領域の関与をmicrosatellite markerで解析し、遺伝様式、GNAS遺伝子異常の有無そして病因におけるmethylationの意義も検討した。連鎖解析の結果、PHP Ibの原因遺伝子は父性刷り込みを受けることが示唆され、最大lod scoreは2.6でPHP Ibの原因遺伝子が20q13.3(D20S149とGNAS間)に存在することが示唆された。PHP Ib全例のGNAS1のexon A/Bの両alleleがmethylationを受けていないのに対し、その他の保因者を含む家族ではexon A/Bのmaternal alleleのみがmethylationを受けていた。その他のexonでは差はみられなかった。Gs α 遺伝子異常は検出されなかった。PHP Ibではexon A/Bが特異的にmethylationを受けていないことを見出し、これが病因に深く関わる可能性を明らかにした。

A. 研究目的

保因者が共通したPHP Ibの2家系においてPHP Ibの発症に第20染色体長腕領域が関与しているか否かをマイクロサテライトマーカーにより解析を行うと同時に、遺伝様式、GNAS遺伝子の異常の有無そして病因におけるmethylationの意義について検討を加えた。

B. 研究方法

対象はPHP Ibの2家系17人(発症6人)で白血球DNAを用い第20染色体長腕のマイクロサテライトマーカーにより連鎖解析した。さらにGNAS1の変異およびGNAS1の4個のexonのmethylationを解析した。

(倫理面への配慮)

白血球DNAを用いた連鎖解析およびGNAS遺伝子の解析は本人および家族の同意を得て行なった。

C. 研究結果

各配偶者と保因者との子はすべてPHP Ibであり、娘(PHP Ib)の子(保因者の孫)もPHP Ibで、PHP Ib患者はすべて保因者と同じhaplotypeを有していた。一方、息子(PHP Ib)の子(孫)2人は保因者と同じhaplotypeを有するも生化学的に正常でありPHP Ibを発症しないキャリアと考えられた。以上からPHP Ibの原因遺伝子は父性刷り込みを受けることが示唆され、最大

lod scoreは2.6でPHP Ibの原因遺伝子が20q13.3(D20S149とGNAS間)に存在することが示唆された。PHP Ib全例のGNAS1のexon A/Bの両alleleがmethylationを受けていないのに対し、その他の保因者を含む家族ではexon A/Bのmaternal alleleのみがmethylationを受けていた。その他のexonでは差はみられなかった。Gs α 遺伝子異常は検出されなかった。

D. 考 察

一人の保因者のハプロタイプが二度の結婚により2家系に発現しておりPHP Ibの遺伝様式や原因遺伝子解明に非常に貴重な症例と考えられた。PHP Iaや偽性偽性副甲状腺機能低下症と同様、PHP Ibの原因遺伝子も父性刷り込みを受けることが私どもの症例でも確認された。今回の連鎖解析で得られたlod scoreはPHP Ibの原因遺伝子が20q13.3に存在することを示唆している。連鎖解析の結果からはGNAS遺伝子が原因遺伝子として除外できなかったが、Southern blottingではGs α 遺伝子異常は検出されなかった。最近、methylationの異常が遺伝子発現に影響を及ぼすことが報告されている。GNAS1の4個のexonのmethylationを解析した結果、PHP Ibではexon A/Bのmaternal alleleが特異的にmethylationを受けていないことを見出した。このmethylationの消失がGs α 遺伝子発現抑制に関与している可能性が考えられた。その機序として、methylationを受けていないexon A/Bのsilencer elementに結合しうる腎皮質特異的なrepressor蛋白の存在が考えられた。すなわち、exon A/Bのmaternal alleleがmethylationを受けた状態では、repressor蛋白はexon A/Bのsilencer elementに結合できずGs α 遺伝子発現が抑制されないが、methylation

が消失しているとrepressor蛋白がsilencer elementに結合でき、遺伝子発現を抑制するというモデルが考えられた。しかし、repressor蛋白の同定およびmethylationの異常による遺伝子発現の抑制にかかわる機序の解明にはさらなる検討が必要である。

E. 結 論

我々の経験したPHP Ib 2家系において第20染色体長腕のマイクロサテライトマーカーを用い連鎖解析を行なった結果、PHP Ibの原因遺伝子が20q13.3に存在し、父性刷り込みを受けることを確認した。さらにPHP Ibではexon A/Bが特異的にmethylationを受けていないことを見出し、これが病因に深く関わる可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kanatani M, Sugimoto T, Kaji H, Ikeda K, Chihara K. Skeletal responsiveness to parathyroid hormone in pseudohypoparathyroidism. *European Journal of Endocrinology* Vol144: 263-269, 2001

Bastepe M, Pincus JE, Sugimoto T, Tojo K, Kanatani M, Azuma Y, Kruse K, Rosenbloom AL, Koshiyama H, Jüppner H. Positional dissociation between the genetic mutation responsible for pseudohypoparathyroidism type Ib and the associated methylation defect at exon A/B: evidence for a long-range regulatory element within the imprinted

GNAS1 locus. Human Molecular Genetics Vol
10: 1231-1241, 2001.

2. 学会発表

偽性副甲状腺機能低下症(PHP)Ib型の原因遺
伝子と遺伝様式: 2家系における連鎖解析

神戸大学大学院医学系研究科 内分泌・神経・
血液内科、Endocrine Unit, MGH*

金谷政則、杉本利嗣、神澤道子、Jüppner H*、
千原和夫

2002年6月 日本内分泌学会発表

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

副甲状腺ホルモンの骨形成促進作用およびその低下機序の解明

分担研究者 松本俊夫 徳島大学医学部内科学第一講座 教授

研究要旨

PTHは間欠的投与によりin vivoで骨形成を促進する。我々は既にAP-1転写因子及びその標的遺伝子interleukin (IL)-11の低下が老化による骨形成低下に関与することを示した。そこで、PTHの骨形成促進作用におけるAP-1/IL-11の役割を検討した。その結果、in vitro及びin vivoで、delta-fosB等のfosファミリーと共にIL-11の発現が、力学的負荷やPTHにより誘導されることが示された。PTH, IL-11は共に脂肪細胞分化を抑制して骨芽細胞分化を促進し、骨芽細胞のアポトーシスをも抑制した。また、デキサメサゾンにはPTHによるIL-11誘導をin vivoで抑制した。したがって、AP-1/IL-11カスケードは生理的、病態生理学的に広く骨形成調節に関わる普遍的シグナルであり、PTHの下流においてもその骨形成促進作用の一部を担うものと考えられた。

A. 研究目的

副甲状腺ホルモン（PTH）は間欠的投与によりin vivoで骨形成を促進する。一方、加齢や力学的負荷の低下に伴いこの作用が減弱することが、骨形成の抑制と骨量の減少をもたらす可能性がある。そこで加齢や不動に伴いPTHの骨形成促進作用の抑制がもたらされる機序を明らかにするため、特に我々が既に老化により低下することを示しているAP-1/Interleukin (IL)-11骨形成シグナルに注目し、その関与を検討する。

B. 研究方法

1) In vitroの系

新生児マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞（POB）を用いて、PTHやfluid shear stress (FSS)によるAP-1/IL-11カスケードの活性化およびそのシグナル経路をRT-PCR, Western blotなどにより検討する。

2) In vivoの系

ICRマウスにPTH投与、あるいは強制的に運動させた後、大腿骨および脛骨における遺伝子発現の変化をRT-PCR, Western blotなどにより検討する。

実験に際し、マウスはエーテル麻酔下に頸椎脱臼により安楽死させる。

C. 研究結果

1) PTHおよびFSSはin vitroで骨芽細胞におけるc-fos, delta-fosB/fosB mRNAを30分以内にfra-1, IL-11 mRNAを2時間以内に誘導した。

2) 1)と同様の結果がin vivoの系でも得られた。Real time PCRによる定量的検討では、IL-11の骨での発現はPTH投与により約3倍増加した。

3) 1)の遺伝子発現誘導はMEK阻害薬U0126により完全に阻害された。

4) In vivoにおいてdexamethasoneの前投与に

よりPTHによるIL-11誘導が抑制された。一方、Fosファミリーの誘導には影響を与えなかった。

5) PTHはin vitroで骨芽細胞のALP活性を上昇させたが、この効果はIL-11中和抗体により有意に抑制された。

6) PTH, FSS及びIL-11はdexamethasoneやetoposideによる骨芽細胞のアポトーシスを有意に抑制した。この効果はU0126により阻害された。

D. 考 察

力学的負荷及びPTHはErk依存性にfos family遺伝子およびそれに引き続きAP-1の標的遺伝子の一つであるIL-11遺伝子の発現を骨芽細胞で誘導することが明らかとなった。delta-fosB, fra-1, IL-11は各々の過剰発現トランスジェニックマウスにおける検討より、in vivoで骨形成促進作用を有することが示されている。したがって、AL-1/IL-11カスケードは力学的負荷やPTHに共通の下流シグナルとして、その骨形成促進作用に参与している可能性がある。

IL-11は元来脂肪分化抑制因子として知られているが、間葉系細胞に共通の起源を持つ骨芽細胞への分化を逆に促進するのみならず、骨芽細胞のアポトーシスの抑制をも介して骨形成に作用する可能性があることが示された。また、ステロイド骨粗鬆症では著明な骨形成抑制が認められるが、この機序にもIL-11産生の低下が関与する可能性が示された。

E. 結 論

AP-1/IL-11はPTHの力学的負荷に共通の骨形成シグナルであり、逆に老化やステロイド骨粗鬆症ではその抑制が骨形成低下に関与している可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kitagawa H, et al.: Ligand selective potentiation for rat mineralocorticoid receptor activation function-1 (AF-1) by a CBP-containing HAT complex. *Mol Cell Biol*, in press: 2002.

2) Okazaki R, et al.: Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor alpha and beta. *Endocrinology*, in press: 2002.

3) Saika M, et al.: 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology*, 142:2205, 2001.

2. 学会発表

1) 第74回日本内分泌学会学術総会
(6/29-7/1/01, 横浜)

副甲状腺ホルモン (PTH) によるAP-1/IL-11
カスケードの活性化と機序
木戸慎介、井上大輔、松本俊夫

2) 第19回日本骨代謝学会 (8/8-8/10/01)

副甲状腺ホルモン (PTH) によるdelta-fosB
およびinterleukin-11の発現誘導の機序および
その役割

井上大輔、木戸慎介、松本俊夫

3) 第4回日本分子生物学会年会
(12/9-12/12/01)

骨形成促進シグナルにおけるAP-1/IL-11カスケ

ードの活性化・作用機序とその病態生理学的役割

木戸慎介, 井上大輔、松本俊夫

4) 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the European Calcified Tissue Society

(6/5-6/11/01, Madrid, Spain)

Potential roles for AP-1/IL-11 pathways in mechanical stress-induced bone formation.

Shinsuke Kido, Daisuke Inoue, Emiko Tohjima and Toshio Matsumoto

5) 23rd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research

(10/12-10/16/01, Phoenix, USA)

AP-1/IL-11 signaling cascades may be involved in PTH-induced bone formation: ERK-dependent induction of delta-fosB and IL-11 by hPTH (1-34).

Shinsuke Kido, Daisuke Inoue and Toshio Matsumoto

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし