

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

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  
共同研究者 山内美香 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

研究要旨

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、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の調節における情報伝達には膜貫通領域、細胞内領域が重要であると考えられた。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いえる。

A. 研究目的

副甲状腺におけるカルシウム感知受容体(CaR)の受容機構と役割を解明するため、検討課題として以下の点を挙げた。CaRの副甲状腺細胞増殖の調節への関与、CaR機能異常による副甲状腺組織の変化、各ドメインのうち膜貫通領域と細胞内領域の役割という点である。また臨床上的問題点として、副甲状腺腫大の有無が副甲状腺機能亢進症(pHPT)と家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症(FHH)の鑑別点となりうるか否かという点である。このような問題点を考える上で示唆に富む貴重な症例を経験し、その機能解析と副甲状腺の組織学的検討を行った。

B. 研究方法

著明な副甲状腺腫大を有し副甲状腺摘除術を

施行したFHH症例について同意を得た上、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CaR遺伝子の変異の有無を検討し、restriction fragment length polymorphism解析により多型であるか否かを検討した。*in vitro* でヒト胎児腎細胞(HEK293)に変異CaRを導入し、ウエスタンブロット法により膜表面におけるCaRの発現と、細胞外イオン化Caに対する細胞内イオン化Caの変化を測定し機能解析を行った。副甲状腺組織については、Ki67、CaR、ビタミンD受容体(VDR)の免疫染色を行った。

C. 研究結果

組織所見では lipohyperplasia に合致する所見を認めた。Ki67染色では、一般にpHPTでは染色細胞が散在し正常ではほとんど染色されな

いが、本例では標本中に染色細胞を認めた。VDR、CaRでは pHPT においていずれもその発現が低下するが、本例ではVDR、CaRとも正常と同程度に染色された。遺伝子解析では R648stopの変異をヘテロで認め、血縁者の高Ca血症を示した例にのみ同様の変異をヘテロで認めた。CaRの発現実験にて正常より短いCaRの膜での発現を確認した。細胞外Ca濃度の変化に対する細胞内Ca濃度の変化は本変異型では全く認めなかった。

#### D. 考 察

CaRの副甲状腺細胞増殖調節への関与については、本例では *in vitro* で CaR の不活性型変異を確認し、組織にて副甲状腺腫大を確認したことから、副甲状腺において CaR が細胞増殖の調節に重要な役割を担っていることが示唆された。我々はこれまでに腎不全患者における副甲状腺組織の検討から、CaR が VDR より細胞増殖の調節に重要である結果を得ている。本例の組織所見において CaRの機能不全があるにもかかわらずVDR発現は正常であったことは、この結果をさらに裏付ける結果といえる。

CaRの異常による副甲状腺組織の変化については、FHHにおける組織は正常と同程度の脂肪組織を有した lipohyperplasia を示すとされている。本例もこれと合致する所見であり、CaRのヘテロな変異では lipohyperplasiaをきたす可能性が示唆された。また免疫染色の結果からCaRの機能不全はVDR発現に影響を及ぼさないことが示された。

CaRの膜貫通領域、細胞内領域の機能については、細胞内第2あるいは第3ループまでしかな

い受容体は膜表面への発現ができないことが報告されている。本例では第1ループまでしかないにもかかわらず CaR が発現しており、この部分が膜への発現に関与することが判明した。また、R648stopの機能解析で全く反応を認めなかったことから、膜貫通領域、細胞内領域がCaRの副甲状腺細胞増殖の調節における情報伝達に重要であると考えられる。

また、臨床上の問題点である pHPT とFHHの鑑別については、本FHH例のように画像で副甲状腺腫大が確認されることがあり、腫大の有無は鑑別点にならない。

#### E. 結 論

副甲状腺において CaRは細胞増殖の調節に関与し、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た。さらに、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における情報伝達に膜貫通領域、細胞内領域が重要である。一方、臨床上の問題点である pHPT とFHHの鑑別に、副甲状腺腫大の有無は鑑別点とならない。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamauchi M, Sugimoto T, Yamaguchi T, Yano S, Wang J, Bai M, Brown EM, Chihara K. Familial hypocalciuric hypercalcemia caused by an R648stop mutation in the calcium-sensing receptor gene. J Bone Miner Res. 17, 2174-2182, 2002.

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

分担研究者 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

研究要旨

PTHの骨に対する直接作用は、従来骨吸収促進が主作用と考えられてきたが、最近、間歇的投与が主に骨形成促進を介してアナボリック作用を示すことが明らかとなった。しかしながらその機序については不明な点が多い。本研究では、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。

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。そこで本研究では、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、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

本年は特に PTH および IL-11 の骨芽細胞アポトーシス作用およびこれらの相互作用について検討した。

1) 新生児マウス頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞や骨芽細胞株MC3T3E1細胞を用いてデキサメタゾン（DEX）・エトポシドによりアポトーシスを誘導し、trypan blue染色、DNA ladderなどを指標に評価した。

2) アポトーシスがERKシグナルや転写に依

存するか否かを各種 inhibitor を用いて検討した。

3) 抗アポトーシス因子であるbcl-2の発現に対する効果を Western blot 法により検討した。

4) IL-11の役割を中和抗体を用いて検討した。

5) 倫理面への配慮：マウスは、倫理委員会で承認されたプロトコルに基づき、麻酔下で苦痛を与えないよう安楽死させた。

C. 研究結果

1) PTHおよびIL-11はDEXおよびエトポシドで誘導されたアポトーシスをほぼ半分に抑制した。

2) 1) の効果は用量依存性であった。

3) 1) の効果はERK依存性であった。

4) PTHの抗アポトーシス効果は転写阻害薬によりブロックされたが、IL-11の効果は抑制されなかった。

5) DEXはbcl-2の発現を抑制したが、PTHおよびIL-11はこの抑制を解除した。

6) PTHの効果はIL-11の中和抗体により一部

抑制された。

7) DEXはIL-11の発現を転写レベルで強力に抑制した。

#### D. 考 察

PTHの骨形成促進作用には骨芽細胞に対する抗アポトーシス作用が関与していることが示唆された。このPTHの作用はERK依存性で、転写を必要とし、一部はIL-11の発現促進を介するものと考えられた。また、PTHによるアポトーシスの抑制にはbcl-2発現の促進が関与している可能性が考えられた。PTHはIL-11をin vitroおよびin vivoで誘導し、DEXはこれを強力に抑制することから、PTHの骨形成促進作用およびDEXによる骨形成抑制作用にはIL-11が関与している可能性がある。

#### E. 結 論

PTHの骨形成促進作用には一部IL-11の発現促進を介した、骨芽細胞の抗アポトーシス作用が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. Okazaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, Ooka H, Tomiyama H, Sakamoto Y and Matsumoto T: Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor alpha and beta. *Endocrinology* 143(6): 2349-2356, 2002.

2. Abe M, Hiura K, Wilde J, Moriyama K, Hashimoto T, Ozaki S, Wakatsuki S, Kosaka M, Kido S, Inoue D, Matsumoto T: Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood* 100(6):2195-2202, 2002

3. Takeuchi Y, Watanabe S, Ishii G, Takeda S, Nakayama K, Fukumoto S, Kaneta Y, Inoue D, Matsumoto T, Harigaya K, Fujita T. Interleukin-11 as a stimulatory factor for bone formation prevents bone loss with advancing age in mice *J Biol Chem*: 277(50): 49011-49018, 2002.

4. Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Fuse, H., Ogawa, S., Yogiashi, Y., Okuno, A., Nagasawa, H., Nakajima, T., Matsumoto, T., and Kato, S. Ligand-selective potentiation of rat mineralocorticoid receptor activation function 1 by a CBP-containing histone acetyltransferase complex. *Mol Cell Biol* 22:3698-706.; 2002.

5. Matsumoto, T., Nagata, N., Horikoshi, N., Adachi, I., Ohashi, Y., and Ogata, E. Comparative study of incadronate and elcatonin in patients with malignancy-associated hypercalcaemia. *J Int Med Res* 30:230-43; 2002.

6. Iuchi, T., Akaike, M., Mitsui, T., Ohshima, Y., Shintani, Y., Azuma, H., and Matsumoto, T. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res* 92:81-7; 2003.

7. Kido S, Inoue D, Hiura K, Javier W, Ito Y and Matsumoto T: Expression of RANK is

Dependent upon Differentiation into the Macrophage/Osteoclast Lineage: Induction by 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 and TPA in a Human Myelomonocytic Cell Line, HL60. BONE : in press, 2003.

8. Tohjima, E., Inoue, D., Yamamoto, N., Kido, S., Ito, Y., Kato, S., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., and Matsumoto, T. Decreased AP-1 Activity and Interleukin-11 Expression by Bone Marrow Stromal Cells May be Associated with Impaired Bone Formation in Aged Mice. J Bone Miner Res in press; 2003.

## 2. 学会発表

1. 第75回日本内分泌学会学術総会 (6/28-30/02、大阪)

PTHによるAP-1/IL-11カスケードの活性化は骨芽細胞の初期分化を促進するとともに、骨芽細胞アポトーシスをも抑制する

加藤修司、井上大輔、木戸慎介、伊藤祐司、松本俊夫

2. 第20回日本骨代謝学会 (7/25-27/02、岡山)  
力学的負荷による骨形成促進機構における fosB/Interleukin-11経路の活性化機序

木戸慎介、井上大輔、答島恵美子、松本俊夫

3. 第20回日本骨代謝学会 (7/25-27/02、岡山)

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

4. Ninth Workshop on Cell Biology of Bone and Cartilage in Health and Disease (Davos, Switzerland, 3/16-19/02)

Interleukin-11 Is An Osteogenic Cytokine That Inhibits Osteoblast Apoptosis

D. Inoue, S. Kido, S. Kato, Y. Ito, and T. Matsumoto

5. 24<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2002

Downregulation of Interleukin-11 may be involved in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis

S. Kido, D. Inoue, S. Kato, Y. Ito, T. Matsumoto

6. 24<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2002

Mechanism of mechanical stress-induced activation of AP-1/IL-11 transcriptional cascades

D. Inoue, S. Kido, T. Matsumoto

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 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

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

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。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となった。本症においては、PTHの合成分泌と分解のいずれもが亢進していると考えられた。

### A. 研究目的

最近 Bio-PTH に特異的な測定系が開発され、これまで用いられてきたいわゆる intact PTH assay 系では、Bio-PTH の他に HPLC で PTH (7-84)と同じ文面に溶出されるPTH fragments がcrossreactすることが明らかにされた。そこで、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偽性副甲状腺機能低下症（PHP）において、Bio-PTHとPTH(7-84)様fragmentsを測定することにより、本症におけるPTH分泌とその代謝について検討した。

### B. 研究方法

PHPにおける血中 PTH 濃度をBio-PTHに特異的な測定法と従来の intact PTH 測定法により測定し、両者の差から PTH (7-84) 様 fragments 濃度を決定した。

### C. 研究結果

Bio-PTH濃度は、正常者 $22.3 \pm 7.1$  pg/ml、PHP  $252.5 \pm 124.8$  pg/mlであった( $P < 0.01$ )。

Bio-PTHとiPTHの間には正の相関が認められ、BioPTH/iPTH比は、正常者 $0.77 \pm 0.06$ 、PHP  $0.64 \pm 0.03$ であった( $P < 0.01$ )。PTH(7-84)様 fragmentsの濃度は、正常者 $7.2 \pm 4.1$  pg/ml、PHP  $142.5 \pm 76.9$  pg/ml ( $P < 0.01$ )であり、PTH(7-84)/Bio-PTH比は、正常者 $0.30 \pm 0.11$ 、PHP  $0.56 \pm 0.07$ であった( $P < 0.01$ )。

### D. 考 察

PHPにおいては、PTH(7-84)様fragmentsも増加しており、PTHの合成分泌と分解のいずれもが亢進していると考えられた。

### E. 結 論

Bio-PTHの測定は、副甲状腺機能の正確な評価のために重要と考えられるが、従来のintact PTH assayによる測定値との比較は、PHPにおけるPTH代謝異常を検討する上に有用と考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hatakeyama Y, Mizunashi K, Furukawa Y, Yabuki S, Sato Y, Igarashi T. Plasma levels of

PTH(1-84) whole molecule and PTH(7-84)-like fragments in pseudohypoparathyroidism type I. J Clin Endocrinol Metab (in press).

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

骨・カルシウム代謝異常症の病因、病態の解明

分担研究者 福本 誠二 東京大学医学部附属病院検査部講師

研究要旨

ビタミンD抵抗性と低リン血症を特徴とする腫瘍性くる病・骨軟化症(tumor induced rickets/osteomalacia: TIO)の惹起因子として、fibroblast growth factor(FGF)-23が同定された。そこでFGF-23の測定系を開発し、各種疾患患者における血中 FGF-23濃度を検討した。FGF-23は健常成人にも存在し、生理的にも何らかの役割を果たしていることが示唆された。また血中FGF-23はTIO患者で高値を示し、責任病巣の摘除により速やかに低下した。さらにFGF-23は、TIO類似の病態を示すX染色体優性低リン血症性くる病患者でも高値を示した。従ってFGF-23は、複数の低リン血症性疾患の発症に関与することが示唆された。

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。本症の惹起因子として fibroblast growth factor(FGF)-23が同定された。そこでFGF-23の測定系を構築し、リン代謝異常症の発症におけるFGF-23の関与を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

FGF-23に対する2種類のモノクローナル抗体を用い、全長 FGF-23を測定する enzyme-linked immunosorbent assay系を構築した。本アッセイ系を用い、各種疾患患者の血中FGF-23濃度を測定した。

C. 研究結果

健常成人の血中FGF-23濃度は、10～50

pg/mlであった。TIO患者の血中FGF-23濃度は、術前には明らかな高値を示し、責任病巣の摘除により速やかに低下した。またこれに引き続いて、低リン血症が改善した。さらにTIO類似の病態を示し、代表的ビタミン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患者の大部分でも、血中FGF-23は高値を示した。

D. 考 察

FGF-23は健常成人血中にも存在することから、生理的にも何らかの作用を果たしている可能性がある。TIO患者では術前高値を示した FGF-23が術後速やかに低下し、その後低リン血症の改善が認められたことから、FGF-23がTIOの惹起因子であることが確認された。さらにFGF-23は、TIO以外の低リン血症性疾患でも高値を示したことから、今後各種リン代謝異常症の発症におけるFGF-23の関与を明らかにしていく必要がある。



## E. 結 論

FGF-23の測定系を構築し、血中FGF-23が複数の低リン血症性疾患において高値であることを示した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Watanabe S et al.: Association between activating mutations of calcium-sensing receptor and Bartter's syndrome. *Lancet* 360(9334): 692-694, 2002

2) Nagase T et al.: A family of autosomal dominant hypocalcemia with positive correlation between serum calcium and magnesium: Identification of a novel gain-of-function mutation (Ser820Phe) in the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 87(6): 2681-2687, 2002

3) Fukumoto S, Yamashita T: Fibroblast growth factor-23 is the phosphaturic factor in tumor-induced osteomalacia and may be phosphatonin. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11(4): 385-389, 2002

4) Shimada T et al.: Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo. *Endocrinology* 143(8): 3179-3182, 2002

5) Yamazaki Y et al.: Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab* 87(11): 4957-4960, 2002

### 2. 学会発表

1) Watanabe S et al.: Comparison of magnesium metabolism in patients with autosomal dominant hypocalcemia and other PTH-deficient hypoparathyroidism. Twenty-Fourth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (San Antonio, USA)

2) Yamazaki Y et al.: FGF-23 protein is present in normal plasma and is increased in patients with tumor-induced osteomalacia. Twenty-Fourth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (San Antonio, USA)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

ビタミンDの骨に対する直接作用に関する研究

分担研究者 田中 弘之 岡山大学大学院医歯学総合研究科助教授

研究要旨

1,25dihydroxyvitamin D3 (1,25) のビタミンD受容体 (VDR) を介した骨への直接作用は不明確なことが多い。骨に直接ビタミンDは大きな作用を果たしていないかを明らかにすることは今後の治療薬開発に重大な意味を持つものと考え、VDRKO骨の野生型マウスへの移植実験を行い、1,25の骨に対する直接作用は骨幹部の皮質骨形成の抑制であることを示してきた。今年度は新生仔骨の比較、骨器官培養による骨形成過程の解析を行い、やはり1,25の骨に対する直接作用は骨幹部の皮質骨形成の抑制であることが明らかになった。

A. 研究目的

1,25dihydroxyvitamin D3 (1,25) のビタミンD受容体 (VDR) を介した骨への直接作用は不明確なことが多い。即ち、VDRKOマウスは出生直後に骨になんら異常を示さないこと、離乳以降重症のくる病を発症するが、これは食餌中のCaやPiを調節することによって、血清Ca、Piの正常化とともに正常化することなどから、骨病変はVDRKOによって生じたミネラル調節の異常が原因であると考えられるからである。骨に直接ビタミンDは大きな作用を果たしていないかを明らかにすることは今後の治療薬開発に重大な意味を持つものと考え、VDRKO骨の野生型マウスへの移植実験を行ってきた。この結果、組織学的に異常を示さない生後2週のVDRKO骨を野生型に移植すると、VDRKO骨は野生型の骨を野生型マウスに移植した場合よりも著しい骨量の増加を示した。この間一貫してKO骨と野生型骨で差を認めた遺伝子はrunx2遺伝子であり、これらのことより1,25は

骨においてrunx2を負に制御することによって、骨形成を負に調節していることが示唆された。この結論をさらに裏付ける目的で今年度は、次の2つの点について検討を加えた。即ち、①体液中のミネラル異常の影響を未だ受けていないと考えられる出生直後のVDRKO骨を定量的に解析し野生型との相違を明らかにする。②出生直後の各骨を器官培養することにより骨形成過程をさらに詳細に検討する。

B. 研究方法

当施設で系統維持を行っているヘテロのVDRKO同士の交配を行い vaginal plug 確認日をday 0として、Day20に6時間毎の確認で出生後6時間以内のマウスを取得。大腿骨を即座に摘出しBGJb培地で培養を行った。遺伝子型は摘出後残った肝組織より抽出したDNAを鋳型に既報の方法でタイピングした。一部は直接70%エタノールで固定し骨組織の検討に供した。

### C. 研究結果

#### ①出生直後の大腿骨の定量的解析

出生後6時間以内に摘出した大腿骨を、 $\mu$  focus CT, pQCT, 組織学により検討した。骨幹端部には検討したいずれのパラメータでもVDRKOと野生型には差を認めなかった。しかし、骨幹部においては図1に示すごとくVDRKO骨は高い骨皮質厚を示した。さらに、pQCTによる定量でも図2のようにVDRKO骨は高い骨塩量を示した。

#### ②器官培養

①で見られた変化がVDRの有無に由来するものであるかを明らかにするために、骨器官培養を行った。その結果 VDRKO 骨は $10^{-8}$ Mの1,25の添加の有無に関わらず大きな変化を示さなかったが、野生型骨は1,25の添加によってさらに骨皮質の菲薄化を示し（図3）、1,25添加の

大多数の標本ではpQCTによる評価が困難であった。さらに、組織の詳細な検討により、VDRKOと野生型のこのような相違は破骨細胞の違いによるものではなく骨芽細胞の違いによることが明らかになった（図4）。

### D. 考 察

以上の結果より、1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>のVDRを介した骨に対する直接作用は骨皮質の形成を抑制することにあると考えられた。

この結論はこれまでの活性型ビタミンDの作用と一見著しく矛盾するが、我々がこれまで報告してきた 24,25-dihydroxyvitamin Dやその他のビタミンDアナログがいずれも1,25-dihydroxyvitamin Dと比較して弱いVDR結合親和性を示しながら、強い骨形成促進作用を示すことを説明する根拠となる。さらにこの結果は、

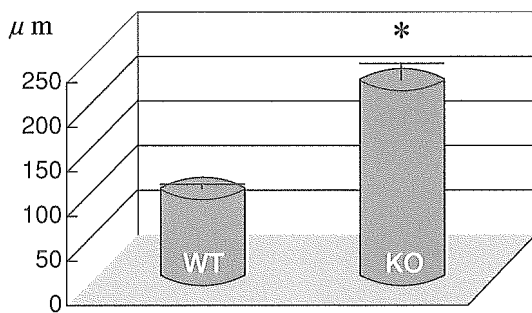


図1 皮質骨幅

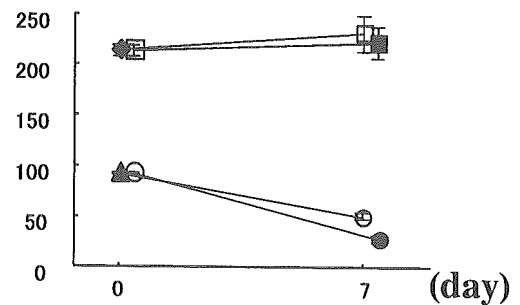


図3 皮質骨幅 器官培養

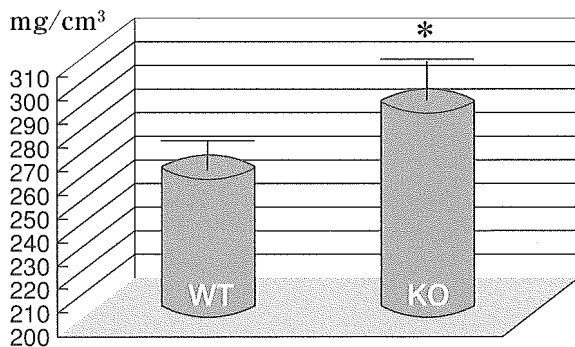


図2 皮質骨密度

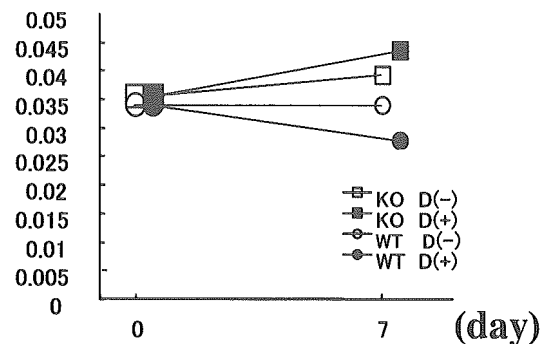


図4 骨芽細胞数

最近明らかになりつつある老人のビタミンD欠乏の状況や副甲状腺機能亢進状態を考えると、従来の活性型ビタミンD製剤を骨粗鬆症治療薬として用いることを否定するものではないことは明らかである。

## E. 結 論

1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>のVDRを介した骨に対する直接作用は骨皮質の形成の抑制である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

本年度なし

### 2. 学会発表

N. Inoue, H. Tanaka, M. Inoue, S. Kato, Y. Seino. Vitamin D receptor null mice bone possesses increased potential of periosteal bone formation. American Society for Bone and Mineral Research 24th Annual Meeting, San Antonio, TX, USA, 2002

H. Tanaka. Normal bone growth and growth hormone. 2<sup>nd</sup> Ferring Pharmaceuticals International Paediatric Endocrinology Symposium, Rome, Italy, 2002 May

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

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

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

分担研究者 大藪 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講座教授

研究要旨

血清カルシウム維持機構の解明の一端として、ビタミンD受容体(VDR)の核局在を担う分子の探索を行なった。その結果、VDR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- $\beta$  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。カルシウム(Ca)感知受容体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考えられた。

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)様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。ビタミンD依存症Ⅱ型(VDDRⅡ)は、ビタミンD受容体(VDR)の機能異常によってもたらされる疾患である。VDDRⅡは、従来、患者の線維芽細胞を用いた検討などからDNA結合、ホルモン結合、核局在に異常のある型に分類されていた。VDRのcDNAがクローニングされて、

前二者の異常はVDR遺伝子の変異として同定されたが、核局在異常をきたす変異については依然不明である。従って、VDRの核局在を担う蛋白質を同定し、その異常症を検討する必要がある。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する。

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(DBD/Hinge)、およびヒンジ領域からリガンド結合領域(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に組み込むことによってbait vectorを構築した。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インサートを取得し、塩基配列を決定した。in vitroでの結合をGST Pull-Down 法およびレポーターアッセイを行い、VDRとの相互作用をさらに検討した。

### C. 研究結果

スクリーニングの結果、VDR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。一つは核-細胞質間分子輸送を担うimportin- $\beta$  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。前者はGST Pull-Down法によりVDRと共沈し、in vitroにおいてもVDRと相互作用することが強く示唆された。またこの分子は、そのC末端領域でVDRのDNA結合ドメインと相互作用していることが明らかとなった。後者を過剰発現するとVDRのリガンド依存的転写活性化が抑制されたことから、VDRの機能に影響を与える因子であると考えられた。両者とも核移行の経路上に位置する分子であり、VDRの核移行にも関与するものと推測された。

### D. 考 察

VDRと核-細胞質間分子輸送に関連する分子が相互作用することを初めて示すことが出来た。しかし、その機能については十分に解明されておらず、さらなる解析が必要である。Importin様分子についてはVDRの核への輸送

能を証明するために、セミインタクト細胞系での検討が適切であると思われる。またnucleoporinについてはVDRの機能抑制のメカニズムに興味を持たれるが、VDRが機能するためのどの段階に作用しているのかを検証することで解明できるのではないかと考えられる。

### E. 結 論

引き続き、機能解析および遺伝子の同定を行う。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 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

ビタミンD受容体の核移行に関わる分子の解析  
宮内芳輝、道上敏美、大藪恵一。第20回日本骨代謝学会2002.7；岡山

Identification of oncogenic nucleoporin CAN/Nup214 as a regulator of vitamin D receptor-mediated transcription. Miyauchi Y, Michigami T, Ozono K. 20th Annual Meeting of American Society of Bone and Mineral Research. 2002.9;USA

Molecular analysis of the vitamin D receptor interactions with highly potent vitamin D analogues using site-directed mutagenesis. Okano T, Nakagawa K, Sowa Y, Mikami K, Kubodera N, Ozono K. 20th Annual Meeting of American Society of Bone and Mineral Research. 2002.9;USA

## H. 知的所有権の取得状況

特になし。

## 2. 常染色体優性低カルシウム血症におけるカルシウム感知受容体の異常に関する研究

### A. 研究目的

常染色体優性低カルシウム血症(ADH)は、カルシウムセンシング受容体(CaSR)の機能亢進によって起こる遺伝性疾患である。責任遺伝子の同定により、特発性副甲状腺機能低下症と鑑別可能となり、早期より確定診断されるようになったが、報告された症例数はまだ少ない。また、一般的に特発性副甲状腺機能低下症に対しては活性型ビタミンDの投与が行われるが、本症では高Ca尿症、尿路結石をきたしやすく、ビタミンDの投与は避けるべきと考えられている。しかし、実際、テタニーをきたすほどの低Ca血症である時もあり、治療法については確立していない。今回我々は、低Ca血症を示した3家系で遺伝子解析を行い CaSR 機能亢進症と診断した。これらの症例について臨床的特徴、治療法の検討を行う。

### B. 研究方法

常染色体優性低 Ca 血症(ADH)が疑われる患者の CaR 遺伝子変異検索を行なうと共に臨床的特徴、治療法の検討を行なう。

### C. 研究結果

本症3家系において同定した CaSR 遺伝子の異常は、C129S, E799K, E228Kであった。家族歴を有する症例を含めて、副甲状腺ホルモン分泌不全を伴う低Ca血症を示した7例において CaSR 遺伝子の異常を認めなかった。本症の3家系5名について、血清 Ca 値と尿中 Ca/クレア

チニン比を検討したところ、血清Ca値が7.0mg/dl以上の時、尿中 Ca/クレアチニン比が0.3を越える頻度が著しく増加した。また、血清 Ca 値が6.0mg/dl以下では、手足のしびれや痙攣が見られた。血清 Ca 血症を維持するために、活性型ビタミンDを投与した。

### D. 考 察

本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考えられた。

### E. 結 論

ADH患者では、血清Ca値を6.0mg/dl~7.0mg/dlに維持するのが良いと思われる。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 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Ca骨代謝関連の論文は別紙記載。

#### 2. 学会発表

常染色体優性低Ca血症の3家系  
平井治彦、山藤陽子、島雅昭、里村憲一、志水信彦、中島滋郎、大藪恵一。第20回日本骨代謝学会2002.7；岡山

## H. 知的所有権の取得状況

特になし。

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

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

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

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による負の転写制御メカニズムを明らかにする目的に、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により負に制御される遺伝子である活性型ビタミンD産生酵素 [ $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ ] 遺伝子、副甲状腺ホルモン (PTH) 及び副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP) 遺伝子を用いて検討した。我々はVDIRがこれら遺伝子の $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  依存的な転写抑制において鍵分子であることを見出した。この分子メカニズムの全貌明らかにするため、タンパク精製によりVDIR及びVDRを含む複合体の同定を試みる。

A. 研究目的

カルシウム代謝調節に必須な栄養素である脂溶性ビタミンDは細胞の増殖抑制、分化誘導、免疫応答などを司る幅広い生理作用を有することが知られている。このようなビタミンDの多彩な生理作用はステロイドホルモン核内受容体群に属し、リガンド依存性転写調節因子であるビタミンD受容体 (VDR) を介した遺伝子発現により調節される。この際、活性型ビタミンDはビタミンDレセプター(VDR)を介して標的遺伝子の発現を正負に制御することが知られている。正の制御メカニズムに関しては既に詳細な解析がなされているが、負の制御メカニズムに関しては不明点が多い。

既に本研究室で同定し、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によって制御されていることを明らかにしている活性型ビタミンD産生酵素 [ $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ ] 遺伝子や $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と共に体内カルシウム維持において重要な役割を果たしている副甲状腺ホルモン (PTH) 及び副甲状腺ホルモン関連ペ

チド (PTHrP) 遺伝子は $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により負に制御される代表的な遺伝子である。これまでに、我々は $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子プロモーター上のリガンド依存的な負の応答領域 ( $1\alpha\text{-nVDRE}$ )を同定し、 $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$  遺伝子発現における転写抑制遺伝子として働く bHLH転写因子VDIRを単離した。また、更なる解析により、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下にはVDIRがVDRと共に $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子の転写抑制に重要であることを見出した。一方、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 非存在、PKA存在下にはVDIRがリン酸化を受け、Co-activatorであるP300と複合体を形成するととり、 $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子の転写活性を上昇することを明らかにした。我々はVDIRがVDRを介する $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な転写抑制機構において鍵分子であると推定し、その分子メカニズムの解明を試みた。

B. 研究方法

VDIRの $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な転写抑制にお



ける機能解析のため、以下の検討を行った。全ての解析は $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による抑制が見られるマウス腎臓近位尿細管細胞であるMCT細胞を用いた。

1) ルシフェラーゼ(LUC)法で、VDIRが $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による転写抑制に及ぼす影響を検討した。また、この際ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)が関与しているかをHDAC阻害剤(TSA)投与実験により検討した。

2) 免疫沈降法を用いて、VDIRとVDRが $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下で複合体を形成するかを検討した。また、HDACおよび、Co-repressor(NCoR)が同じ複合体に含まれるかを検討した。

3) クロマチン免疫沈降法(CHIP)を用いて、VDIR、VDR、HDAC、NCoRが $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下において $1\alpha$ -nVDRE上で複合体を形成するのかを検討した。

4) PTHやPTHrP遺伝子にも $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子と同様な転写抑制メカニズムが存在するかをLUC assay、gel mobility shift assay、ABCD assay法を用いて検討した。

5) MCT細胞から核タンパクを抽出し、GST-VDIRをbaitとして、結合する因子を同定する。具体的にはVDRとVDIRを含む複合体をグリセロールグラジエントにて分離し、その構成因子群をMALDI TOF-MSにて同定する。

### C. 研究結果

VDIRを強発現することにより、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  依存的な転写抑制が顕著に認められたことから、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による転写抑制においてVDRと共に必須であることを確認した。また、TSA添加により、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による転写抑制が阻害されることから、HDAC2の関与の可能性が示唆された。免疫沈降の結果

より、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の存在時、HDAC2およびNCoRがVDIRとVDRを含む複合体に含まれていることが明らかになった。更に、この複合体が実際に $1\alpha$ -nVDRE上で形成されていることをCHIP assayにて確認した。

転写抑制メカニズムを解明するために行ったGST-VDIRをbaitとして行ったタンパク精製によりVDIRとVDRが $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的に形成する巨大複合体を形成していることが明らかになり、さらにその複合体の中にHDAC2およびNcoRがやはり含まれていることが確認できた。

### D. 研究考察

以上の検討から $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な転写抑制機構において、 $1\alpha$ -nVDREに結合したVDIRが、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的にVDRおよび、HDAC、NCoRを含むco-repressorと複合体を形成することを明らかにした。更に、我々は他に活性型ビタミンDにより負に制御されることが知られているPTH及びPTHrP遺伝子にも同様な転写抑制分子メカニズムが存在することを示し、VDIRを介する転写抑制メカニズムは活性型ビタミンDにより発現が抑制される標的遺伝子において共通する転写抑制メカニズムである可能性を提示した。しかし、その詳細な転写抑制メカニズムは依然として不明であり、さらにそれが組織特異的に生じる理由は明らかではない。

近年、転写抑制のメカニズムにも様々な因子が関与していることが明らかになっている。しかもそれらは結合するプロモーター配列特異的な複合体を形成していると考えられている。従って、我々が用いているビタミンD依存的に転写抑制が生じるプロモーター上にてこれまで

知られていない未知の複合体が形成されている可能性が高いと考えられる。既に我々の同様の検討からATP依存性クロマチンリモデリング複合体がこの転写抑制に関与していることがわかっており、複数の複合体の関与も予想される。

現在までの検討より、我々はこれら遺伝子の転写抑制に組織特異的な転写因子が関与していると考えている。そこで、我々はこの因子を同定することがこれら遺伝子のビタミンD依存的な発現抑制機構の組織特異性を証明するための第一の課題であると考え、生化学的な手法を用いて複合体の全構成因子の同定に着手している。今後はDNAカラムなどの様々な手法を用いてこの因子の同定と共に転写抑制複合体構成因子全ての同定を行うことによりその詳細な転写抑制メカニズムが明らかになると思われる。

## E. 結 論

以上の研究より活性型ビタミンD依存的な転写抑制メカニズムには現在まで報告されてない新しいメカニズムが存在することを明らかにした。この結果は現時点に、不明の点が多いリガンド依存的な転写抑制機構の解明に糸口になると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表 (原著)

1. Suzawa, M., Takada, I., Yanagisawa, J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., Matsumoto, K., Kato, S.: Inhibition of adipogenesis by cytokines with suppression PPAR $\gamma$  function through the TAK1/TAB1-NIK mediated cascade. *Nature Cell Biol.*, 2003 (in press).

2. Nakamichi, Y., Shukunami, C., Yamada, T., Aihara, K., Kawano, H., Sato, T., Nishizaki, Y., Yamamoto, Y., Shindo, M., Yoshimura, K., Kawaguchi, H., Hiraki, Y., Kato, S.: Chondromodulin-I (ChM-I) is a bone remodeling factor. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 636-644, 2003.

3. Sato, T., Matsumoto, T., Yamada, T., Watanabe, T., Kawano, H., Kato, S.: Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (ARKO) mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300, 167-171, 2003.

4. Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., Nagasawa, H., MacMahon, S. B., Cole, M. D., Tora, L., Takahashi, N., Kato, S.: Nuclear receptor function requires a TFTC-type histone acetyl transferase complex. *Mol. Cell*, 9, 553-562, 2002.

5. Takeyama, K., Ito, S., Yamamoto, A., Tanimoto, H., Furutani, T., Kanuka, H., Miura, M., Tabata, T., Kato, S.: Androgen-dependent neurodegeneration by polyglutamine-expanded human androgen receptor in drosophila. *Neuron*, 35, 855-864, 2002.

6. Furutani, T., Watanabe, T., Tanimoto, K., Hashimoto, T., Koutoku, H., Kudoh, M., Shimizu, Y., Kato, S., Shikama, H.: Stabilization of androgen receptor protein is induced by agonist, not by antagonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294, 779-784, 2002.

7. Kato, S.: Androgen receptor structure and function from knock-out mouse. *Clin Pediatr Endocrinol*, 11, 1-7, 2002.

8. Kato, S., Yoshizawa, T., Kitanaka, S.,

- Murayama, A., Takeyama, K.: Molecular genetics of vitamin D-dependent hereditary rickets. *Hormone Research*, 57, 73-78, 2002.
9. Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Fuse, H., Ogawa, S., Yogiashi, Y., Okuno, A., Nagasawa, H., Nakajima, T., Matsumoto, T., Kato, S.: Ligand selective potentiation of rat mineralocorticoid receptor activation function-1 (AF-1) by a CBP-containing HAT complex. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 3698-3706, 2002.
10. Matsui, D., Sakari, M., Sato, T., Murayama, A., Takada, I., Kim, M., Takeyama, K., Kato, S.: Transcriptional regulation of the mouse steroid 5 $\alpha$ -reductase type II gene by progesterone in brain. *Nucleic Acids Res.*, 30, 1387-1393, 2002.
11. Sakaue, H., Konishi, M., Ogawa, W., Asaki, T., Mori, T., Yamasaki, M., Takata, M., Ueno, H., Kato, S., Kasuga, M., Itoh, N.: Requirement of fibroblast growth factor 10 in development of white adipose tissue. *Genes & Development*, 16, 908-912, 2002.
12. Nawata, H., Goto, K., Morinaga, H., Yanase, T., Yanagisawa, J., Kato, S., Nomura, M., Okabe Taijiro, Takayanagi, R.: Molecular mechanisms underlying the action of environmental endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Sciences*, 9, 57-70, 2002.
13. Shimosawa, T., Shibagaki, Y., Ishibashi, K., Kitamura, K., Kangawa, K., Kato, S., Ando, K., Fujita, T.: Adrenomedullin, an endogenous peptide, counteracts cardiovascular damage. *Circulation*, 105, 106-111, 2002.
14. Mailloux, A. A., Spencer-Dene, B., Dillion, C., Ndiaye, D., Savona-Baron, C., Itoh, N., Kato, S., Dichson, C., Thiery, J. P., Bellusci, S.: Role of FGF 10/FGFR2b signaling during mammary gland development in the mouse embryo. *Development*, 129, 53-60, 2002.
15. Harada, H., Toyono, T., Toyoshima, K., Yamasaki, M., Itoh, N., Kato, S., Sekine, K., Ohuchi, H.: FGF10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. *Development*, 129, 1533-1541, 2002.
16. Suzawa, M., Tamura, Y., Fukumoto, S., Miyazono, K., Fujita, T., Kato, S., Takeuchi, Y.: Stimulation of smad1 transcriptional activity by ras-extracellular signal-regulated kinase pathway: a possible mechanism for collagen-dependent osteoblastic differentiation. *J. Bone Miner. Res.*, 17, 240-248, 2002.
17. Lee, H. S., Miyauchi, K., Nagata, Y., Fukuda, R., Sasagawa, S., Endoh, H., Kato, S., Horiuchi, H., Takagi, M., Ohta, A.: Employment of the human estrogen receptor  $\beta$  ligand-binding domain and co-activator SRC1 nuclear receptor-binding domain for the construction of a yeast two-hybrid detection system for endocrine disrupters. *J. Biochem.*, 131, 399-405, 2002.

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

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

研究協力者 榎島 誠 大阪大学大学院生命機能研究科個体機能学 助教授

研究要旨

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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> とリトコール酸との間で異なることが明らかになった。

A. 研究目的

ビタミンD受容体 (VDR) の機能障害は、ビタミンD受容機構異常症の原因として重要である。我々の研究によって、活性型ビタミンD<sub>3</sub> の受容体として知られていたVDRが、二次胆汁酸であるリトコール酸にも応答することが明らかになった。本研究では、活性型ビタミンD<sub>3</sub> 及びリトコール酸のVDRに対する構造活性相関を解析することで、VDRの活性化機構を解明し、ビタミンD受容機構異常症の新規治療法の開発へ結びつけることを目的とする。

B. 研究方法

VDRと最も近いアミノ酸構造を持つ核内レセプター、プレグナンXレセプター (PXR) は、リトコール酸に反応するが活性型ビタミンD<sub>3</sub> には反応しない。各種動物のVDRとPXRのアミノ酸構造および報告された立体構造解析データを比較検討した。活性型ビタミンD<sub>3</sub> の結合

に重要な VDR のリガンド結合ポケットの構成アミノ酸を相当する PXR のアミノ酸またはアラニンに変化させたヒトVDR (S237M、S237A、S278V、S278A) 及びくる病患者で報告されているリガンド結合ポケットのアミノ酸変異体 (R274L、H305Q) を作成した。全長VDR、VP16キメラVDR及び GAL4 キメラVDRの変異体をそれぞれ構築し、全長VDRはCYP3A4のVDR結合配列を組み込んだルシフェラーゼレポーターと共に、GAL4キメラ VDR は GAL4 結合配列を組み込んだルシフェラーゼレポーターと共に、VP16キメラ VDR は GAL4 キメラコファクター及びGAL4反応性レポーターと共に、HEK293 細胞にコトランスフェクションし、活性型ビタミンD<sub>3</sub> 及びリトコール酸に対する応答性を比較・評価した。得られた結果に基づいて、リトコール酸の VDR リンガンド結合ポケットに対する結合様式をモデリングした。