

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

ホルモン受容機構異常に関する調査研究
平成15年度 研究報告書

主任研究者 清野 佳紀

平成16年3月

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5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、昨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、ヒタミンDの受容機構に関する研究成果ではヒタミン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、家族性ハセト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。

また、本研究班の研究の中で一般臨床家にとって大きな意味を持つ「低カルシウム血症の診断の手引き」も昨年度までに大幅な改正を行い、多くの臨床家に喜ばれています。低カルシウム血症の病因が1年に数例ずつの割合で明らかにされている現状では、この「診断の手引き」を医学の進歩に遅れないように改正していくことには非常に重要な意義があります。最終年度の報告に向けてこの点を努力していきたいと思えます。

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15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16年3月

清野佳紀

目 次

I	序 文	
II	平成15年度総括研究報告	1
	大阪厚生年金病院長 3 任研究者	清野 佳紀
III	分担研究報告	
1	高Ca尿症を呈した偽性副甲状腺機能低下症Ibの一例における Ca 感知受容体変異と vitamin D ₃ 投与後の尿中Ca排泄量の推移	7
	東北大学医学部分子血管病態学	水梨 一利
2	副甲状腺機能異常症の病因 病態解明	9
	千葉大学大学院医学研究院小児病態学	皆川 貞規
3	副甲状腺ホルモンの骨形成促進作用およびその低下機序の解明に関する研究	14
	徳島大学大学院医学研究科生体情報内科学	松本 俊夫
4	副甲状腺と胃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	19
	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
5	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
6	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
7	ビタミンD受容体の骨組織における高次機能に関する研究	28
	東京大学分子細胞生物学研究所	加藤 茂明
8	ビタミンD受容機構異常症の分子生物学的病態解析と治療法の開発	33
	大阪大学大学院生命機能研究科個体機能学	植島 誠

9	血清カルノウム維持機構ーヒタミンD受容体及びカルノウム感知受容体に関する研究 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	36
		大園 恵一
10	ハセト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 ーハセトウ病眼症とサイトカイン遺伝子多型ー	39
	久留木大学医学部内分泌代謝内科	広松 雄治
11	GnRH 誘導体によるハセトウ病および無痛性甲状腺炎の発症について 大阪大学大学院医学系研究科生体情報医学	43
		網野 信行
12	TSH 受容体抗体病の遺伝素因解析と疾患感受性遺伝子の同定 京都大学医学部附属病院 探索医療センター	47
		赤水 尚史
13	日本人の TSH 受容体遺伝子異常症における遺伝子型と表現型との関連について ー新たな遺伝子変異の同定とヘテロ接合変異を有する個体の甲状腺機能ー	52
	群馬大学大学院医学系研究科小児生体防御学分野	鬼形 和道
14	in vivo における TSH レセプター プロモーター活性の検討 山梨大学大学院医学工学総合研究部	54
		遠藤登代志
15	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 浜松医科大学第二内科	57
		中村 浩淑
16	甲状腺ホルモン不応症の分子機構 群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学	61
		森 昌朋
17	甲状腺ホルモン受容体を介した non-genomic action と甲状腺ホルモン不応症 カルニューリン阻害蛋白 ZAKI - 4 α の発現調節	64
	名古屋大学環境医学研究所内分泌 代謝分野	妹尾 久雄

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（難治性疾患克服研究事業）
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 大阪厚生年金病院長

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、副甲状腺疾患では偽性副甲状腺機能低下症Ib型の原因の解明、カルシウム感知受容体の機能解析、ビタミンD受容体の機能解析、新規ビタミンD受容体リカントの同定、新規のリン調節因子の同定、甲状腺疾患ではハセトウ病発症の新たな誘導因子の発見、ハセトウ病性眼症発症機序の解析、ハセトウ病の疾患感受性決定因子同定のための家族性ハセトウ病のSNPなどによる連鎖解析、TSH受容体異常症の症状の解析、甲状腺ホルモン不応症の病態解析などを行った。

分担研究者

妹尾 久雄	名古屋大学環境医学研究所分子細胞適応部門教授
網野 信行	大阪大学大学院医学系研究科教授
松本 俊夫	徳島大学大学院医学研究科教授
加藤 茂明	東京大学分子細胞生物学研究所教授
中村 浩淑	浜松医科大学第2内科教授
森 昌朋	群馬大学大学院医学系研究科教授
赤水 尚史	京都大学医学部附属病院探検医療センター助教授
皆川 真規	千葉大学大学院医学研究院助手
田中 弘之	岡山大学大学院医歯学総合研究科助教授
大藪 忠一	大阪大学大学院医学系研究科教授
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か、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たまた不十分である。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か

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。各々の subgroup においては、疾患系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

皆川らは腎臓特異的 PTH 不応症のメカニズムについて検討した。PHP1b では、GNAS1 遺伝子 1 塩基 (NESP55 XL α 1A) のメチル化の異常が認められ、XL α 症例による差があったか、XL α s 領域の CpG メチル化状態の詳細な検討では甲状特異的メチル化パターンはなく、この領域の CpG メチル化のアリルとしての連続性が喪失していることから、この領域のメチル化異常は他の領域のエピジェネティックな変化によって二次的に生じたものであることが示唆された。また、本年報告された家族性 PHP1b における STX16 領域の 3kb 欠失は本邦家族性 PHP-Ib において認めたが、孤発性 PHP-Ib 14例ではみとめなかった。

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、杉本らは原発性副甲状腺機能亢進症 (pHPT) 例の副甲状腺においても続発性と同様に CaSR 発現と増殖能は高い負の相関を示し、CaSR が副甲状腺細胞増殖の調節に関与することを示した。また骨芽細胞に CaSR のアンチセンス (AS) やトミナントネカティブ (DN) ヘクターを導入した検討で、ALP 活性、osteocalcin 発現、および石灰化能が AS 株、DN 株で低下することを示し、CaSR の役割は骨芽細胞の分化段階で異なり、主に分化後期に作用することによって石灰化能に関与することを示した。

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か、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 80mg/dl 以上では全例で、70mg/dl 以上でも多くの場合で高 Ca 尿症を呈した。血清 Ca 値が 60mg/dl 以下では、テタニーが出現したため、血清 Ca 値を 60mg/dl~70mg/dl に維持するのが適当であるとの結論に至った。また、水梨は Ca の尿中排泄量の増加を伴った偽性副甲状腺機能低下症 Ib の症例に Ca 感知受容体 (CaR) の codon592 に heterozygous な missense mutation (Asn→Ser) を合併した症例を詳細に検討した。本 mutant CaR の EC50 は wild-type の 3.2mM に対して 2.4mM と低下しており、1 α -OH-D₃(1 μ g/day) 投与後、

尿中はCaは一過性に増加したのち、血清Caの正常化とともに尿中Caも正常化することを示した。

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の同定をおこなった。In vitro nuclear transport assay では、VDRはリカント非依存的に核に局在することか確かめられ、DNA結合領域の核移行シグナル(NLS)が重要であることが示された。しかし、DNA結合領域を欠くVDRを用いた場合にはヒン部位にあるNLSがリカント依存的に機能することか判明した。また、importin- β ではなく、importin-4がVDRと相互作用することが示唆された。
- ② ビタミンD受容体(VDR)のリカント受容機構を解明するために、活性化型ビタミンD₃と最近生理的リカントとして同定されたリトコール酸のVDRに対する結合様式の相違を解析した。リカント選択的なVDR変異体を作成し、活性化型ビタミンD₃及びリトコール酸に相互作用するVDRリカント結合ポケットのアミノ酸の違いを明らかにした。VDRのリカント結合ポケット変異体への効果の解析によってリトコール酸代謝産物3-ケトコラン酸の結合様式を明らかにした。さらにリトコール酸よりも30倍以上強くVDRを活性化する誘導体リトコール酸アセテートを見出した。
- ③ 血中の電解質の異常が明らかでない

VDRKOマウスの骨発生過程を骨格標本を作成し検討したところVDRKOでは骨の発生が野生型に比し早期に進行することか判明し、ビタミンDは骨形成を負に制御していることか明らかとなった。

さらに、骨芽細胞特異的VDRKOマウスでも皮質骨の増大と海綿骨の減少が観察された。

- ④ 新規のリソリン因子Fibroblast growth factor(FGF)-23はArg179とSer180の間でプロセソニックを受ける。そこでプロセソニックを受けていない全長FGF-23のみを測定するELISAと、全長FGF-23と共にプロセソニックを受けたC端フラグメントも測定すると考えられるELISAにより、血中FGF-23濃度を測定した。X染色体優性低リン血症性くる病/骨軟化症(XLH)患者の血中FGF-23は、どちらのELISAでも高値を示すものか多かった。しかしこれらの測定値の比は、XLH患者と腫瘍性くる病/骨軟化症患者で異なることから、XLH患者においてFGF-23蛋白のプロセソニックには異常は存在しないこと、FGF-23はXLHの発症にも重要な役割を果たしていることか考えられた。
- ⑥ PTHの骨に対する直接作用の分子機構については、PTHがERK依存性にAP-1を誘導する一方BMP非依存性にSmad1/5を活性化し、両者の協調作用によりinterleukin-11転写を誘導すること、その結果骨芽細胞の分化を促進するとともにアポトーシスをも抑制す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 異常TRが甲状腺自身にも影響している可

能性を解明するために、強いトミナントネカティブ作用を発揮する異常 TR α 1(α F397X)あるいは β 1(β F451X)を甲状腺に特異的に発現したトランスジェニック (Tg) マウスの作成を試みた。このマウスの検討から異常 TR のトミナントネカティブ作用は、甲状腺濾胞形成、甲状腺ホルモン合成に抑制的に働くと考えられ、甲状腺不応症でも異常 TR が甲状腺機能に障害的に作用している可能性が示された。

- ② ヒト皮膚線維芽細胞を用いて甲状腺ホルモンによる ZAKI-4 α の増加か、mTOR (mammalian target of rapamycin, a serine-threonine kinase) の特異的阻害剤 rapamycin により阻害されることを明らかにし、更に1) 甲状腺ホルモンが mTOR の磷酸化を介して活性化すること、2) この活性化は蛋白合成阻害剤による抑制を受けないこと、3) 活性化が極めて短時間に誘導されることを明らかにした。この結果は、甲状腺ホルモンによる mTOR の活性化が non-genomic action であることを示すか他の実験より、この過程には TR が必須であり、甲状腺ホルモン不応症の病態には mTOR の活性化の異常が関与している可能性が示された。
- ③ 甲状腺ホルモン不応症の本態である転写抑制系の障害において、クロマチン構造変化が果たす役割を検討した。転写抑制系において甲状腺ホルモン添加によりヒストン脱アセチル化酵素の結合とヒストンの脱アセチル化が生じてクロマチン構造が変化し転写が抑制された。変異甲状腺ホルモン受容体存在下ではヒストンの脱アセチル化によるクロマチン構造変化が障害されることか判明した。
- ④ TSH 不応症について検討した。計 7 例の

検討から、新生児マススクリーニング (MS) 時の TSH 値は126~382 mU/L、治療開始月齢 1~32 か月、ホルモン補充量 3~5 mcg/体重 (kg)、TRH に対する TSH 過剰遷延反応、甲状腺は正所性、XP 上大腿骨遠位端に骨核あり、全例とも明らかな機能低下症状を認めなかった。いずれの症例も成長障害はなかった。変異をヘテロ接合に有する個体の表現型の検討では、G498S 変異を有する個体に軽度 TSH 高値を認めたのみであり、検討した症例の最終身長は標準内であった。なお、新たに同定した V473I 変異受容体は軽度の機能障害を示した。

TSH 受容体に対する自己抗体が関与するハセトウ病や甲状腺機能低下症に関する結果

- ① GnRH 誘導体により抗 TSH 受容体抗体産生が増加し、ハセトウ病が発症することを明らかにした。
- ② ハセトウ病の随伴症である眼症や前頸骨部粘液水腫について、その成因に TSHR の関与が疑われる。従って種々の随伴症の病態の解明には甲状腺外 TSHR の分布 発現機構の解明が重要であり、in vivo での TSHR プロモーター活性の検討を行った。ラット TSHR minimal promoter region、-320 bp を pEGFP 上流に組み込み、これを C57B6 マウス前核胚に導入しトランスジェニックマウスを作成したか、甲状腺を含め脂肪組織にも EGFP の有為な活性は観察されなかった。以上の結果より、細胞レベルでの minimal promoter region は In vivo では不十分であり、より上流の領域かその発現に必要と考えられた。
- ③ ハセトウ病眼症の遺伝的素因を検討するために日本人334例ポーランド人264例のハセト

ウ病患者を対象にサイトカイン遺伝子多型とハセトウ病眼症との関連性を検討した。TNF- α 遺伝子プロモーター領域の-1031T /C 多型と眼症の重症度との間に有意な関連が認められた。IL-18 遺伝子プロモーター領域の-607C/A 多型と弱い関連が認められた。しかし、IFN- γ 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-13 遺伝子多型と眼症との関連は、ポーランド人においても日本人においても認められなかった。

- ⑤ ハセト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、1) 候補遺伝子の一つである TSH レセプター遺伝子の SNP を用いて、ハプロタイプブロックの存在とハプロタイプ解析による同病との関連の検討を行った。その結果、ハプロタイプブロックの存在を見出し、ハセトウ病との弱いながらも有意な関連を認めた。2) 5q23-q33 において、新たなマイクロサテライト多型を用いた関連解析を行い、比較的強い関連を認めた。同領域に存在する免疫関連遺伝子を中心として候補遺伝子を pick up し、SNP による関連

解析を行い、2つの遺伝子の SNP において関連を見出した。

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、新規のリノ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。家族性ハセトウ病における連鎖解析結果や、ハセトウ病の重要な随伴症状である眼症の遺伝素因に関する結果は、疾患発症の予防や早期発見に貢献することか期待される。甲状腺ホルモン不応症に関する研究は核内受容体研究で古くより問題となっている non-genomic action についての新しい発展をもたらすものである。また、日常診療に用いられる GnRH アナログによるハセトウ病を含む甲状腺疾患の発症の検討結果は、健康情報として重要であるはかりてなく、自己抗体産生機序解明に新たな光を投げかけ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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

高Ca尿症を呈した偽性副甲状腺機能低下症Ibの一例における
Ca感知受容体変異と vitamin D₃投与後の尿中Ca排泄量の推移

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

Caの尿中排泄量の増加を伴った偽性副甲状腺機能低下症Ibの症例にCa感知受容体 (CaR) の codon592にheterozygous な missense mutation (Asn→Ser) が認められた。mutant CaR の EC50 は wild-type の 3.2mM に対して 2.4mM と低下していた。1 α OHD₃(1 μ g/day) 投与後、尿中Caは一過性に増加したか、1 α OHD₃の投与を継続していたところ、血清Caの正常化とともに尿中Caも正常化した。少量の1 α OHD₃投与により血清PTHを高値に保つことと、血清および尿中Caを正常化してきたと考えられる。

A. 研究目的

胸椎後韌帯骨化症を契機に偽性副甲状腺機能低下症Ib型と診断された53歳女性において、低Ca血症にも関わらずCaの尿中排泄量の増加が認められた。本症例の高Ca尿症の発症機序を解明するとともに vitaminD₃投与後の尿中Ca排泄量の推移を検討した。

B 研究方法

Ca受容体 (CaR) の exon2-7 を PCR にて増幅し、direct sequence した。下に示すような missense mutation が認められたので、mutant CaR を HEK293 細胞に発現し機能解析を行った。

C. 研究成果

CaRcodon592 に heterozygous な変異 (Asn→Ser) が認められた。mutant CaR の EC50は wild-type の 3.2mMに対して2.4mMと低下して

いた。1 α OHD₃(1 μ g/day) 投与後、尿中Caは一過性に増加したか、1 α OHD₃の投与を継続していたところ、血清Caの正常化とともに尿中Caも正常化した。

血清PTH値は、1 α OHD₃投与前640-755pg/ml、投与後は382-685pg/mlであった。

D. 考 察

CaRのmissense mutation は、主に codon 1-300 と codon 520-881 に認められているか、本症例の変異は、後者の cluster に存在していた。CaRの active mutation による hypoparathyroidism に PTH(1-34) を皮下注射することにより、尿中および血清Caを正常化することか報告されている。我々の症例では、少量の1 α OHD₃投与により血清PTHを高値に保つことと血清および尿中Caを正常化してきたと考えられる。

E. 結 論

CaR の active mutation が高 Ca 尿症の原因と考えられ、少量の $1\alpha\text{OHD}_3$ 投与が血清及び尿中Ca正常化に有効であった。

F 研究発表

論文発表

Mizunashi K, Kurihara I, Hurokawa Y Low dose 1α -hydroxylated vitamin D₃ normalized calcium excretion in a patient with activating mutation of calcium-sensing receptor and pseudohypoparathyroidism type Ib J Am Soc Nephrol (on submission)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

副甲状腺機能異常症の病因・病態解明

分担研究者 皆川 真規 千葉大学大学院医学研究院小児病態学 助手

研究要旨

腎臓特異的 PTH 不感症である偽性副甲状腺機能低下症 Ib (PHP-Ib) における随伴症状と Gs α 蛋白転写調節領域である XL α s 領域の CpG メチル化状態の詳細な検討では症状特異的メチル化パターンはなく、この領域の CpG メチル化のアリルとしての連続性が喪失していることから、この領域のメチル化異常は他の領域のエピジェネティックな変化によって二次的に生じたものであることが示唆された。STX16 領域の 3kb 欠失は家族性 PHP-Ib において認められたか、孤発性 PHP-Ib 14 例ではみとめなかった。

A. 研究目的

偽性副甲状腺機能低下症 Ib (PHP-Ib) 原因は偽性副甲状腺機能低下症 Ia (PHP-Ia) の病因である Gs α 蛋白をコードする遺伝子 (GNAS1) の転写調節領域の DNA メチル化の異常によることか最近明らかにされているが、このメチル化による Gs α 蛋白の組織特異的発現制御機構については未だ不明である。PHP-Ib は PHP-Ia と分類されているか、臨床的に鑑別診断の困難な例もみられる。20番染色体長腕父性 Uniparental Disomy (UPD) による PHP-Ib の 1 例では、1) 右ラムタ縫合骨癒合症、2) 幼児期発達遅滞（治療後著明に改善した）、3) 協調運動障害 平衡障害 体幹の可動域制限、3) 軽度の甲状腺機能低下症などを合併するか、これらの特徴か GNAS1 遺伝子のメチル化異常パターン（すべてのアリルが父性アリルと同様のパターンとなっている）によるものか、近接する遺伝子の効果であるのかは定かてはない。われわれのこれまでのササン解析による検討では

日本人孤発例の PHP-Ib ではすべてに NESP55 領域、AS 領域、エクソン 1A 領域の父性アリルパターンのみのメチル化異常を認めているか、XL α s 領域においては症例ごとの違いを認めた。特に XL α s 領域の制限酵素 *NotI* および *AscI* 部位の両者にて完全脱メチル化（父性アリルパターン）を認めた 8 例のうち 3 例に軽度の発達遅滞を認めた。そこでエクソン XL α s の 5'側と 3'側のメチル化を個々の CpG 部位ごとに bisulfite PCR により検討した。また、PHP-Ib の多くは孤発性であるが、最近染色体優性遺伝性 PHP-Ib (autosomal dominant PHP-Ib AD-PHP-Ib) において連鎖解析の結果から GNAS1 遺伝子の 220kb 上流（5'側）に存在する STX16 遺伝子のコード領域の 3kb の欠失がみられることが報告された。STX16 遺伝子は Syntaxin-16 と呼ばれる ubiquitous なコリン体に局在する蛋白をコードしているか、この領域の欠失が 3'方向にはるか 220kb 離れたエクソン 1A 領域のメチル化を制御しているこ

とか示唆されている。そこで、孤発性 PHP-Ib および家族性 PHP-Ib においてこの領域の欠失がみられるか検討した。

B. 対象・方法

1) XL α s 領域の CpG メチル化の検討

対象は表 1 の 14 例の孤発性 PHP-Ib のうち XL α s 領域の制限酵素 *NotI* および *AscI* 部位の両者にて完全脱メチル化（父性アリルパターン）を認めた 8 例とした。EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) を用いて全血由来 DNA 15 μ g を bisulfite 処理後、それをテンプレートとしてエクノンXLの5'側 (XL-BS-4) および3'側 (XL-BS-2) に分けて PCR を行い、TA クローニングにてサフクローニングし各サンプル10クローンずつをシークエンシングした。

2) STX16 領域の 3kb 欠失の検討

対象は日本人孤発性14例の PHP-Ib（すべてメチル化の異常を確認したもの）および家族性の PHP-Ib 1 家系とした。この 1 家系は 2 人の子のうち兄が発端者、妹が正常カルシウムであるが高PTH血症を伴っており罹患者と考えられる。両親は非罹患者である。全血より抽出した DNA を 3kb 欠失領域を挟む PCR プライマーにより増幅し、アカロースケルにて PCR 産物のサイズを確認した。PCR 法により STX16 の 3kb 欠失を確認した 1 家系を対象として、ササン解析により制限酵素 *AvrII* 切断後特異的プローフにて検出した。

C. 研究結果

図 1 にエクノンXLの5'側 (XL-BS-4)、図 2 に3'側 (XL-BS-2) の CpG メチル化の程度の結果を示す。検討した 8 例の XL α s 領域の5'側、3'側の CpG メチル化パターンに臨床症状（円

形顔貌、中手趾骨短縮、診断時の発達遅滞）に特異的なパターンは認められなかった。8 例すべてがこの領域の低メチル化であり、一部にメチル化の程度の比較的高い CpG を認めたがメチル化されている CpG もサフクローニングの結果クローンごとの連続性は維持されていなかった。

孤発性 PHP-Ib の 14 例のすべてで予測される 4.3kb 相当の増幅産物を認め、この領域の欠失を示すものではなかった。一方、家族性 PHP-Ib では罹患者の 2 名の子と保因者と考えられる母に 3kb 欠失に由来する 1.3kb の増幅産物を認め、3kb 欠失をヘテロで有していると考えられ、ササン解析においても一致する結果であった。

D 考 察

XL α s 領域の CpG メチル化は孤発性の PHP-Ib において症例間の差があったか、臨床像の違いを説明できるものはなかった。また、孤発性の PHP-Ib ではこの部位のメチル化は 1 本の DNA において連続した一貫性を欠いており、父性母性アリルのメチル化パターンの維持が障害されていることが示唆された。この検討では全血由来の DNA のみの検討であり、組織特異的なメチル化パターンの障害の反映である可能性も否定できないか、PHP-Ib で生じた XL α s 領域の CpG メチル化の異常は二次的な変化である可能性が高く、臨床症状に与える影響は少ないものと考えられる。

孤発性と考えられた PHP-Ib（すべて *GNAS1* プロモーター領域の CpG メチル化の異常の存在が確認されたもの）では STX16 領域の 3kb 欠失は認めなかったか、常染色体優性遺伝性 PHP-Ib (AD-PHP-Ib) において STX16

領域の3kb欠失が認められた。表2に Bastepeらの報告のまとめを示すか、3kb 欠失は塩基配列の変化のため孤発性と思われる症例でも母か3kb 欠失を有する保因者であったり、de novoの変化であった場合には AD-PHP-Ib であると考えられる。すなわち、彼らの報告のうち AD-PHP-Ib では18家系中16家系で 3kb 欠失があったことになる。我々の検討した1家系でも3kb欠失を認めており、AD-PHP-Ib においては STX16 領域の 3kb 欠失が原因となっている可能性が高い。しかし、3kb 欠失の有無しない2家系があることにより、逆にこの 3kb 欠失がないからといって疾患の遺伝性を否定できない。孤発性 PHP-Ib の特徴について検討すると、われわれの検討で孤発例の PHP-Ib の14例全例、Bastepeらの報告でも孤発例の12例全例（前述したように STX16 の 3kb 欠失を有する孤発例は AD-PHP-Ib と考えられるため孤発性としては除外するべきである）で、Exon1A 以外の領域のメチル化異常をともなっていた。しかし、Exon1A 以外の領域のメチル化異常を有する家族例が存在することから、逆に Exon1A 以外の領域のメチル化異常があるからといって遺伝性を有しないものとすることはできない。

E 結 論

孤発性の PHP-Ib における PTH 抵抗性に随伴する臨床症状に特異的な XL α s 領域のメチル化パターンはなかった。PHP-Ib でのこの領域の CpG 部位のメチル化異常はアリルとしての一貫性を喪失していることが明らかになり、XL α s 領域のメチル化パターンは他の領域の DNA のエピジェネティックな異常によって二次的に生じたものであることが示唆された。

また、優性遺伝する PHP-Ib の家系において、

GNAS1 遺伝子の 220kb 上流にある STX16 遺伝子内の 3kb の欠失を同列したか、エクソン1A 以外にもメチル化異常を認める孤発性の PHP-Ib では3kbの欠失はなかった。Gs α 蛋白の正常な発現には Exon1A の母性メチル化パターンが必須であることが明らかになったか、このパターンの確立にはシエネティックな因子およびエピジェネティックな因子が関与していると思われる。

PHP-Ib の病因はシエネティック、エピジェネティックの両者の異常を含む多様性がある。

F 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) 皆川真規 副甲状腺ホルモン/副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体 (PTH1R) 遺伝子多型と身長 ホルモンと臨床 51(11) 955-958, 2003

2 学会発表

- (1) 第76日本内分泌学会学術総会 平成15年5月9日 偽性副甲状腺機能低下症 Ib DNA メチル化異常と臨床像の検討 皆川真規、女田敏行、渡辺智之、数川逸郎、木下香、佐藤裕美子、下橋京子、河野陽一
- (2) 第37回日本小児内分泌学会 平成15年10月2日 偽性副甲状腺機能低下症の成長障害 木下香、女斎未知子、佐藤裕美子、数川逸郎、下橋京子、渡辺智之、皆川真規、河野陽一
- (3) 第37回日本小児内分泌学会 平成15年10月2日 特異な病像を呈する偽性副甲状腺機能低下症 Ib-GNAS1 遺伝子 XL α s 領域

の DNA メチル化との関連 數川逸郎、皆川真規、渡辺智之、木下香、佐藤裕美子、下橋京子、南谷幹史、安田敏行、河野陽一

低Ca血症と考えられた1例 佐藤裕美子、數川逸郎、下橋京子、渡辺智之、皆川真規、河野陽一

- (4) 第37回日本小児内分泌学会 平成15年10月3日 日常遭遇しうる食事性の低カルシウム血症の2例 飯田真紀、南谷幹史、皆川真規、河野陽一
- (5) 第37回日本小児内分泌学会 平成15年10月3日 原因不明のヒタミンD欠乏による

H 知的所有権の取得状況

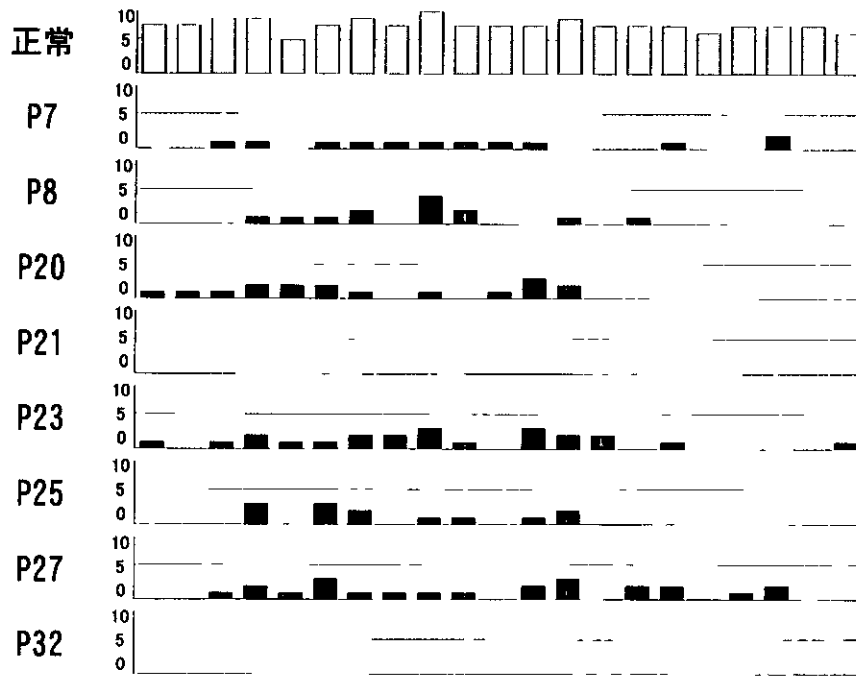
- | | | |
|---|--------|----|
| 1 | 特許取得 | なし |
| 2 | 実用新案登録 | なし |
| 3 | その他 | なし |

表 1

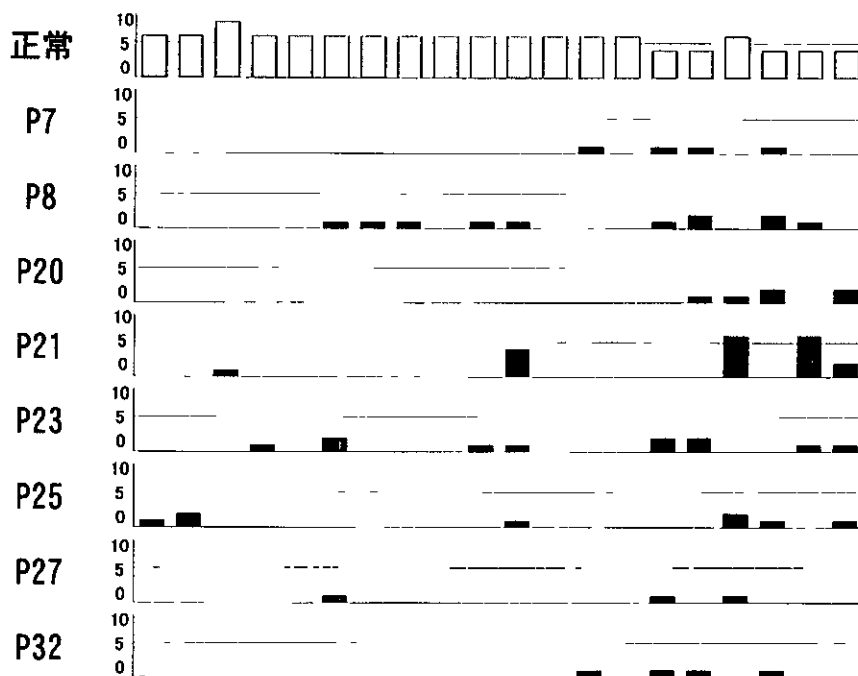
	性	円形顔貌	中手趾骨短縮	発達遅滞	NESP55	AS	XL α s		Exon1A
					<i>BglII</i> + <i>SacII</i>	<i>EcoRV</i> + <i>FspI</i>	<i>SacI</i> + <i>NotI</i>	<i>SacI</i> + <i>AscI</i>	<i>PstI</i> + <i>NgoMIV</i>
P3	男	-	-	-	+/+	-/-	+/-	+/-	-/-
P7	男	+	-	+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
P8	男	-	-	-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
P9	女	-	-	-	+/+	-/-	-/-	+/-	-/-
P13	女	-	-	-	+/+	-/-	+/-	+/-	-/-
P18	男	-	-	-	+/+	-/-	+/-	-/-	-/-
P20	男	-	-	-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
P21	女	+	-	+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
P23	女	+	-	+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
P24	女	-	-	-	+/+	-/-	+/-	-/-	-/-
P25	男	-	-	-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
P27	女	+	+	-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
P29	男	-	-	-	+/+	-/-	+/-	+/-	-/-
P32	男	-	-	-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-

表 2

Exon 1Aの完全脱メチル化	その他の部位のメチル化異常	STX16領域の3kb欠失	例数
+	-	+	家族例 12
			孤発例 4
+	-	-	家族例 1
+	+	-	家族例 1
			孤発例 12



☒ 1



☒ 2

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
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 教授

研究要旨

老化、不動、ステロイド骨粗鬆症には PTH に対する骨の反応性低下が関与している可能性があるか、PTH の骨形成促進作用の分子機序には不明な点が多い。本研究では骨における PTH 作用のシグナルを解析し、PTH が ERK 依存性に AP-1 を誘導する一方 BMP 非依存性に Smad1/5 を活性化し、両者の協調作用により interleukin-11 転写を誘導すること、その結果骨芽細胞の分化を促進するとともにアポトーシスをも抑制す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 7 回膜貫通型受容体である PTH/PTHrP 受容体を介して Gs, Gq など複数の Gタンパクと共役することにより骨や腎などの標的臓器に作用する。Gs α の不活性化は PTH に対する不応性により偽性副甲状腺機能低下症をもたらすか、その病態は主に腎近位尿細管におけるリン再吸収抑制および活性化型ビタミン D 産生促進作用の欠如に基づくものと考えられる。一部の症例ではおそらく PTH の骨に対する抵抗性の欠如により骨代謝異常が認められることがあるか、その機序については不明である。

一方、PTH は間欠的投与により *in vivo* で骨形成を促進すること知られているか、骨における PTH 作用に関しては、Gs および Gq を介したシグナルの貢献度とその相互作用なども含め未だ不明な点が多い。さらに加齢や力学的負荷の低下に伴う骨粗鬆症の病態においては、骨における PTH 作用の減弱、すなわち PTH 抵抗性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、骨芽細胞における PTH の細胞内シグナルを解明し、PTH の骨形成促進機序および加齢や不動に伴う PTH の骨形成促進作用の抑制機序を明らかにするため、特に AP-1/Interleukin (IL)-11 骨形成シグナルに注目し、その関与を検討する。

B 研究方法

- 1) 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） エトポシト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) アポトーシスに関与するシグナルを各種キナーゼ抑制薬や IL-11 中和抗体などを用いて検討した。
- 3) AP-1 とクロストークし、骨形成に重要な役割を有すること知られている Smad1/5 の PTH シグナルにおける役割を検討した。
- 4) 倫理面への配慮 マウスは、倫理委員会承認されたプロトコールに基づき、麻酔下で