

DeLuca, H F, Garabedian, M, and Nguyen, T N Interaction between vitamin D receptor and ligands two-dimensional alanine scanning mutational analysis 12th Workshop on Vitamin D, Maastricht, The Netherlands, 2003 7

4 Masuno, H, Yamamoto, K, Choi, M, Shimuzu, M, Ito, T, Yamada, S, Makishima, M, Garabedian, M, and Nguyen, T N How does VDR recognize bile acids? 12th Workshop on Vitamin D, Maastricht, The Netherlands, 2003 7

5 女達竜太郎、山本恵子、下村伊一郎、山田幸

子、榎島誠 内分泌及び生体異物シグナルに反応するVDRの構造解析 第26回日本分子生物学学会年会、神戸、2003 12

6 榎島誠 コレステロール胆汁酸代謝を調節する核内レセプター (シンポジウム 核内レセプターと疾患 創薬のターゲットとしての核内レセプター) 第77回日本薬理学会年会、大阪、2004 3

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（難治性疾患対策研究事業）
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 人園 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) の核移行メカニズムの検討を行なった。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) が重要であることか示された。しかし、DNA 結合領域を欠く VDR を用いた場合にはヒンシ部位にある 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- β が VDR と相互作用することか示唆された。これらの成果は、VDRの核移行に関する新規の知見である。また、カルシウム (Ca) 感知受容体異常を伴う常染色体優性低 Ca 血症の患者をあらたに2名解析し、新規の遺伝子変異を見出した。両名とも低カルシウム血症に伴う痙攣の既往があり、血清 Ca 値をある程度の値に維持する必要かあることか示された。

1. ビタミンD受容体(VDR)の核移行を担
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) 様の配列か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 はリカント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2者の異常は VDR 遺伝子の変異として同定されたか、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かある。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

in vitro nuclear transport assay は、シキトニン処理により選択的に透過性となった形質膜と正常な核を持つセミインタクト細胞を調整し、そこに組換え蛋白質や細胞抽出液を添加することによって in vitro で核移行を再構成する実験系である。本法は、我々かこれまでに行な

った transfection 法とは異なり系に加える試料の種類や量を調節することにより、核移行を詳細に解析することができるとともに、異なる条件下での核移行を比較検討する際にも有用なテクニックである。本実験においては、シキトニン処理によりセミインタクト化したHeLa細胞に、VDR および欠失型 VDR (DBD+hinge, hinge+LBD、LBD) のリコンビナント精製標品と別産HeLa細胞より調製した細胞質画分、およびATPを加え、30°C、30分静置して反応させた。反応後細胞を洗浄し、固定および透過処理を施して抗 VDR 抗体による免疫染色を行い、VDR の核移行の有無を解析した。また、1,25(OH)₂D₃ 添加の有無による VDR の局在の変化も検討した。

C. 研究結果

VDR の核移行を解析する手法として初めて in vitro nuclear transport assay を適用した。その結果、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、hinge+LBD 型の VDR ではリカント非添加時に核局在が見られなかったことから、DNA 結合領域の核移行シグナル (NLS) が重要であることか示された。しかし、hinge+LBD 型の VDR では、ヒンゲ部位にあるNLSかりカント依存的に機能して、リカント存在下で VDR を核移行させることか判明した。GST-pull down 法を用いた in vitro binding assayでは、importin-βではなく、importin-βがVDRと結合した。

D 考 察

核-細胞質間分子輸送に関連する分子として importin-4 か VDR と相互作用することを初めて示した。より直接的に importin-4 か VDR の

核移行を担うことを証明する必要かある。in vitro nuclear transport assay を用いて、VDR 内の NLS が複数あること、ひとつは DNA 結合領域にありリカント非依存性に核移行を担い、他方は hinge 領域にありリカント依存性に核移行させることか明らかとなった。

E. 結 論

VDR には少なくとも2種類の核移行システムか存在し、リカント非依存性および依存性の VDR の核移行を担う。VDR の核移行は、importin-4 による可能性か示された。

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

Vitamin D receptor can interact with two molecules involved in the nuclear transport
Miyachi Y, Michigami T, Ozono K 12th Vitamin D Workshop 03/07/06-10, The Netherlands

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、

カルノウム感知受容体 (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か、報告された症例数はまた少ない。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の投与が行われるか、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であると考えられている。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家系に加えて、新しく2症例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CaSR遺伝子変異検索を行なうと併に臨床的特徴、治療法の検討を行なう。

C. 研究結果

新たに副甲状腺機能低下症と診断された5歳と2歳の姉妹例について本遺伝子の異常の有無について検討した。その結果、新規のS122P変異を認めた。本例でも無投薬では低カルノウム血症によるテタニー症状を呈するため、0.008ug/kg/day という少量の活性型ビタミンD

の投与を他病院で受けている。血清カルノウム値は7-7.5mg/dlで、尿中Ca/Crが0.2前後のコントロールである。

D. 考 察

従来我々の結論である、「常染色体優性低Ca血症では、血清カルノウム値6-7mg/dlを保つようにビタミンD治療を行い、尿中Ca/Cr比を0.25以下に保つべきである」について、これを支持する結果が得られた。

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

カルノウムリン代謝異常症 大園恵一 第106回日本小児科学術集会、教育講演 0304 25-27, 福岡

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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

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
—バセドウ病眼症とサイトカイン遺伝子多型—

研究協力者 広松 雄治 久留木大学医学部内分泌代謝内科 助教授

研究要旨

日本人334例ポーランド人264例のハセドウ病患者を対象にサイトカイン遺伝子多型とハセド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遺伝子の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。ハセドウ病眼症の発症にはTNF- α 遺伝子あるいはこれと連鎖不均衡にある遺伝子の多型が遺伝因子として関与しているものと推測される。

A. 研究目的

ハセドウ病眼症はハセドウ病に高率に合併する自己免疫疾患であり、遺伝因子を背景に環境因子が働き発症すると考えられている。私どもはこれまでに外眼筋の腫大度と TNF- α 遺伝子の発現、後眼窩脂肪組織の容積と IL-4、IL-6、IL-10の発現が関連していることを報告してきた。そこで今回、私どもは日本人とポーランド人を対象にこれらのサイトカイン遺伝子多型とハセドウ病眼症との関連性を検討したので報告する。

B. 研究方法

対象はポーランド人のハセドウ病患者264例（平均発症年齢41歳）と健常者194例、日本人のハセドウ病患者334例（平均発症年齢38歳）と健常者①158例、②575例を対象とした。ハセドウ病患者中、アメリカ甲状腺学会の分類で class 3 以上の眼症を有するものは、ポーラン

ト人95例、日本人105例であった。

遺伝子多型は、dot-blot hybridization with SSOP、PCR-RFLP、sequence specific PCR、direct sequence法、GeneScan 法にて測定し、解析した。

（倫理面の配慮）

倫理委員会の承認および患者ならびに健常者から同意を得て行った。

C. 研究結果

日本人のハセドウ病患者では、IL-13遺伝子のプロモーター領域の-1112C/T 多型において CC genotype 頻度か、健常者に比較して有意に高かった（Table 1）。しかしながら、ポーランド人では差がみられなかった。

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（Table 2）。ポーランド人においても

TNF- α 遺伝子プロモーター領域の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遺伝子のプロモーター領域の-607C/A多型も眼症と弱い関連が認められた (Table 3)。しかしながら今回検討した他の IFN- γ 、IL-4、IL-6、IL-10遺伝子多型にはハセトウ病の発症や眼症との関連は認められなかった。

D 考 察

ハセトウ病眼症はハセトウ病に高率に合併する自己免疫疾患であり、遺伝因子を背景に環境因子が働き発症すると考えられている。後眼窩組織では外眼筋や脂肪組織にリンパ球浸潤がみられ、後眼窩における自己免疫反応がその病態形成に大きな役割を演じている。そこで今回は種々のサイトカインの遺伝子多型と眼症との関わりについて検討した。TNF- α 遺伝子プロモーター領域の多型が眼症と関連していることをみいだした。Caucasian のポーランド人にも同様に関連が認められた。またIL-18遺伝子のプロモーター領域の-607C/A多型も眼症と弱い関連が認められた。これらのことから Th1/Th2 バランスがハセトウ病眼症の発症に関与することか示唆された。私どものこれまでの報告 (眼症患者の後眼窩組織のT細胞クローニングやサイトカイン遺伝子発現の解析より T helper 1(Th1)-mediated immune response が病態に関与している) を支持しているといえる。

E. 結 論

ポーランド人 (Caucasian) と日本人においては、TNF- α 遺伝子プロモーター領域の多型あるいはこれと連鎖不均衡にある遺伝子はハセトウ病眼症の発症と関連する疾患感受性遺伝子の一つと推測される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) Bednarczuk T, Hiromatsu Y, Fukutani T, Jazdzewski K, Miskiewicz P, Osikowska M, Nauman J Association of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism and non-genetic factors with Graves' ophthalmopathy in European and Japanese populations *Eur J Endocrinol* 148 13-18, 2003
- 2) Hiromatsu Y, Ishibashi M, Nishida H, Kawamura S, Kaku H, Baba K, Kaida H, Miyake I Technetium-99m sestamibi imaging in patients with subacute thyroiditis *Endocr J* 50 239-44, 2003
- 3) Bednarczuk T, Placha G, Jazdzewski K, Kurylowicz A, Kloza M, Makowska U, Hiromatsu Y, Nauman J Interleukin-13 gene polymorphisms in patients with Graves' disease *Clin Endocrinol (Oxf)* 59 519-525, 2003
- 4) Hiromatsu Y, Toda S Mast cells and angiogenesis *Microscopy Research and Technique* 60 64-69, 2003
- 5) Fukutani T, Hiromatsu Y, Kaku H, Miyake I, Mukai T, Imamura Y, Kohno S, Takane N, Shoji S, Otabe S, Yamada K A polymorphism of interferon- γ gene associated with changes of anti-thyrotropin receptor antibodies induced by antithyroid drug treatment for Graves' disease in Japanese patients *Thyroid* 14 91-95, 2004
- 6) Bednarczuk T, Hiromatsu Y, Seki N, et al Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) gene

polymorphism in Graves' ophthalmopathy
Hum Immunol (in press)

- 7) 広松雄治、寺崎聖代、福谷知香、賀来寛雄、三宅育代 ハセトウ病眼症患者の後眼窩組織におけるサイロクロフィン遺伝子の発現 眼科紀要54 196-199, 2003
- 8) 広松雄治 ハセトウ病眼症の遺伝因子 眼科紀要 54 183-186, 2003
- 9) 広松雄治 ハセトウ病眼症の治療方針と治療の実際 Modern Physician 23 1119-1123, 2003
- 10) 三宅育代、広松雄治 甲状腺機能低下症 今月の治療10 S240-243, 2003
- 11) 深澤江、吉田克己、広松雄治 甲状腺機能異常 総合臨床52 2619-2625, 2003
- 12) 広松雄治 ハセトウ病眼症の病因 病態と治療 内分泌 糖尿病科17 344-350, 2003
- 13) 広松雄治、牧田善二 内分泌系の生理 下条文武、齋藤康 監修 タイナミノクメティン 西村書店 13-2~13-6, 2003

14) 広松雄治 薬剤誘発性甲状腺疾患 伴良雄 編 よくわかる甲状腺疾患のすべて 水井書店 p 370-374, 2003

2 学芸発表

- 1) 広松雄治、福谷知香、高田和奈、賀来寛雄、三宅育代、山田研太郎、Tomasz Bednarczuk, Janusz Nauman CTLA-4遺伝子多型とハセトウ病眼症—ポーランド人と日本人における検討— 第107回日本眼科学会総会 平成15年4月17日~20日 福岡
- 2) 戸田修二、小池英介、広松雄治、鈴木幸一、杉原甫 Air-liquid interface は甲状腺濾胞上皮細胞の増殖、濾胞形成と maf 転写因子の発現を促進する。第46回日本甲状腺学会総会 平成15年11月19日~21日 名古屋

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

Table 1 Association of IL-13 gene -1112C/T polymorphism with Graves' disease and Graves' ophthalmopathy

Genotype	Graves'	Normal	
	N=310	N=137	
CC	219 (71 %)	77 (56 %)	$\chi^2=9.744$ $P=0.0077$
CT	83 (27 %)	52 (38 %)	
TT	8 (2 %)	8 (6 %)	

Genotype	Ophthalmopathy		
	ATA \geq III	ATA 0~II	
CC	74 (76 %)	145 (68 %)	n s
CT	22 (22 %)	61 (29 %)	
TT	2 (2 %)	6 (3 %)	

ATA classification of American Thyroid Association
n s not significant

Table 2 Association of TNF- α gene -1031T/C polymorphism with Graves' disease and Graves' phthalmopathy

Genotype	Graves'		
	N=173		
	Normal		
	N=575		
TT	109 (63 %)	405 (70 %)	<i>ns</i>
TC	59 (34 %)	156 (27 %)	
CC	5 (3 %)	14 (3 %)	

Genotype	Ophthalmopathy		
	ATA \geq III	ATA 0~II	
TT	28 (45 %)	81 (73 %)	$\chi^2=16.0$
TC	29 (47 %)	30 (27 %)	$P<0.0001$
CC	5 (8 %)	0 (0 %)	

Table 3 Association of IL-18 gene -607C/A polymorphism with Graves' disease and Graves' ophthalmopathy

Genotype	Graves'		
	N=334		
	Normal		
	N=158		
AA	110 (33 %)	58 (37 %)	<i>ns</i>
AC	167 (50 %)	77 (49 %)	
CC	57 (17 %)	23 (14 %)	

Genotype	Ophthalmopathy		
	ATA \geq III	ATA 0~II	
AA	32 (30 %)	78 (34 %)	$\chi^2=6.685$
AC	62 (59 %)	105 (46 %)	$P=0.0353$
CC	11 (11 %)	46 (20 %)	

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

GnRH誘導体によるバセドウ病および無痛性甲状腺炎の発症について

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

ハセトウ病における甲状腺中毒症は、抗TSH受容体抗体産生により惹起される。今回、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。また、無痛性甲状腺炎もGnRH誘導体使用で発症することも明らかにした。その発症機件につき若干の考察を加えた。

A 研究目的

ハセトウ病における甲状腺ホルモン過剰症は刺激型の抗TSH受容体抗体により引き起こされることは既に確立されている。しかし、どのような機件でこの抗体産生が開始され、さらに産生増加が見られるかはまたほとんど分かっていない。従来、私共は抗TSH受容体抗体産生増加が出産後に起こることを明らかにしており、実際臨床においても出産後にハセトウ病の発生が高頻度にも起こることも明らかにした。また、昨年度の本研究会で、スキ花粉症が抗TSH受容体抗体産生増加をすることを見出し、ハセトウ病の明らかな増悪因子の一つであることを確立した。

今回は日常診療で比較的良好に使用されているGonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) 誘導体使用が甲状腺自己免疫に及ぼす影響を観察し、実際にこれらの薬剤使用後ハセトウ病の発症、一方で無痛性甲状腺炎も発症することを確認した。今回の研究ではそれらの症例を詳細に報告すると同時に、なぜそのようなことが発生するのか、そのメカニズムにつき検索を加えた。

B. 研究方法

GnRH 誘導体治療中に甲状腺機能異常を発生した3人の患者を検索した。症例1は49才の主婦であり、娘がハセトウ病であったため定期的に甲状腺機能検査を観察していた患者である。患者は月経困難症および子宮筋腫と診断されており、酢酸フセレリン（スプレキュア）900 μ g/日の治療を受けていたところ、使用開始後4ヶ月目に甲状腺中毒症状を発生した。最終的にハセトウ病による甲状腺中毒症と診断され、フセレリン治療は中止した。ハセトウ病と診断された直後から、メルカゾール治療を開始されたが寛解までには3年以上を要した。

症例2は41才の主婦で17年前にハセトウ病と診断されPTU治療を5年間受け、その後寛解をしていた患者である。この患者も月経困難症と子宮筋腫と診断され、酢酸リュープロレリン（リュープリン）（188mg）を毎月1回注射を開始された。4回目の注射後、すなわち注射開始後4ヶ月目に患者は全身倦怠感を訴え、最終的に無痛性甲状腺炎があるものと診断された。

症例3は29才の事務員で、子宮内膜症による

月経困難症を有しており、フセレリン治療(900mg/日)を受けていた。治療初期、健康状態に全く異常は無かったか、やはり治療開始4ヶ月後に甲状腺中毒症状が発現し、最終的にハセトウ病の発症と診断された。フセレリン治療を中止し、メルカソール治療が開始された。

血液検査では遊離 T4、遊離 T3および TSH が甲状腺機能把握のために測定された。また、抗サイログロブリン抗体および抗マイクロノーム抗体も測定された。ハセトウ病と診断するため抗 TSH 受容体抗体を radioreceptor assay (TBII) および bioassay (TSAb) で測定した。

C 研究結果

これらの3患者とも GnRH 誘導体使用後4ヶ月目で甲状腺中毒症を発症した。症例1は治療4ヶ月前には完全に甲状腺機能は正常であった(図1)。また、TBII および TSAb も陰性であったか、フセレリン治療開始後4ヶ月目にハセトウ病甲状腺中毒症の症状とともに血中 FT4 および FT3 が上昇し TSH は抑制され、また TBII および TSAb は明らかな陽性が見られた(表1)。甲状腺腫大でも治療前に比し、軽度増大を来した。メルカソール治療は3年間行われた。

症例2はリュープロレリン治療1週間前には完全に甲状腺機能は正常であった(表2)。リュープロレリン使用後、4ヶ月目に軽度の甲状腺中毒症が見られ TSH は抑制されていた。TBII は全経過観察中陰性のままであった。この甲状腺中毒症の時に末梢好酸球/単球比は0.26で、FT3/FT4 比 (pg/ μ g) は0.24であり、明らかな破壊性甲状腺中毒症のパターンであることが確認された。以後、無治療で経過観察したか自然に甲状腺機能は正常化が見られ最終的に

リュープロレリンにより誘発された無痛性甲状腺炎と診断された。マイクロノーム抗体は治療前100倍であったか、4ヶ月目に6400倍と上昇し、さらに治療後6ヶ月までには12400倍とかなり上昇を示し、リュープロレリン使用により背景の免疫がかなり活性化されたことが推測される。

症例3では、治療前臨床的に甲状腺機能は正常と推定されたが残念ながら検査成績は無い。フセレリン使用後4ヶ月目に表2に示すように明らかな甲状腺中毒症状を示し、TBII 陽性、甲状腺腫大は横径5.6cmで、ハセトウ病と診断された。この症例もハセトウ病甲状腺中毒症と診断された時点でフセレリン治療を中止し、以後メルカソール治療を行っている。最終的に寛解に至るまでやはり2年間を有している。

D 考察

自己免疫性疾患は色々な因子により増悪し臨床的発病を見る。今回ハセトウ病および無痛性甲状腺炎が GnRH 誘導体により発病することか明らかとされた。GnRH 誘導体は性ホルモン関連疾患に日常診療でもしばしば使用されており、その副作用としては顔面紅潮、頭痛やうつ状態などが知られている。しかしながら、甲状腺自己免疫に関する詳細な検査はほとんどなされていない。

今回使用したこれらの GnRH 誘導体によるハセトウ病や無痛性甲状腺炎の発症はたまたまの偶然ではないと考えられる。なせなら、これらの薬剤使用後ほぼ4ヶ月前後で両疾患の発症が見られているからである。

なせこのようなことが起こるかを明らかにすることはハセトウ病の抗 TSH 受容体産生機構を解明する上でも極めて重要である。GnRH 誘

導体の使用初期には下垂体 GnRH 受容体を刺激し、一過性に血中エストロゲンは上昇するが、長期使用により GnRH 受容体の down regulation が起こり、その後は GnRH 誘導体があっても作用せず、最終的に血中のエストロゲンは更年期と同程度の低い値を持続することか明らかになっている。すなわち、血中エストロゲンが比較的高い値から数週以内に急速に低下することか大きな特徴である。これらの変化はその振幅が低いとは言え、妊娠末期から出産直後におけるエストロゲンの急速な低下と極めてよく類似している。従来よりエストロゲン低値は自己免疫増悪と関連するものと推測されており、事実 GnRH 誘導体使用時に動物実験におけるループス腎炎の増悪が知られており、またヒトでもこれらの薬剤使用后NK活性の上昇やヒトループス腎炎の増悪も確認されている。おそらく、このような機作で潜在性の甲状腺自己免疫が増悪し、ハセトウ病および無痛性甲状腺炎の臨床発症を来したものと推測された。

E. 結 論

GnRH 誘導体使用により血中エストロゲンが急速に低下を来し、そのため潜在性の甲状腺自己免疫が増悪しハセトウ病および無痛性甲状腺炎が発症するものと考えられた。

抗 TSH 受容体抗体産生と血中エストロゲンの役割を今後改めて検索していく必要がある。

F. 研究報告

1 論文発表

Amino N, Hidaka Y, Takano T, Tatsumi K, Izumi Y, Nakata Y Possible Induction of Graves' disease and painless thyroiditis by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogues *Thyroid* 13 815-818, 2003

Tada H, Mizuta I, Takano T, Tatsumi K, Izumi Y, Hidaka Y, Amino N Blocking-type anti-TSH receptor antibodies and relation to responsiveness to antithyroid drug therapy and remission in Graves' disease *Clin Endocrinol* 58 403-408, 2003

Amino N, Tada H, Hidaka Y, Izumi Y Postpartum autoimmune thyroid syndrome *Endocr J* 47 645-655, 2000

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

Amino N, Tada H, Hidaka Y Postpartum autoimmune thyroid syndrome A model of aggravation of autoimmune disease *Thyroid* 9 705-713, 1999

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 45-49, 2002

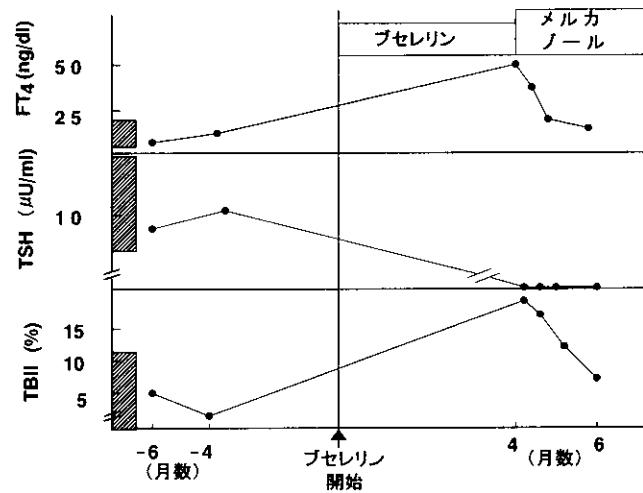


図1 フセレリンによるハセトウ病の発症

表1 フセレリンによるハセトウ病の発症

	投与後4ヶ月目	投与中止後5ヶ月目	投与中止後10ヶ月	参照値
FT ₄ (ng/dL)	5.0	0.8	1.3	10-16
FT ₃ (pg/mL)	12.3	2.2	3.0	24-46
TSH (μU/mL)	< 0.02	5.3	0.8	0.4-3.8
TBII (%)	26	8	3	< 12
甲状腺腫大 (cm)	5.6	5.0	4.7	無し
メルカゾール		15mg	5mg	

表2 リュープロレリンによる無痛性甲状腺炎の発症

	治療 1週間前	4回目注射 1週間後 (注射開始 後4ヶ月目)	注射中止後			参照値
			1ヶ月目	2ヶ月目	6ヶ月目	
FT ₄ (ng/dl)	1.5	1.7	1.5	1.2	1.1	10~16
FT ₃ (pg/ml)	3.3	4.0	3.8	3.2	2.9	24~46
TSH (μU/ml)	1.3	<0.02	<0.02	0.11	1.2	0.4~3.8
TBII (%)	5	5	5	9	8	<12
TgAb (U/ml)	2.6	7.5	9.9	9.5	6.6	<0.3
MCAb	100	6400	102400	102400	102400	陰性
甲状腺腫大(cm)	4.0	4.8	4.0	4.0	3.7	なし

リュープロレリン1.88mg 1回/月注射。4回目で中止。

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

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

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

我々はこれまでに、TSH 受容体抗体病の一つであるハセトウ病の遺伝的素因について検討してきた。すなわち、自己抗原である TSH レセプター遺伝子近傍マイクロサテライト多型マーカーとの有意な相関を得た。また、共同研究として sib pair を用いたランダムスクリーニングによるボンジョナルクローニングアプローチを行い、lod score 3 以上の興味あるローカスを残つか見出し、同ローカスに存在するマイクロサテライト多型マーカーとの有意な関連を認めた。そこで、今回の研究においては、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 において関連を認めた。

A 研究目的

ハセトウ病は、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。我々はこれまでに、多因子性疾患の一つであるハセトウ病の遺伝的素因について検討してきた。候補遺伝子アプローチとして、自己抗原である TSH レセプター遺伝子と免疫制御分子である CTLA遺伝子を中心に検討し、マイクロサテライト多型マーカーによって有意な相関を得た。また、共同研究において、sib pair を用いたランダムスクリーニングによるボンジョナルクローニングアプローチを行い、lod score 3 以上の興味あるローカスを残つか見出している。さらに、同ローカスのうち5q23-33に存在するマイ

クロサテライト多型マーカーを用いてうち数個において有意な関連を認めた。そこで、今回の研究においては、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、Block の存在と同病との関連の検討を行った。2) 全ゲノムスクリーニングで見出されたハセトウ病疾患感受性遺伝子存在領域である5q23-q33, 8q23-q24において、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った。

B 研究方法

TSH レセプター遺伝子内の疾患感受性領域の絞り込みを行うために、この遺伝子内における SNP を用いてハプロタイプブロックの存在を

検討した。TSHR 遺伝子内に存在する SNP の中で、5～30Kbp 間隔で10個の SNP を選び、連鎖不平衡 (LD) 解析を行った。LD 係数が 0.8以上の領域内において、ハプロタイプが4～6種類の少数のハプロタイプ (共通ハプロタイプ) に主に分類し、ハプロタイプ解析を行った。

染色体5q23-33領域については、同領域約1cM毎に設定した MicrosatelliteMarker での解析と Cytokine Cluster 免疫関連遺伝子の SNP を用いて関連解析を行った。

C. 研究結果

1) TSHR 遺伝子内の SNP を用いて関連解析

Genotype別の解析でハセトウ病において2つの SNP で関連があり、Allele 別の解析ではAITDで1つ、ハセトウ病で3つ、橋本病で2つの SNP において弱い関連があった。これらの SNP を用いての連鎖不平衡解析によって、Exon 1 から10の領域は3つの Block に分割された。それぞれのブロック内のハプロタイプ解析においてBlock 1で橋本病との関連、Block2でハセトウ病との関連、Exon10 の SNP (D727E) を含む Block3で両方の疾患との関連、が示唆された。

2) Ch5q21-33領域の解析

約1cM 毎に設定した Microsatellite Marker での解析 D5S2115 以外に D5S2117、D5S2110 付近にも比較的強い関連が認められ、疾患感受性領域の存在が示唆された。この領域における Cytokine Cluster 免疫関連遺伝子の SNP を用いて関連解析では、IRF1、GM-CSF においてハセトウ病との関連があった。

D. 考察

TSHR 遺伝子内の SNP とハセトウ病や橋本病との関連を認めたことは、TSHR 遺伝子内または近傍において、ハセトウ病と橋本病が異なる疾患感受性遺伝子を有する可能性を示唆している。今後は、他の SNP を用いた解析を進めるとともに、機能解析や他の遺伝子との相互作用を含めて検討する予定である。

また、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。今回、同領域の新たなマイクロサテライト多型とハセトウ病との比較的強い関連が認められ、2つの遺伝子の SNP とも有意な関連が認められたことは、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。

E. 結論

- ① TSHR 遺伝子内のSNP にハプロタイプブロックを認め、ブロック内のハプロタイプ解析においてハセトウ病や橋本病との有意な関連を認めた。5q23-33 領域におけるハセトウ病疾患感受性遺伝子の存在が強く支持された。
- ② 染色体 5q23-33 領域の新たなマイクロサテライト多型とハセトウ病との比較的強い関連が認められ、2つの遺伝子の SNP とも有意な関連が認められた。

以上より、TSH レセプターや 5q23-33 領域におけるハセトウ病疾患感受性遺伝子の存在が支持された。

F. 研究発表

1 論文発表

- ① Akamizu T, Hiratani H, Ikegami S, Rich SS, Bowden DW Association study of autoimmune thyroid disease at 5q23-33 in Japanese patients J HumGenet, 48 236-42, 2003
- ② Nakai Y, Hosoda H, Nin K, Ooya C, Hayashi H, Akamizu T, Kangawa K Plasma levels of active form of ghrelin during oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa Eur J Endocrinol, 149(1) R001-3, 2003
- ③ Saijo M, Akamizu T, Ikuta K, Iida Y, Ohmori K, Matsubara K, Matsuda Y, Suzuki M, Matsuda F, Nakao K, Generation of a transgenic animal model of hyperthyroid graves' disease Eur J Immunol, 33 2531-2538, 2003
- ④ Akamizu T Monoclonal Antibodies to Thyroid Specific Autontigens Autoimmunity 36 (6-7) 361-366, 2003
- ⑤ Hataya Y, Akamizu T, Hosoda H, Kanamoto N, Moriyama K, Kangawa K, Takaya K, Nakao K Alterations of Plasma Ghrelin Levels in Rats with Lipopolysaccharide-Induced Wasting Syndrome and Effects of Ghrelin Treatment on the Syndrome Endocrinology 144 (12) 5365-5371, 2003
- ⑥ Akamizu T, Kangawa K Central effects of ghrelin and growth hormone secretagogue Pituitary and Periphery Communication in and out Ed CJ strasburger 3-5 Bio Scientifica Ltd, Buisol, 2003
- ⑦ Moriyama K, Okuda J, Saijo M, Hattori Y, Kanamoto N, Hataya Y, Matsuda F, Mori T, Nakao K and Akamizu T Recombinant monoclonal thyrotropin-stimulation blocking antibody (TSBAB) established from peripheral lymphocytes of a hypothyroid patient with primary myxedema J Endocrinol Invest 26 1076-1080, 2003
- ⑧ Li YS, Kanamoto N, Hataya Y, Moriyama K, Hiratani H, Nakao K, Akamizu T Transgenic Mice Producing MHC Class II Molecules on Thyroid Cells Do not Develop Apparent Autoimmune Thyroid Disease Endocrinology 2004, in press
- ⑨ 赤水尚史、平谷仁美 日本人自己免疫性甲状腺疾患に関する感受性遺伝子存在候補領域についての関連解析 ホルモンと臨床 51 155-159, 2003
- ⑩ 満間昭典、紫芝良昌、内村英正、長坂顕雄、網野信行、赤須文人、赤水尚史、澤翠人、飯高誠、市川和夫、伊藤光泰、遠藤登代志、岡村健、岡本泰之、久保田吉、清水多恵子、高野徹、高松順大、竹田京子、多田尚人、坪井久美子、浜田昇、廣岡良文、森田修司、三橋知明、白沢尚子、吉田克己、吉村弘 甲状腺疾患カイトライン ハセトウ病 甲状腺機能低下症 無痛性甲状腺炎慢性甲状腺炎(橋本病)亜急性甲状腺炎(日本甲状腺学会診断カイトライン作成ワーキンググループ、執筆 連絡責任者網野信行) ホルモンと臨床50 643-653, 2003
- ⑪ 赤水尚史 TSH 受容体抗体の認識部位 内分泌糖尿病科6 365-370, 2003
- ⑫ 赤水尚史、西條美佐 Basedow 病の動物モデル作成ー抗甲状腺刺激ホルモン受容体

抗体遺伝子発現法— 最新医学58(7)1643-1648, 2003

- ⑬ 赤水尚史 ハセトウ病の病態と診断 Modern Physician 23(7) 1044-1047, 2003
- ⑭ 赤水尚史 肥満と血中グレリンホルモンと臨床51(9) 819-866, 2003
- ⑮ 赤水尚史 自己免疫性甲状腺疾患のモデル動物 ホルモンと臨床51(10) 861-866, 2003
- ⑯ 赤水尚史 モデル動物作成によるハセトウ病発症機序の解明 J Clin Immunol 26(6) 329-335, 2003
- ⑰ 赤水尚史 実験的ハセトウ病 内分泌 糖尿病科17(4) 405-409, 2003

2 学会発表

- ① Akamizu T, Saijo M, Nakao K An animal Model of Graves' Disease 20th International Symposium on Molecular Thyroidology (Matsumoto, Japan) 4 12- 13, 2003
- ② Akamizu T, Kangawa K Central effects of Ghrelin and GHS 2003 Hypopituitary Control and Complications Study Symposium and Investigators Meeting (Prague, Czech Republic) 3 11-15, 2003
- ③ Saijo M, Akamizu T, Ikuta K, Ohmori K, Honjo T, Nakao K Oral Administration of Lipopolysaccharides Induces hyperthyroidism in a Patients Derived Thyroid-Stimulating Anti-Thyrotropin Receptor Antibodies Transgenic Mouse The 85th Annual Meeting of the Endocrine Society (Philadelphia, USA) 6 19-22, 2003
- ④ Nakai Y, Hosoda H, Nin K, Hayashi H, Ooya C, Akamizu T, Kangawa K Plasma Concentrations of Active Form of Ghrelin during Glucose Tolerance Test in Patients with Anorexia Nervosa The 85th Annual Meeting of the Endocrine Society (Philadelphia, USA) 6 19-22, 2003
- ⑤ Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Ariyasu H, Li Yu-Shu, Moriyama K, Arai H, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K Genomic Structure and Characterization of the 5'-Flanking Region of the Human Ghrelin Gene The 85th Annual Meeting of the Endocrine Society (Philadelphia, USA) 6 19-22, 2003
- ⑥ Akamizu T, Saijo M Transgenic Model of Graves' Disease 7th Asia & Oceania Thyroid Association Congress 2003 (Raffles City Convention Center, Singapore), 2-4 December, 2003
- ⑦ Li YS, Kanamoto N, Hataya Y, Moriyama K, Nakao K, Akamizu T Preparation and Characterization of Transgenic Mice Expressing MHC Class II Molecules on Throid Cells The 75th meeting of The American Throid Association, Palm Beach, Florida, #106 (p85), 2003
- ⑧ 赤水尚史、中尾一和 自己免疫性甲状腺疾患の病因と病態 第26回日本医学会総会 4 4-6, 2003 福岡
- ⑨ Yu-Shu Li, 赤水尚史、金本巨哲、籀谷雄二、西條美佐、平谷仁美、森山賢治、中尾一和 甲状腺特異的MHC Class II 発現 Transgenic Miceの作製と機能解析 第76回日本内分泌学会学術総会 5 9-11, 2003

- ⑩ 金本巨哲、赤水尚史、田上哲也、籀谷雄二、有安宏之、Yu-Shu Li、森山賢治、荒井弘司、細田洋司、小島行康、寒川賢治、中尾一和 ヒトグレリン遺伝子5'上流領域の構造とその機能解析 第76回日本内分泌学会学術総会 5-9-11, 2003
- ⑪ 西條丞佑、赤水尚史 抗 TSH レセプター抗体遺伝子導入マウス (TSAAb-Tg mouse) の甲状腺機能亢進と自己抗体産生機構 第76回日本内分泌学会学術総会 5-9-11, 2003
- ⑫ 有安宏之、高屋和彦、細田洋司、籀谷雄二、金本巨哲、赤水尚史、寒川賢治、中尾一和 ヒトにおける血中クレリンの由来組織とその分泌調節 第76回日本内分泌学会学術総会 5-9-11, 2003
- ⑬ 岩倉浩、細田公則、孫徹、藤倉純二、高田努、野口倫生、高屋和彦、伊藤裕、赤水尚史、小川伸宏、林達也、井上元、細田洋司、小島行康、寒川賢治、中尾一和 ラットクルカコンプロモーター及ヒラットインスリン2プロモーターを用いたクレリン過剰発現トランスジェニックマウスの解析 第76回日本内分泌学会学術総会 5-9-11, 2003
- ⑭ 平谷仁次、池上賢、Donald Bowden、清水章、赤水尚史 SNPを用いた TSH レセプター遺伝子内の連鎖不平衡解析 第46回日本甲状腺学会学術集会 11-19-21, 2003 名古屋
- ⑮ 赤水尚史、中村好一、山腰暎子、稲葉裕、網野信行、清野佳紀 豚族性ハセトウ病に関する全国疫学調査成績 第46回日本甲状腺学会学術集会 11-19-21, 2003 名古屋

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服事業）
分担研究報告書

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
—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—

研究協力者 鬼形 和道 群馬大学大学院医学系研究科 小児生体防御学分野

研究要旨

TSH 受容体遺伝子異常を同定した5例（R450H/G498S, R450H/R519G, 450H/V473I, 450H/R450H 2例）と学会発表の2例（450H/R519G, 450H/R450H），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12.6～38.2mU/L、治療開始月齢1～32か月、ホルモン補充量3～5mcg/体重(kg)、TRHに対するTSH過剰遅延反応、甲状腺は正常、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。

A. 研究目的

日本人におけるTSH受容体遺伝子の機能喪失型変異によるTSH不応症は、MSにより発見されるクレチン症および高TSH血症の鑑別において重要である。日本人に特有と考えられるR450H変異を有するTSH不応症症例および変異遺伝子をヘテロ接合に有する個体の表現型（成長・発達、甲状腺機能）と遺伝子型の相関について検討する。さらに、全国的な調査を計画し新たな変異に対しては機能解析を行なう予定である。こうした検討を通して、クレチン症の分子生物学的分類の確立とともにTSH受容体遺伝子異常症の診断・治療指針の作成を目的とする。

B. 研究方法

クレチン症、高TSH血症を同胞・家族内に持つ全国から奇せられた20家系を対象とした。インフォームトコンセントを得た後にTSH受容体遺伝子の解析を行なった。変異を有する個体の表現型（成長・発達、IQ、甲状腺機能検査）と遺伝子型の関連、および変異をヘテロ接合に有する個体の甲状腺機能を評価した。

C. 研究結果

新たな遺伝子異常症（450H/V473I）の1例と450H変異を有するか他のアレルに変異（膜貫通部分）を認めない1例を同定した。前者の機能解析では、軽度の機能障害を認めた。表現型の検討では、マススクリーニング時の

TSH 値は12.6~38.2mU/L、治療開始月齢1~32か月、ホルモン補充量3~5mcg/体重(kg)、TRH 負荷に対するTSHの過剰遷延反応、甲状腺は正所性、XP上大腿骨遠位端に骨核あり、全例に明らかな甲状腺機能低下症候を認めなかった。いずれの症例も検討した年齢(4~12歳)で成長障害を認めなかった。甲状腺サイズについては、R450H/G498S の兄妹例で低形成を認めたか。R450H/R450H の3症例では軽度低形成を認めた。R450H/R450H の1例ではホルモン補充後にIQ改善を認めた。変異をヘテロ接合に有する個体の甲状腺機能、最終身長は基準値内であった。

D. 考 察

受容体機能解析から、G498S 変異が細胞膜に到達できない重度の機能障害であるのに対して、R519C、R519H では膜には到達するが中等度の障害を、R450H、V473I では軽度の障害を認めた。R450H/G498S 症例の甲状腺低形成が著明であることと関連する。一方、変異受容体機能解析では軽度障害を認める R450H/R450H 3例の表現型の一部に差異を認めており、さらに症例集積が必要である。ヘテロ接合に有する個体についても詳細な検討は今後の課

題である。

E. 結 論

R450H 変異解析を軸とした TSH 受容体遺伝子解析は MS により発見されるクレチン症の高 TSH 血症の鑑別診断 治療指針、および遺伝相談に貢献すると考える。症例の蓄積を図り、その詳細な表現型の検討から TSH の新たな生理的役割を追究することか可能である。

F. 研究発表 (学会発表)

The R450H mutation of the thyrotropin receptor gene is common in Japanese patients with resistance to thyrotropin 75th Annual Meeting of the American Thyroid Association West Palm Beach, 2003

High Prevalence of R450H Thyrotropin Receptor Gene Inactivating Mutation in Japanese Cases with Resistance to Thyrotropin 10th International Symposium on Molecular Thyroidology Matsumoto, 2003

高 TSH 血症の鑑別診断 — TSH 受容体遺伝子解析の意義 — 第46回日本甲状腺学会, 名古屋, 2003

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

in vivo における TSH 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 山梨大学大学院 助教授

研究要旨

ハセトウ病は TSH レセプター (TSHR) 自己抗体により惹起されるか、TSHR が甲状腺以外の組織に発現していることより、随伴症である眼症や前頭骨部粘液水腫についてもその成因に 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、今回 in vivo での TSHR プロモーター活性の検討を行った。ラット TSHR プロモーター、-320 bp を pEGFP 上流に組み込み、FRTL5 細胞に遺伝子導入したところ、TSH 依存性および甲状腺細胞特異的に GFP の蛍光活性が得られた。そこで、TSHR プロモーター/EGFP 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。PCR および Southern blot の結果、3 系統の遺伝子導入動物が得られた。しかし、甲状腺を含め脂肪組織にも EGFP の有る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、より上流の領域がその発現に必要と考えられた。

A. 研究目的

ハセト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か、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。ハセト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か確立されているか、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、さらにこれらの組織での発現には TSHR 遺伝子プロモーターの CRE 領域およびその下流の GA binding protein 結合領域が重要であることを明らかにしてきた。

ハセトウ眼症などの随伴症の病態 新たな治療法の確立のためには、これら甲状腺外 TSHR の分布 発現機構を in vivo レベルで解明することか重要であり、本研究では TSHR 遺伝子

の minimal promoter region の in vivo での活性を GFP 蛍光活性で検出すべく、TSHR minimal promoter/EGFP のトランスジェニックマウスの作成を試みた。

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、-320p (翻訳開始点を +1 とする) より -1 までを pEGFP に結合した。(TSHPR(-320/EGFP)。さらにラットサイロクロフィン遺伝子プロモーター 800~-1 bp を pEGFP に結合した TgP/EGFP を作成し対象として用いた。

(2) 甲状腺細胞、脂肪細胞

甲状腺細胞は FRTL-5 を用い、insulin,