

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 佳紀

平成17年3月

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 佳紀

平成17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6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。本研究班は平成14年に3年間の大きな成果を挙げた後、新たに出発し、本年度末で再び成果のまとめをするに至りました。

平成16年度、副甲状腺研究班では、PHP1bの原因の追究ならびにカルシウム感知受容体の役割を中心に、引き続き病態に及ぼす役割が明らかにされました。ビタミンD受容機構に関しては、引き続きビタミンD受容体の核移行シグナルや新しい転写因子が明らかにされました。ビタミンD抵抗性くる病においては、病態におけるFGF-23の新たな役割が発見されました。甲状腺研究班では、甲状腺ホルモン不応症ならびにTSH不応症における異常TRやTSH受容体の変異を明らかにいたしました。さらに、バセドウ病眼症においても、病態におけるTSH受容体の関与や、遺伝的素因の検討など新しい成果を挙げました。

重要な成果を出していただいた分担研究者ならびに研究協力者各位のご協力を心より感謝申し上げます。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いただき、感謝に絶えません。

ここに、平成16年度の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があります。

平成17年3月

清野佳紀

10. 血清カルシウム維持機構ービタミンD受容体およびカルシウム感知受容体に関する研究……37	
大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学小児発達医学講座	大藪 恵一
11. 日本人のTSH受容体遺伝子異常症の頻度と骨代謝への影響 ……………40	
ーTSH受容体遺伝子変異 (R450H) の簡便同定法の確立と骨代謝パイロットスタディーー	
群馬大学大学院医学系研究科小児生体防御学	鬼形 和道
12. TSHレセプター遺伝子の発現機能に関する研究 ……………42	
山梨大学医学部第3内科	遠藤登代志
13. 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……44	
ーバセドウ病眼症とサイトカイン遺伝子多型ー	
久留米大学医学部内分泌代謝内科	広松 雄治
14. TSH受容体抗体の定量的測定法とバセドウ病治療法選択に関する研究 ……………50	
医療法人 神甲会 隈病院	網野 信行
15. 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 ……………52	
京都大学医学部附属病院 探索医療センター	赤水 尚史
16. 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：……………56	
甲状腺ホルモン受容体によるTSH β 遺伝子転写抑制機構	
浜松医科大学第二内科	中村 浩淑
17. 甲状腺ホルモン不応症の病態解明の研究……………60	
ーTRH遺伝子をモデルとした甲状腺ホルモン受容体による	
ネガティブフィードバック機構の分子メカニズムの解析ー	
群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学	森 昌朋
18. 甲状腺ホルモン不応症の発症機序：……………65	
受容体を介した甲状腺ホルモンのnon-genomic actionによる	
PI3K→Akt/PKB→mTOR→p70 ^{S6K} シグナリングカスケードの賦活	
名古屋大学環境医学研究所	妹尾 久雄
IV 研究成果の刊行に関する研究……………77	
V 班員構成名簿 ……………111	

目 次

I 序 文

II 平成16年度総括研究報告書..... 1	
主任研究者	清野 佳紀

III 分担研究報告

1. PTHのNAG遊離促進作用 5	
東北大学医学部分子血管病態学	水梨 一利
2. 偽性副甲状腺機能低下症の病因・病態・臨床像解析..... 6	
千葉大学大学院医学研究院小児病態学	皆川 真規
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.....13	
徳島大学大学院生体情報内科学	松本 俊夫
4. 特発性副甲状腺機能低下症の病因の検討：カルシウム感知受容体の関与.....17	
島根大学医学部内分泌代謝・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.....20	
東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科	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.....22	
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受容体を介した活性型ビタミンD依存的な転写抑制因子群同定の試み.....26	
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.....31	
日本大学医学部生化学	槇島 誠
9. エンドサイトーシス受容体メガリンとビタミンD代謝.....34	
大阪府立母子保健総合医療センター研究所 環境影響部門	道上 敏美

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型の原因であるDNAメチレーションの異常。新規の病態の発見。VDRの作用発現機序の解明と強力な新規ビタミンD受容体リガンドの発見。新規のリン調節因子Fibroblast growth factor(FGF)-23と細胞外リン濃度の関係。PTHの骨芽細胞作用の分子機構を明らかにした。甲状腺疾患ではTSH受容体と骨代謝の関連の検討。バセドウ病の治療終了指針と治療法選択指針。バセドウ病眼症の遺伝的素因の検討。甲状腺ホルモン不応症については阻害型変異トランスジェニックマウスの検討。転写抑制系の障害の詳細、TRを介した甲状腺ホルモンのnon-genomic作用などを明らかにした。

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・医療法人神甲会 隈病院 学術顧問
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索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
大園 恵一・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が、その病態発生機構については不明な点は数多く残されており、治療法についてもまだまだ不十分である。さらに、研究の進歩に伴い、これまで単一の疾患とされていた疾患も原因病態によって全く別個の疾患である

ことも明らかとなり、これらに対して新たに診断基準もしくは診断のための手順書などの作成が必要となってきた。このために、本研究班では、対象疾患を広く設定し、副甲状腺機能低下症にかかわる病態の解明、実態の把握、治療法の開発、甲状腺機能異常にかかわる病態の解明、実態の把握、治療法の開発を行うことを研究の目的とした。

B 研究方法

研究は副甲状腺疾患を扱う subgroup と甲状腺疾患をとりあつかう subgroup で独立して行われ、各 subgroup の情報は清野によって統括され、各 subgroup の研究に反映されるように努めた。各々の subgroup においては、疾患家系における連鎖解析、臨床サンプルの解析、動物細胞培養を用いた実験、遺伝子改変マウスを用いた実験などにより研究を進めた。

C 研究結果と考察

副甲状腺 subgroup

偽性副甲状腺機能低下症 Ib 型の原因が DNA メチレーションの異常である。孤発性 PHP1 b では、GNAS1 遺伝子上流 (NESP55 · XL α · 1A) のメチル化の異常が認められた。X 不活性化に著しい偏りが高頻度 (50%) に認められ、メチル化異常が GNAS1 遺伝子の近接する遺伝子の genetic な異常ではない可能性が示された。PTH の作用として腎における Lysosome 酵素の放出反応は診断上も重要でこの機構が vesicle membrane の Recycling の促進によって発生していることを示した。PTH の骨に対する直接作用の分子機構については、ERK 依存性の経路と Smad1/5 の活性化経路の二つにより IL-11 を誘導すること、この結果骨芽細胞の分化の促進

とアポトーシスの抑制が生じることを示した。従来より本邦で報告の無かった Casr に対する自己抗体が原因で生じる副甲状腺機能低下症を初めて同定した。ビタミン D の骨に対する直接的な抑制効果は runx2 の遺伝子発現抑制によるものであり、その責任領域をプロモーターの 100bp まで絞り込んだ。また、腎の 1 α 水酸化酵素遺伝子のビタミン D による転写抑制機構をモデルとして新規のクロマチンリモデリング複合体 WINAC の関与について明らかにした。この他、情報伝達の中で最も最前線に位置する VDR の核局在についても ①VDR は DNA 結合領域に存在する配列により、リガンド非依存的に核に局在すること ②DNA 結合領域外の C 端側に他の配列が存在し、リガンド依存的核移行を行なう能力があることを見出した。新規ビタミン D 受容体リガンドとしてリトコール酸アセテートを見出し、この誘導体が ①腸管粘膜由来細胞株及びマウスの腸管粘膜における VDR 標的遺伝子の発現を効果的に誘導すること ②リトコール酸には認められない骨髄性白血病細胞株 THP-1 細胞の分化を誘導する活性を有することを明らかにした。FGF23 の病態における関与を明らかにするため腎不全患者で検討したところ高リン血症を示す慢性腎不全患者では FGF23 濃度は著明な高値を示し、さらに FGF23 の高値と活性型ビタミン D₃ 製剤に対する治療抵抗性、難治性の二次性副甲状腺機能亢進症の発症との間に相関が認められ高リン血症性疾患の病態にも FGF23 が関与していることを明らかにした。

甲状腺 subgroup

バセドウ病で初診時の TRAb 値測定に定量法を導入し 5 年間の寛解との関係を調べた。TRAb 50 IU/L 以上の患者では 87.5% が寛解せ

モンの作用機構に関する研究成果とともに、カルシウム、リン制御の詳細についての新たな情報となるものであり、創薬の標的として有望である。

甲状腺：家族性バセドウ病を用いた検討により、遺伝的素因が明らかになりつつある。また本疾患の重要な合併症である眼症についてもその遺伝的素因が明らかになって、これらは疾患発症予防をも可能とする。また、バセドウ病発症因子の解明によっても、疾患発症予防をも可能とすることが期待される。甲状腺ホルモン不応症の分子生物学的解析は、作用機構の詳細を明らかにすることであり、転写共役因子病ともいえる新たな疾患群の同定も期待される一方、甲状腺ホルモンによるTSHの抑制機構の解明は治療についての重要な情報ともなる。さらに、TSH受容体異常症については、動物実験レベルで明らかとなったTSH受容体の骨代謝にお

ける作用がヒトにおいて実証される可能性があり今後症例を重ねる必要がある。

D. 結 論

副甲状腺・甲状腺において得られた成果は、疾患の正確な診断と適切な治療法選択に有用な情報となりうる。また、新規のリン調節系の発見やビタミンD受容機構の詳細の解明は、本分野における新しい治療法開発に今後貢献していくものである。家族性バセドウ病における連鎖解析結果や、バセド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が期待される。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、バセドウ病治療の検討結果は、直接日常診療に還元されうるものである。

ず、抗甲状腺剤治療よりアイソトープ治療または手術療法を選択するほうが望ましいと考えられた。バセドウ病の遺伝的素因について、候補遺伝子の一つであるTSHレセプター遺伝子内のSNPで関連解析を行い、イントロン8に存在するSNPで有意な関連を認めた。さらに、エクソン7から8付近に分布するSNPにおいてもバセドウ病との関連が認められ、TSHR遺伝子エクソン7-8領域はバセドウ病の疾患感受性領域と考えられた。一方、重症のバセドウ病眼症患者を対象とした検討では、CTLA-4遺伝子多型とバセドウ病発症、TNF遺伝子プロモーター領域の-1031T/C多型と眼症との間に有意な関連が認められた。ヒトのTSH受容体遺伝子異常症における骨代謝のパイロットスタディを行い遺伝子変異を有する個体に軽度の骨塩量低下を認めた。ヒトにおいてもTSHが骨代謝に関わることが示唆された。RTHにみられる不適切TSH分泌状態（SITSH）の機序を明らかにするため、甲状腺ホルモン受容体（TR）のT3依存性TSH β 遺伝子転写抑制機序を検討した。「T3がTRに結合すると、クロマチン構造が変化し、TRAP220がGATA2から解離して転写が抑制される。」というモデルが提唱された。一方、甲状腺ホルモン不応症（RTH）の病態にTRH遺伝子の発現調節も深く関与することが明らかとなりつつある。TRによるTRH遺伝子のネガティブフィードバック調節分子機構の詳細な解析を行った。その結果、TRH遺伝子の転写抑制DNA領域に、転写因子Leader binding protein-1c（LBP-1c）が結合し、LBP-1cを介してTRがTRHプロモーターに間接的にリクルートされることが判明した。更に、T3存在下においてヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）2ならびに3が一過性にLBP-1/TR複合体にリ

クルートされ、ヒストン脱アセチル化が惹起される結果TRH遺伝子転写が抑制されることが明らかとなった。また、甲状腺ホルモン応答性遺伝子ZAKI-4遺伝子の増加が、mTOR（mammalian target of rapamycin, a serine-threonine kinase）の活性化を介することから、甲状腺ホルモンによるmTORの活性化機序を詳細に検討し、細胞膜のPI3Kを活性化で始まるAkt/PKB \rightarrow mTOR \rightarrow p70S6Kのシグナリングカスケードを活性化経路を明らかにした。このシグナリングカスケードの活性化の欠損も不応症の発症機序の一因と考えられた。

以上の成果は今後以下のように展開、還元され得るものとする。

副甲状腺：ビタミンDの受容機構に関する研究成果は、ビタミンD作用機構を明らかにすることであり、この成果により、新規の治療薬開発が可能となる。特に、ビタミンDの骨に対する直接作用の解明は新しい骨疾患治療薬の開発における方向性の決定に重要な情報となる。最も疾患治療に直接的な影響を持つ成果は、家族性偽性副甲状腺機能低下症の原因としてDNAメチレーションの異常とその異常を規定する遺伝子異常が解明されたことであるが、孤発性PHP1bではepigeneticな遺伝子発現制御機構であるX不活性化に著しい偏りがみられ、エピジェネティックな因子は予想以上に複雑である。低カルシウム血症の診断のガイドラインを作製したが、その後も新たな病態が発見されており、本研究班でもカルシウム感知受容体に対する自己抗体による低Ca血症が始めて発見され、ガイドラインの改訂を行う。新規のリン制御因子であるFGF23についての成果は、副甲状腺ホル

Ⅲ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服策研究事業）
分担研究報告書

PTHのNAG遊離促進作用

東北大学医学部分子血管病態学 水梨 一利

研究要旨

我々は、PTH投与後にNAGなどのlysosomal enzymeの尿中排泄量増加が増加すること、この増加反応が尿細管のPTHに対する応答性の指標として有用であることを報告してきた。今回は、OK cellを用いてNAG遊離やlysosomeやendosomeの細胞内分布に対するPTHの作用を検討した。PTHは、vesicle membraneのrecycling pathwayを促進することで、Lysosome酵素の遊離を増加させていると考えられた。

A. 研究目的

我々は、PTHの投与後にN-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) などのlysosomal酵素の尿中排泄量が増加すること、その増加反応が、尿細管のPTHに対する応答性の指標として有用であることを報告してきた。今回は、lysosome細胞内移動や蛋白輸送に対するPTHの作用を明らかにすることを目的として以下の実験を行った。

B. 研究方法

内因性NAG遊離やlysosomeの細胞内移動に対するPTHの作用をOK cellを用いて検討した。また、FITC-labeled albuminの取り込み、及びあらかじめ取り込ませたFM1-43やFITC-labeled albuminの遊離に対するPTHの作用も検討した。lysosomeはlysotrackerによる染色あるいはLamp2とGFPの融合蛋白の発現により、endosomeは、Syntaxin7, 8とGFPの融合蛋白の発現により、それぞれ可視化した。

C. 研究結果

PTHは、内因性のNAGの遊離を促進させた。

更にalbuminの取り込みを増加させるとともに、あらかじめ取り込ませたFM1-43やFITC-labeled albuminの遊離を促進した。lysosomeは細胞全体に分布しているが、PTH負荷後に核周囲部へと移動し、Syntaxin7やSyntaxin8とco-localizeした。

D. 考 察

Lysosomeは、細胞内のvesicle membraneのrecyclingを介して、細胞内外の物質輸送に関わっていると考えられた。

E. 結 論

PTHは、vesicle membraneのrecycling pathwayを促進することで、Lysosome酵素の遊離を増加させていると考えられた。

F. 研究発表

論文発表

Mizunashi K, J Am Soc Nephrol. Effects of PTH and calcitonin on the NAG release and intracellular distribution of lysosomes. (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

偽性副甲状腺機能低下症の病因・病態・臨床像解析

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

これまでの検討でGNASI遺伝子エクソン1Aに母性アリの脱メチル化をみとめた孤発性PHP1b14例でSTX16およびNESP55領域の欠失はなく、GNASI遺伝子シスエレメントの異常は同定されなかった。孤発性PHP1bではepigeneticな遺伝子発現制御機構であるX不活性化に著しい偏りが高頻度（50%）にみとめられ、これらではエクソン1Aのメチル化異常がGNASI遺伝子の近接する遺伝子のgeneticな異常によらず生じ、GNASI遺伝子の存在する20番染色体以外の染色体上の遺伝子のepigeneticな発現制御機構にも何らかの異常を伴っている可能性が示唆された。

A. 研究目的

偽性副甲状腺機能低下症（PHP）は古典的なホルモン不応症である。昨年の本研究班の研究により提唱された「副甲状腺機能低下症の診断の手引き」が診断・治療の点で果たしている役割は非常に大きい。PHPに関する重型の診断方法についてさらに深める余地が残されている。PHPの大部分は1a型と1b型に区分されるが、これらは遺伝性、病像が異なるため正確な診断が必要である。これまで臨床的な診断により両者は容易に区別できると考えられてきたが、われわれの研究により臨床的診断の困難な症例が存在し、それらがDNAメチル化解析により1b型に区別されることを示した。これまで副甲状腺ホルモン抵抗性のみが特徴とされた1b型の多様性が明らかになり、分子生物学的診断法の確立および臨床像の解析の必要性が増すことになった。

PHP1bの病因に関しては、諸外国およびわれわれのこれまでの研究によりホルモン受容機構

のkey factorであるGs α 蛋白をコードするGNASI遺伝子の転写調節領域のDNAメチル化異常によることがほぼ確立された。PHP1b特異的なepigenetic異常は、エクソン1A（A/B）領域に存在するDMRの母性アリの特異的メチル化の脱メチル化であるが、特異的組織でのGs α 蛋白発現のメチル化による制御機構と母性アリの特異的脱メチル化の機序は不明である。このepigeneticな異常を惹起するとされているgeneticな異常は、これまで家族性PHP1b（母系遺伝）におけるGNAS遺伝子シスエレメントの欠失としてSTX16領域の欠失16家系（Bastepe M et al. *J Clin Invest* 112, 2003）および昨年の本研究班においてわれわれが報告した2家系に同定されているが、最近新たなNESP55領域の欠失が2家系において報告されており（Bastepe M et al. *Nat Genet* 37, 2004）、この2家系では見かけ上メチル化異常がエクソン1A以外のdifferentially methylated region（DMR）にもおよんでいる点は、われわれがこ

れまで孤発性とし非遺伝性のPHP1bと考えてきた症例と類似している。そこで、孤発性PHP1bにおいてこの領域の欠失がみられるか検討した。

また、大部分のPHP1bは孤発例であるがその原因についての情報はまだ非常に少ない。われわれはこのepigeneticな異常がgeneticな異常によらず何らかのepimutagenによりprimaryに生じた異常であると推測しているが、Demuraらによって報告されたPHP1bの1例は特殊な臨床像を呈し（発達遅滞、若年性レニン依存性高血圧症）、completely skewed X-inactivationがみとめられた（Demura M et al. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2003）。この報告は孤発性PHP1bの成因を考える上で大変示唆に富んでおり、こうしたX染色体の制御異常が孤発性PHP1bの特徴の1つではないかと考え、検討した。

B. 対象・方法

1) NESP55領域の欠失の検討

対象は14例の孤発性PHP1bとした。これらはすべてこれまでの検討でGNASI遺伝子のエクソン1A領域の母性アレルの脱メチル化を確認しており、STX16の欠失をみとめなかった症例である。末梢血由来ゲノムDNAを用いて、既報の方法（Bastepe M et al. *Nat Genet* 37, 2004）に基づいてNESP55領域を挟むプライマーでPCR増幅し、アガロースゲル電気泳動によりNESP55領域の欠失の有無を検討した。

2) skewed X-inactivationの検討

対象は先の14例の日本人孤発性PHP1bのうち、6例の女性とした。既報の方法（Demura M et al. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2003）に従い、末梢血由来ゲノムDNAをアンドロジェン受容体遺伝子プロモーター部のCAGリピート

多型をはさむ位置にPCRプライマーを設定し（一方のプライマーはテキサスレッドラベルしたもの）、PCR増幅しオートシーケンサーで電気泳動した。Skewed X-inactivationは、メチル化感受性制限酵素Hpa IIおよびHha Iにて切断前後のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行い、電気泳動パターンおよび蛍光ピーク値を比較することによって評価した。

（倫理面への配慮）

ヒトにおいては臨床像の解析が中心で、研究にあたっては、施設の倫理委員会の承認のもとで個人情報の保護と研究対象者の人権を最優先として、患者に対し十分に説明を行い書面による承諾を得ておこなった。

C. 研究結果

1) NESP55領域の欠失の検討

図1にBastepeらが報告した家系Y2にみられたNESP55領域の欠失の検討方法と結果を示す。この家系にみられた異常では、エクソンNESP、AS4、AS3の欠失がある。正常ではプライマーabに由来する1191bpとプライマーcdに由来する1561bpの増幅がみられるが、欠失のある場合プライマーbおよびcの配列が欠失するためにプライマーad由来の425bpのPCR産物が生じる。コントロールおよび14例のPHP1bでこの欠失はみられなかった。

同様に図2に家系CでみられたNESP55領域の欠失の検討方法と結果を示す。この家系にみられた異常では、エクソンNESP、AS4、AS3の欠失があり、かわりに挿入がみられる。プライマーabeのPCRで正常では1191bpの増幅がみられるが、異常ではプライマーbの配列を欠きかわりにプライマーeの配列が挿入されるために539bpの増幅がみられる。また、プライマー

cdfのPCRで正常では1561bpの増幅がみられるが、異常ではプライマーcの配列を欠きかわりにプライマーfの配列が挿入されるために1087bpの増幅がみられる。いずれのPCRにおいても、コントロールおよび14例のPHP1bでこの欠失はみられなかった。

2) skewed X-inactivationの検討

図3にアンドロジェン受容体プロモーターCAGリピート多型を用いたX-inactivation assayの結果を示す。検討した6例のPHP1b女性のうち2例はこの多型がホモであったために検討できなかった(表1のP13とP27)。検討可能であった4例のうち2例(P9とP21)でcomplete skewed X-inactivation(父性母性アレルの偏りが90%以上のもの)をみとめた。これらの症例についてXL α s領域のメチル化異常パターン(以前の本研究班発表にて報告済み)、skewed X-inactivation、臨床症状をまとめたのが表1である。これらの特徴の間には何ら相関をみとめていない。

D. 考 察

表2にこれまでの報告(Bastepe M et al. *J Clin Invest* 112, 2003; Bastepe M et al. *Nat Genet* 37, 2004; Liu J et al. *Hum Mol Genet* 14, 2005)およびわれわれの検討結果をまとめた。家族性PHP1bの大部分はSTX16の欠失であり、ごくまれに特殊なNESP55領域を含む欠失の症例がある。1家系で異常の同定されていないものがあるが、この家系ではGNAS1遺伝子のシスエレメントのgeneticな異常があるものと推測される。一方、孤発例PHP1bでは、エクソン1AのみならずGNAS1遺伝子の他の領域のDMRのメチル化異常をともなっている。この

ようにメチル化異常部位がNESP、AS、XLにも及ぶものは非遺伝性の可能性が高く、かつNESP55領域の欠失がなければ非遺伝性であると考えられる。

孤発性のPHP1bのメチル化異常をきたす原因は不明であるが、正常集団では3%程度しかないcomplete skewed X-inactivationが高頻度(50%)にみられたことから、GNAS1に生じたようなepigenetic異常は他の遺伝子のepigeneticな遺伝子制御機構にも生じている可能性が示唆された。特異な合併症の原因については他の遺伝子のepigenetic異常を検討する必要がある。

これらの異常の関連について模式図化したものが図4である。ただし、これらの要素を結ぶ間のメカニズムはほとんど明らかにされておらず、今後の課題である。

E. 結 論

PHP1bの病因はgenetic、epigeneticの両者の異常を含む多様性がある。孤発性PHP1bではepigeneticな遺伝子発現制御機構であるX不活性化に著しい偏りが高頻度(50%)にみとめられ、これらではエクソン1Aのメチル化異常がGNAS1遺伝子の近接する遺伝子のgeneticな異常によらず生じ、GNAS1遺伝子の存在する20番染色体以外の染色体上の遺伝子のepigeneticな発現制御機構にも何らかの異常を伴っている可能性が示唆された。特殊な合併症はGNAS1以外の遺伝子のepigeneticな異常による可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 数川逸郎、皆川真規、渡邊智之、木下香、佐藤裕美子、下橋京子、南谷幹史、安田敏行、河野陽一. 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メチル化異常と臨床像の検討. ホルモンと臨床 52(10):971-976, 2004

2. 学会発表

- (1) 第77日本内分泌学会学術総会 平成16年6月24日
偽性副甲状腺機能低下症の表現型とDNAメチル化異常. 数川逸郎、皆川真規、安齋未知子、木下香、佐藤裕美子、渡辺智之、南谷幹史、安田敏行、河野陽一.
- (2) 第38回日本小児内分泌学会 平成16年9月23日
GNAS1転写調節領域にメチル化異常を認め甲状腺機能低下症を合併した偽性副甲状腺機能低下症Ibの1例

小林啓二、大竹明、皆川真規、皆川孝子、木村明美、新美仁男、佐々木望

- (3) 第38回日本小児内分泌学会 平成16年9月23日
慢性腎不全に伴う二次性副甲状腺機能亢進症に対し副甲状腺摘出術を施行した1例
安齋未知子、松村千恵子、宇田川淳子、皆川真規、河野陽一、倉山英昭
- (4) 第38回日本小児内分泌学会 平成16年9月23日
新生児期小腸部分切除後のカルシウム欠乏によると考えられたくる病の1例
木下香、安齋未知子、佐藤裕美子、数川逸郎、下橋京子、皆川真規、河野陽一

G. 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

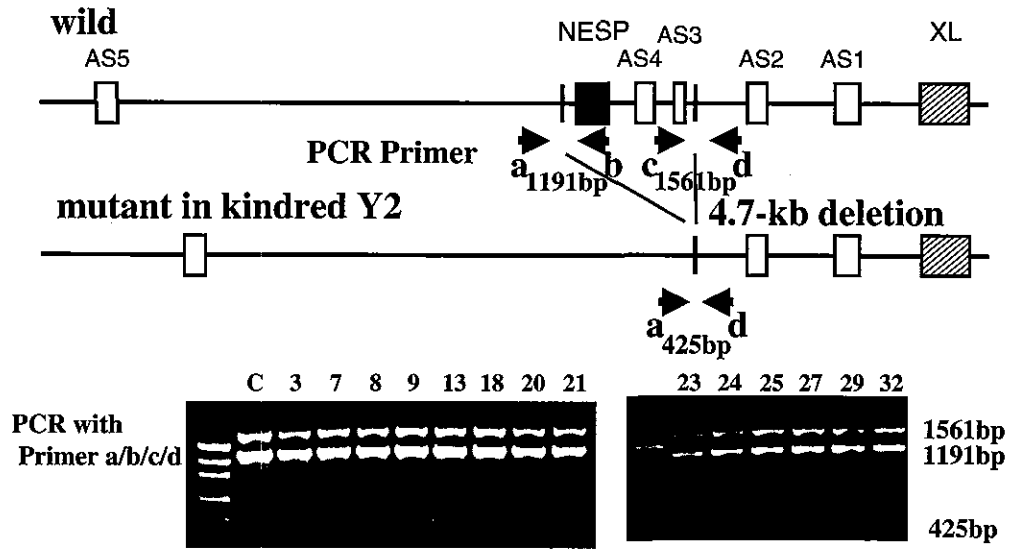


图 1

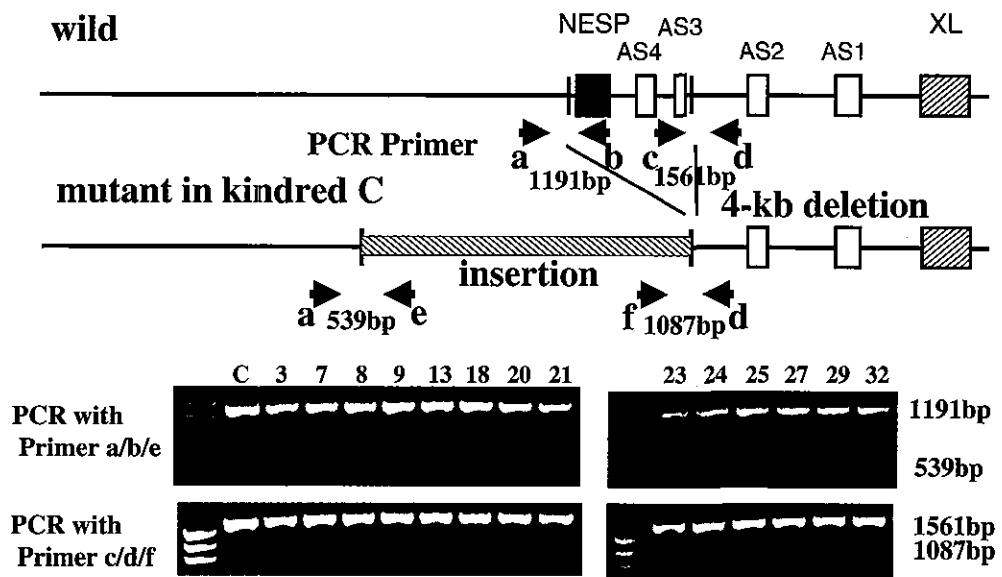


图 2

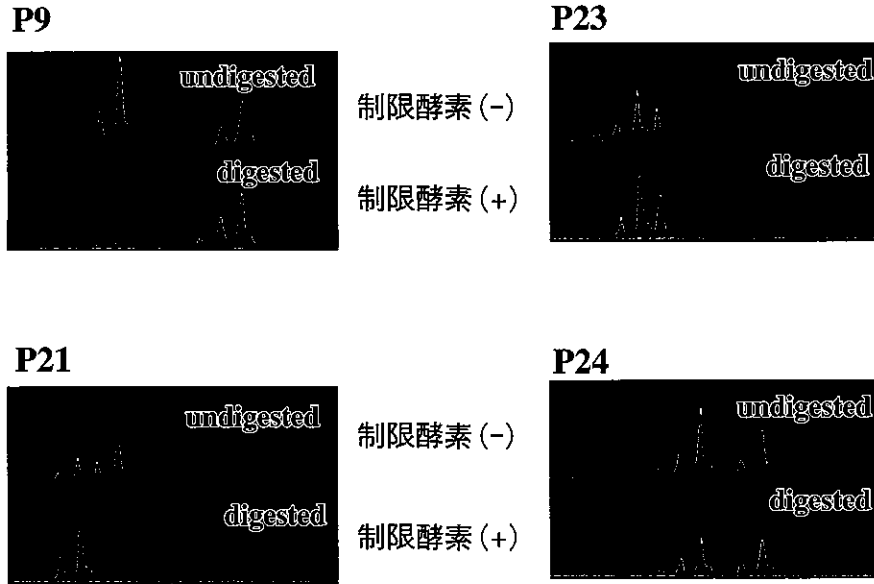


図 3

表 1

	XL <i>NotI</i>	XL <i>AscI</i>	X- inactivation	円形顔貌	短指症	知能	合併症
P9	-/-	+/-	90:10	-	-	正常	
P13	+/-	+/-	検討不能	-	-	正常	
P21	-/-	-/-	95:5	+	-	IQ=82	感音性難聴
P23	-/-	-/-	55:45	+	-	IQ=84	先天性眼瞼下垂
P24	+/-	-/-	60:40	-	-	正常	
P27	-/-	-/-	検討不能	+	+	正常	

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 の欠失	NESP55 DMR の欠失	例数
+	-	+	-	家族例：19 孤発例：4
+	-	-	-	家族例：1
+	+	-	+	家族例：2
+	+	-	-	孤発例：29

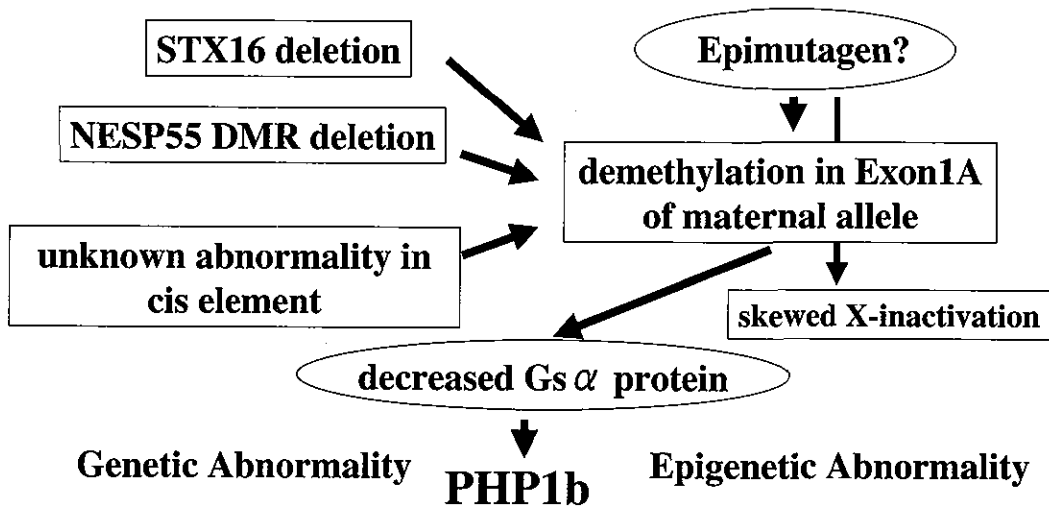


図4