

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が、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を誘導するのみならず異なるシグナル経路を介してBMPの下流転写因子Smad1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が、その病態は主にPTHが果たすべき腎近位尿細管におけるリン再吸収抑制、活性型ビタミン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が、その機序については不明である。

また、副甲状腺機能低下症の治療薬として用いられる活性型ビタミンDはPTH作用の一部のみしか代償できないことから、高カルシウム尿症などがしばしば問題となる。PTHの各臓器における作用機序の解明は副甲状腺機能低下症における新たな代替療法の可能性を開くものと考えられる。

骨に対しては、PTHは骨吸収促進作用を介した血中へのカルシウム動員によって血中カルシウム濃度の維持に貢献している一方、間欠的投与により骨形成を促進してアナボリックに作用することが知られている。このような複雑な骨作用におけるGs, Gqを介したシグナルの貢献度や、作用の時間依存性の機序などについてはほとんど不明である。さらに加齢、グルココルチコイド過剰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に関与している可能性がある。

本研究の目的は、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ことである。これまでの研究により特にAP-1転写因子およびその下流標的遺伝子である骨形成性サイトカインInterleukin (IL)-11に注目し、PTHがERK依存性の δ fosB誘導に引き続きIL-11の転写をも

促進することを明らかにした。そこで平成16年度はこれらのシグナル系におけるBMP下流転写因子であるSmad1の関与を検討した。

B. 研究方法

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が知られているSmad1のPTHシグナルにおける役割を検討した。

- 1) IL-11遺伝子の発現および転写に対するBMP-2の効果をRT-PCRおよびluciferase assayにより調べた。
- 2) Smad1の活性化に対するPTHの効果を調べた。
- 3) AP-1とSmad1との協調作用をluciferase assayにより検討した。
- 4) 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ールに基づき、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) BMP-2は新生児マウス頭蓋骨由来の初代培養骨芽細胞において、IL-11 mRNAの発現を増加させた。
- 2) 上記の促進効果は転写レベルで認められた。
- 3) PTHは単独でSmadのリン酸化、活性化をもたらした。この効果はERKの阻害薬による影響を受けなかった。
- 4) AP-1転写因子の一つでin vivoでの骨形成促進能を有する δ fosBは、Smad1と協調的にIL-11遺伝子の転写を促進した。

D. 考察

以上の検討により、骨芽細胞においてPTHがERK依存的なAP-1(δ fosB)の誘導およびERK

非依存的なSmad1の活性化を介してIL-11遺伝子の転写を誘導することが明らかとなった。

PTHによるSmad1の活性化機序の詳細は不明であるが、AP-1誘導に至る経路とは別のERK非依存的なシグナル経路の関与が考えられる。そしてこれらの両経路の活性化とその協調的な作用が、IL-11などの骨形成促進因子の転写を誘導することによりPTHの骨形成促進作用に寄与しているものと思われる。

我々のこれまでの研究により、AP-1・Smad1転写因子複合体の活性は力学的負荷によっても活性化され、逆に加齢やグルココルチコイドによって抑制されることが明らかとなっていることから、この転写複合体は普遍的な骨形成制御因子であるとともに、加齢やグルココルチコイド過剰におけるPTH作用の低下にも関わっている可能性がある。

E. 結論

PTHはERK依存性に δ fosBをはじめとするAP-1転写因子を誘導する一方、ERK非依存性にSmad1を活性化することが明らかとなった。PTHはこれらの独立した二つのシグナル経路の協調的作用によりIL-11などの下流標的遺伝子を誘導し、骨芽細胞分化促進、アポトーシス抑制作用などを介して骨形成促進作用を発揮するものと考えられる。AP-1・Smad1/5転写因子複合体の活性は力学的負荷によっても誘導され、逆に加齢や不動などでは抑制されることから、生理的骨形成や骨形成低下病態において、骨のPTH反応性を規定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. Abe, M., Hiura, K., Wilde, J., Shioyasono, A., Moriyama, K., Hashimoto, T., Kido, S., Oshima, T., Shibata, H., Ozaki, S., Inoue D., Matsumoto, T., et al. 2004. Osteoclasts enhance myeloma cell growth and survival via cell-cell contact: a vicious cycle between bone destruction and myeloma expansion. *Blood* 104:2484-2491.
2. Aihara, K., Azuma, H., Akaike, M., Ikeda, Y., Yamashita, M., Sudo, T., Hayashi, H., Yamada, Y., Endoh, F., Fujimura, M., Kato, S., Matsumoto, T., et al. 2004. Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice. *J Biol Chem* 279:35798-35802.
3. Inoue, D., Kido, S., and Matsumoto, T. 2004. Transcriptional induction of fosB/delta fosB gene by mechanical stress in osteoblasts. *J Biol Chem* 279: 49795-49803, 2004.
4. Hashimoto, T., Abe, M., Oshima, T., Shibata, H., Ozaki, S., Inoue, D., and Matsumoto, T. 2004. Ability of myeloma cells to secrete macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta correlates with lytic bone lesions in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 125:38-41.
5. Tanimoto, Y., Yokozeki, M., Hiura, K., Matsumoto, K., Nakanishi, H., Matsumoto, T., Marie, P.J., and Moriyama, K. 2004. A soluble form of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) with S252W mutation acts as an efficient inhibitor for the enhanced osteoblastic differentiation caused by FGFR2 activation In Apert syndrome. *J Biol Chem* 279: 45926-45934.
6. Watanabe, Y., Ohshima, H., Mizuno, K., Sekiguchi, C., Fukunaga, M., Kohri, K., Rittweger, J., Felsenberg, D., Matsumoto, T., and Nakamura, T. 2004. Intravenous Pamidronate Prevents Femoral Bone Loss and Renal Stone Formation during 90-Day Bed Rest. *J Bone Miner Res* 19: 1771-1779.
7. Inoue D and Matsumoto T. Reduced AP-1 Mediated Transcription of Interleukin-11 Gene in Marrow Stromal Cells As a Mechanism of Senile Osteoporosis: Lessons from SAMP6. Proceedings of the 2nd International conference on Senescence: The SAM Model. International Congress Series (Elsevier, Amsterdam): 61-65: 2004.

2. 学会発表

1. 第77回日本内分泌学会学術総会 (6/24-26/2004、京都)
力学的負荷 (Fluid shear stress) プロテインキナーゼC依存性にSmad1/5を活性化して骨芽細胞分化を促進する。
井上大輔、木戸慎介、今村健志、宮園浩平、松本俊夫
2. 第22回日本骨代謝学会学術総会 (8/4-7/2004、大阪)
グルココルチコイドによるIL-11遺伝子転写の抑制
伊藤祐司、木戸慎介、井上大輔、松本俊夫
3. 第22回日本骨代謝学会学術総会 (8/4-7/2004、大阪)
力学的負荷はPKC依存性かつBMP受容体非

依存性にSmad1を活性化して骨芽細胞分化を促進する：木戸慎介、井上大輔、今村健志、宮園浩平、山内英美子、宮本貴子、谷口寿章、松本俊夫

4. 26th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Seattle, October 1-5, 2004)

Inhibition of interleukin-11 gene transcription by glucocorticoid.

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

H. 知的所有権の出願・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

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

主任研究者 杉本 利嗣 島根大学医学部内分泌代謝・血液腫瘍内科 教授
共同研究者 山内 美香 島根大学医学部内分泌代謝・血液腫瘍内科 助手

研究要旨

原因不明のカルシウム（Ca）代謝異常症の代表的疾患である特発性副甲状腺機能低下症（IHP）の病因の検討を行った。自己免疫機序の関与が考えられるIHP弧発例について、その病因にCa感知受容体（CaSR）が関与するか否かを検討した。CaSRにE942Kとなる変異を認めたが、Ca代謝異常を示さない家族にも同様の変異が認められ、IHPの病因には関与していないと考えられた。本症例の血清中に抗CaSR抗体を認め、さらに患者血清がヒト副甲状腺培養細胞のPTH分泌を抑制することを示した。IHPの病因として刺激型抗CaSR抗体が関与する可能性を本邦で初めて示した。原因不明のCa代謝異常症の病因として、CaSRの遺伝子異常とともに、抗CaSR自己抗体の関与が、本邦でも検討される必要性を提起した。

A. 研究目的

特発性副甲状腺機能低下症（IHP）をはじめとする原因不明のカルシウム（Ca）代謝異常症の病因を解明するにあたり、Ca感知受容体（CaSR）の関与について、特に抗CaSR抗体が関与するか否かを明らかにする。

B. 研究方法

自己免疫疾患を合併し、血中Ca値が著明な動揺性を示し、IHPの病因に自己免疫機序の関与が考えられるIHP弧発例について、以下の検討を行った。

a) CaSR遺伝子異常についての検討

患者末梢血より得た白血球よりDNAを抽出し、ダイレクトシーケンス法によりCaSR遺伝子変異の有無を確認する。

b) 抗CaSR抗体の存在の有無についての検討

腎不全による続発性副甲状腺機能亢進症患者の副甲状腺摘出術で得られたヒト副甲状腺組織より蛋白抽出を行う。ヒトCaSRに対する抗体のみを患者血清から精製し、これを一次抗体としてWestern blotting法にてヒトCaSRに対する抗CaSR抗体の有無を確認する。

c) ヒト副甲状腺における患者血清のPTH分泌に対する影響

上記と同様に続発性副甲状腺機能亢進症患者の副甲状腺摘出術で得られたヒト副甲状腺培養細胞にCaを投与すると、CaSRを介して上清へのPTH分泌は抑制される。これが患者血清の投与によりどの様な影響を受けるかを検討する。以上より、存在すると考えられる抗CaSR抗体の機能が患者の臨床像に関与

するか否かを明らかにする。

(倫理面への配慮)

検討したすべての患者からinformed consentを取得しており、当施設の倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

a) 本IHP例のCaSRにE942Kとなるヘテロな変異を認めた。これは既報の変異でなく、遺伝子多型でもなかった。しかし、IHPを有さない、検討したすべての家族に同様の変異を認めた。

b) Western blotting法にて、精製した患者血清でCaSRの分子量レベルにimmunoblotを認めた。

c) 患者血清はコントロール血清と異なり、ヒト副甲状腺培養細胞のPTH分泌を有意に抑制した。

以上より、IHP弧発例で、その病因に刺激型の抗CaSR抗体が関与する可能性が示された。

D. 考 察

CaSRの同定により、家族性低Ca尿性高Ca血症や新生児重度副甲状腺機能亢進症がCaSRの不活性型変異により惹起され、一方、常染色体優性副甲状腺機能低下症は活性型変異が原因であることが明らかとなった。本IHP例についてもCaSRの遺伝子変異の検討を行い、遺伝子多型でない新規の変異を確認した。しかしIHPを示さない家族にも同様の変異を認め、この変異はIHPの病因には関与しないと考えられた。

一方、CaSRの遺伝子変異によるCa代謝異常症と同様の臨床像を示すにもかかわらずCaSRに変異を認めない例がいくつか存在する。これ

らの病態のうち一部を明らかにする報告が、2003年にKiforらによってなされた。CaSRに対する抗体によるCaSRの機能障害である。CaSRに対する抗体の存在は1996年に副甲状腺機能低下症例で報告されていたが、これが病因に関わるかは明らかとなっていなかった。Kiforらは高Ca血症を示す家系で抗CaSR抗体が存在することを示し、これがCaSR機能を抑制することをin vitroで証明した。さらに、副甲状腺機能低下症においても、CaSRの刺激型抗体が原因である2症例が報告された。今回我々は、弧発性のIHP例につき、刺激型の抗CaSR抗体がその病因に関わる可能性を本邦で初めて示した。IHPの病因の少なくとも一部には、抗CaSR抗体が関与する症例が本邦でも存在することが明らかとなった。今後IHP以外の原因不明のCa代謝異常症についても、病因として、CaSRの遺伝子異常とともに、刺激型や抑制型の抗CaSR自己抗体の関与が、本邦でも検討される必要性を提起した。今回の研究は、Ca代謝異常症の病因分類と診断法の確立に向け一助となるものと考えられる。

E. 結 論

自己免疫機序の存在が考えられるIHP弧発例における病因の検討を行った。CaSRにE942Kとなる変異を認めたが病因には関与していないと考えられた。IHPの病因として刺激型の抗CaSR抗体が関与する可能性を本邦で初めて示した。原因不明のCa代謝異常症の病因として、CaSRの遺伝子異常とともに、抗CaSR自己抗体の関与が、本邦でも検討される必要性を提起した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamauchi M, Yamaguchi T, Kaji H, Sugimoto T and Chihara K. Involvement of calcium-sensing receptor (CaR) in osteoblastic differentiation of mouse MC3T3-E1 cells. Am J Physiol Endocrinol Metab 288:608-616,2005.

2. 学会発表

山内美香、梶博史、千原和夫、杉本利嗣：原発性副甲状腺機能亢進症と家族性低Ca尿性高Ca血症の鑑別診断。第15回臨床内分泌代謝Update（札幌）2005年3月12-13日

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

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 腎臓・内分泌内科 講師

研究要旨

低リン血症性くる病/骨軟化症の惹起因子として同定されたFibroblast growth factor (FGF) 23の、各種リン代謝異常症の発症における役割については不明な点が残されている。そこで原発性副甲状腺機能低下症と慢性腎不全患者血中のFGF23濃度を検討した。FGF23は腎機能が正常な原発性副甲状腺機能亢進症患者では基準値内の値を示した。一方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た。これらの成績は、低リン血症性くる病/骨軟化症の発症に加え、高リン血症性疾患の病態にもFGF23が関与していることを示している。

A. 研究目的

X染色体優性低リン血症性くる病/骨軟化症 (X-linked hypophosphatemic rickets/osteomalacia: XLH)、常染色体優性低リン血症性くる病/骨軟化症 (autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia: ADHR)、および腫瘍性くる病/骨軟化症 (tumor-induced rickets/osteomalacia: TIO) は、いずれも尿細管リン再吸収障害による低リン血症を特徴とする類似疾患である。このうち、ADHRの原因遺伝子としてfibroblast growth factor (FGF) 23がクローニングされ、TIOやXLHにおいてもFGF23の高値が報告された。しかし、他のリン代謝異常症発症におけるFGF23の役割については、不明な点が残されている。そこで低リン血症、高リン血症を示す疾患患者の血中FGF23濃度を検討することにより、リン代謝異常症の発症におけるFGF23の役

割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

低リン血症を示す原発性副甲状腺期の亢進症患者、および高リン血症を呈する慢性腎不全患者の血中FGF-23濃度を測定した。さらに慢性腎不全患者ではFGF23濃度と二次性副甲状腺機能亢進症の発症との関連を検討した。

C. 研究結果

腎機能が正常な原発性副甲状腺機能亢進症患者ではFGF23は基準値内の値を示した。従って本症の低リン血症の発症においてはFGF23作用の過剰は大きくは寄与していないことが明らかとなった。一方慢性腎不全患者ではFGF23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

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

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) の骨への直接作用は骨幹部の皮質骨形成の抑制であることを様々な実験系を用い示してきた。さらに、この過程にはrunx2遺伝子発現の1,25による抑制が関与していることも明らかにしてきた。本年度はこの抑制反応の分子メカニズムを明らかにする目的でrunx2プロモータ領域の解析を行い、-168のDR3は抑制反応に関与していないこと、-1.8Kbから-1.9Kbの間に存在する100bpの塩基配列が抑制反応に必要であることを明らかにした。また、骨代謝に重要な因子であるFGF23の1,25による転写調節についても検討を開始した。

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マウスの骨を用い様々な実験系で検討を行ってきた。即ち、KO骨の野生型マウスへの移植実験、骨器官培養、骨器官発生の検討であり、いずれの実験系においても1,25の骨に対する直接作用は骨形成の負の調節にあるということであった。さらに、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考えられた。この結論をさらに裏付ける目的で今年度は、runx2遺伝子の5'プロモータ領域の解析を行い、1,25による負の転写制御機構の解明を試みた。さらに、骨の石灰化を抑制する因子として同定された線維芽細胞増殖因子23 (FGF23) の1,25による転写制御についても検討を加えた。

B. 研究方法

pGL3 basic vectorにマウスrunx2遺伝子の上流の約4.6kbを組み込んだレポーターベクターを作製した (-4579~-8: pGL3 4.6)。これをもとに5'側から様々な長さの塩基を削除したTruncation mutantを作製した。また、転写開始コドンの近傍に位置するDR3配列 (AGTACTGTGAGGTCA: -98~-84) に変異を加えたmutant (DR3 mutant) を作製した。これらのコンストラクトを用いビタミンDの転

関が認められた。

D. 考 察

FGF23はADHRの原因遺伝子であるのに加え、TIOやXLH患者でも血中濃度の上昇が報告されている。実際のXLHのモデルマウスであるHypマウスの低リン血症は抗FGF23抗体で改善することから、FGF23作用過剰がこれらの低リン血症くる病/骨軟化症の原因と考えられる。また慢性腎不全に伴う高リン血症は著明なFGF23の上昇をもたらし、このFGF23の高値と二次性副甲状腺機能亢進症との発症に相関が認められた。これらの結果は、FGF23測定が二次性副甲状腺機能亢進症の発症予測に有用であり、FGF23作用の抑制が本症発症予防に有用である可能性を示している。

E. 結 論

低リン血症くる病/骨軟化症の発症に加え、高リン血症性疾患の病態にもFGF23が関与していることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takeuchi Y et al.: Venous sampling for fibroblast growth factor (FGF)-23 confirms preoperative diagnosis of tumor-induced

osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab* 89(8):3979-3982, 2004.

- 2) Shigematsu et al.: Possible involvement of circulating fibroblast growth factor 23 in the development of secondary hyperparathyroidism associated with renal insufficiency. *Am J Kidney Dis* 44(4):250-256, 2004.
- 3) Yamashita H et al.: Fibroblast growth factor (FGF)-23 in patients with primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 151(1): 55-60, 2004.
- 4) Kazama JJ et al.: Pretreatment serum FGF-23 levels predict the efficacy of calcitriol therapy in dialysis patients. *Kidney Int* 67(3):1120-1125, 2005.
- 5) Nakanisih S et al.: Serum fibroblast growth factor-23 levels predict the future refractory hyperparathyroidism in dialysis patients. *Kidney Int* 67(3):1171-1178, 2005.

2. 学会発表

1) Araya K et al.: A mutant in FGF-23 gene enhances the processing of FGF-23 protein and causes tumoral calcinosis. Twnty-Sixth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Seattle, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

写活性に対する効果をluciferase活性で検討した。

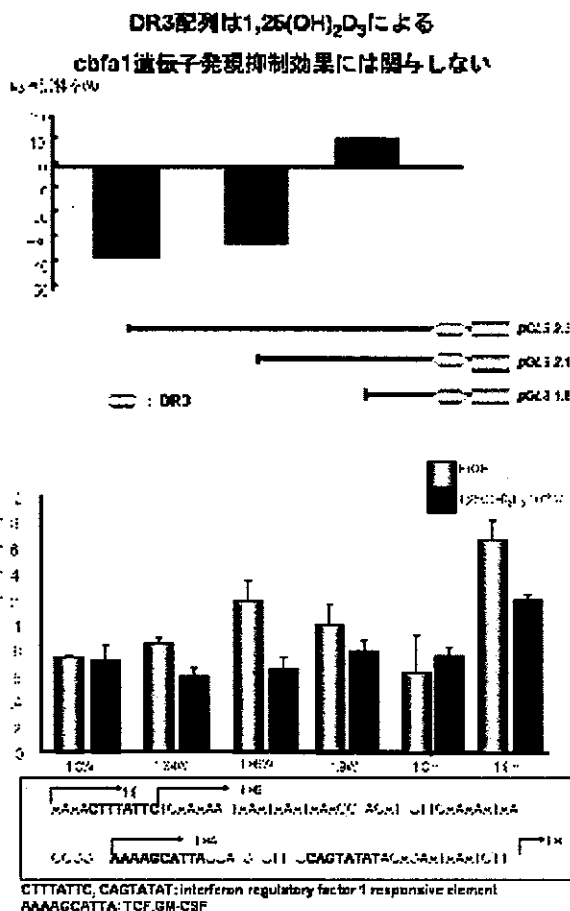
FGF23の転写制御については適切な実験系が存在しないことから、FGF23遺伝子発現がin vitroで確認できる細胞系をreal-time PCR法によりスクリーニングを行った。さらに、本細胞系に対して1,25を添加しFGF23の遺伝子発現を検討した。次に、FGF23の5'上流2kbまでをクローニングしpGL3 basic vectorに組み込んだレポーターを作成し、ビタミンDの転写活性に対する効果をluciferase活性で検討した。

C. 研究結果

①runx2のプロモーター活性の検討

Runx2遺伝子の転写活性は転写開始点近傍に位置するDR3配列を削除することで失われた。

転写開始点からプロモーター領域約1.8kbま

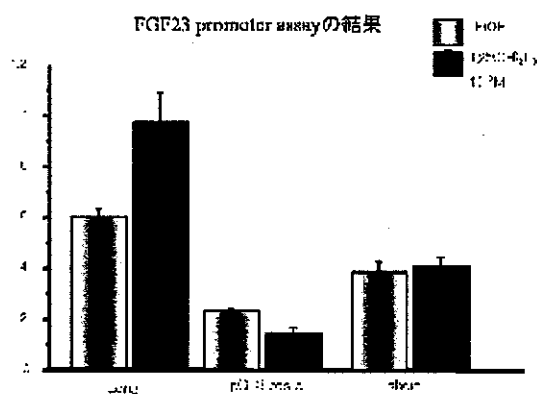


でサブクローニングしたコンストラクトではVD3により転写活性の抑制は認められなかったが、1.9kbをサブクローニングしたコンストラクトで初めて転写活性の抑制が認められるようになった。またこれらのコンストラクトにVDRとの結合能を喪失したDR3mutantを重ね合わせると抑制作用はさらに増強された。

次に、-1.8kbから-1.9kbの間100bpの塩基配列をモチーフサーチしたところ 転写制御に関わると考えられる2つのinterferon regulatory factor 1 responsive elementと1つのTCF responsive elementが発見された。そこでさらに10bpごとにtruncationコンストラクトを作成したところ、負の転写制御にはTCFサイトが存在する-1.84kbから-1.8kbの40bpが必要最小限の配列であることが明らかとなった。

②FGF23の1,25による転写制御

FGF23の転写制御をin vitroで検討するため、安定したFGF23遺伝子発現を示す株化細胞をスクリーニングしたところ、マウスST2細胞が最も安定した発現を示した。このため、転写制御の検討にはST2細胞を用いることとした。次にマウス胸腺細胞から既報の塩基配列情報を基に5'上流2.1kb (long) までと0.5kb (short) をpGL3にクローニングしレポーターコンストラクトを作成し、ST2にトランスフェクトした。



この細胞系に1,25を添加したところ、longコンストラクトにおいて1,25による転写活性の増加が観察された。

一方、新規活性型ビタミンDアナログであるED-71の添加では、いずれのコンストラクトにおいても転写活性の増加は観察されなかった。

D. 考 察

1,25-dihydroxyvitamin D₃のVDRを介した骨に対する作用は体液中のCa、リン濃度の影響を受けるため、通常のKOマウスの骨所見からは断定的なことはいいがたい。この欠点を克服するために、①VDR欠損骨の正常個体への移植②器官培養③胎仔期の骨の検討を行ってきた。この結果、1,25は少なくとも骨芽細胞の初期分化を直接抑制するものであることが明らかとなった。また、その作用にはrunx2の1,25による転写抑制が介在することも明らかとなってきた。今回の実験結果は、この作用の分子機構に迫らんとするものである。Runx2の1,25による転写抑制は非常に複雑であり、プロモーター上には正負の調節領域が存在することが示唆された。さらに負の調節領域は既にビタミンD₁ α水酸化酵素遺伝子において報告されているエレメントと構造は異なっており、この部に結合する調節因子もまたVDRとは異なるものであることが推測される。

一方、これまで全く検討されてこなかったFGF23の転写調節に関しても適切な培養細胞実験系を見出すことによって、新たな研究の進展が期待できる。特に、1,25とED-71の転写調節における著しい差異はED-71の作用メカニズムの解明の端緒となる結果であると考えられる。

E. 結 論

1,25のVDRを介した骨に対する直接作用は骨芽細胞の分化の抑制であり、その作用の少なくとも一部は1,25によるrunx2の負の転写制御機構が関与している。-1.84から-1.8kbの間に負の転写制御に必須のエレメントが存在する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ogawa M, Moriya N, Ikeda H, Tanae A, Tanaka T, Ohyama K, Mori O, Yazawa T, Fujita K, Seino Y, Kubo T, Tanaka H, Nishi Y, Yoshimoto M. Clinical evaluation of recombinant human growth hormone in Noonan syndrome. *Endocrine Journal* 51: 61-68, 2004
2. Tanaka H, Seino Y. Direct action of 1,25-dihydroxyvitamin D on bone; VDRKO bone shows excessive bone formation in normal mineral condition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90:343-345, 2004
3. Y. Ichinose, H. Tanaka, M. Inoue, S. Mochizuki, E. Tsuda, Y. Seino. Osteoclastogenesis Inhibitory Factor/Osteoprotegerin Reduced Bone Loss Induced By Mechanical Unloading. *Calcif Tissue Int.* 75: 338-343, 2004
4. Kaga M, Takahashi K, Ishihara T, Suzuki H, Tanaka H, Seino Y, Makino H. Bone assessment of female long-distance runners. *J Bone Miner Metab* 22(5):509-513, 2004
5. D Harada, Y Yamanaka, K Ueda, J Shimizu,

M Inoue, Y Seino, H Tanaka. An effective case of Growth hormone Treatment on Cartilage-hair hypoplasia. Bone (in press)

2. 学会発表

M. Takaiwa, K. Aya, Y. Yamanaka, Y. Seino, H. Tanaka. The stimulatory G protein signaling indirectly increases FGF-23 mRNA level. ASBMR 26th Annual Meeting in Seattle, Washington, USA

K. Hasegawa, Y. Seino, S. Kato, H. Tanaka. 1,25(OH)₂ D₃ is an important regulator in organogenesis of bone. ASBMR 26th Annual Meeting in Seattle, Washington, USA

K. Hasegawa, Y. Seino, H. Tanaka. 1,25(OH)₂D₃ suppresses cbfal gene expression transcriptionally: Identification of regulatory elements.

ASBMR 26th Annual Meeting in Seattle, Washington, USA

N. Namba, E. Ogura, K. Ozono, Y. Seino, H. Tanaka SHP-2 Mutations in Noonan Syndrome Lead to Increased MAPK Activation: A Possible Mechanism of Short Stature. ASBMR 26th Annual Meeting in Seattle, Washington, USA

K. Ueda, Y. Yamanaka, D. Harada, R. Nishimura, D. M. Ornitz, Y. Seino, H. Tanaka PTH can improve the disturbed bone growth in achondroplastic mice. ASBMR 26th Annual Meeting in Seattle, Washington, USA

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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

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

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

ビタミンD受容体（VDR）を介した転写制御機構に関しては、一般にリガンド依存的な転写活性化機構についてよく研究されてきた。その一方で、リガンド依存的な転写抑制機構に関しては、依然として不明な点が多い。そこで本研究では、ビタミンD3 α 水酸化酵素遺伝子のリガンド依存的な転写抑制機構を題材として、我々が同定した新規クロマチンリモデリング複合体WINACによる転写抑制機構の解明をクロマチン構造調節の観点から試みた。その結果、WINAC複合体はアセチル化修飾されたクロマチン構造を特異的に認識し、リガンド未結合状態のVDRをプロモーター領域に呼び込む働きがあることを見出した。生体内ではこの機構を介することによって、本遺伝子のネガティブフィードバック機構を円滑に進めていると考えられた。

A. 研究目的

活性型ビタミンD₃をリガンドとするビタミンD受容体（VDR）はDNA結合性の転写制御因子であり、リガンド結合によって標的遺伝子の発現を正負に調節している。ビタミンD正の制御メカニズムに関する研究はある程度明らかになっているものの負の制御メカニズムに関しては未だに不明点が多い。

我々はビタミンDのVDRを介した負の転写制御メカニズムに興味を持ち、以前当研究室で単離したビタミンD生合成の鍵酵素であるビタミンD₃1 α 水酸化酵素（1 α (OH)ase）遺伝子のプロモーター上に負の応答領域（1 α -nVDRE）を同定した。1 α (OH)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 α ,25(OH)₂D₃非存在、PKA存在下にはVDIRが

リン酸化を受け、更にco-activatorであるp300と複合体を形成するととり、1 α (OH)ase遺伝子の転写活性を上昇することを明らかにした（Murayama *et al.*, *EMBO J.*, 23, 1598-1608, 2004）。一方、当研究室では転写共役因子複合体の一つとして、VDRにリガンド非依存的に結合する新規ATP依存性クロマチンリモデリング複合体WINACを精製・同定した。さらに、この複合体がビタミンDによる1 α (OH)ase遺伝子の発現抑制に対して、NCoRタンパクを含むHDAC複合体と協調的に働いていることを報告した（Kitagawa *et al.*, *Cell*, 113, 905-917, 2003）。一方、1 α (OH)ase遺伝子は主に腎臓で発現すると知られており、体内のCaや活性型ビタミンDに反応し、その発現が精巧に制御されている。特に腎臓の近位尿細管においては活性型ビタミンDによりフィードバック反応により発現

が抑制される。酵素の基質特異性やプロモーター機能解析から、腎臓特異的な転写制御機構解明が期待される。

そこで、我々はWINAC複合体とVDIRの複合体の更なる詳細な解析を行い、 1α (OH)ase遺伝子プロモーターの特異性の解明を試みた。

B. 研究方法

WINAC複合体とVDIRの複合体の $1\alpha,25$ (OH) $_2$ 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 $1\alpha,25$ (OH) $_2$ D $_3$ による抑制が見られるヒト乳ガン細胞であるMCF7細胞を用いた。

1) ルシフェラーゼ (LUC) 法で、VDIRやWINAC複合体の主要因子であるWSTFがそれぞれ存在する時、両方存在する時に $1\alpha,25$ (OH) $_2$ D $_3$ による転写抑制に及ぼす影響を検討した。

2) 免疫沈降法により、WINAC複合体の主要構成因子WSTFタンパクとVDIRのリガンド依存的な複合体形成能について検討した。

3) GST pull-down法から、WSTFタンパクとVDIRと直接結合能について検討する。

4) クロマチン免疫沈降法 (ChIP) を用いて、WSTF、VDIR、VDR、HDAC、NCoRが $1\alpha,25$ (OH) $_2$ D $_3$ 存在下において 1α (OH)ase遺伝子プロモーター上への複合体形成能を調べた。

5) DNA結合アッセイより、*in vitro*において、 1α (OH)ase遺伝子プロモーター領域におけるWINAC複合体がE-box上でリクルートされるか否かを検討した。

C. 研究結果および考察

1α -nVDREを用いたレポーターアッセイの結果、WINAC複合体主要構成因子である

WSTFは、ビタミンDによる転写抑制に対してVDIRと協調的に働くことが明らかとなった。これは免疫沈降法、およびGST pull-down法を用いてVDIRとWSTFが、VDRを介することによって、リガンド依存的に結合することからも支持される。しかしながら、ChIP法による解析の結果では、HDACコリプレッサー複合体の 1α (OH)ase遺伝子プロモーター上への結合はビタミンD依存性であるにもかかわらず、VDR、WSTFはプロモーター上にリガンド非依的に結合することが明らかとなった。この矛盾を解明するため、DNA結合アッセイによって、リガンド非存在下におけるVDR/WSTFのプロモーター上への結合を検討した。その結果、この複合体の結合はDNA配列を認識したものでなく、WSTFを介したクロマチン結合能によるものであることが判明した。さらに、WSTFクロマチン結合能欠失変異体を用いた解析によって、このWSTFのクロマチン結合能は、 1α (OH)ase遺伝子のリガンド依存的な転写抑制に対して必須であることが明らかとなった。

D. 結論

以上の結果から、VDRを介したリガンド依存的な転写抑制機構は、周辺の染色体構造調節を介して行われており、WINAC複合体は、その機構に中心的な役割を果たすことが今回明らかとなった。

E. 研究発表

1. 論文発表

Murayama, A., Kim, M., Yanagisawa, J., Takeyama, K., Kato, S.: Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J.*, **23**,

1598-1608, 2004.

Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K., Krust, A., Yamada, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Nakamura, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Metzger, D., Chambon, P., Kato, S.: Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 1673-1678, 2004.

Kouzmenko, A. P., Takeyama, K., Ito, S., Furutani, T., Sawatsubashi, S., Maki, A., Suzuki, E., Kawasaki, Y., Akiyama, T., Tabata, T., Kato, S.: Wnt/ β -catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J. Biol. Chem.*, **279**, 40255-40258, 2004.

Maki, A., Sawatsubashi, S., Ito, S., Shirode, Y., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Kouzmenko, A., Takeyama, K., Kato, S.: Juvenile hormones antagonize ecdysone actions through co-repressor recruitment to EcR/USP heterodimers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **320**, 262-267, 2004.

Sawatsubashi, S., Maki, A., Ito, S., Shirode, Y., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Kouzmenko, A., Takeyama, K., Kato, S.: Ecdysone receptor-dependent gene regulation mediates histone poly (ADP-ribosyl)ation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **320**, 268-272, 2004.

Takeyama, K., Ito, S., Sawatsubashi, S., Shirode, Y., Yamamoto, A., Suzuki, E., Maki, A.,

Yamagata, K., Zhao, Y., Kouzmenko, A., Tabata, T., Kato, S.: A novel genetic system for analysis of co-activators for the N-terminal transactivation function domain of the human androgen receptor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1209-1215, 2004.

Wada, O., Oishi, H., Takada, I., Yanagisawa, J., Yano, T., Kato, S.: BRCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220. *Oncogene*, **23**, 6000-6005, 2004.

Ito, S., Takeyama, K., Yamamoto, A., Sawatsubashi, S., Shirode, Y., Kouzmenko, A., Tabata, T., Kato, S.: In vivo potentiation of human oestrogen receptor α by Cdk7-mediated phosphorylation. *Genes to Cells*, **9**, 983-992, 2004.

Kato, S., Fujiki, R., Kitagawa, H.: Vitamin D receptor (VDR) promoter targeting through a novel chromatin remodeling complex. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.*, **89-90**, 173-178, 2004.

Kato, S., Matsumoto, T., Kawano, H., Sato, T., Takeyama, K.: Function of androgen receptor in gene regulations. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.*, **89-90**, 627-633, 2004.

Tateishi, Y., Kawabe, Y., Chiba, T., Murata, S., Ichikawa, K., Murayama, A., Tanaka, K., Baba, T., Kato, S., Yanagisawa, J.: Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways

for estrogen receptor. *EMBO J.*, **23**, 4813-4823, 2004.

Meindl, S., Röt, A., Hoetzenecker, W., Kato, S., Cross, S., Elbe-Burger, A.: Vitamin D receptor ablation alters skin architecture and homeostasis of dendritic epidermal T cells. *British J. Dermatology*, 2004 (in press).

Ikeda, K., Ogawa, S., Tsukui, T., Horie-Inoue, K., Ouchi, Y., Kato, S., Muramatsu, M., Inoue, S.: Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol. Endocrinol.*, **18**, 1131-1143, 2004.

Kahata, K., Hayashi, M., Asaka, M., Hellman, W., Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Kato, S., Imamura, T., Miyazono, K.: Regulation of transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein signalling by transcriptional coactivator GCN5. *Genes to Cells*, **9**, 143-151, 2004.

Aihara, K. I., Azuma, H., Akaike, M., Ikeda, Y., Yamashita, M., Sudo, T., Hayashi, H., Yamada, Y., Endoh, F., Fujimura, M., Yoshida, T., Yamaguchi, H., Hashizume, S., Kato, M., Yoshimura, K., Yamamoto, Y., Kato, S., Matsumoto, T.: Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice. *J. Biol. Chem.*, **279**, 35798-35802, 2004.

Yamada, T., Kawano, H., Sekine, K.,

Matsumoto, T., Fukuda, T., Azuma, Y., Itaka, K., Chung, U. I., Chambon, P., Nakamura, K., Kato, S., Kawaguchi, H.: SRC-1 is necessary for skeletal responses to sex hormones in both males and females. *J. Bone Miner. Res.*, **19**, 1452-1461, 2004.

Kawasumi, M., Okada, T., Yamada, M., Miyamae-Kaneko, M., Matsuoka, M., Nakahara, J., Tomita, T., Iwatsubo, T., Kato, S., Aiso, S., Nishimoto, I., Kouyama, K.: Targeted introduction of V642I mutation in amyloid precursor protein gene causes functional abnormality resembling early stage of Alzheimer's disease in aged mice. *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 2826-2838, 2004.

Segawa, H., Kaneko, I., Yamanaka, S., Ito, M., Kuwahata, M., Inoue, Y., Kato, S., Miyamoto K.: Intestinal Na-Pi cotransporter adaptation to dietary Pi content in vitamin D receptor null mice. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **287**, F39-F47, 2004.

Peters, J. M., Kato, S., Gonzalez, F.: The United States-Japan workshop on: the role of nuclear receptors in carcinogenesis. *Mol. Carcinogenesis*, **41**, 77-84, 2004.

Uchida, E., Kagawa, N., Sasaki T., Urushino, N., Sawada, N., Kamakura, M., Ohta, M., Kato, S., Inouye, K.: Purification and characterization of mouse CYP27B1 overproduced by an Escherichia coli system coexpressing molecular chaperonins GroEL/ES. *Biochem. Biophys.*

Res. Commun., **323**, 505-511, 2004.

Fan, W., Yanase, T., Wu, Y., Kawate, H., Saitoh, M., Oba, K., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Yanagisawa, J., Kato, S., Takayanagi, R., Nawata, H.: Protein kinase A potentiates Ad4BP/SF-1 transactivation by re-integrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, GCN5/TRRAP, and suppressor, DAX-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Mol. Endocrinol.*, **18**, 127-141, 2004.

Unno, A., Takada, I., Takezawa, S., Oishi, H., Baba, A., Shimizu, T., Tokita, A., Yanagisawa, J., Kato, S.: TRRAP as a hepatic coactivator of

LXR and FXR function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **327**, 933-938, 2005.

Nakagawa, K., Kawaura, A., Kato, S., Takeda, E., Okano, T.: 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ is a preventive factor in the metastasis of lung cancer. *Carcinogenesis*, **26**, 429-440, 2005.

Capuano, P., Radanovic, T., Wagner, C. A., Bacic, D., Kato, S., Uchiyama, Y., St-Arnoud, R., Murer, H., Biber, J.: Intestinal and renal adaptation to a low Pi-diet of type II Na-Pi-cotransporters in VDR and 1 α -OHase deficient mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **288**, C429-C434, 2005.

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

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

研究協力者 榎島 誠 日本大学医学部生化学 教授

研究要旨

ビタミンD受容体（VDR）のリガンド受容機構の解析を進め、新規生理的リガンドとして同定されたリトコール酸の誘導体のVDRに対する効果を検討した。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。リトコール酸アセテートは、他の胆汁酸受容体FXR及びPXRをほとんど活性化せず、VDR選択的な胆汁酸受容体であった。この誘導体は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し、またリトコール酸には認められない骨髓性白血病細胞株THP-1細胞の分化を誘導する活性を有していた。VDRリガンド結合ポケットへのドッキングモデルでは、胆汁酸特異的な結合様式を保持していた。胆汁酸誘導体の開発は、VDRの新たな機能、疾患との関連性、そして作用選択的なVDRリガンドの開発へと応用できる。

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D₃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、活性型ビタミンD₃とリトコール酸とではVDRに対する結合様式が異なることが明らかになった。本研究では、リトコール酸の誘導体のVDRに対する効果を検討し、新規VDR作用薬の開発へと導くことを目的とする。

B. 研究方法

全長VDR、VP16キメラVDR、GAL4キメラVDR、及びそれらの変異体の発現ベクター、及びそれぞれに応答するルシフェラーゼレポーターをHEK293細胞にトランスフェクション

し、リトコール酸誘導体のVDRに対する効果を比較・評価した。得られた結果及び報告されているVDRの結晶構造データをもとに、VDRとリトコール酸誘導体との結合様式をコンピューターを用いてモデリングした。腸管粘膜由来細胞株またはマウスへリトコール酸誘導体を投与し、VDR標的遺伝子の発現をリアルタイムPCR法にて評価した。リトコール酸誘導体を骨髓性白血病細胞へ投与し、増殖・分化に対する影響を検討した。

C. 研究結果

1. リトコール酸誘導体のVDRに対する効果を検討したところ、リトコール酸の3位の修飾が活性に大きく影響を与えることが明らかになった。リトコール酸フォーメート、リトコール酸アセテートなどの3位修飾体はVDRを強く

活性化したが、リトコール酸イソブチレートやリトコール酸ヘキサクシネートなど修飾基の分子量が大きいものでは活性はむしろ減少した。リトコール酸アセテートはリトコール酸よりも少なくとも30倍以上強力なVDRアゴニストであった。リトコール酸アセテートは、他の胆汁酸受容体FXRやPXRをほとんど活性化せず、VDR選択的な胆汁酸誘導体であった。

2. リトコール酸アセテートは、リトコール酸と同様にリトコール酸選択的VDR変異体S237Mを活性化したが、活性型ビタミンD3選択的S278V変異体には効果がなかった。しかし、リトコール酸が活性化しないH305A変異体は、リトコール酸アセテートによって活性化された。以上の結果から、リトコール酸アセテートは、胆汁酸特異的な結合様式を保持しつつ、側鎖が β -シート側に位置する形でVDRリガンド結合ポケットへドッキングすることが示された。

3. リトコール酸アセテートは、腸管粘膜由来細胞株及びマウスにおける腸管粘膜におけるVDR標的遺伝子をリトコール酸よりも効果的に誘導した。また、リトコール酸は骨髓性白血病細胞株THP-1細胞を分化させなかったが、リトコール酸アセテートは活性型ビタミンD3と同様にTHP-1細胞の単球系への分化を誘導した。

D. 考 察

カルシウム代謝調節性ビタミンである活性型ビタミンD3と腸内細菌が産生する二次胆汁酸であるリトコール酸とでは、VDRに対する結合様式が異なることが明らかになった。リトコール酸やその誘導体を利用して、VDR-RXRヘテロ二量体としての活性化機構、リクルートさ

れるコファクターの選択性、genomic actionとnon-genomic actionの選択性など今後解析することによって、VDRの新たな機能及び疾患との関連性が解明されることが期待できる。

リトコール酸とVDRとのドッキングモデルからより活性の強い胆汁酸誘導体の開発が可能であると予測し、リトコール酸誘導体を検討した結果、リトコール酸よりも強力なVDRアゴニストであるリトコール酸アセテートを見出した。VDRのリガンド結合様式の解析をさらに進めることで、VDR受容機構異常症の治療薬として利用できる作用選択的なアゴニストの開発へ応用できる。

E. 結 論

リトコール酸誘導体を検討した結果、リトコール酸よりも強力なVDRアゴニストであるリトコール酸アセテートを見出した。この誘導体は、腸管粘膜細胞において効果的にVDR標的遺伝子の発現を誘導し、また骨髓性白血病細胞の分化を誘導した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 植島誠. 核内レセプターによるコレステロール恒常性の維持機構. 生化学 76: 509-516, 2004
2. Adachi, R., Honma, Y., Masuno, H., Kawana, K., Shimomura, I., Yamada, S., and Makishima, M. Selective activation of vitamin D receptor by lithocholic acid acetate, a bile acid derivative. J. Lipid Res. 46: 46-57, 2005
3. Makishima, M. Regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear