

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調節ホルモンとLysosomeの細胞内移動

研究協力者 水梨一利 東北大学医学部分子血管病態学

研究要旨

PTHやCalcitoninの投与後に見られる、Lysosome酵素の尿中排泄増加反応が、尿細管の反応性の指標として有用であることを報告してきた。今回我々は、LysosomeおよびEndosomeにそれぞれ特異的に発現するLamp2やSyntaxinと蛍光蛋白との融合蛋白を尿細管細胞に発現させ、PTHとCalcitoninのLysosomeおよびEndosomeにおよぼす作用を明らかにした。

A. 研究目的

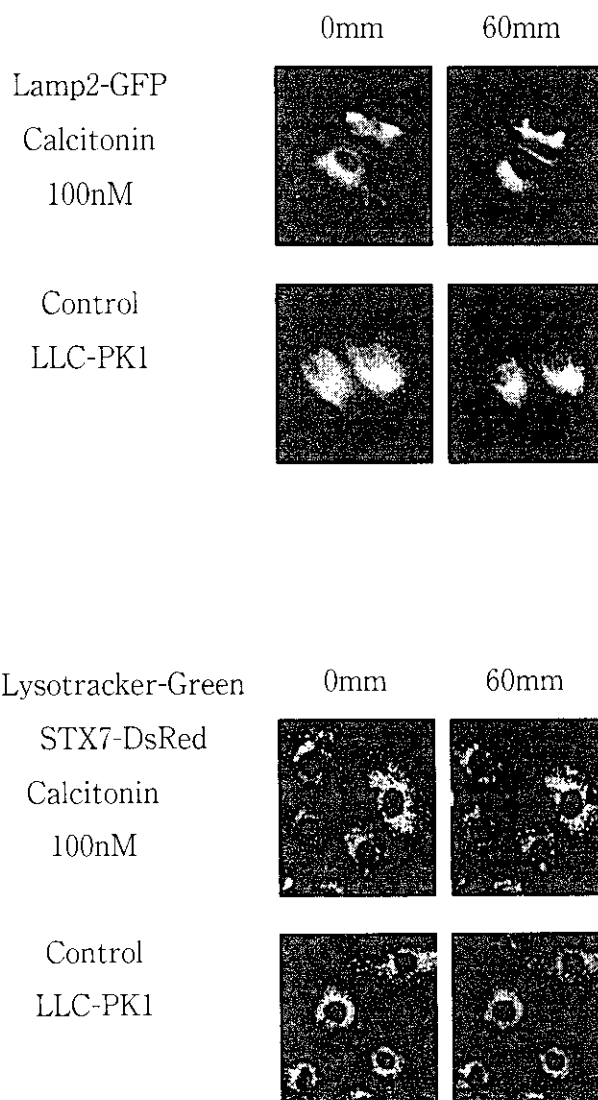
Lysosome酵素の尿中排泄は、偽性副甲状腺機能低下症(PHP)の病態解明と診断に有用であり、Lysosome酵素の遊離増加は、細胞外からの取込み促進を伴うことを明らかにしてきた。そこで、PTHとCalcitonin(CT)のLysosomeおよびEndosomeにおよぼす作用を検討した。

B. 研究方法

Lysosomeは、Lysotrackerによる発光及びLamp2と蛍光蛋白(EGFPおよびDsRed)との融合蛋白の発現によりEndosomeは、Syntaxin7,8とDsRedとの融合蛋白の発現により、それぞれ同定した。更に、MegalinとDsRedとの融合蛋白を発現させ、これとの関係も検討した。

C. 研究結果

OK cellとLLC-PK1 cellにおいて、Lysosomeは細胞全体に分布しているが、PTHやCTの負荷後に核周囲部へと移動し、Syntaxin7,8とco-localizeすることから、この部位がrecycling vesicleであることが確認された。



更に、この部位に、Megalin が発現していることが認められた。

D. 考 察

Lysosomeは、細胞内のvesicle membraneのrecyclingを介して、細胞内外の物質輸送に関わっていると考えられ、PTHやCTは、このrecycling pathwayを促進することが明らかとなった。

E. 結 論

Lysosome酵素の尿中排泄増加反応は、このようなvesicle membraneのrecyclingを反映し

ているものと考えられた。これを制御するメカニズムがさらに明かにされれば、PHPをはじめとするホルモン不応症の新たな治療法の開発が期待される。

F. 研究発表

論文発表

1. Goto M, Mizuhashi K. Decreased sensitivity of distal nephron and collecting duct to parathyroid hormone on pseudohypoparathyroidism type I. J Am Soc Nephrol 2001. 12: 1965-1970

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・カルシウム代謝異常症の病因に関する研究

研究協力者 福本誠二 東京大学医学部附属病院検査部 講師

研究要旨

腫瘍性くる病・骨軟化症は、代表的なビタミンD抵抗性くる病であるX染色体優性低リン血症性くる病・骨軟化症類似の病態を示す腫瘍随伴症候群である。本症は原因腫瘍の摘除により完治することから、惹起腫瘍から産生される液性因子が原因と考えられてきたが、その惹起因子は不明であった。我々は本症惹起腫瘍に高発現する遺伝子の作用を検討することにより、本症を惹起する可能性のある液性因子としてfibroblast growth factor-23を同定した。

A. 研究目的

腫瘍性くる病・骨軟化症(tumor-induced rickets/osteomalacia: TIO)は、腫瘍からの液性因子により低リン血症などが惹起されると考えられる腫瘍随伴症候群である。本症は、代表的なビタミンD抵抗性くる病・骨軟化症の原因疾患であるX染色体優性低リン血症性くる病・骨軟化症と類似の病態を示すことから、TIO惹起因子の同定は、ビタミンD抵抗性くる病・骨軟化症の病態の解明に大きく貢献する可能性がある。そこでTIO惹起因子の同定を目的とした。

B. 研究方法

TIO惹起腫瘍に高発現する遺伝子を恒常的に発現させたChinese hamster ovary(CHO)細胞をヌードマウスに移植することにより、これらの遺伝子のin vivoでの作用を検討した。

C. 研究結果

TIO惹起腫瘍に高発現する遺伝子として、dentin matrix protein-1やfibroblast growth

factor(FGF)-23などが同定された。このうち、FGF-23を恒常的に発現するCHO細胞の移植により、リン利尿、低リン血症、骨石灰化障害などが惹起され、FGF-23がTIOの有力な惹起因子と考えられた。

D. 考察

TIO惹起腫瘍がFGF-23を過剰発現することは、他のグループによっても報告されている。またFGF-23は、TIOと同様の病態を示す常染色体優性低リン血症性くる病・骨軟化症の原因遺伝子としてもポジショナルクローニングにより同定された。従ってFGF-23は、リン代謝を調節し得る新たな液性因子である可能性がある。X染色体優性低リン血症性くる病・骨軟化症も液性因子により惹起されると考えられているものの、その惹起因子は不明なままである。今後FGF-23が、他のリン代謝異常の発症にも関与しているのかどうかを明らかにしていく必要がある。

E. 結 論

腫瘍性骨軟化症を惹起する可能性のある液性因子として、新たな液性因子FGF-23を同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

a. Fukumoto S, Chikatsu N, Okazaki R, Takeuchi Y, Tamura Y, Murakami T, Obara T, Fujita T: Inactivating mutations of calcium-

sensing receptor result in parathyroid lipohyperplasia. *Diagn Mol Pathol* 10:242,2001
b. Fukumoto S, Yamashita T: Fibroblast growth factor (FGF)-23 and hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *Endocrine J* 48:603,2001

2. 学会発表

福本誠二、山下武美: 低リン血症性くる病/骨軟化症とfibroblast growth factor(FGF)23. *日本内分泌学会雑誌* 77:44,2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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

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

前年度、我々はビタミンD受容体遺伝子欠損マウス（VDRKO）骨を野生型マウスに移植することによって、VDRKO骨は野生型骨に比べ著しい骨の増加を示すことを明らかにし、この結果から、ビタミンDの骨に対する直接作用は骨形成の抑制である可能性を示唆した。

しかしながら、本実験系では移植片に宿主側の細胞が少なからず侵入し、この変化を惹起している可能性が否定し切れなかった。そこで、宿主細胞の侵入の可能性を除外する目的で、移植片をフィルターメンブレンに包み込み移植を行った。この結果、大腿骨においても、頭蓋冠においてもVDRKO骨は野生型マウス環境下では、野生型骨に比べ骨量の増加を示した。さらに、液性環境を均一なものとするために、出生直後の大腿骨、頭蓋冠を用い器官培養を行ったが、ここでもVDRKO骨は骨量の増加を示した。さらに、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を 10^{-8}M 添加した場合には、野生型骨はさらに骨量増加は停滞し、VDRKO骨との差はさらに拡大を示した。以上より、VDRKO骨は正常な体液環境では骨形成の促進を示し、これはVDRKOによる非特異的反応ではなく、リガンド結合を介した情報伝達の障害によるものであることが明らかになった。従って、ビタミンDは骨形成を抑制すると結論付けられた。

A. 研究目的

ビタミンD受容体遺伝子欠損マウス（VDRKO）の開発によって、ビタミンDに関する様々な新しい情報が得られるようになった。VDRKOマウスは①出生直後には骨に異常を示さないこと②離乳後より著しいくる病を示すが、食餌によってカルシウムの吸収を増加させ、血清カルシウム・リン値を正常化することによってくる病は治癒する などからビタミンDは骨において必須ではないと言われてきた。しかし、②については血清カルシウム・リン値は正常であったとしても不安定であること、PTHの高値がビ

タミンDの作用の欠損を代償している可能性があることから、この点からは骨に対するビタミンDの直接作用を否定することはできない。さらに、骨は骨形成系、骨吸収系、軟骨細胞、造血系細胞、脂肪細胞、骨細胞など異なる間葉系細胞からなる器官であり、ひとつのlineageの細胞に特異的にその機能を欠落させたとしても、必ずしも器官としての骨に対する真の作用は知り得ず、VDRKO骨を野生型体液環境におくことによるのみ真の作用を解明することが可能と考える。

B. 研究方法

このような発想に基づき我々は前年度未だ組織学的には野生型とは明らかな差を認めないとされる生後2週VDRKO骨を野生型マウスの一側背部筋膜下への移植を行った。この結果、同じ体液環境下（正常体液環境）にVDRKO骨と野生型骨を置くとVDRKO骨のほうが著しい骨量の増加を示すことが判明し、ビタミンDの骨に対する直接作用は骨形成の抑制であるとの結論に至った。

しかし、この実験系では骨を直接背部筋膜下に移植するため、宿主側の細胞の混入は避けられず、このため骨量増加に関与しているのはVDRKO側の細胞であるのか、野生型の細胞であるのかは明らかではなかった。

そこで、本年度は宿主側の細胞の混入を避けるために、移植骨をfilter membraneに包み込み移植を行った。さらに、その機序の詳細を明らかにする目的で生直後の骨の器官培養も行った。

C.D. 研究結果と考察

membraneで包み込んだ場合にも、移植後2週でVDRKOと野生型の間には明らかな差を認めた。この反応は骨膜性骨形成を主体とする頭蓋冠を移植した場合により顕著に現われた。

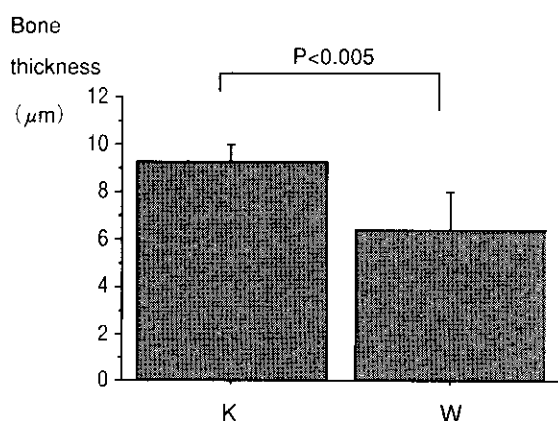


図1 filter membraneに移植片を封入して行った結果ポアサイズ0.45 mmの膜で移植片(頭蓋冠)を封入して背部筋膜下に移植を行った。K: VDRKO, W: wild

さらに、生直後の大腿骨を無血清BGJb培地で1週間器官培養を行った。この培養においては、ガス交換を行うために、バイヤル中に骨と培地を封入し、5%CO₂ガスを毎日交換し、回転させて培養を行った。

図2に示すように、1週間の培養の結果、VDRKO骨は野生型骨に比較して高い骨密度を示し、その差は特に骨幹部に著明であった。さらに、1,25(OH)₂D₃の10⁻⁸M存在下では、VDRKO骨はなんら影響を受けなかったのに対し、野生型では明らかな骨密度の低下を示し、その結果VDRKOとの差はさらに拡大した。

同様の現象は頭蓋冠をagaroseを用いた3次元培養を行ったときにも観察された。一方、その分子メカニズムを明らかにする目的で、生直後の骨よりRNAを抽出しRT-PCRで骨に関連する種々の遺伝子の発現状態をスクリーニングしたところ、Cbfa-1、OPG、BMP-4にのみ明らかな発現量の差を認めた。この、遺伝子発現の差をさらにreal time PCR法によって定量的に解析したところ、cbfa-1とOPGの遺伝子発現にのみ有意な発現量の差を認めた。

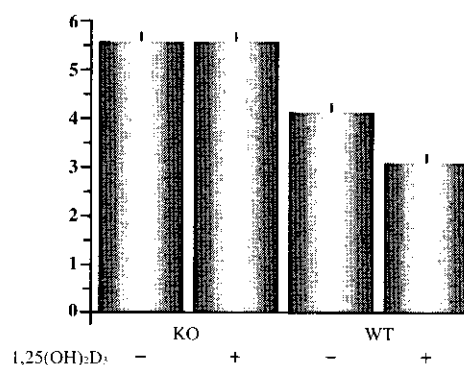


図2. 骨器官培養

生直後の大腿骨を1週間培養しマイクロX線像より骨量を定量した

E. 結 果

以上の結果より、ビタミンDはcbfa-1の遺伝子発現を抑制することにより、骨芽細胞の初期分化を抑制し過剰な骨膜性骨形成を抑制していることが明らかとなった。24-hydroxylase遺伝子KOマウスにおいても、過剰な1,25(OH)₂D₃によって、骨膜性骨形成が抑制されていることがすでに報告されており、我々のこの成績は逆の方向から1,25(OH)₂D₃の骨に対する直接作用をin vivoで裏付けるものと考ええる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ikegami S, Moriwake T, Tanaka H, Inoue M, Kubo T, Suzuki S, Kanzaki S, Seino Y. An ultra sensitive assay revealed age-related changes in serum oestradiol at low concentrations in both

sexes from infancy to puberty. Clin Endocrinol 55: 789-795, 2001

2. 学会発表

Tanaka H, Kinuta K, Inoue M, Shinohara M, Kato S, Seino Y. Vitamin D is a negative regulator of the excessive bone formation. Twenty-third annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Phoenix AZ Oct12-16)

Kanazawa H, Tanaka H, Seino Y. High glucose condition enhances the sensitivity of calcium sensing receptor.

Twenty-third annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Phoenix AZ Oct12-16)

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、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、この1 α ,25(OH)₂D₃依存的な抑制に関わる転写因子(VDIR)の単離に成功した。VDIR機能解析の結果、VDIRは1 α ,25(OH)₂D₃依存的な転写抑制機構に必須であり、様々なビタミンD抑制遺伝子群に抑制的に機能することが判明した。

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。これまでに1 α (OH)ase 遺伝子のクローニングに成功し、この遺伝子発現制御が1 α ,25(OH)₂D₃によって抑制されていることを明らかにしてきた。そこで、本研究では、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着目し、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した。近年、我々は1 α (OH)ase遺伝子発現における転写抑制因子とし

て、VDR interacting repressor (VDIR)の単離に成功しており、VDIRの機能解析を行い、ビタミンDによる転写抑制機構の解明を試みた。

B. 研究方法

マウス腎臓近位尿細管細胞であるMCT細胞株よりVDIRの単離に成功した。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の結合およびその詳細な領域を検討した。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。6) VDIRによる転写抑制化機構が、 $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子の転写抑制のみならず、他のビタミンD抑制遺伝子である副甲状腺ホルモン(PTH)遺伝子やPTH関連ペプチド遺伝子への転写抑制能を検討した。

C. 研究結果

VDIRはE-box配列を認識・結合する650アミノ酸からなるbHLH familyに属する転写因子である。VDIRは $1\alpha\text{-nVDRE}$ 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。VDRとVDIRの結合領域はVDRはDNA結合領域(DBD)であるのに対し、VDIRは二つの転写活性化領域(AD1, AD2)であった。

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抗体での免疫沈降では、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下ではVDRが検出され、PKA存在下ではp300が検出された。

これらVDIRによるビタミンD依存的な転写抑制機構は、 $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子発現抑制のみならず、PTHやPTHrP遺伝子発現抑制機構にも同様のメカニズムが存在することが判明した。

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、 $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 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。さらに $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 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。これらの情報伝達機構はVDRとVDIRの相互作用により厳密に変換されており、VDRのDBDが直接的にVDIRの転写活性化領域に結合することでVDIRの転写活性を阻害していると考えられた。

一方これらのメカニズムがPTHやPTHrP遺伝子発現機構にも共通して存在していることが判明した。従ってVDIRはビタミンDによる転

写抑制機構に非常に重要であると考えられる。

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。

E. 結 論

1 α (OH)ase遺伝子上流プロモーター上の負のビタミンD応答領域に結合するVDIRは、VDRのDBDと直接結合し、ビタミンD依存に転写抑制していることが判明した。更にPTHやPTHrP遺伝子発現制御機構においても共通したメカニズムが存在しており、VDIRはビタミンDの転写抑制機構に重要な因子であることが強く示唆された。

F. 研究発表

1. 発表論文 (原著)

研究成果の発表 (原著論文)

1. Yanagisawa J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., Nagasawa, H., McMahon, S. B., Cole, M. D., Tora, L., Takahashi, N., Kato, S.: Nuclear receptor function requires a TFIIA-tyacetyl transferase complex. *Mol. Cell*, 2002 (in press).
2. Matsui, D., Sakari, M., Sato, T., Murayama, A., Takada, I., Kim, M., Takeyama, K., Kato, S.: Transcriptional regulation of the mouse steroid 5 α -reductase type II gene by progesterone in brain. *Nucleic Acids Research*, 2002 (in press).
3. Sawada, N., Sasaki, T., Kitanaka, S., Kato, S., Inouye, K.: Structure-function analysis of CYP27A1. Studies on mutants from patients with vitamin D-dependent rickets type I (VDDR-I) and cerebrotendinous xanthomatosis (CTX). *Eur. J. Biochem.*, 268, 6607-6615, 2001.
4. Mezaki, Y., Yoshida, T., Yanagisawa, J., Kato, S.: N-terminal activation function is dominant in ligand-dependent transactivation of medaka estrogen receptor α in human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289, 763-768, 2001.
5. Van Cromphaut, S. J., Dewerchin, M., Hoenderop, J. G. J., Stockmans, I., Van Herck, E., Kato, S., Bindels, R. J. M., Collen, D., Carmeliet, P., Bouillon, R., Carmeliet, G.: Doudenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13324-13329, 2001.
6. Kallay, E., Pietschmann, P., Toyokuni, S., Bajna, E., Hahn, P., Mazzucco, K., Bieglmayer, C., Kato, S., Cross, H. S.: Characterization of a vitamin D receptor knockout mouse as a model of colorectal hyperproliferation and DNA damage. *Carcinogenesis*, 22, 1429-1435, 2001.
7. Yagishita, N., Yoshizawa, T., Yamamoto, Y., Sekine, K., Uematsu, Y., Murayama, H., Nagai, Y., Krezel, W., Chambon, P., Matsumoto, T., Kato, S.: Aberrant growth plate development in VDR/RXR γ double-null mutant mice. *Endocrinology*, 142, 5332-5341, 2001.

8. Yamamoto, Y., Wada, O., Suzawa, M., Yogiashi, Y., Yano, T., Kato, S., Yanagisawa, J.: A tamoxifen responsive estrogen receptor alpha mutant D351Y shows reduced tamoxifen-dependent interaction with corepressor complexes. *J. Biol. Chem.*, 276, 42684-42691, 2001.
9. Yahata, T., Shao, W., Endoh, H., Hur, J., Coser, K. R., Sun, H., Ueda, Y., Kato, S., Isselbacher, K. J., Brown, M., Shioda, T.: Selective coactivation of estrogen-dependent transcription by CITED1 CBP/p300-binding protein. *Genes Dev.*, 15, 2598-2612, 2001.
10. Kitanaka, S., Takeyama, K., Murayama, A., Kato, S.: The molecular basis of vitamin D-dependent rickets type I. *Endocrine J.*, 48, 427-432, 2001.
11. Inui, N., Murayama, A., Sasaki, S., Suda, T., Chida, K., Kato, S., Nakamura, H.: Correlation between 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase gene expression in alveolar macrophages and the activity of sarcoidosis. *Am. J. Med.*, 110, 687-693, 2001.
12. 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 α coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J.*, 20, 1341-1352, 2001.
13. 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.
14. 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.
15. Kato, S.: Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer*, 8, 3-9, 2001.

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受容機構に関する研究

研究協力者 大菌 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、ビタミンD受容体の核輸送に関わる分子の探索を目的として酵母two-hybrid法を行い、ビタミンD受容体と相互作用する蛋白質を同定した。また、腫瘍随伴性高カルシウム血症(HHM)に伴うビタミンD代謝異常の病態を明らかにするため、HHMの動物モデルを作製し、ビスフォスフォネートや抗PTHrP中和抗体の投与を行い、 1α 位水酸化酵素の発現制御に血清カルシウム値が関与することを示す結果を得た。

1. ビタミンD受容体(VDR)の核輸送に関わる分子の同定

A. 研究目的

VDRがリガンド依存性転写因子として機能するためには、核に局在することが重要である。我々は以前、VDRのヒンジ領域に、核移行シグナル(NLS)として機能しうる配列が存在することを報告した。この配列が、NLSとしてはユニークなものであったことから、VDRには独自の核輸送システムが存在する可能性があると考え、酵母two-hybrid法を用いてVDRの核輸送に関わる分子の同定を試みた。

B. 研究方法

ヒトVDRのDNA結合領域からヒンジにかけての領域をbaitとし、bait vector pAS2-1 (Clontech) に組み込み、酵母株AH109を形質転換してbait株を作製した。このbait株と、ヒト腎cDNA libraryにて形質転換されたlibrary株 Y187 (Clontech)を接合させ、栄養要求性の変化

と β -galactosidaseの呈色反応により、スクリーニングを行った。陽性株についてはDNAを抽出し、library vectorに特異的なprimerを用いたPCRによりinsertを取得し、sequencingを行って塩基配列を決定後、データベース検索により分子を同定した。

同定された分子に興味をもたれた場合は、さらにmammalian two-hybrid法を用いてVDRとの相互作用を検討した。取得されたinsertをpM vectorに挿入し、pVP16またはpVP16-VDRとともにCOS7細胞にco-transfectionし、reporter活性を検討した。

C. 研究結果

酵母two-hybrid法において相互作用が示唆された300クローンの内、クローンDH1150として同定されたものは、機能はまだ良く分かっていない分子であるが、核輸送に重要なimportin familyのRan-binding domainに類似したアミノ酸配列を有しており、importin-like な分子と

考えられた。データベース上は、ヒトとマウスで配列が報告されている。今回取得されたのはこの分子のC端側257残基の配列であった。Mammalian two-hybrid法でもこのDH1150とVDRとの相互作用を検討した結果、reporter活性はVDR存在時にはligand依存性に増強したのに対し、VDR非存在下ではこのような増強を認めず、DH1150とVDRとの間に相互作用が存在することが示唆された。

また、クローンDH2650は、oncogenic nucleoporinとして知られている分子の一つで、核膜孔のcomponentの一つであり、細胞周期に関与することが示唆されている。今回取得されたのはC端側の361残基であった。Mammalian two-hybrid法ではVDRとの相互作用は明らかではなかったが、この配列を哺乳類細胞用の発現ベクターであるpFLAG-CMVに挿入し、ラット24位水酸化酵素promoter/luciferase constructとともに、内在性のVDRを有するヒト骨芽細胞株SaOS-2に導入し、VDRの転写活性化能に対するDH2650の影響を検討した。その結果、DH2650がVDRのligand依存性転写活性可能を強く抑制することが示された。COS7細胞を用いて、exogeneousにVDRを導入した場合にも同様に、DH2650はVDRのligand依存性転写活性化能を抑制した。

D. 考 察

同定された分子については、今後、GST-pull down法などを用いてVDRとの相互作用を確認する必要がある。また、これらの分子の細胞内分布と、VDRの細胞内動態に対する関与について、検討を要する。

E. 結 論

酵母two-hybrid法を用いて、VDRの核輸送に関わる可能性のある分子を同定した。

F. 研究発表

本プロジェクトに関する論文、学会発表は、今年度はなし。

2. 腫瘍随伴性高カルシウム血症動物モデルにおけるビタミンD代謝異常の病態解析

A. 研究目的

腫瘍随伴性高カルシウム(Ca)血症(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性症候群である。PTHrPはPTHと共通の受容体に結合し、骨吸収を亢進し、高Ca血症を来すが、HHMにおいては原発性副甲状腺機能亢進症とは異なり、血中1,25(OH)₂D値は低下していることが多い。本研究では、PTHrP産生腫瘍をヌードラットに移植することにより作製したHHM動物モデルを用いて、HHMにおけるビタミンD代謝異常の病態解析を行う。

B. 研究方法

PTHrPを過剰産生するヒトinfantile fibrosarcoma OMC-1を7週齢の雄性ヌードラットに移植することによりHHMのモデルを作製した。この担癌ラットにおいては、血清Ca値が軽度上昇を示す間は血中1,25(OH)₂D値はむしろ上昇傾向を示したが、血清Ca値が15mg/dlを越える高値をとる際には1,25(OH)₂D値は著明に低下していた。そこで、本モデルにおける血清Ca値のビタミンD代謝に対する関与についてさらに詳しく検討するため、本モデルに対して

骨吸収阻害剤であるビスフォスフォネートおよび抗PTHrP中和抗体の投与を行い、ビタミンD代謝に与える影響を検討した。ビスフォスフォネート製剤としてはYM529(山之内製薬より供与)を用いた。また、抗PTHrP中和抗体は中外製薬より供与された。

C. 研究結果

OMC-1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YM529を投与したところ、血清Ca値は正常化し、血中1,25(OH)₂D値は正常を越える著明な高値を示した。腎臓における1 α 位水酸化酵素の発現をRT-PCRにより検討したところ、無治療の担癌ラットでは本酵素の発現が低下していたのに対し、YM5投与群の腎臓では強い発現を認めた。一方、PTHrPに対する中和抗体を投与した群では、血清Ca値は低下したが、血中1,25(OH)₂D値は低値にとどまり、腎臓における1 α 位水酸化酵素の発現も抑制されていた。

D. 考 察

OMC-1担癌ラットに対してYM529を投与した場合と抗PTHrP中和抗体を投与した場合の1 α 位水酸化酵素の発現および血中1,25(OH)₂D値の反応性の違いから、PTHrPはPTHと同様に1 α 位水酸化酵素の発現を誘導するが、高Ca血症が存在するときにはこの誘導は抑制されることが考えられた。

E. 結 論

HHMにおける血中1,25(OH)₂D値の低下には、高Ca血症による1 α 位水酸化酵素の発現抑制が関与している。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Michigami T, Yamato H, Suzuki H, Nagai-Itagaki Y, Sato K, Ozono K. Conflicting actions of parathyroid hormone _related protein and serum calcium as regulators of 25-hydroxyvitamin D3-1 α hydroxylase expression in a nude rat model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Journal of Endocrinology*, 171: 249-257, 2001.

2) 学会発表

1. Michigami T, Yamagata M, Ozono K. Osteoprotegerin gene transfer into muscle by electroporation in vivo as efficient gene therapy for osteolytic bone diseases. 23rd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2001, Phoenix.
2. Michigami T, Yamato H, Suzuki H, Nagai-Itagaki Y, Ozono K. Effects of bone resorption inhibitors in a new rat model of humoral hypercalcemia of malignancy. 3rd International Conference on Cancer-Induced Bone Diseases. 2001, Awaji.

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

研究協力者 赤水尚史 京都大学医学部附属病院 探索医療センター 助教授

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。血清free T4 (fT4)上昇とTSH低下、甲状腺^{99m} technetium pertechnetate摂取率増加を認めるマウス、すなわち甲状腺機能亢進症のモデル動物が得られた。また、バセドウ病の遺伝因子に関する研究では、バセドウ病患者の罹患同胞対解析による全ゲノムスクリーニングにおいて高い単独lod頂値を見出した。さらに、それらの領域のいくつかにおいて、マイクロサテライト多型を用いた関連解析にてもバセドウ病との関連を認めた。最後に、家族性バセドウ病の疫学調査を第二次調査まで行った。2000年1年間に家族性バセドウ病により全国の病院を受療した患者数は2800名(95%信頼区間2000~3500名)と推計された。

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、前年度作製した抗TSH受容体抗体トランスジェニックマウスの機能解析を行った。また、バセドウ病の遺伝因子の研究として、疫学的データ収集のため家族発症バセドウ病の全国的調査を行った。さらに、バセドウ病感受性遺伝子の同定を候補遺伝子及びポジショナルクローニングアプローチによって検討した。

B. 研究方法

我々はこれまでに、バセドウ病患者の末梢血リンパ球から単離されたヒト抗TSH受容体抗

体免疫グロブリン遺伝子を利用して、抗TSHレセプター抗体遺伝子トランスジェニックマウスの作成を行ってきた。1系統のF1マウス血中とB細胞表面においてヒトIgMの検出に成功した。12-16週齢のトランスジェニックマウス(TG) (n=74)と非トランスジェニックマウス(NTG) (n=38)の、血清中のfree T4 (fT4)とTSHの濃度を測定した。また、^{99m} technetium pertechnetate 2mCiを尾静脈から投与し、planer像を撮影するとともに、甲状腺での放射能の集積量と、全投与量との比を求めた。末梢血、骨髄、脾臓、腹腔内のリンパ球サブセットをFACSにて解析した。血中IgM濃度はELISAによって測定した。

家族発症バセドウ病の全国的調査は厚生労働省特定疾患調査研究事業「特定疾患に関する疫学調査研究」班との共同で第一次調査と第二次

調査を行い、岡山大学と順天堂大学の倫理委員会で承認を受けた。バセドウ病感受性遺伝子領域のポジショナルクローニングは、九州大学との共同研究笹月・白澤との共同で行い、連鎖の強い領域についてマイクロサテライト多型を用いて関連解析を行った。遺伝子解析については京都大学医学研究科の「医の倫理委員会」の承認を受けた。

C. 研究結果

抗TSHレセプター抗体遺伝子トランスジェニックマウスのラインを樹立した。12-16週齢のTG (n=74)とNTG (n=38)の血清中のfT4とTSHの濃度を測定では、fT4; TG 2.1 ± 0.63 ng/dl (mean \pm SD) (ヒト IgM= 47 ± 38 ug/ml)、NTG 1.2 ± 0.30 ng/dl; TSH; TG 1.3 ± 1.2 ng/ml、NTG 4.4 ± 2.2 ng/mlと有意な差がみられた($P < 0.0001$)。TGで、fT4とヒトIgM(相関係数(r)= 0.507)の相関が見られ($p < 0.001$)、N=51(69%)にhyperthyroidismが認められた(criteria; fT4, TSHがそれぞれNTGのmean+2SD以上、以下)。^{99m} technetium pertechnetate 甲状腺摂取率では、120分値(peak値); TG(n=3) 16.4 ± 3.14 %、NTG(n=3) 7.8 ± 0.644 %と有意な差が見られ($p < 0.001$)、planer像でも両者のuptakeの明確な差が認められた。TGにおいて、末梢血、骨髄、脾臓のいずれにおいてもB細胞数の減少が認められ、自己寛容の成立が示唆された。

家族性バセドウ病の全国疫学調査を開始した。第一次調査では、調査対象2367科のうち、1361科(回収率57.5%)より回答があり、報告患者数は902名であった。この成績に基づき、2000年1年間に家族性バセドウ病により全国の病院を受療した患者数は2800名(95%信頼区間

2000~3500名)と推計された。第二次調査票は、10月19日現在541枚返送されている。ポジショナルクローニングアプローチによって、染色体5q31-33にバセドウ病患者との高い連鎖を示す遺伝子領域が見い出された。この領域のマイクロサテライト多型を用いて関連解析を行い、有意の結果を示すアレルを認めた。

D. 考察

甲状腺機能亢進症のモデルマウスを作成することに成功した。バセドウ病の発症、広くは自己免疫病の機序を検討するうえで、このモデルマウスは有用であると考えられる。

家族性バセドウ病の全国疫学調査では、バセドウ病全体に占める家族性の割合は、 $2,800 / 154,000 \approx 1.8\%$ と推定され、非家族性の場合に比して非常に高いと考えられた。今後、第二次調査票の詳細な解析を行う予定である。

日本人バセドウ病疾患感受性遺伝子領域として5q31-33が有力と考えられた。今後、同領域での疾患感受性遺伝子の同定が期待されよう。

E. 結論

- ①. 甲状腺機能亢進症のモデルマウスを作成することに成功した。
- ②. 家族性バセドウ病の疫学調査を第二次調査まで行った。
- ③. 2000年1年間に家族性バセドウ病により全国の病院を受療した
- ④. 5q31-33がバセドウ病感受性遺伝子領域の有力な候補の一つであると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Sakai K, Shirasawa S, Ishikawa N, Tamai H,

- Akamizu T, Tanimura M, Yamamoto K, Kuma K, Ito K, Sasazuki T. Identification of the susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31-33 and Hashimoto's thyroiditis to 8q23-24 by multipoint affected sib-pair linkage analysis. *Hum Mol Genet*, 10(13):1379-1386, 2001
- ②Byun CH, Park JY, Akamizu T, Chae CB. Identification of the Peptides that Inhibit the Function of Human Monoclonal Thyroid Stimulating Antibodies from Phage Displayed Peptide Library. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(7):3311-8, 2001
- ③Hataya Y, Akamizu T, Takaya K, Kanamoto N, Ariyasu H, Saijo M, Moriyama K, Shimatsu A, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. A Low Dose of Ghrelin Stimulates Growth Hormone (GH) Release Synergistically with GH-Releasing Hormone in Humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 86(9):4552-4555, 2001
- ④Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Sud M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Stomach is a Major Source of Circulating Ghrelin and Feeding State Determines Plasma. State Determines Plasma Ghrelin-like Immunoreactivity Levels in Humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 86(10):4753-4758, 2001
- ⑤Kanamoto N, Akamizu T, Hosoda H, Hataya Y, Ariyasu H, Takaya K, Hosoda K, Saijo M, Moriyama K, Shimatsu A, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Substantial Production of Ghrelin by a Human Medullary Thyroid Carcinoma Cell Line. *J Clin Endocrinol Metab*. 86(10):4984-4990, 2001
- ⑥Hattori Y, Akamizu T, Saijo M, Kanamoto N, Moriyama K, Ito N, Nakao K. Characterization of the secretable ectodomain of thyrotropin receptor produced by the recombinant baculovirus system. *Mol Cell Endocrinol*. 182:165-74, 2001
- ⑦ Akamizu T, Antithyrotropin receptor antibody: An update. *Thyroid*. 11:1123-1134, 2001
- ⑧島津章、臼井健、中村嘉夫、高屋和彦、赤水尚史、中尾一和：尿崩症を伴った成人発症のクラス1組織球症の臨床像ホルモンと臨内分泌興味ある症例第39集49:6-8, 2001
- ⑨赤水尚史：自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性遺伝子、内科、87(6):1656-1659, 2001
- ⑩赤水尚史：内分泌の基礎、看護のための最新医学講座、代謝疾患・内分泌疾患、7:156-162, 2001
- ⑪平谷仁美、赤水尚史：日本人における自己免疫性甲状腺疾患感受性遺伝子の存在候補領域に関する関連解析 臨床病理、49:1151-1156, 2001
- ⑫金本巨哲、澤田直哉、西條美佐、籀谷雄二、有安宏之、森山賢治、高屋和彦、赤水尚史、高橋潤、橋本信夫、島津章、中尾一和：ステロイドパルス療法を試みたリンパ球性漏神経炎の一例、第11回臨床内分泌代謝：Update Proceeding 77：60-62, 2001
- ⑬金本巨哲、赤水尚史、田浦大輔、西條美佐、籀谷雄二、有安宏之、森山賢治、高屋和彦、安里亮、島津章、中尾一和：橋本病急性憎悪の床経過中に化膿性甲状腺炎が合併したと考えられた一例、第11回臨床内分泌代謝：

2. 学会発表

- ①Akamizu T, Hattori Y, Saijo M, Hataya Y, Kanamoto N, Moriyama K, Nakao K. Characterization of the secretable ectodomain of thyrotropin receptor produced by the recombinant baculovirus system. The 83rd Annual Meeting of the Endocrine Society, (Denver, U.S. A.) 6.20-23, 2001
- ②Kanamoto N, Akamizu T, Hosoda H, Hataya Y, Ariyasu H, Takaya K, Hosoda K, Saijo M, Moriyama K, Shimatsu A, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Production of a novel peptide ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell line. 73rd Annual Meeting of the American Thyroid Association, (Washington, DC, U.S.A) 9.13-16, 2001
- ③Akamizu T, Kanamoto N, Hosoda H, Hataya Y, Sijou M, Moriyama K, Kojima K, Kangawa K, Nakao K. Expression of Ghrelin in Medullary Thyroid Carcinomas. The 3rd Korea -China-Japan Thyroid Conference (Seoul, Korea) 10.18-20, 2001
- ④旗谷雄二、赤水尚史、高屋和彦、金本巨哲、有安宏之、西條美佐、服部喜之、森山賢治、細田公則、島津章、細田洋司、児島将康、寒川賢治、中尾一和。健常人におけるグレリンと成長ホルモン刺激ホルモン (GHRH) との併用投与。第74回日本内分泌学会学術総会, 2001.6.29-7.1, 横浜
- ⑤西條美佐、服部善之、旗谷雄二、金本巨哲、森山賢治、大森勝、生田宏一、松田文彦、鈴木操、本庶佑、中尾一和。抗TSHレセプター抗体遺伝子導入トランスジェニックマウスにおける自己寛容の成立とその破綻についての検討。第74回日本内分泌学会総会, 2001.6.29-7.1, 横浜
- ⑥金本巨哲、赤水尚史、旗谷雄二、有安宏之、西條美佐、服部喜之、森山賢治、高屋和彦、細田公則、島津章、細田洋司、児島将康、寒川賢治、中尾一和。甲状腺髄様癌由来細胞におけるグレリン発現に関する検討。第74回日本内分泌学会総会, 2001.6.29-7.1 横浜
- ⑦服部喜之、赤水尚史、金本巨哲、西條美佐、森山賢治、中尾一和。甲状腺髄様癌由来細胞におけるグレリン発現に関する検討。バキュロウイルス昆虫細胞発現系によって作製した分泌性可溶性TSHレセプターに関する定量的性状検討。第74回日本内分泌学会総会 2001.6.29-7.1 横浜
- ⑧旗谷雄二、赤水尚史、高屋和彦、金本巨哲、有安宏之、西條美佐、森山賢治、児島将康、寒川賢治。中尾一和。グレリンはGHRHと相乗的に成長ホルモン分泌を刺激する。第38回日本臨床分子医学, 2001. 8.2-3, 札幌
- ⑨金本巨哲、赤水尚史、旗谷雄二、西條美佐、森山賢治、島津章、宮内昭、細田洋司、児島将康、寒川賢治、中尾一和。甲状腺髄様癌におけるグレリン発現、産生に関する検討。第44回日本甲状腺学会, 2001.11.8-10, 沖縄
- ⑩西條美佐、赤水尚史、旗谷雄二、金本巨哲、森山賢治、柏井聡、大野人嗣、中尾一和。パセドウ病眼症に時期を変えて両眼窩内悪性リンパ腫を合併した1症例。第44回日本甲状腺学会, 2001.11.8-10, 沖縄
- ⑪森山賢治、田上哲也、赤水尚史、西條美佐、金本巨哲、旗谷雄二、臼井健、島津章、山田和範、葛谷英嗣、中尾一和。内分泌攪乱化学

物質Bisphenol Aが甲状腺ホルモン受容体に及ぼす攪乱作用の分子メカニズムの解析。第44回日本甲状腺学会, 2001.11.8-10, 沖縄

⑫旗谷雄二、赤水尚史、金本巨哲、有安宏之、西條美佐、森山賢治、高屋和彦、島津章、中尾一和。慢性リンパ球性白血病（CLL）に下垂体機能低下症が合併した一例。第44回日本甲状腺学会, 2001. 11.8-10, 沖縄

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

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

分担研究者 小西 淳二 京都大学医学研究科核医学画像診断学 教授
共同研究者 御前 隆 京都大学医学研究科核医学画像診断学

研究要旨

バセドウ病の発症に、環境要因としての季節差が関わっているかを、薬剤治療後の再発時期に注目して検討した。過去10年間に再発した52例中、春と夏が35例を占め、秋と冬より有意に多かった。TSH受容体抗体を測定できた症例では、従来法では再発時に69%の陽性率であったが、試験管固相法では再発時87.5%、再発前ですでに75%で陽性であり、感度の向上に伴い、早めに予知できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

バセドウ病の病因は多因子性と言われている。甲状腺機能亢進症を中心とする臨床病像の直接の原因が、刺激型TSH受容体抗体であることは明らかになってきたものの、その抗体ができる機序は遺伝的背景、食生活、環境因子、精神的ストレスなど、複合的であると推察される。環境因子の一つに気候が挙げられ、以前より春から夏にかけて起こりやすいとされているが、寒い時期に発症していても気づかず、暑い時期に自覚症状が明らかとなって、医療機関を受診する患者が多いためではないか、との反論もある。

バセドウ病の病勢と季節に関連があるかどうか、抗甲状腺剤休薬後の経過観察中の再発例の時期を手がかりに調べ、併せて、再発前後のTSH受容体抗体活性の変動を新しい高感度測定法で検討する。

B. 研究方法

本検討の研究デザインは該当全症例を対象としたretrospective studyである。診療記録を基に、過去10年間に著者らの外来で抗甲状腺剤治療を受け、休薬中に再発した例を集計した。自己中止による増悪例、産後再発、過去にアイソトープ治療や甲状腺切除を受けている例は除外した。TSH受容体抗体の測定は市販の二種類のradioreceptor assay kitを用いた。一つはこれまで繁用されて来た、可溶化ブタ甲状腺膜分画を用いた沈降法（以下沈降法）であり、もう一つは昨年のもので述べた、遺伝子組み替えヒト型受容体を固相化した新しい測定法（以下固相法）である。

C. 研究結果

52例が再発しており、図のように、月によりその頻度に差が見られ、季節ごとにまとめると春と夏に有意に多く、秋と冬に少なかった($p<0.05$)。TSH受容体抗体活性を検索できた最