

C. 研究結果

アミノ酸構造のアラインメント及び立体 C α 構造の比較において、VDRとPXRは極めて類似の構造であることを確認した。しかし、リガンド結合ポケットを構成するアミノ酸の側鎖の相違から、リガンド結合ポケットの立体構造に大きな相違があることが示された。リガンド結合ポケットを構成するアミノ酸の変異体を作成し、リガンドに対する反応性を検討した結果、次のことが明らかになった。

活性型ビタミンD3に対する反応性について。S278Aは正常 VDR とほぼ同様の活性があった。S237A、S278V及び H305Q は、弱い応答性を有していた。S237M及び R274L の活性はほとんど認められなかった。

リトコール酸に対する反応性について。S237M、S237Aは正常 VDR よりも若干弱い活性を有していた。S278A及び H305Q は非常に弱い活性を有していた。R274L及び S278V には、ほとんど活性が認められなかった。

詳細な濃度依存性の活性化の検討により、S278Vは活性型ビタミンD3に应答するがリトコール酸には应答しない変異体であり、S237Mはリトコール酸には应答するが活性型ビタミンD3にはほとんど应答しない変異体であることが明らかになった。

D. 考 察

VDRの変異体の解析によって、活性型ビタミンD3とリトコール酸のVDRリガンド結合ポケットへの結合様式に相違があることが明らかになった。つまり活性型ビタミンD3の結合様式とは異なる方法でVDRを活性化させることが可能であることを示しており、活性型ビタミンD3に対して抵抗性のビタミンD受容機構

異常症の新規治療法の開発が可能であることを示唆している。リトコール酸とVDRの構造活性相関のさらなる解析が期待される。

E. 結 論

活性型ビタミンD3とリトコール酸のVDRリガンド結合ポケットへの結合様式の相違が明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Makishima, M., Lu, T. T., Xie, W., Whitfield, G. K., Domoto, H., Evans, R. M., Haussler, M. R. and Mangelsdorf, D. J. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 296: 1313-1316, 2002.

2. 学会発表

1. Mangelsdorf, D. J., Makishima, M., Lu, T. T., Zhang, Y., Gauthier, K., Liverman, A. and Repa, J. Nuclear receptors as the body's lipid sensors. Keystone Symposia. Nuclear Receptor Superfamily, Snowbird, Utah, USA, April 13-19, 2002

2. Lu, T. T., Makishima, M., and Mangelsdorf, D. J. Nuclear receptor regulation of bile acid metabolism. Keystone Symposia. Nuclear Receptor Superfamily, Snowbird, Utah, USA, April 13-19, 2002

3. Lu, T. T., Makishima, M., and Mangelsdorf, D. J. Nuclear receptor regulation of bile acid metabolism. XVII International Bile Acid Meeting, Freiburg, Germany, May 30-June 1, 2002

4. 榎島誠：胆汁酸センサーとして働く核内レ

セプター群. 第25回日本分子生物学会年会、横
浜、2002年12月11日～14日

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

マス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

研究協力者 鬼形 和道 群馬大学医学部小児科

研究要旨

わが国におけるTSH受容体遺伝子の機能喪失型変異による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16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。このR450H変異は日本人に特有であり、いわゆる“創始者効果”とも考えられた。本変異を中心としたTSH受容体遺伝子解析は新生児マススクリーニングより発見されるクレチン症および高TSH血症の管理・治療指針に寄与するとともに、遺伝相談を行う上で有益な情報であると考えられた。

A. 研究目的

TSH受容体遺伝子の機能喪失型変異によるTSH不応症は常染色体劣性遺伝形式をとる疾患である。1995年に初めて報告されて以来、我々の報告した1家系を含めて現在までに13家系、計18の変異が報告されているが、ほとんどが新生児マススクリーニングにて発見されている。新生児マススクリーニングにおいてTSH高値により発見される疾患には、先天性甲状腺機能低下症（クレチン症）以外に持続的に高TSH血症を呈する一群が存在する。こうした対象においてTSH不応症は鑑別すべき重要な疾患である。今回、マススクリーニングで発見されたクレチン症および高TSH血症を対象にTSH受容体遺伝子の解析をおこない、わが国におけるTSH不応症について検討した。

B. 研究方法

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16家系を対象とした。インフォームドコンセントを取得した後に末梢血白血球よりゲノムDNAを抽出し、TSHR遺伝子の膜貫通部分を中心にPCRダイレクトシーケンス法による解析をおこなった。

C. 研究結果

わが国では3家系（1論文〈自験例〉：R450H/G498S；群馬，2学会報告：R450H/R450H；神奈川，R450H/R519G；茨城）のTSH不応症が報告されている。今回、新たに3家系（R450H/R450H；名古屋・群馬，R450H/R519G；熊本）のTSH受容体遺伝子異常症を同定したが、いずれの家系もR450H変異を有している点が興味深い。R450H/R450H

の3症例の表現型は甲状腺の軽度低形成を認めるも位置は正所性を示した。

D. 考 察

わが国のTSH受容体遺伝子異常症は、既報の3家系(R450H/G498S、R450H/R450H、R450H/R519G)と新たに同定した3家系(450H/R450H、450H/R450H、R450H/R519G)の計6家系である。いずれの家系においてもR450H変異を有していること、およびR450H変異をホモ接合に有する3家系の存在より、本変異がいわゆる“創始者効果”である可能性が示唆された。今後、全国的な調査を行なうとともに、遺伝型-表現型の関連、臨床像の特徴、および新たな変異に対しては機能解析を行なう予定である。

E. 結 論

TSH受容体遺伝子のR450H変異は日本人のTSH不応症6家系において共通であった。この変異に関する全国規模の検討は新生児マススクリーニングより発見されるクレチン症および高TSH血症の管理・治療指針に寄与するとともに、遺伝相談を行う上で有益な情報であると考えられた。

F. 研究発表(学会発表)

高TSH血症におけるTSH受容体遺伝子解析
—日本人におけるR450H変異の意義—
(第36日本小児内分泌学会 広島, 2002)
高TSH血症におけるTSH受容体遺伝子解析
—日本人におけるR450H変異の意義— (第45回日本甲状腺学会 浜松, 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

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

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

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た。バセドウ病におけるスギ花粉症合併率は40%を超えるため、本症の明らかな増悪因子になっているものと考えられる。今後Th2免疫反応の抑制が本症の新しい治療法の開発につながるものと考えられた。

A. 研究目的

バセドウ病は比較的長期の経過を取り、抗甲状腺剤治療により早期に寛解する例と、反対に再発・増加を繰り返す症例が多数存在する。本症の甲状腺機能亢進症は刺激型の抗 TSH 受容体抗体により引き起こされるものと考えられているが、何らかの増悪因子によりこの抗体産生増加が強まるため本症の増悪・再発が起こるものと推測される。しかし、これまで出産後の増悪を除いては本症における明らかな増悪因子はほとんど分かっていなかった。我々は以前よりバセドウ病患者にスギ花粉症が合併すると甲状腺機能亢進症の増悪・再発がしばしば見られること、さらにバセドウ病患者の血中好酸球は未治療時では健常人に比し有意に高いことを明らかにし、本症の病態が Th2 免疫反応優位の病態と密接に関係していることを指摘してきた。

今回はまずはじめにバセドウ病も含めた自己免疫性甲状腺疾患におけるスギ花粉症の合併頻度を調べた。次いで寛解ないしは寛解に近い状

態におけるバセドウ病患者において、スギ花粉症の症状が出現してからの自己抗体産生上昇の有無を検索し、さらにその機作として血中サイトカイン測定を行った。

B. 研究方法

バセドウ病におけるスギ花粉症の合併率をみるため、健常対象者766人、バセドウ病126人、無痛性甲状腺炎患者46人及び橋本病患者88人を対象に、スギ花粉症を有しているかどうかを調べた。スギ花粉症の診断は毎年スギ花粉の飛散する2月末から4月末にかけて、鼻炎などの花粉症特有の症状があるかどうかを問診にて確認した。

自己抗体産生の検索では、寛解ないし寛解に近いバセドウ病患者10例を対象に1999年または2000年8月からその後1年半にわたり経時的に甲状腺機能検査及び各種自己抗体、さらにスギ特異的 IgE 抗体価の変動を検索した。対象10例中5例はスギ花粉症を合併している患者で（A

グループ)、残り5例はスギ花粉症のない患者(Bグループ)を選んだ。抗TSHレセプター抗体はヒトリコンビナントTSHを用いた高感度測定法で行った。血中IL-5およびIL-13の測定は市販のELISAを用いた。

C. 研究結果

バセドウ病患者におけるスギ花粉症の合併率は、表1に示すようにバセドウ病患者で42.9%と高頻度に合併していることが判明した。一方無痛性甲状腺炎では13.0%と有意に合併率が低いことが分かった。

バセドウ病患者でスギ花粉症合併症例(Aグループ)では、花粉症症状出現とほぼ同時に末梢好酸球が増加したが、スギ花粉症を合併していない対象患者(Bグループ)では特に有意な変化は見られなかった。またAグループでは、スギ花粉症の症状出現後約3ヵ月後を頂値としてスギ花粉特異的IgEの一過性上昇が見られたが、Bグループでは全く陰性のままで変化は見られなかった(図1)。抗TSHレセプター抗体価の変動では、Aグループの5例中3例でスギ花粉発症後IgE上昇と類似して抗体価の上昇がみられたが、残り2例では変化が無かった。Bグループの対象患者では抗レセプター抗体価は

低いままで、特に有意な変化は見られなかった(図1)。抗TPO抗体はAグループで7・8月頃を

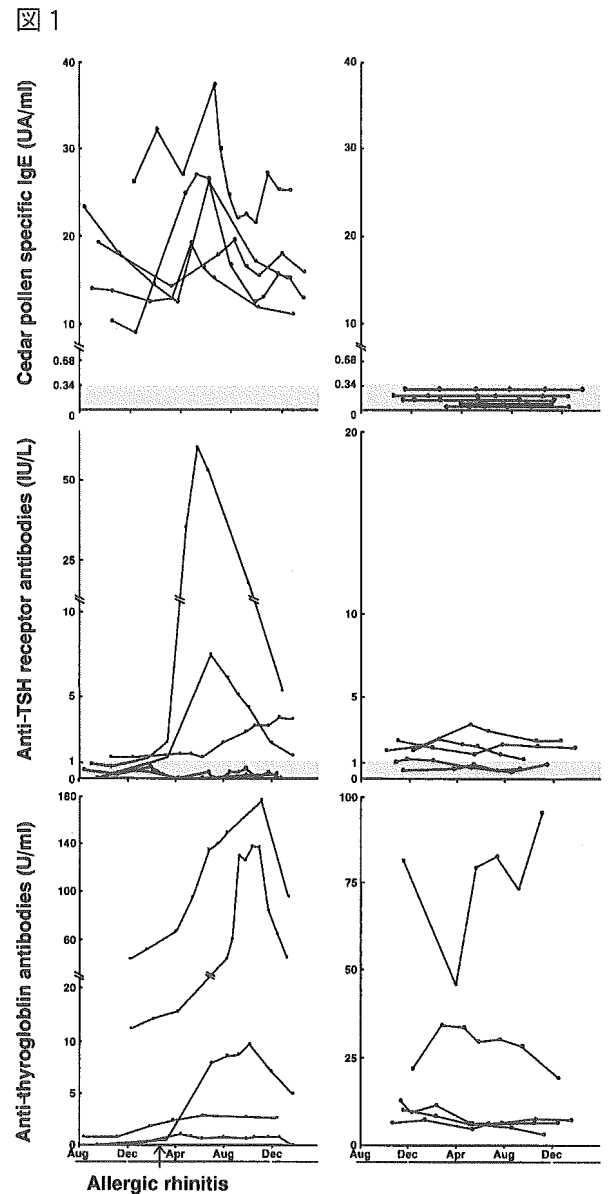


表1. 自己免疫性甲状腺疾患患者におけるスギ花粉症状の合併頻度

	人数	年齢	女/男	スギ花粉症	
				人数	%
バセドウ病	126	36.5±13.7	23/103	54	42.9*
無痛性甲状腺炎	46	37.0±14.0	5/41	6	13.0**
橋本病	88	45.5±14.3**	12/76	23	26.1
健常人	766	34.3±10.9	154/612	250	32.6

健常人に比しp<0.05(*)またはp<0.01(**)で有意差あり

頂値とする抗体価の一過性上昇がみられたが、Bグループでは有意な変化は見られなかった。抗サイログロブリン抗体もTPO抗体同様に花粉症発症後抗体価は漸増し、8月から11月に頂値を示す有意な上昇が見られたが、Bグループではこのような変化は見られなかった(図1)。これら自己抗体産生の機序を明らかにするため血中IL-5及びIL-13を測定したが、いずれも測定感度以下であった。

D. 考 察

Th2関連疾患の代表的存在であるスギ花粉症合併がバセドウ病患者において有意に高いことは、バセドウ病がTh2優位の免疫疾患であることを強く示唆する。一方、橋本病の経過中増悪して発症する無痛性甲状腺炎では合併の頻度が低いことから、Th1優位の病態と推測された。

個々の症例でスギ花粉症の症状出現前後における自己抗体の経時変化を検索したところ、IgE抗体のみならず抗TSH受容体抗体、抗TPO抗体及び抗サイログロブリン抗体いずれもスギ花粉合併患者で明らかな上昇を認めた。一方スギ花粉症を合併していない患者ではこのような特異な変化はみられなかったことから、スギ花粉症が自己抗体産生に大きな影響を及ぼしていることが判明した。

そのメカニズムとしてスギ花粉症によるアレルギー性鼻炎では局所的なTh2免疫反応が全身に影響し、生体全体がTh2優位になるものと推測された。残念ながら今回の検索ではサイトカインの有意の変動を捉えることが出来なかった。今後他の手法を用いてTh2関連サイトカイン上昇による産生増加を証明する必要がある。

バセドウ病患者では、従来疾病の軽快・増悪を繰り返すことが漫然と経験的に分かっていた

が、今回スギ花粉症は明らかな増悪トリガーになっていることが証明された。スギ花粉症の症状出現時期は幸いなことに決まっているので、今後このような増悪を何らかの手段で抑制することがバセドウ病を早く寛解に導く一つの方法となるものと考えられた。

E. 結 論

バセドウ病はスギ花粉症の合併率が高く、Th2優位の疾患と考えられた。またスギ花粉症の症状出現後数ヶ月して抗TSHレセプター抗体も含め抗甲状腺抗体価が上昇することが明らかにされた。

これらのことからバセドウ病においてはTh2優位性を抑制することが本症の新しい治療につながるものと推測された。

F. 研究報告

1. 論文発表

Hidaka Y, Amino N, Iwatani Y, Itoh E, Matsunaga M, Tamaki H: Recurrence of thyrotoxicosis after attack of allergic rhinitis in patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1667-1670, 1993

Hidaka Y, Masai T, Sumizaki H, Takeoka K, Tada H, Amino N: Onset of Graves' thyrotoxicosis after an attack of allergic rhinitis. *Thyroid* 6: 349-351, 1996

Izumi Y, Hidaka Y, Tada H, Takano T, Kashiwai T, Tatsumi K, Ichihara K, Amino N: Simple and practical parameters for differentiation between destruction-induced thyrotoxicosis and Graves' thyrotoxicosis. *Clin Endocrinol* 57: 51-58, 2002

Takeoka K, Hidaka Y, Hanada H, Nomura T,

Tanaka S, Takano T, Amino N: Increase in serum levels of autoantibodies after attack of seasonal allergic rhinitis in patients with Graves' disease. (Submitted)

Amino N, Hidaka Y, Takano T, Izumi Y, Tatsumi K, Nakata Y: Association of seasonal allergic rhinitis is high in Graves' disease and low in painless thyroiditis. (Submitted)

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

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

分担研究者 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。そこで今回、家族内に同病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。

A. 研究目的

バセドウ病は、TSH受容体自己抗体によって複数の遺伝因子と環境因子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。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。昨年度、家族内（第一度近親以内）に同病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、一次調査結果を報告したが、今年度は二次調査を集計し解析した。また、バセドウ病感受性遺伝子同定の研究として、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、複数のマイクロサテライト多型を用いた関連解析を行い、感受性遺伝子存在の確認を試みた。

B. 研究方法

家族発症バセドウ病の全国的調査は厚生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。家族性バセドウ病とは、「対象者本人がバセドウ病の診断基準を満たし、兄弟姉妹、実の親、実の子（第一度近親以内）の誰か1人以上にバセドウ病が発病している者」と

表1. 家族性バセドウ病の頻度と相対危険率

家族性バセドウ病	2,850
平成11年総人口	126,686,000
平成11年甲状腺中毒症	154,000
バセドウ病患者*	92,400-133,800
バセドウ病有病率	0.073-0.11%
家族性バセドウ病の占める割合	2.1-3.1%
相対危険率	19-42

*: バセドウ病を甲状腺中毒症の60-90%と仮定

定義した。全国2367施設の内科（内分泌代謝科、甲状腺科）、小児科、甲状腺専門病院に調査票を送付した。

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、同領域の6つのマイクロサテライト多型を用いて関連解析を行った。また、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った。

C. 研究結果

家族性バセドウ病の全国疫学調査の第一次調査では、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2850名(95%信頼区間2000~3500名)と推計された。これによって、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。また、平成11年度の日本における全人口と甲状腺中毒症患者数から、家族罹患の相対危険率は、約19-42倍と概算された(表1)。第二次調査は487例回収(回収率55%)された(表2)。家族性バセドウ病の臨床所見、検査、治

表2. 家族性バセドウ病のパターン

パターン		数
両親のみ	母	155
	父	43
	母と父	1
	小計	199
子供のみ	娘	49
	息子	10
	小計	59
同胞のみ*	姉妹例	124
	兄弟例	32
	姉妹・兄弟例	11
	小計	167
一卵性双生児	姉妹例	13
	兄弟例	4
	小計	17
混合型		45
総計		487

*: 一卵性双生児は除く

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。家族性バセドウ病患者の中で、第一度近親に橋本病患者を有するものは約8%あった。また、橋本病以外の自己免疫・アレルギー性疾患を合併するものは10%あった。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. 考 察

家族性バセドウ病を対象に全国疫学調査において、家族罹患の相対危険率は、約19-42倍と概算された。このことは、バセドウ病患者に家族集積があることを示し、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あることを意味している。家族性バセドウ病患者の中で、第一度近親に橋本病患者を有するものは約8%あり、バセドウ病と橋本病の発症に共通の基盤のあることを示唆している。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。

染色体5q23-33領域は、多数のサイトカイン遺伝子がクラスターを形成する部位であり、他の自己免疫疾患やアレルギー疾患の疾患感受性遺伝子座位として従来から興味をもたれてきた。バセドウ病に関しても全ゲノムスクリーニングによって同病の疾患感受性遺伝子候補座位

として白澤・笹月らによって見出された。今回、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ことは、同領域に疾患感受性遺伝子が存在することを示唆している。また、これらのマーカー間の距離がかなり離れていることから複数の疾患感受性が存在するかもしれない。さらに、バセドウ病の臨床所見に基づいてsubgroup（眼症、抗体価、甲状腺腫の大きさ、抗甲状腺剤に対する反応性）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ことは、バセドウ病の臨床所見に関連する遺伝子である可能性を示唆している。

E. 結 論

- ①. 家族性バセドウ病を対象に全国疫学調査より、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。
- ②. 5q23-33領域におけるバセドウ病疾患感受性遺伝子の存在が強く支持された。

F. 研究報告

1. 論文発表

- ① Akamizu T, Ozaki S, Hiratani H, Uesugi H, Sobajima J, Hataya Y, Kanamoto N, Saijo M, Hattori Y, Moriyama K, Ohmori K, Nakao K. Drug-induced neutropenia associated with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): possible involvement of complement in granulocyte cytotoxicity. Clin Exp Immunol. 127(1):92-8, 2002
- ② Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, Hataya Y, Shimatsu A,

Kuzuya H, Nakao K. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(11):5185-90, 2002

③ Iwakura H, Hosoda K, Doi R, Komoto I, Nishimura H, Son C, Fujikura J, Tomita T, Takaya K, Ogawa Y, Hayashi T, Inoue G, Akamizu T, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Imamura M, Nakao K. Ghrelin expression in islet cell tumors: augmented expression of ghrelin in a case of glucagonoma with multiple endocrine neoplasm type I. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(11):4885-8, 2002

④ Ariyasu H, Takaya K, Hosoda H, Iwakura H, Ebihara K, Mori K, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific RIA for the active form of ghrelin. *Endocrinology* 143(9):3341-50, 2002

⑤ Sellitti DF, Doi SQ, Akamizu T, Koshiyama H. No abstract available. Comment on “thyrotropin receptor expression in cardiac muscle tissue” . *J Clin Endocrinol Metab.* 87(2):946, 2002

⑥ Akamizu T. The genetics of thyroid complex diseases. Association of AITD with microsatellite markers for TSHR and CTLA-4 in Japanese patients. In: Akamizu T, Kasuga M and Davies TF (Eds.) *The Genetics of Complex Thyroid Diseases.* 123-136, 2002

⑦ Akamizu T, Hiratani H, Ikegami S, Rich SS, Bowden DW. Association study of autoimmune thyroid disease at 5q23-33 in Japanese patients. *J HumGenet*, 2003 (in press)

⑧ 赤水尚史：甲状腺 認定医・専門医の為の

内科学レビュー2002,酒井 紀、早川弘一、西崎統、小林祥泰、福井次矢監修162-166,2002

⑨ 服部喜之、赤水尚史：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。ホルモンと臨床 50：(2)101-108,2002

⑩ 赤水尚史、籾谷雄二、金本巨哲、高屋和彦、有安宏之：新規ペプチドグレリンの臨床応用に関する基礎的研究。財団法人成長科学協会研究年報 25, 2001

2. 学会発表

① Ariyasu H, Takaya K, Hosoda H, Iwakura H, Ebihara K, Mori K, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals The 84rd Annual Meeting of the Endocrine Society, (San Francisco U.S. A.) 6.19-22, 2002

② Saijo M, Akamizu T, Ikuta K, Ohmori K, Iida Y, Matsubara K, Matsuda Y, Honjo T, Nakao K. Transgenic Mice Bearing Anti-TSH Receptor Autoantibody Genes Derived from a Graves' Patient. The 84rd Annual Meeting of the Endocrine Society, (San Francisco U.S.A.) 6.19-22, 2002

③ Akamizu T, Hiratani H, Ikegami K, Hataya Y, Kanamoto N, Saijo M, Moriyama K, Shirasawa S, Sasazuki T, Nakao K. Further Association Study on Candidate Loci of Susceptible Genes of Autoimmune Thyroid Diseases in a Japanese Population. The 9th International Symposium on Molecular Thyroidology (Tottori, Japan) 4.6-7, 2002

④ 籾谷雄二、赤水尚史、有安宏之、金本巨哲、

西條美佐、森山賢治、高屋和彦、島津章、中尾一和。ACTH値が経過中に変動した視床下部性副腎皮質機能低下症の一例。第12回臨床内分泌代謝 Update,2002.3.9-10, 大阪

⑤ 赤水尚史、西條美佐、平谷仁美、中尾一和。バセドウ病の新規モデル動物作成及び同病感受性遺伝子の探索。第75回日本内分泌学会学術総会, 2002.6.28-30, 大阪

⑥ 有安宏之、高屋和彦、細田洋司、小川佳宏、籾谷雄二、金本巨哲、日高周次、海老原健、赤水尚史、児島将康、寒川賢治、中尾一和。肥満モデル動物における血漿グレリン濃度と血糖の変化によるグレリン分泌調節の検討。第75回日本内分泌学会学術総会, 2002.6.28-30, 大阪

⑦ 西條美佐、赤水尚史、籾谷雄二、金本巨哲、森山賢治、大森勝之、生田宏一、飯田晴彦、松田洋一、本庶 佑、中尾一和。バセドウ病患者由来抗TSHレセプター抗体遺伝子トランスジェニックマウスにおける甲状腺機能亢進症の発症とその解析。第75回日本内分泌学会学術総会, 2002.6.28-30, 大阪

⑧ 平谷仁美、赤水尚史、池上賢、籾谷雄二、金本巨哲、西條美佐、森山賢治、Donald Bowden、白澤専二、笹月健彦、中尾一和。5q23-33領域における日本人自己免疫性甲状腺疾患感受性とバセドウ病臨床像に関する関連解析。第75回日本内分泌学会学術総会, 2002.6.28-30, 大阪

⑨ 森山賢治、田上哲也、赤水尚史、西條美佐、金本巨哲、籾谷雄二、臼井健、島津章、中尾一和。内分泌攪乱化学物質が甲状腺ホルモン作用に及ぼす攪乱作用の評価法確率の試み。第75回日本内分泌学会学術総会, 2002.6.28-30, 大阪

⑩ 西條美佐、生田宏一、大森勝之、本庶 佑、中尾一和、赤水尚史。ヒト由来抗TSHレセプター抗体遺伝子トランスジェニックマウスの甲状腺機能亢進と機能解析。第45回日本甲状腺学会, 2002.11.20-22, 浜松

⑪ バセドウ病の病因・病態はどこまでわかったか。第20回内分泌・代謝セミナー（日本内分泌学会主催）。2002.8.22-23, 淡路

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

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

研究協力者 遠藤 登代志 山梨大学医学部第3内科 講師

研究要旨

バセドウ眼症はADLの低下を来たす難治な随伴症であるが、サイトロピンレセプター(TSHR)が甲状腺以外の組織で発現していることが判明し、TSHR抗体が主因であると考えられるようになってきた。従って、本症の発症・治療の解明には甲状腺・非甲状腺細胞でのTSHR発現機構の相違を明らかにする事が重要であり、今回、脂肪細胞でのTSHR遺伝子プロモーター活性の調節機構を甲状腺細胞のそれと比較した。その結果、①甲状腺ではcAMP responsive element(CRE)より上流の配列が必須であるが、脂肪細胞ではCREより下流の配列の重要性が確認された。②CREより下流の配列には脂肪細胞の分化に伴いDNA結合能が増加し、転写を促進させる因子が存在する。③これら転写因子の結合配列は脂肪細胞が未分化な状態ではメチル化されており、分化に伴い脱メチル化される。④これらの転写因子の1つはGA binding proteinであることが推定された。以上の結果より、脂肪細胞の分化がTSHRの発現に関与し、バセドウ眼症の治療の観点よりも、さらに詳細な検討が必要と考えられる。

A. 研究目的

バセドウ眼症は重症化すると眼痛・副視などを来し日常生活に支障をきたすが、その成因は不明であり、有効な治療法も確立されていない。バセドウ病での甲状腺機能亢進症は刺激型のTSHR抗体が惹起することが確立されているが、我々はTSHRが脂肪細胞などの甲状腺外組織に発現していることを明らかにしてきたが、その後胸腺細胞、リンパ球などにも発現していることも報告され、前けい骨部粘液水腫など眼症以外の随伴症の発症にもTSHR抗体が中心的役割を果たしていると推定されている。

従って、バセドウ眼症などの病態・新たな治療法の確立のためには、これら甲状腺外TSHRの発現機構を分子レベルで解明し、その調節機

序を明らかにすることが必要である。

そこで、本研究ではTSHR遺伝子プロモーターの甲状腺・非甲状腺細胞での相違、調節機構の差異、および関与する転写因子の解明を目的とする。

B. 研究方法

(1)TSHR遺伝子プロモーター活性の測定

ラットTSHR遺伝子はKohnらに供与されたものを使用し、-1707bp(翻訳開始点を+1とする)より-1までをpGL2-Catに結合し(pTR-CAT5'-1707)、さらに5'端よりの欠失ミュータントを作成した。

(2)甲状腺細胞、脂肪細胞

甲状腺細胞はFRTL-5を用い、insulin,

somatostatin, hydrocortisone, transferin, glycyl-L-lysine, throtropin存在下で培養した。脂肪細胞は3T3-L1細胞を前脂肪細胞として用い、insulin, dexamethazone, dibutyl cAMP存在下に分化を誘導した。

(3)その他

DNAのメチル化はFormmerらの方法に従い、sodium bisulfite存在下にCpG methylation patternを測定した。マウスGA binding protein α , 及び $\beta 2$ cDNAはNegishiらより入手したものをそれぞれpGEX-2T ないしpcDNA3にligateし、recombinant proteinを作製し、またmammarian expression vectorとして用いた。

C. 結 果

(1)甲状腺細胞、脂肪細胞での最小プロモーター領域の決定

pTR-CAT5' -1707, -1190, -907, -638, -419, -220, -199, -177; -146, -90のコンストラクトをFRTL-5、3T3-L1細胞に導入後、そのCAT活性を測定したところ、前者では-199bpより下流の配列が最大活性に必要であったが、分化誘導後の3T3-L1細胞では-146bpより下流の配列で最大活性が得られた。

(2)脂肪細胞での最小プロモーター内の機能領域の検討

-146bpより-90bpの配列に種々の変異を挿入し、その活性を同様に測定すると、-146bp~-127bpと-122bp~-106bpの2つの領域が脂肪細胞でのプロモーター活性に重要であることが示唆された。前者はCRE領域であり、後者はTTCCT配列を中心とする領域(近位領域)であった。また、後者領域に相当する合成プローベを作成しgel mobility-shift assayを行った結果、この領域に分化でDNA結合能が増加する核蛋

白の存在が複数観察された。

(3)DANメチル化とTSHRプロモーター活性
-146bp~-106bpの領域のCpG methylation patternを測定したところ、未分化な状態では80%以上メチル化を受けていたが、分化後はほとんど脱メチル化されていた。さらにメチル基導入合成プローベを用いて同様にgel mobility-shift assayを行ったところ、DNA/蛋白複合体の形成は観察されなかった。

(4)GA binding proteinの関与

TTCCT配列は転写因子Etsファミリーの結合配列であり、さらに脱メチル化によって結合活性を増加させる核蛋白として、GA binding protein(GABP)が知られている。そこでrecombinant GABP α 及び $\beta 2$ を用いてgel mobility-shift assayをおこなうと前述プローベとDNA/蛋白複合体の形成し、さらにpcDNA/GABP α 及び $\beta 2$ をpTR-CAT5' -146と共に分化型細胞に導入したところ、プロモーター活性は5~6倍その活性が増加し、GABPが転写促進に関与していることが示唆された。

D. 考 察

今回、脂肪細胞と甲状腺細胞ではTSHR遺伝子発現機構において、そのpromoter usageに相違のある事が判明し、さらに脂肪細胞では分化に伴い転写が促進されその機序の1つとしてGABPが関与することも明らかとなった。しかし、gel mobility-shift assayの結果は分化に伴い近位領域に結合する核蛋白は複数存在し、これらの中には脂肪細胞特異蛋白と考えられるものもあり、脂肪細胞でのTSHR遺伝子の特異的発現にはより重要な機能を果たしていることも想定される。今後、これらBABP以外の因子の同定しその性質を明らかにすることも、甲状腺

以外でのTSHRの発現機構の解明には重要と考えられる。

一方、我々は脂肪細胞の分化には甲状腺ホルモンが促進的に作用し、細胞内cAMPは抑制的に働くことを明らかにして来たが、これらはバセドウ病の臨床経過に関与し、眼症の治療を考える上でも重要と思われる。今後、甲状腺ホルモンやcAMPのTSHR遺伝子プロモーター近位領域の機能に及ぼす分子機構の解明も必要であり、これらの要因のバセドウ眼症に及ぼす影響を観察しうる in vivo 測定系の確立も急務と考えられる。

E. 結 論

TSHR遺伝子のCRE下流の近位領域は脂肪細胞でのTSHRの発現に重要な領域であり、この部位の詳細な検討はバセドウ眼症の病態解明・

新たな治療法の確立に寄与すると考えられた。

F. 研究発表

1 Ikeda, M., Taki, K., Nukui, I., Endo, T. Onaya, T. Thyroid hormone increases peroxisome-activated receptor gene expression by potentiation of CCAAT enhancer binding protein-mediated transcriptional activation. Mol Endocrinol. submitted

2 Endo, T., Shimura, H., Yokomori, N., Onaya, T. Regulation of thyrotropin receptor gene expression by GA binding protein.in 3T3-L1 adipocytes. Mol. Endocrinol. submitted

3 遠藤登代志 バセドウ病の発症機構と薬物療法・管理の基本戦略 Medical Practice, 19,196-202, 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

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

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

研究要旨

我々は、甲状腺ホルモン不応症の発症機序に関し、ヒトの β 型甲状腺ホルモン受容体(TR)遺伝子の異常を報告すると共に、種々の臨床的及びノックアウトマウスを用いた研究を行ってきた。本研究では、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リン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。ZAKI-4遺伝子は第6染色体の短腕に存在し、7つのエクソンから構成されている。Alternative initiationとalternative splicingにより3つの transcripts が産生され、2つのアミノ端の異なるアイソフォーム(α , β)が翻訳される。 α , β 共にカルシニューリンと結合し、その活性を抑制する。 α アイソフォームの発現のみが甲状腺ホルモンにより増加し、この発現増加は内因性カルシニューリン活性の低下を伴っていた。甲状腺ホルモン依存性の α アイソフォームの発現増加は、アデノウイルスベクターを用いて、ドミナントネガティブTRを発現することにより完全に抑制され、甲状腺ホルモンが受容体を介して α アイソフォームの発現を調節していることが示された。カルシニューリンは生体に広く分布し、T細胞の活性化の他、神経の可塑性に関わる長期増強(long-term potentiation=LTP)や長期抑制(long-term depression=LTD)を制御していることや神経細胞のアポトーシス、心筋およびあるいは骨格筋の肥大などに関与していることが知られている。従って、甲状腺ホルモンによるZAKI-4 α の発現調節は、内因性カルシニューリン活性の調節を介し、種々の生体機能調節に関わっていると考えられる。

A. 研究目的

我々は、mRAN differential display法を用い、ヒト皮膚線維芽細胞より甲状腺ホルモン応答性遺伝子としてZAKI-4 cDNAをクローニングした(J Biol Chem., 271: 14567, 1996)。近年、ZAKI-4に相同性を有する一群の遺伝子が同定され、ヒトではDSCR1(Down's syndrome candidate region)、ZAKI-4(DSCR1L1)、DSCR1L2が報告されている。これらの遺伝子

産物のカルボキシル端がよく保存され、DSCR1はこのC端を介してカルシニューリンと結合し、その活性を抑制することが報告された。しかしながら、ZAKI-4遺伝子産物の機能に関しては報告されていない。

カルシニューリンはカルシウム-カルモジュリンにより活性化されるセリン・スレオニン脱リン酸化酵素であり、酵素活性を持つAサブユニットと調節サブユニットBからなっている。

1991年、免疫抑制剤であるシクロスポリンA (CsA)とFK506が、それぞれシクロフィリンA (cyclophilin A)、FK506-binding protein (FKBP)と結合し、カルシニューリンと複合体を形成することによりその活性を抑制することが明らかにされた。一方、カルシニューリンは転写因子NF-AT (nuclear factor of activated T cell) を脱リン酸化により活性化し、T細胞を活性化することも明らかにされ、免疫抑制剤は、NF-ATの活性化を抑制し、その作用を発揮することが示された。カルシニューリンは生体に広く分布し、T細胞の活性化の他、神経の可塑性に関わる長期増強 (long-term potentiation=LTP) や長期抑制 (long-term depression=LTD) を制御していることや神経細胞のアポトーシス、心筋あるいは骨格筋の肥大にも関与していることも明らかにされつつある。従って、内因性カルシニューリン抑制蛋白は、生体の種々の臓器の機能調節に重要な役割を果たしていると考えられる。甲状腺ホルモンによるZAKI-4遺伝子の発現調節機序の解明は、このホルモンによるカルシニューリンを介した新たな作用を明らかにすると共に、甲状腺ホルモン不応症の病態解明に役立つと考えられる。

本研究では、ヒトZAKI-4遺伝子の構造を明らかにすると共に、その遺伝子産物の機能を解析し、アイソフォーム特異的組織発現分布と甲状腺ホルモンによる発現調節機序を検討した。

B. 研究方法

1. ZAKI-4遺伝子転写産物の解析

ZAKI-4遺伝子が脳に高発現していることからグリオーマ摘出時に得られた正常脳組織よりRNAを抽出し、RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)により転写産物を解析した。

RACEに用いられたプライマーは図1に示した。解析の結果得られた配列をBlast Searchし、ゲノム構造を明らかにした。

2. ZAKI-4遺伝子座の決定

FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) 法を用い、遺伝子座を決定した。

3. ZAKI-4 mRNAの発現部位の検討

転写産物の解析により3つのtranscriptが確認されたため、各々のtranscriptの発現を種々の組織から抽出したRNAを用いたNorthern blot法により検討した。

4. ZAKI-4遺伝子産物の機能解析

ZAKI-4遺伝子から2つのアイソフォームが産生されることが明らかにされたため、各々のアイソフォームにカルシニューリン抑制作用があるか否かを検討した。カルシニューリンとの結合アイソフォームとの結合は翻訳産物の免疫沈降法を用いて検討した。また、Constitutively active calcineurin (Δ CN)を発現するプラスミドとZAKI-4 α あるいは ZAKI-4 β をコトランスフェクトし、カルシニューリン活性を測定した。更に、IL-2遺伝子の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したreporter geneを用いた検討を行った。ヒトT細胞由来のJurkat細胞に導入このreporter geneをすると、カルシウム-カルモジュリンシグナリン系の活性化によりルシフェラーゼ活性が上昇する。この上昇に対して、ZAKI-4 α あるいは β を発現するプラスミドの導入がどのような影響を与えるかを検討した。

5. ZAKI-4遺伝子発現の調節

ZAKI-4遺伝子から産生される2つのアイソフォームが、甲状腺ホルモンによりどのように調節されるかをNorthern blot法およびreal time PCR法により検討した。

更に、甲状腺ホルモンによる調節が β 型甲状腺ホルモン受容体(TR β)を介しているか否かを検討するため、正常TR β および強いドミナントネガティブ作用を発揮するTRG345R (TR β の345番目のグリシンがアルギニンに置換されたmutant)を発現するアデノウイルスベクターを構築し、T3作用にこれら受容体の過剰発現がどのように影響するかを検討した。

リガンド非依存性に転写活性化能をもつTRVP16 (TR β のリガンド結合ドメインを単純ヘルペスウイルスの転写活性化ドメインVP16と置換)を構築し、アデノウイルスベクターに挿入した。TRVP16がリガンド非依存性に甲状腺応答配列(TRE)を介して転写活性化することは、TRE (3 x Pal) reporter gene assayにより確認した。

C. 結果

1. ZAKI-4 転写産物の解析

脳組織から得られたRNAを鋳型として5' - RACE (Rapid amplification of cDNA end) および3' - RACEを行った。

図1に示す如く、脳組織には3種類の転写産物が存在し、 α 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ と名付けた。我々は、ヒト皮膚線維芽細胞より甲状腺ホルモン応答性遺伝子としてZAKI-4 cDNAをクローニングしたが (J Biol Chem., 271: 14567, 1996)、このcDNAは、今回明らかにした α アイソフォームに相当していた。図中灰色のボックスに示したように、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ は、5' - 端を事にするものの、

coding sequenceは同一であった。 α アイソフォームのN-端のcoding sequenceは、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ と異なるが、C-端およびnon-coding sequenceは同一であった。

2. ZAKI-4遺伝子構造と局在する染色体

α 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ の塩基配列のホモロジー解析の結果、5つの重複するゲノムクローンが検出され、ZAKI-4遺伝子の構造が明らかにされた(図2)。

単一のZAKI-4遺伝子は7つのエクソンより構成され、 α 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ の3つの産物を転写すると考えられる(図3)。これらの転写産物は5' - 端が異り、一つの遺伝子から、転写開始点とスプライシングの差異により生成する。図3に示したように、 $\beta 1$ mRNAは、エクソン1, 3, 5~7から構成され、 $\beta 2$ は、エクソン2, 3, 5~7から構成させる。一方、 α mRNAはエクソン4, 5~7から構成される。翻訳開始コドンは、エクソン3と4に存在し、終止コドンは、エクソン7に存在する。従って、 $\beta 1$ と $\beta 2$ mRNAsは同一の蛋白産物、ZAKI-4 β アイソフォームを生成し、 α mRNAは、 β と同一のC端を持つがN端が全く異なるアイソフォーム α を生成する。

ZAKI-4 α cDNAを用いたFISHにより、この遺伝子が第6染色体短腕に存在することが示された(図4)。

3. ZAKI-4 転写産物の発現解析

各転写産物に特異的なエクソン (β : エクソン3, α : エクソン4) をプローベをとして、ヒト組織における発現を検討した(図5)。

α mRNAは主に脳に、 β mRNAは種々の臓器に発現が認められたが、特に脳、心臓、筋肉、

と腎臓に多く発現していた。 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ mRNAに特異的なオリゴヌクレオチドを用いた検討では、両者の発現パターンがほぼ同様であることが示された。ZAKI-4 α と β の発現分布の差異はこれらのアイソフォームの発現が組織特異的に調節されることを示唆している。

4. ZAKI-4アイソフォームとカルシニューリンの結合

ZAKI-4遺伝子産物の機能は未だ知られていないが、最近、DSCR1がyeast two hybrid systemを用いた検討により、カルシニューリンと結合することが報告された (Hum Mol Genet 9, 1681, 2000)。ZAKI-4とDSCR1のC端のアミノ酸配列は高い相同性を示すため、各ZAKI-4アイソフォームとカルシニューリンとの結合を検討した。

ZAKI-4 α 、 β 及び α と β 共通のC端をコードする塩基をpGEM-T Easy プラスミドにクローニングし、無細胞網状赤血球翻訳系を用いて、 ^{35}S -標識メチオニンの存在下で蛋白を合成した。同様にカルシニューリンサブユニットAも翻訳した。図6に示したように、これらの蛋白はSDS-PAGEで単一のバンドとして確認された。また、抗ZAKI-4抗体によってZAKI-4 α 、 β 及びそのC端蛋白は免疫沈殿されたが (レーン3~5)、カルシニューリンサブユニットAは沈殿されなかった (レーン2)。ZAKI-4 α 、 β 及びC端の蛋白をそれぞれカルシニューリンサブユニットAと共に翻訳し、ZAKI-4抗体による免疫沈殿を行った。その結果、ZAKI-4 α 、 β 及びC端の蛋白だけではなく、カルシニューリンサブユニットAもZAKI-4抗体によって免疫沈殿された (レーン6~8)。従って、ZAKI-4 α と β は共にそのC端を介してカルシニューリンサブユニット

Aと結合し、N端アミノ酸配列の差異はこの結合に影響を与えなかった。カルシニューリンサブユニットAは酵素活性を持つため、この分子間の結合が酵素活性にどんな影響を与えるか、次のようにreporter gene assayを用いて検討した。

5. ZAKI-4アイソフォームによるカルシニューリン活性の調節

カルシニューリンはセリン・スレオニン脱リン酸化酵素であり、T細胞の転写因子NF-AT (nuclear factor of activated T cell)を活性化することにより、サイトカイン、IL-2などの発現を調節することはよく知られている。図7Aに模式的に示したように、T細胞にionomycinを加え、カルシウム-カルモジュリンシグナリン系を活性化し、カルシニューリンを活性化すると、その基質NF-ATが脱リン酸化され、その核内移行が促進される。PMAによって活性化されるAP-1はNF-ATと共にIL-2プロモーター領域に結合して、IL-2遺伝子の転写を活性化する。免疫抑制剤サイクロスポリンA (CsA) は、その結合蛋白と複合体を形成し、カルシニューリンを抑制し、NF-ATを介するIL-2遺伝子の活性化を抑制する。

我々は、IL-2プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したreporter geneを作成し、上述のZAKI-4 α 、 β 及びC端をcodingするcDNAをpShuttleにクローニングし、それぞれIL-2 reporter geneと共にelectroporation法によってヒトT細胞由来のJurkat細胞に導入した。導入24時間後にionomycinとPMA、或いはCsAを添加し、更に24時間後にルシフェラーゼの活性を測定した。ZAKI-4 α 、 β 或いはC端を強制発現させた細胞のルシフェラーゼ活性はCsA