

厚生労働科学研究費補助金
特定疾患対策研究事業

ホルモン受容機構異常に関する調査研究班

平成14年度 研究報告書

平成15年3月

主任研究者 清野佳紀

I. 序 文

序 文

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4年が経過いたしました。

このホルモン受容機構異常に関する調査研究班が、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。本研究班は一昨年で3年間の大きな成果を挙げた後、本年度は新たな出発を致しました。

副甲状腺の研究において、ビタミンDの受容機構に関する研究成果ではビタミンDの作用機構を明らかにしたことであり、新規治療薬開発が可能となりました。さらにカルシウム受容体遺伝子異常は新しい病態として今後の診断・治療の開発が重要となりました。また、新規リン制御因子としてFGF23が同定され、新たなリン制御の実態に関する有力な情報となりました。甲状腺に関する研究においては、家族性バセドウ病の全国調査結果によって遺伝素因を解明することにより、将来疾患の発症予防が可能となりました。甲状腺ホルモン不応症の解析では甲状腺ホルモン作用が明らかにされ、TSH受容体異常症の解析の成果により、抗TSH血症の治療・管理が著しく進歩することとなりました。

さらに本年度の研究では、以上の成果以外にも重要な情報を得ることができました。

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14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15年3月

清野佳紀

目 次

I. 序 文

II. 平成14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. 低カルシウム血症鑑別診断ガイドラインの作成…………… 7

岡山大学大学院医歯学総合研究科小児医科学 清野 佳紀

2. 副甲状腺機能異常症の病因・病態解析……………12

国立千葉病院小児科 安田 敏行

3. 副甲状腺におけるカルシウム感知受容体の受容機構と役割に関する研究……………15

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

4. 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に関する研究……………17

徳島大学大学院医学研究科生体情報内科学 松本 俊夫

5. 偽性副甲状腺機能低下症におけるPTH(1-84) whole molecule濃度の検討 ……20

東北大学医学部分子血管病態学 水梨 一利

6. 骨・カルシウム代謝異常症の病因、病態の解明……………22

東京大学医学部附属病院検査部 福本 誠二

7. ビタミンDの骨に対する直接作用に関する研究 ……24

岡山大学大学院医歯学総合研究科小児医科学 田中 弘之

8. 血清カルシウム維持機構-ビタミンD受容体およびカルシウム感知受容体に関する研究 ……27

大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学小児発達医学講座
大藪 恵一

9. 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 ……30

東京大学分子細胞生物学研究所 加藤 茂明

10. ビタミンD受容機構異常症の分子生物学的病態解析と治療法の開発に関する研究……………34		
	大阪大学大学院生命機能研究科個体機能学	楨島 誠
11. マスクリーニングで発見される高TSH血症, クレチン症におけるTSH受容体 遺伝子異常症の検討……………37		
	群馬大学医学部小児科	鬼形 和道
12. バセドウ病における抗TSH受容体抗体産生機序に関する研究： スギ花粉症による刺激について……………39		
	大阪大学大学院医学系研究科生体情報医学	網野 信行
13. 家族性バセドウ病全国疫学調査成績およびバセドウ病疾患感受性遺伝子に関する研究 ……43		
	京都大学医学部附属病院 探索医療センター	赤水 尚史
14. 非甲状腺細胞のサイトロピンレセプタープロモーター活性の検討 ……48		
	山梨大学医学部第3内科	遠藤 登代志
15. 甲状腺ホルモン応答性遺伝子ZAKI-4 (カルシニューリン阻害蛋白) の構造解析と 甲状腺ホルモンによる調節機序……………51		
	名古屋大学環境医学研究所内分泌・代謝分野	妹尾 久雄
16. バセドウ病眼症の発症メカニズムの解析と治療法の開発に関する研究……………64		
	久留米大学医学部内分泌代謝内科	広松 雄治
17. 甲状腺ホルモン不応症の発症およびその病態に関する研究： 甲状腺ホルモン受容体によるTSH β 遺伝子転写抑制機構 ……70		
	浜松医科大学第二内科	中村 浩淑
18. 甲状腺ホルモン不応症の病態における転写共役因子の役割……………74		
	群馬大学医学部第一内科	森 昌朋

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

厚生労働科学研究費補助金（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調査研究

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っており、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。

分担研究者

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
網野 信行	大阪大学大学院医学研究科生体統合医学生体情報医学教授
松本 俊夫	徳島大学大学院医学研究科生体情報内科学教授
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
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
安田 敏行	国立千葉病院小児科医長
田中 弘之	岡山大学大学院医歯学総合研究科小児医科学助教授
大園 恵一	大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学小児発達医学教授
福本 誠二	東京大学医学部附属病院検査部講師

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。

C 研究結果と考察

副甲状腺 subgroup

偽性副甲状腺機能低下症に関する結果

副甲状腺疾患の管理治療において、生理活性を有するいわゆる Bio-PTH の測定が重要である。水梨は PTH (1-84) whole molecule (Bio-PTH) 値と従来の intact PTH assay 系による測定値の比較から、PHP患者では、血中 Bio-PTH 値と PTH (7-84) 様 fragments がいずれも増加していること、PTH (7-84)/Bio-PTH 比は、正常者に比べ増加していることが明かにした。この結果は、PTH の合成分泌と分解のいずれもが亢進していることを示すものであり、偽性副甲状腺機能低下症 (PHP) では、標的器官の PTH 不応によって続発性に副甲状腺機能が亢進していることが明らかとなった。

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。しかしながら、PTH/PTH r P 受容体プロモーターには異常を発見することが出来なかった。皆川らは本年度も引き続き腎臓特異的な PTH 不応症のメカニズムにつき検討した。PHP1b では、GNAS1 遺伝子上流 (NESP55 · Xl α · 1A) のメチル化の異常は、Xl α で症例による差があり、これにより発達・潜在性甲状腺機能低下症の表現系との差に結びつく可能性が示唆された。腎臓近位尿細管由来細胞を用いた RT-PCR 解析を行った。PHP1b では NESP55 · Xl α の発現なく、Exon1A と 1 共に両アリル発現であり、腎特異的なインプリンティングの異常に原因を特定することはできなかった。

特発性副甲状腺機能低下症に関する結果

① 副甲状腺におけるカルシウム感知受容体 (CaR) の受容機構と役割の研究の一つとして、杉本らは著明な副甲状腺腫大を示した家族性低 Ca 尿性高 Ca 血症 (FHH) 例より CaR の副甲状腺細胞増殖の調節への関与と副甲状腺組織変化、各ドメインの役割について検討した。CaR の機能低下は細胞増殖亢進に関与し、ヘテロな不活性型変異により副甲状腺組織は lipohyperplasia をきたす可能性が示唆され、CaR の機能低下は VDR 発現に影響しないことが明らかとなった。また、CaR の副甲状腺細胞増殖調節の情報伝達における膜貫通領域、細胞内領域が重要も示した。一方、臨床上的問題点である原発性副甲状腺機能亢進症と FHH の鑑別については、副甲状腺腫大の有無は有用ではないとの結論を得た。

② 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が、治療基準は確立していない。CaR 異常を伴う常染色体優性低 Ca 血症の患者における検討では、血清 Ca 値が8.0mg/dl 以上では全例で、7.0mg/dl 以上でも多くの場合で高Ca尿症を呈した。血清 Ca 値が6.0mg/dl 以下では、テタニーが出現したので、血清 Ca 値を6.0mg/dl~7.0mg/dlに維持するのが適当であるととの結論に至った。

ビタミンD 受容機構とビタミンD 抵抗性くる病に関する結果

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。

- 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2種選択し検討した。DR の細胞内輸送に関わる可能性のあるクローンが二つ見出された。一つは importin- β family に属する新規分子、他方は核膜孔複合体の構成因子 nucleoporin の構成分子であった。機能解析によりこれらの分子は VDR の機能に影響を与える可能性が示唆された。
- ② 1α 水酸化酵素遺伝子を活性型ビタミンD が負に制御する因子が結合する DNA 配列と新しい E-box に結合する bHLH 構造を持つ蛋白を同定し、負の制御メカニズムの詳細に検討を加えた。
- ③ ビタミンD 受容体 (VDR) の新規生理的リガンドとして同定された胆汁酸、リトコール酸による VDR 活性化機構を解明するために、VDR と近縁の核内レセプター PXR との

アミノ酸配列および立体構造の比較を行い、それに基づき VDR のリガンド結合ポケットの各種変異体を作成した。活性型ビタミンD 3 選択的 VDR 変異体及びリトコール酸選択的VDR変異体を見出し、VDR リガンド結合ポケットへの結合様式が活性型ビタミンD 3 とリトコール酸との間で異なることが明らかになった。

- ④ 血中の電解質の異常が明らかでない新生仔骨及びその器官培養を用いた実験の結果、ビタミンD は骨形成を負に制御していることが明らかとなった。
- ⑤ 新規のリン利尿因子 FGF23 の測定系を確立し、各種病態で測定を行い、健常人でも血中に存在し生理的役割が考えられること、XLH では高値であることを示した。
- ⑥ PTH の骨に対する直接作用の分子機構についても PTH が ERK 依存性に骨芽細胞のアポトーシスを抑制すること、またその作用には骨形成サイトカインである interleukin-11が関与している可能性があることを明らかにした。

甲状腺 subgroup

甲状腺ホルモン不応症に関する結果

- ① ヒト皮膚線維芽細胞を用いてクローニングされた甲状腺ホルモン応答性遺伝子 ZAKI-4 の構造を決定すると共にその産物の蛋白脱燐酸化酵素カルシニューリン抑制剤としての機能を明らかにした。
- ② CV1 細胞に下垂体特異的転写因子 Pit1 および GATA2 を発現させることにより、T3/TR による TSH β 遺伝子プロモーター転写抑制を高感度に観察できる系を開発した。この系を用いて、A) T3非結合 TR は TSH β 遺伝子の基礎転写活性を亢進せず、TR 自身

が転写活性化因子ではない、B) T3/TR による TSH β 遺伝子転写抑制には、TR の DNA 結合領域が重要である、C) コレプレッサーおよびコアクチベーターは必ずしも必須因子ではないが、抑制効果が100%発揮されるには必要である、D) TSH β 遺伝子プロモーターの-80/-55の領域を除去することにより基礎転写活性が著明に増大する、E) TSH β 遺伝子の転写活性化には GATA2 が特に重要と考えられることを明らかにした。

- ③ 甲状腺ホルモン不応症患者に発見された新規の変異甲状腺ホルモン受容体を用いて、変異受容体と転写共役因子との関係、特に負の制御系の障害における転写共役因子の影響について検討した。その結果、同一の変異受容体でも、正の刺激系と負の抑制系ではまったくその作用が異なることが明らかになった。
- ④ TSH 不応症について検討した。クレチン症および高 TSH 血症を同胞あるいは家族内に持つ家系を対象に TSH 受容体遺伝子解析をおこない、新たに3家系(450H/R450H, 450H/R450H, R450H/R519G)において変異を同定した。既報の3家系(R450H/G498S, R450H/R450H, R450H/R519G)と合わせた6家系に共通の変異(R450H)を認めた。

TSH 受容体に対する自己抗体が関与するバセドウ病や甲状腺機能低下症に関する結果

- ① 寛解ないしそれに近い状態にあるバセドウ病患者の経過中、スギ花粉症が発生するとその数ヵ月後に抗 TSH 受容体抗体、抗 TPO 抗体及び抗サイログロブリン抗体の産生増加が、スギ花粉特異的 IgE 抗体産生と同様にみられ、スギ花粉症合併は本症の明らかな増悪因子になっていることを示した。
- ② バセドウ病眼症発症の主因をなす TSHR

抗体について、脂肪細胞と甲状腺細胞の TSHR 発現調節機構の違いを明らかにし、新たな治療予防方策の基礎的情報を得た。

- ③ 同様に後眼窩組織におけるサイログロブリン(Tg) messenger RNA (mRNA) の発現を検討した。
- ⑤ バセドウ病の遺伝的背景や環境的要因の関与を明らかにするために、同病の家族集積と臨床疫学について調査することが必要と考えられる。そこで、そこで今回、家族内に同病患者を持つ家族性バセドウ病を対象に全国疫学調査を実施し、その頻度分布と臨床疫学像を把握することとした。全国の家族性バセドウ病患者数は2850名(95%信頼区間2000~3500名)、バセドウ病患者全体に占める家族性の割合は、約2.1~3.1%と推計された。家族罹患の相対危険率は、約19~42倍と概算された。家族性バセドウ病の臨床所見、検査、治療、予後に関しては、非家族性を含めた全体のバセドウ病と比べて大きな相違はないと考えられた。以上より、バセドウ病患者に家族集積が確認され、その発症に遺伝因子や環境因子、またはその両者の関与が示された。また、バセドウ病疾患感受性遺伝子に関しては、全ゲノムスクリーニングとそれによって見出された染色体5q23-33領域について検討した。同領域の6つのマイクロサテライト多型のうち少なくとも2つのマーカーにおいて有意な関連を認めた。バセドウ病の臨床所見に基づいて subgroup に分けて各マーカーとの関連解析を行い、subgroup による関連度の差を認めた。

D. 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。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とともに、甲状腺ホルモン不応症に関する研究は核内受容体の転写調節機構の解明に寄与するものと考えられる。

Ⅲ. 分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患研究事業）
分担研究報告書

低カルシウム血症鑑別診断ガイドラインの作成

主任研究者 清野 佳紀 岡山大学大学院医歯学総合研究科教授

研究要旨

副甲状腺機能低下症の分子生物学的な進歩に伴い特発性副甲状腺機能低下症の多くのものでその原因が明らかとなってきた。①奇形症候群に伴う副甲状腺の臓器発生の異常 (GATA3：感音性難聴・腎奇形、22q11.2欠失：心奇形・顔貌異常、Kenney-Caffey 症候群) ②カルシウム感受性の異常 (常染色体優性：カルシウム感知受容体異常、原発性低マグネシウム血症) ③免疫異常 (HAM 症候群：AIRE 遺伝子異常) ④PTHの異常 の4つの原因に大別でき、従来特発性と考えられていた殆どの症例の原因が特定できるようになっている。この中にはカルシウム感知受容体の異常に基づく常染色体優性遺伝性副甲状腺機能低下症のように早期の診断が予後を左右するものもある。そこで、これら最近の本分野の進歩を取り込んだ鑑別診断のガイドライン作成を行った。

A. 研究目的

副甲状腺機能低下症の診断は intact-PTH の測定が可能となって臨床的には容易となった。しかし、その cut-off を明確に示したガイドラインは存在しない。また、副甲状腺機能低下症の分子生物学的な進歩に伴い特発性副甲状腺機能低下症の多くのものでその原因が明らかとなってきた。①奇形症候群に伴う副甲状腺の臓器発生の異常 (GATA3：感音性難聴・腎奇形、22q11.2欠失：心奇形・顔貌異常、Kenney-Caffey 症候群) ②カルシウム感受性の異常 (常染色体優性：カルシウム感知受容体異常、原発性低マグネシウム血症) ③免疫異常 (HAM 症候群：AIRE遺伝子異常) ④ PTH の異常 の4つの原因に大別でき、従来特発性と考えられていた殆どの症例の原因が特定できるようになっている。この中にはカルシウム感知受容体の異常に基づく常染色体優性遺伝性副甲状腺機能低下

症のように早期より高カルシウム尿症のため腎の石灰化を来し腎機能障害にいたるものもあり、早期の診断が予後を左右する。そこで、1998年に行った全国疫学調査の結果と、これら最近の本分野の進歩を取り込み、鑑別診断のガイドライン作成を行った。

ここで取り上げた疾患はいずれも稀な病態であるが、稀な病態を的確に診断できるように、フローチャート形式で作成し、巻末に参考となる文献リストを提示した。

低カルシウム血症診療の一助になれば幸いである。

なお、新生児に見られる低カルシウム血症と術後性、外傷性の副甲状腺機能低下症については今回は取り上げていない。

低 Ca 血症

低 Ca 血症 (8.5mg/dl 未満)

血中アルブミンが 4 g/dl 未満の場合、

補正 Ca = Total Ca-0.8 (アルブミン値-4), で評価する。

神経筋の易興奮性に基づく症状

しびれ感、テタニー、痙攣 (全ての形)

Chvostek 徴候

Trousseau 徴候

喉頭痙攣・気管支痙攣

心電図 (QT 延長、AV block)

低カルシウム血症の原因によりみとめられることのある症状

基底核石灰化、脱毛、皮膚の白斑、candida 症、菌エナメル発育不全、低身長、心奇形、顔貌異常、中手骨短縮、性腺機能低下、甲状腺機能異常、副腎機能低下症、感音性難聴、腎異形成症、くる病・骨軟化症、O 脚、X 脚



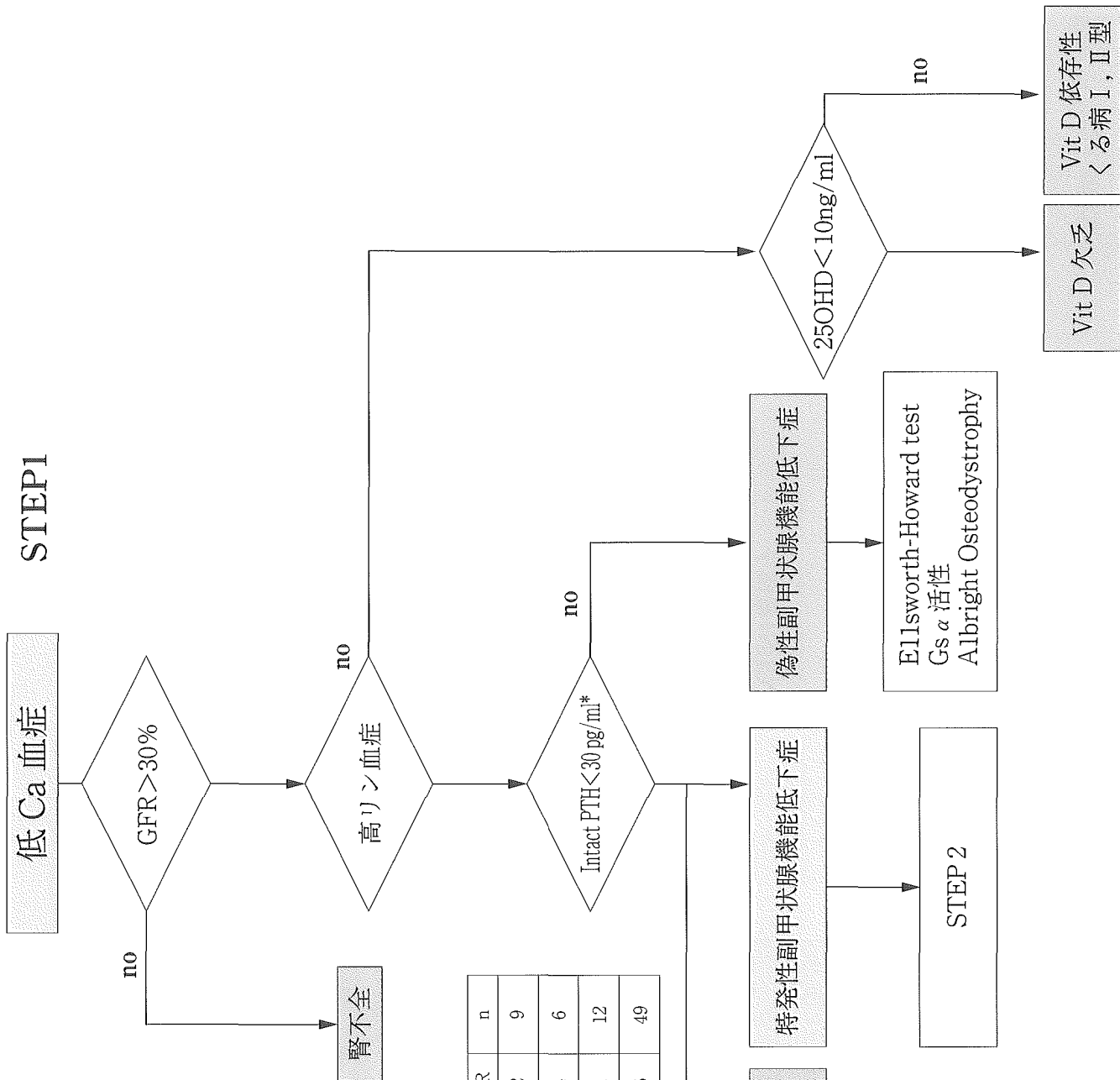
一般検査

- 1) 血中 Ca の評価：イオン化カルシウムが実際に低くないか？ 酸塩基平衡と同時にイオン化カルシウムを測定する。
- 2) 血中 Mg 値の確認
- 3) 血中 Pi の評価
- 4) 骨 X 線の評価 (手掌部の X 線像等)
- 5) 腎不全症の除外
- 6) 尿中 Ca、P、Cre の測定
- 7) ビタミン D 欠乏症の除外
食事歴、血中ビタミン D 分画の測定 (25OHD)
- 8) 血中 intact PTH
低値 (30pg/ml 以下) ⇒ 特発性 (PTH 不足性) 副甲状腺機能低下症
高値 ⇒ 偽性副甲状腺機能低下症、ビタミン D 欠乏症、ビタミン D 依存症



型の鑑別

STEP1

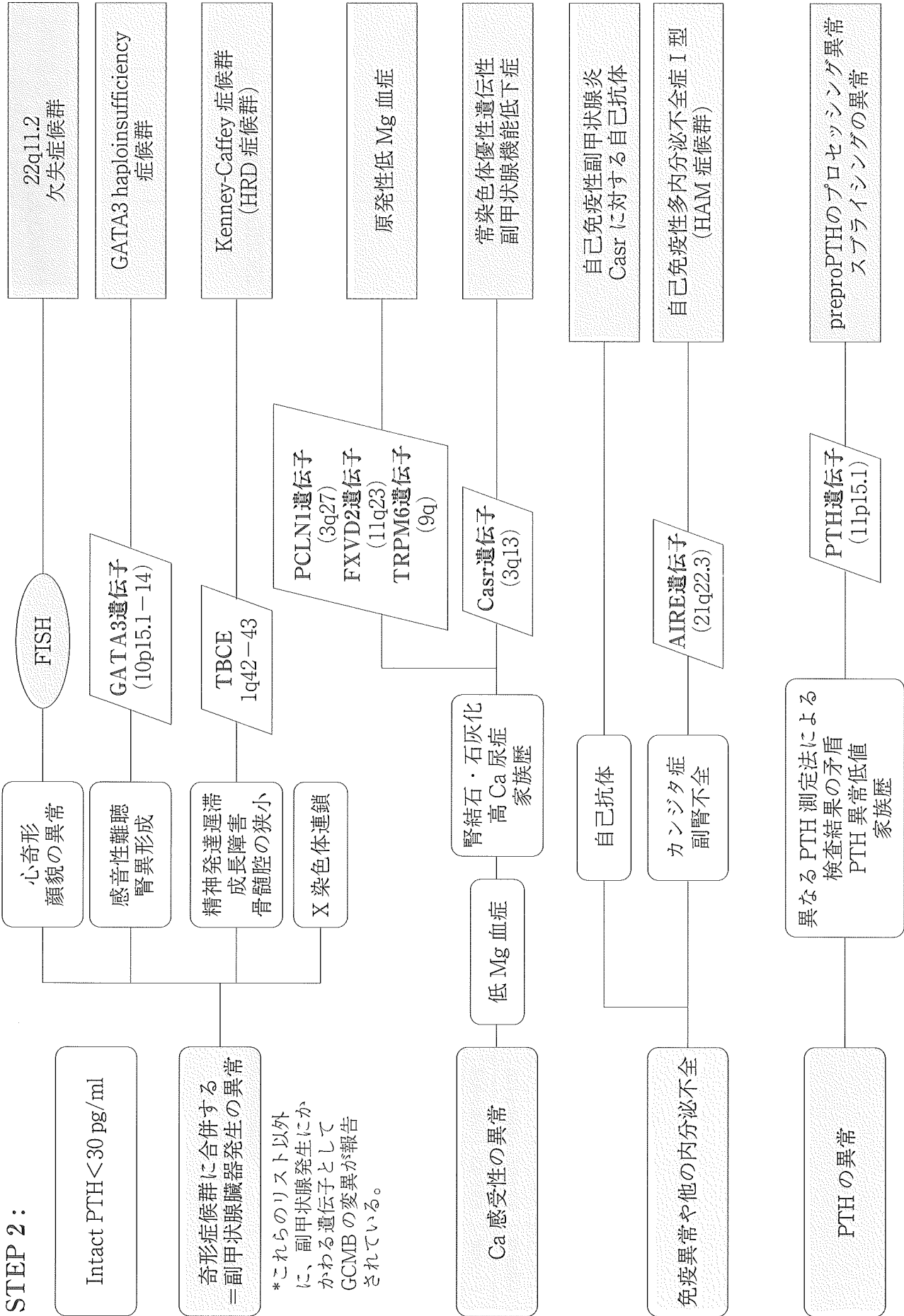


年齢別血清 Ca、I-P、%TRP、TmP/GFRの正常値

年齢区分	Ca	I-P	%TRP	TmP/GFR	n
1歳未満	9.7±0.5	5.64±1.01	92.1±3.5	5.65±1.2	9
1-10歳	8.9±0.3	4.80±0.51	92.9±3.3	5.31±0.4	6
10-15歳	8.9±0.5	4.07±0.78	92.3±3.4	4.52±1.1	12
15-20歳	8.8±0.2	4.02±0.44	91.5±2.8	4.27±0.6	49

* intact PTH の濃度は血中 Ca により変化するため、特発性副甲状腺機能低下であっても <30pg/ml でないこともある。

STEP 2:



*これらのリスト以外に、副甲状腺発生にかかわる遺伝子として GCMB の変異が報告されている。

GATA-3 haploinsufficiency

Kenney-Caffey 症候群 (HRD 症候群) 2

原発性低 Mg 血症3-5

常染色体優性遺伝性副甲状腺機能低下症6

自己免疫性多内分泌不全症 I 型 (HAM 症候群) 7 異常 PTH8

isolated hypoparathyroidism9

1. Van Esch H, Groenen P, Nesbit MA, et al. GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome. *Nature* 2000; 406:419-22.
2. Parvari R, Hershkovitz E, Grossman N, et al. Mutation of TBCE causes hypoparathyroidism-ratardation-dysmorphism and autosomal recessive Kenny-Caffey syndrome. *Nat Genet* 2002; 32:448-52.
3. Walder RY, Landau D, Meyer P, et al. Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Net Genet* 2002; 31:171-4.
4. Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P, et al. Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney Int* 2001; 59:2206-15
5. Meij IC, Koenderink JB, Van Bokhoven H, et al. Dominant isolated renal magnesium loss is caused by misrouting of the Na(+),K(+)-ATPase gamma-subunit. *Nat Genet* 200; 26:265-6.
6. Pollak MR, Brown EM, Estep HL, et al. Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a Ca(2+)-sensing receptor gene mutation. *Nat Genet* 1994; 8:303-7.
7. Scott HS, Heino M, Peterson P, et al. Common mutations in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients of different origins. *Mol Endocrinol* 1998; 12:1112-9.
8. Parkinson DB, Thakker RV. A donor splice site mutation in the parathyroid hormone gene is associated with autosomal recessive hypoparathyroidism. *Nat Genet* 1992; 1:149-52.
9. Ding C, Buckingham B, Levine MA. Familial isolated hypoparathyroidism caused by a mutation in the gene for the transcription factor GCMB. *J Clin Invest* 2001; 108:1215-20.

厚生労働科学研究費補助金（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
(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

腎臓特異的 PTH 不応症である偽性副甲状腺機能低下症 PHP1b に対する検討を報告した。PHP1b では、GNASI 遺伝子上流 (NESP55・XI α ・1A) のメチル化の異常は、XI α で症例による差があり、これにより発達・潜在性甲状腺機能低下症の表現系との差に結びつく可能性が示唆された。腎臓近位尿細管由来細胞を用いた RT-PCR 解析を行った。PHP1b では NESP55・XI α の発現なく、Exon1A と 1 共に両アリル発現であった。

A. 研究目的

私達は、小児科で重要な副甲状腺機能低下症の病因に関して治療を含めた病態解析と共に行ってきた。昨年度までに 1) カルシウム感受容体異常症、2) 腎臓特異的な異常を伴う偽性副甲状腺機能低下症 (PHP) 1b、3) 臓器発生異常についての検討を報告した。

PHP I 型は、GNASI 遺伝子コード領域の母親由来の塩基配列異常による 1a と (Gs α haploinsufficiency)、腎臓単独型 PTH 不応症と考えられている 1b とに分けられる。両者とも古典的ホルモン不応症であり、前者は知能障害・G 蛋白の介在する多内分泌腺不応症・骨病変を呈するのに対し、後者の臨床像の中核は PTH の腎臓特異的不応症であり最終病因は未だ不明である。

腎臓特異的 PTH 不応症である偽性副甲状腺機能低下症 1b について、私どもは、本症が母系遺伝することから DNA のメチル化 (genomic imprinting disease) との作業仮説をたて、

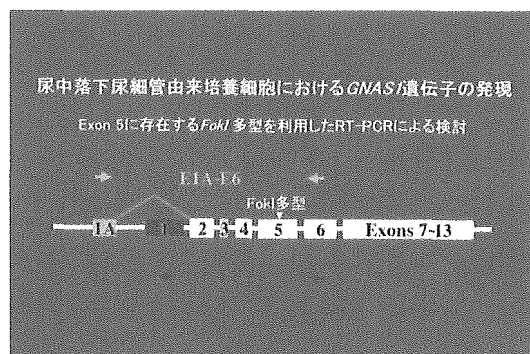
PTH/PTHrP 受容体・GNASI 遺伝子近傍のメチル化の有無で検討してきた。GNASI 遺伝子のプロモーターは複数あり、センス promoter は 4 つから構成される。健常人ではそのうちエクソン 1A と XI α は父系、NESP55 は母系の選択的メチル化を受け、Gs α はメチル化を受けていない。昨年度までに PHP1b では GNASI 遺伝子転写調節領域 (NESP55・XI α ・1A) のメチル化の異常があり、母系メチル化を受けるエクソン 1A promoter での解除と父系メチル化を受ける NESP55 での両アリルメチル化、XI α のメチル化の多様性を報告した。

今年度は、PHP1b の表現型とメチル化の多様性の関連、初代近位尿細管由来細胞を用い GNASI 遺伝子 NESP55・XI α の発現エクソン 5 にある FokI 多型を利用して Exon1A と 1 の父・母由来のアリル発現を、健常人・PHP1a・PHP1B で検討した。

B. 対象・方法

PHP1bの臨床像とメチル化パターンの解析は検討した8例全例を対象とした。

PHP1b 8例そのうち4例はGNAS1遺伝子Exon5のFok1部位がヘテロである。別に同部位にFok1多型を有するPHP1a 4例と健常人3例を対象とした。



初代近位尿細管細胞培養は既報の報告に従い行い、RNAを抽出後RT-PCR法で解析した。Primerの位置は上図の如く設定しExon 1AとExon 1の腎尿細管発現を検討した。さらに上流のNESP55とXl α については別のprimerを用いた。

全て対象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

PHP1bの臨床像とメチル化パターンの解析

PHP1bでは、Xl α のメチル化パターンは、5例で両性アリル脱メチル化で、3例で正常と同様の父性アリルメチル化であった。臨床像を再解析すると、3例の父性アリルメチル化を呈するPHP1bの2名で、幼児期の精神発達の遅れとTSHの基礎値高値（正常上限値）を認めた。しかし、明かなAHOは認めなかった。

RT-PCR

1) Exon 1Aの発現

健常コントロールではゲノムDNAでExon1A単アリル脱メチル化を示すが、腎尿細管由来細胞mRNAは単アリル性（脱メチル化由来）の発現であった。

Exon1A両アリル脱メチル化を示すPHP-Ibは、mRNAは両アリル性の発現を示した。

以上はゲノムDNAでメチル化を受けるアリの発現が認められないことと一致する結果であった。

2) Exon 1の発現

健常人・PHP1bともExon 1 mRNAは両アリル性発現であった。

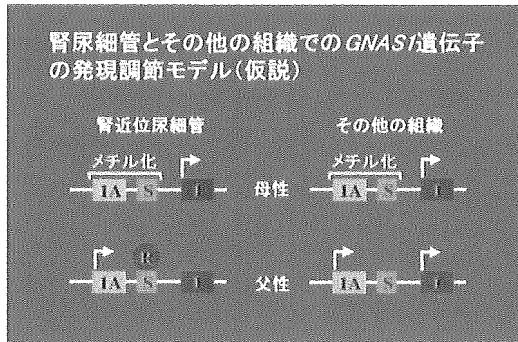
3) NESP55およびXLasの発現

両アリルとも発現は認められなかった。

D. 考 察

PHP1bの家族例では、GNAS1遺伝子近傍に責任遺伝子があり、私どもがPHP1b孤発例で示したものと同様のメチル化異常を認めている。これらの家族例の一部で血中TSH基礎値が高い症例が報告されている。今回、私達が検討した孤発例でも、TSHの基礎値が高く、しかも問診により乳幼児期の発達の遅れを伴った症例を確認した。しかも、これらの特殊な症例のGNAS1遺伝子メチル化パターンが異なる可能性は、GNAS1遺伝子のメチル化解析が臨床・病態診断に直結することを示唆する。

ゲノムDNAのメチル化パターンの解析からは、以下の図で示すrepressor説が理解しやすい。すなわち、PHP1bではGNAS1遺伝子上流Exon 1Aで両アリルともメチル化をうけないため腎臓近位尿細管特異的にrepressorが結合し母性（本来メチル化）GNAS1遺伝子の発現が抑えられるというものである。今回のRT-



PCRの結果は両アリルとも発現が認められるものであった。

E. 結 論

PHP1bはepigenetic病で症例の臨床像と *GNAS1* 遺伝子メチル化の解析から、本症の一部に腎臓特異的PTH不応症のみでなく、潜在的甲状腺機能低下症・乳幼児期の発達の遅れを呈する例があることが示唆された。これは、本研究班の研究で臨床解析が充実したため、後日の病因解析からいたった知見である。しかしメチル化異常は、直接調べた腎臓近位尿細管での

Gsα の転写低下・母系アリル発現低下と結びつかなかった。PHP1bの原因を解明する過程で新しい臨床概念と結びつく発見に至った可能性が高いが、メチル化異常とホルモン不応症の間にはGapがある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 86:1791-1796, 2002.