

receptors. J. Pharmacol. Sci., in press

4. 榎島誠. 核内レセプターによるコレステロール胆汁酸代謝調節機構. 日大医学雑誌、印刷中
5. 榎島誠、諸橋憲一郎. 核内レセプターによる脂質代謝制御機構. 実験医学、印刷中

## 2. 学会発表

1. 榎島誠、川名克芳、安達竜太郎、下村伊一郎、本間良夫、山本恵子、増野弘幸、山田幸子. ビタミンD受容体に作用する胆汁酸誘導体. 第305回脂溶性ビタミン総合研究委員会、東京、2004.9
2. 榎島誠. 胆汁酸の受容体として働くビタミンD受容体 (若手サテライトシンポジウム: 環境適応と概日リズム). 第46回歯科基礎医学会学術大会、広島、2004.9
3. 榎島誠. 核内レセプターによるコレステロール胆汁酸代謝調節機構. 第63回日本大学医学部総会、東京、2004.10
4. 榎島誠、安達竜太郎、本間良夫、山本恵子、増野弘幸、川名克芳、下村伊一郎、山田幸子. ビタミンD受容体と胆汁酸との構造活性相関. レチノイド研究会第15回学術集会、

東京、2004.11

5. 榎島誠. ビタミンD受容体の新規リガンド. Bone & Joint Research Club (骨と関節の代謝調節を考える基礎の会)、木更津、2004.11
6. 榎島誠、安達竜太郎、本間良夫、増野弘幸、川名克芳、下村伊一郎、山田幸子. リトコール酸誘導体によるビタミンD受容体の選択的活性化 (ワークショップ: 核内レセプター研究の最前線). 第27回日本分子生物学会年会、神戸、2004.12
7. 榎島誠. コレステロール胆汁酸代謝の調節因子として機能する核内レセプター. 第12回母子医療センターシンポジウム、大阪、2005.2
8. Makishima, M. Development of new ligands for sterol-sensing nuclear receptors LXR and VDR. The University of Tokyo International Symposium "Frontiers in Drug Development", Tokyo, Japan, 2005.2

## 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

エンドサイトーシス受容体メガリンとビタミンD代謝

研究協力者 道上 敏美 大阪府立母子保健総合医療センター研究所 環境影響部長

研究要旨

近位尿細管上皮細胞刷子縁に局在するエンドサイトーシス受容体メガリンの機能を一時的に攪乱することにより、メガリンが、25位水酸化ビタミンD/ビタミンD結合蛋白複合体に対する受容体として機能し、ビタミンD活性化機構において重要な役割を担っていることを示した。

A. 研究目的

メガリンは、腎臓の近位尿細管上皮細胞に局在する多機能エンドサイトーシス受容体である。メガリンノックアウトマウスを用いた解析から、近位尿細管上皮細胞における25位水酸化ビタミンDのとりこみにメガリンが関与していることが示された。当該研究では、メガリンのリガンドの一つであるreceptor associated protein (RAP) を利用してメガリン機能を一時的に攪乱した動物モデルを用いて、ビタミンD作用受容機構におけるメガリンの役割について詳細に検討することを目的とする。

B. 研究方法

小胞体保持シグナルを除いて可溶型としたRAPにヒスチジンタグ (His) を付加したリコンビナント蛋白を調製し、マウスの腹腔内に投与後、腎臓の切片を作製し、Hisに対する抗体を用いて免疫染色を行い、His-RAPが近位尿細管上皮細胞への取込みを確認した。さらに、His-RAPの投与によって、尿中への低分子量蛋白の排泄増加、DBPの排泄増加、血中25OHD値の低下が認められるかを検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験については当該施設（大阪府立母子保健総合医療センター研究所）の動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

可溶型His-RAPとメガリンとの相互作用をリガンドプロットにより確認した後、マウス腹腔内にHis-RAPを単回投与（3.5mg/dose）し、経時的に腎臓の切片を作製してHisタグを認識する抗体による免疫染色を行ったところ、投与後1時間の時点でHis-RAPが近位尿細管上皮細胞の刷子縁下に取り込まれていることが示された。また、メガリンに対する抗体を用いた免疫染色では、His-RAP投与1時間後の時点で多数のdot状の染色を認めた。また、His-RAPの連続投与によって、尿中への低分子量蛋白の排泄増加、DBPの排泄増加、血中25OHD値の低下が認められた。

D. 考 察

今回、可溶型RAPをマウスに投与することにより、メガリン機能の一時的な攪乱を試みた。

His-RAPは約40 kDaの蛋白であり、糸球体でろ過されると予測されたが、実際、His-RAPをマウスの腹腔内に投与したところ近位尿細管でのHis-RAPの取り込みが確認され、腹腔内に投与されたHis-RAPが、一旦循環血液中に入り、糸球体でろ過された後に、管腔側からメガリンとの相互作用を介して上皮細胞内に取り込まれたことが示唆された。また、メガリンに対する抗体を用いた免疫染色でdot状の染色を認めたが、これはエンドソームが染色されているものと考えられ、His-RAPがメガリンに結合してエンドサイトーシスの一時的亢進を来したものと考えられた。His-RAPの連続投与によって、尿中への低分子量蛋白の排泄増加、DBPの排泄増加、血中25OHD値の低下が認められた。これまでのところ、メガリンの変異に基づくヒトの疾患は報告されていないが、ファンconi症候群など近位尿細管機能が低下する病態においてはメガリン機能が障害されていると考えられ、また、ゲンタマイシンなどのアミノグリコシド系薬物はメガリンのリガンドとなることが知られており、これらの薬物による尿細管障害においてもメガリン機能の低下を来す。こうしたさまざまな原因に基づくメガリン機能の障害は、25OHDの不足をもたらし、活性型ビタミンD産生障害を来してビタミンD作用不全を引き起こすと考えられる。一方、副甲状腺ホルモン(PTH)もメガリンのリガンドとなりうることが報告されている。こうした背景から、引き続き、血清カルシウム・リン調節ホルモンの作用機構におけるメガリンの役割について詳細に検討することが必要である。一連の研究の成果は、尿細管性腎疾患におけるホルモン受容機構異常に対するメガリンを作用点とする新たな治療薬の開発に役立つものと期待される。

## E. 結 論

メガリンは、近位尿細管上皮細胞における25OHD/DBP複合体に対するエンドサイトーシス受容体として機能し、ビタミンDの活性化のプロセスにおいて重要な役割を果たしている。

## F. 健康危険情報

該当無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Ihara-Watanabe M, Uchihashi T, Miyauchi Y, Sakai N, Yamagata M, Ozono K, Michigami T. Involvement of phosphoinositide 3-kinase signaling pathway in chondrocytic differentiation of ATDC5 cells: Application of a gene-trap mutagenesis. *J Cell Biochem* 93:418-426, 2004.

Santo Y, Hirai H, Shima M, Yamagata M, Michigami T, Nakajima S, Ozono K. Examination of megalin in the renal tubular epithelium in patients with Dent's disease. *Pediatr Nephrol* 19:612-615, 2004.

Michigami T, Uchihashi T, Suzuki A, Tachikawa K, Nakajima S, Ozono K. Common mutations F310L and T1559del in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene are related to distinct phenotypes in Japanese patients with hypophosphatasia. *Eur J Pediatr* Jan 20, Epub ahead of print, 2005.

Ozono K, Nakajima S, Michigami T. Vitamin D and Reproductive Organs. *Vitamin D, 2nd Edition* (Eds. Feldman, Pike and Glorieux). Elsevier, Inc. 2005.

## 2. 学会発表

Yamagata M, Ozono K, Hashimoto Y, Kondou H, Michigami T. Intraperitoneal administration of recombinant receptor-associated protein impairs megalin function and increases renal phosphate excretion. 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004.10. Seattle, U.S.A.

道上敏美. ホルモンによるリン再吸収制御におけるエンドサイトーシス受容体メガリンの関与について. 第8回小児分子内分泌研究会

2004.7. 富良野.

山形雅代、道上敏美、宮内芳輝、大藺恵一. リン利尿におけるエンドサイトーシス受容体 Megalin の役割. 第22回日本骨代謝学会 2004.8. 大阪.

## H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得：該当なし。
2. 実用新案登録：該当なし。
3. その他：該当なし。

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

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 大藪 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の結果、VDR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が判明した。さらに、DNA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も見出された。ビタミンD依存症Ⅱ型の患者に、後者の配列候補の変異が同定され、変異VDRではリガンド親和性に異常が無いにもかかわらず、リガンド依存性核移行が障害されることが明らかになった。これらの成果は、VDRの核移行に関する新規の知見である。

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）様の配列が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はリガンド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

して同定されたが、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がある。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（および前年度までの結果）

in vitro nuclear transport assayは、ジギ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。VDRおよび欠失型VDR（DBD, LBD）のリコンビナント精製標品と別途HeLa細胞より調製した細胞質画分、およびATPを加え、30℃、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)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>添加の有無によるVDRの局在の変化も検討した。本法により、VDRはリガンド非依存的に核に局在することを確認、DNA結合領域 (DBD) の核移行シグナル (NLS) が重要であることを示した。Yeast two-hybrid法によりVDRと相互作用をすることで見出したimportin-4がGST-pull down法によってもVDRと結合した。

### 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、importin-4がVDRのリガンド非依存性核移行を担う分子であると同定された。また、DBDを欠くVDRを用いた場合には、リガンド依存性の核移行が観察された。

Stanford大学のFeldman博士との共同研究によりビタミンD依存症Ⅱ型の患者に、リガンド依存性の核移行を担う配列候補の変異が同定された (R158C,D144N)。これらの変異VDRではリガンド親和性およびDNA結合性に異常が無いにもかかわらず、DBDを欠く欠失型変異VDRを用いた検討で、リガンド依存性核移行が障害されることが示された。

### D. 考 察

VDR内のNLSが複数あること、ひとつはDNA結合領域にありリガンド非依存性に核移行を担い、他方はDBDよりC端側にありリガンド依存性に核移行させることを明らかにした。importin-4はVDRのリガンド非依存性核移行を担う分子の少なくともひとつであり、多くの核局在分子の核以降に関わるimportin-βはVDRを核に移行させる能力がないことが示さ

れた。ビタミンD依存症Ⅱ型の患者において同定された変異VDRがリガンド親和性に異常が無いにもかかわらず、リガンド依存性核移行が障害されていることが見出された。

### E. 結 論

VDRの核移行が障害されることによりビタミンD依存症Ⅱ型が引き起こされる可能性が示された。

### 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現在投稿中。他のVDR関連の論文は別紙記載。

#### 2. 学会発表

第304回脂溶性ビタミン総合研究委員会：  
2004.7.9, 大阪

ビタミンD受容体の核移行には、リガンド依存性・非依存性の2つの機構が存在する。大藪恵一，道上敏美，宮内芳輝

26th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research：  
2004.10.1-5, USA

Importin 4, not importin beta, is responsible for the ligand-independent nuclear translocation of Vitamin D receptor. Miyaushi Y, Michigami I, Sekimoto T, Yoneda Y, Yamagata M, Ozono K

### H. 知的所有権の出願・登録状況

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、カルシウム感知受容体 (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が、報告された症例数はまだ少ない。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の投与が行われるが、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伴に臨床的特徴、治療法の検討を行なう。変異型CaSR (C129S, S122P, E228K, E799K) を恒常的に発現するHEK239細胞を作成し、その機能異常について解析する。

### C. 研究結果

CaSRに異常をきたした副甲状腺機能低下症の家系の患者を治療中である。少量の活性型ビタミンDの投与により、血清カルシウム値を

6.5-7.5mg/dl、尿中Ca/Crを0.2前後にコントロールしている。C129Sを恒常的に発現するHEK細胞は作製を終了し、親株との遺伝子発現の違いを検討中である。S122P,E228K,E799Kは変異したCaSR cDNAは作製済みであり、発現ベクターに組換え中である。

### D. 考 察

従来の我々の結論である、「常染色体優性低Ca血症では、血清カルシウム値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」に基づき患者を治療している。C129Sを恒常的に発現するHEK細胞の遺伝子発現プロフィールより、CaSRの作用メカニズムの一端が明らかにされると期待される。

### 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

121回大阪小児科医会第学術集会：04.02.28, 大阪 成長異常に関する最近の話題 大藪恵一

### H. 知的所有権の取得状況

特になし。

厚生労働省科学研究費補助金（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の頻度と骨代謝への影響  
—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—

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）に加えて、新たに2家系の450H/R450H症例を同定した。R450H変異はArg (CGC) からHis (CAC) への1塩基置換であるが、このguanineとadenineを的確に認識する蛍光プライマーを用いた方法（SSPCE-FCS; Sequence Specific Primer Cycle Elongation-Fluorescence Correlation Spectroscopy）で多くの検体を短時間に解析可能となった。この方法の導入により、さらに2家系のR450Hヘテロ接合変異を同定した。

一方、TSH受容体ノックアウトマウスでは骨塩量が低下することが報告され、甲状腺ホルモンではなくTSHそのものが骨代謝を調節していることが示唆された（Abeら, Cell, 2003）。ヒトのTSH受容体遺伝子異常症における骨塩量、および骨代謝マーカー測定のパイロットスタディーとして数名の症例の検討をおこなった。R450H/G498S, R450H/R519Gの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。

**A. 研究目的**

日本人の多くの症例に認められるTSH受容体遺伝子のR450H変異は欧米からの報告には見られず、わが国特有であり創始者効果とも考えられる。全国規模のTSH受容体遺伝子異常症の検討を行うことにより、ヘテロ接合変異を有する個体（保因者）の頻度を探求する。このためには、R450H変異を簡便に同定する方法論が必要である。

一方、TSH受容体ノックアウトマウスでは骨塩量が低下し、これが甲状腺ホルモン補充にて改善しないことから、TSHが直接的に骨代謝に関与していることが報告された。ヒトのTSH受容体遺伝子異常症における骨塩量およ

び骨代謝マーカーの検討のパイロットスタディーを行なった。

**B. 研究方法**

Arg (CGC) からHis (CAC) への1塩基置換であるR450H変異を簡便に同定する方法として、guanineとadenineを的確に認識する蛍光プライマーを作成し、これらを用いた方法（SSPCE-FCS; Sequence Specific Primer Cycle Elongation-Fluorescence Correlation Spectroscopy）で既知の変異（R450Hヘテロ・ホモ変異）を確認した。また、全国から収集した新たな検体の解析を行なった。

6名のTSH受容体遺伝子異常症（R450H/



G498S, R450H/R519C, R450H/R450H各2名), 2名の甲状腺ホルモン不応症 (R243Q, F455S) の骨塩量をQDR4500 (第2-4腰椎) により測定した。

### C. 研究結果

SSPCE-FCS法による解析では, 既知の遺伝子変異 (R450Hヘテロ・ホモ変異) を全て同定可能であり, 特異度・感度ともに問題なかった。また, 新たにR450H/R450Hホモ変異2家系を同定した。

骨塩量の検討では, TSH受容体遺伝子変異 R450H/R519C, R450H/G498S変異を有する個体において骨塩量の軽度低下を認めた。なお, 甲状腺ホルモン不応症の2例の骨塩量は標準値内であった。

### D. 考 察

R450H変異を簡便に同定するSSPCE-FCS法の確立は, クレチン症におけるTSH受容体遺伝子の同定, 日本人における保因者の頻度を推察する上で有用である。

ヒトTSH受容体遺伝子異常症においても骨塩量の低下を示す例が認められ, 機能喪失の程度が強い変異受容体を有する個体であったことが意義深い。今後, 複数例における骨代謝マーカーの検討を計画する。

### E. 結 論

SSPCE-FCS法は, 日本人特有のR450H変異を同定する上で有用である。ヒトTSH受容体遺伝子異常症における骨代謝の評価は, ヒトの骨組織に対するTSHの作用を解明する上で重要である。

### F. 研究発表 (学会発表)

A case of congenital hypothyroidism due to ectopic thyroid gland associated with RTH (R316C). The Endocrine Society's 86<sup>th</sup> Annual Meeting, New Orleans, 2004.

鬼形和道。領域別シンポジウム 甲状腺学の最近の進歩 -基礎から臨床まで- TSH不応症。第77回日本内分泌学会, 京都, 2004.

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レセプター遺伝子の発現機能に関する研究

研究協力者 遠藤 登代志 山梨大学医学部第3内科 助教授

研究要旨

サイトロピンレセプター (TSHR) は甲状腺のみならず、脂肪細胞や骨細胞にも発現しており、バセドウ病眼症などの随伴症もTSHR抗体により惹起されるものと考えられる。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発現機構を明らかにする事が重要である。今年度、TSHR遺伝子発現調節に関する新たな転写因子の検索を試み、骨芽細胞特異的転写因子であるCbfa-1/Runx2がプロモーター領域に結合しその転写活性を抑制すること、甲状腺にはCbfa-1/Runx2が存在しTSHによりその発現が促進されることを見いだした。Cbfa-1/Runx2は骨芽細胞、脂肪前駆細胞、甲状腺に共通に存在しTSHRの発現を調節する。

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が脂肪細胞や骨芽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。最近TSHRノックアウトマウスにて骨形成異常が惹起されるとの報告があり、TSHRが甲状腺以外でも機能していることが明かにされつつあり、TSHR抗体はこれらの組織においても作用することが推定されている。

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、甲状腺・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領域に結合する新たな転写因子を検索し、そ

の特性、TSH刺激との関連等を明らかにすることを目的とする。

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、-220bp（翻訳開始点を+1とする）より-1までをpGL3-Lucに結合し（pTR-Luc 5'220, minimal promoter）、さらに3'端よりの欠失ミュータントを作成した。

(2) 甲状腺細胞

甲状腺細胞はFRTL-5, BHP18-17（ヒト乳頭癌細胞）を用い、前者はinsulin, somatostatin, hydrocortisone, transferin, glycyl-L-lysine, throtropin存在下で培養した。

(3) Cbfa-1/Runx2 cDNA, 抗体

mouse Cbfa-1/Runx2 cDNAは長崎大学小守教授より分与されたものを使用。抗Cbfa-1/Runx2抗体はSanta Cruz社より入手した。

(4) Northern blot, EMSAアッセイは常法により行った。

## C. 結 果

(1) TSHR遺伝子プロモーター (TSHRP) 活性に及ぼすCbfa-1の影響

TSHRP活性にはcAMP responsive element (CRE) が中心的役割を果たしているが、その3'側にCbfa-1 binding consensus sequenceが存在した。この部を欠失させるとFRTL-5細胞中でのプロモーター活性は2~3倍増加した。

consensus sequenceを含む合成オリゴヌクレオチドを用いたEMSAアッセイをおこなったところ、FRTL-5細胞核蛋白とDNA/protein complexを形成し、TSH存在下で培養した細胞核蛋白で増強した。このバンドは抗Cbfa-1抗体の添加にてsupershiftした。同様のバンドはヒト乳頭癌細胞であるBHP18-17細胞核よりの蛋白を使用しても得られた。

(2) 甲状腺細胞におけるCbfa-1 mRNAの存在

<sup>32</sup>P- mouse Cbfa-1 cDNA を用い、TSH存在下・非存在下でのFRTL-5細胞でのCbfa-1 mRNAを検討したところ、Cbfa-1は4.1 KbのmRNAとして発現していること、TSHによりその発現が増加することが確認された。

## D. 考 案

最近、骨芽細胞と脂肪前駆細胞は共通のprogenitor cellより発生し、この細胞にCbfa-1/Runx2が発現しているとの報告がある。今回甲状腺にCbfa-1/Runx2が発現していることが明らかとなり、骨、脂肪、甲状腺は共通の転写因子が存在し、TSHRがともに発現していることより、これらは極めて類似の性質を有してい

ると推定される。

さらに甲状腺におけるCbfa-1/Runx2はTSHにより誘導され、TSHR遺伝子発現を抑制していることが判明した。従ってCbfa-1/Runx2はTSHRのdown regulationに関与していると推定される。バセドウ病では甲状腺・骨・脂肪組織は刺激抗体の持続作用下にあり、当然これらのTSHRの発現にも影響があると思われ、今後TSHR自己抗体価の推移、バセドウ病の寛解・再燃等の臨床経過とCbfa-1/Runx2の関連を検討してゆく必要があるものと思われる。

## E. 結 論

骨芽細胞特異的転写因子であるCbfa-1/Runx2は甲状腺にも発現し、TSHR遺伝子発現を調節している。

## G. 研究発表

1. Furuya F, Shimura H, Suzuki H, Haraguchi K, Onaya T, Endo T, Kobayashi T. Histone deacetylase inhibitors restore radioiodide uptake and retention in poorly differentiated and anaplastic thyroid cancer cells by expression of the sodium/iodide symporter, thyroid-peroxidase and thyroglobulin. *Endocrinology* 145, 2865-2875, 2004.
2. Furuya F, Shimura H, Miyazaki A, Taki K, Ohta K, Haraguchi K, Onaya T, Endo T, Kobayashi T. Adenovirus-mediated transfer of thyroid transcription factor-1 induced radioiodine organification and retention in thyroid cancer cells. *Endocrinology* 145, 5397-5405, 2004.

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 久留米大学医学部内分泌代謝内科 助教授

研究要旨

手術が必要となった重症のバセドウ病眼症患者を対象とした検討でも、CTLA-4遺伝子多型とバセドウ病発症、TNF- $\alpha$  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。IL-12B遺伝子多型やCD40遺伝子多型、ICAM-1遺伝子多型は日本人ではバセドウ病や眼症の発症と関連はみられなかった。人種、地域により遺伝因子の関与の程度は異なることが示唆された。

A. 研究目的

バセドウ病眼症はバ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- $\alpha$  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。遺伝因子としてはこれらのサイトカイン遺伝子や免疫応答に関与する遺伝子が候補遺伝子として注目されている。私どもは日本人とポーランド人においてCTLA-4遺伝子多型がバセドウ病の発症に関連していることを、TNF- $\alpha$  遺伝子多型がバセドウ病眼症と関連していることを一昨年、昨年の本研究で確立した。そこで今回は眼症で手術にいたった重症例を対象にこれらの遺伝子多型と眼症との関連性を検討した。

さらにIL-12B遺伝子、CD40遺伝子、ICAM-1遺伝子多型についてバセドウ病やバセドウ病眼症との関連性を検討した。

B. 研究方法

対象は東京の某病院にて眼症手術を受けたバセドウ病眼症患者314例、久留米大学病院受診中のバセドウ病患者329例（アメリカ甲状腺学会の分類でclass III以上の眼症を有するもの、103例）と医療スタッフの健常対照者①244例、②575例を対象とした。

遺伝子多型は、dot-blot hybridization with SSOP、PCR-RFLP、sequence specific PCR、direct sequence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

手術に至った重症のバセドウ病眼症患者では、CTLA-4遺伝子49A/G多型のGG genotype 頻度が、健常者に比較して有意に高かった（表1）。TNF-a遺伝子プロモーター領域の-

1031T/C多型と眼症との間にも有意な関連が認められた(表2)。

IL-12B、CD40、ICAM-1遺伝子多型はバセドウ病の発症や眼症との関連は認められなかった(表3)。

#### D. 考 察

バセドウ病眼症はバ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。前回までに関連性を報告したCTLA-4遺伝子、TNF- $\alpha$ 遺伝子多型に関しては、手術にいたった重症眼症例でも同様に有意な関連を認めた。したがってこれらの遺伝子多型はその発現を介して、後眼窩組織での自己免疫反応に影響を及ぼし、眼症の病態形成に大きな役割を演じていると推測される。

今回検討したIL-12B遺伝子多型やCD40遺伝子多型、ICAM-1遺伝子多型は日本人ではバセドウ病や眼症の発症と関連はみられなかった。人種、地域により遺伝因子の関与の程度は異なることが示唆された。

眼症は外眼筋腫大をきたして眼球運動障害を呈するものや脂肪組織の増大をきたし眼球突出を呈するものなど大きく2つの病型が存在する。今後はこれらの病型別の解析をすすめる必要がある。

#### E. 結 論

CTLA-4遺伝子49A/G多型やTNF- $\alpha$ 遺伝子プロモーター領域の多型、あるいはこれらと連鎖不均衡にある遺伝子は、それぞれバセドウ病やバセド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, Kurylowicz A, Hiromatsu Y, Kiljanskic J, Telichowska A, Nauman J. Association of G-174C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter with Graves' ophthalmopathy. *Autoimmunity*. 2004; 37: 223-226.
2. Hiromatsu Y, Fukutani T, Ichimura M, Mukai T, Kaku H, Nakayama H, Miyake I, Shoji S, Koda Y, Bednarczuk T. Interleukin-13 gene polymorphisms confer the susceptibility of Japanese populations to Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 ; 90 : 296-301.
3. Hiromatsu Y, Kaku H, Mukai T, Miyake I, Fukutani T, Koga M, Shoji S, Toda S, Koike N. Immunohistochemical analysis of bcl-2, Bax and Bak expression in thyroid glands from patients with Graves' disease. *Endocr J*. 2004;51:399-405.
4. Bednarczuk T, Hiromatsu Y, Seki N, Ploski R, Fukutani T, Kurylowicz A, Jazdzewski K, Chojnowski K, Itoh K, Nauman J. Association of tumor necrosis factor and human leukocyte antigen DRB1 alleles with Graves' ophthalmopathy. *Hum Immunol*. 2004;65:632-639.
5. Ploski R, Bednarczuk T, Hiromatsu Y. Distribution of TNFA haplotypes in healthy Caucasians: comment on the articles by Newton et al and Zeggini et al.

Arthritis Rheum. 2004 Jun;50:2034-5;  
author reply 2035-6.

6. 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-gamma gene associated with changes of anti-thyrotropin receptor antibodies induced by antithyroid drug treatment for Graves' disease in Japanese patients. *Thyroid*. 2004;14:93-97.
7. 広松雄治：病気と薬の説明ガイド 甲状腺機能亢進症・甲状腺機能低下症。薬局 55（増刊号）：1037-1044、2004
8. 広松雄治、迎徳範、高田和奈、賀来寛雄、中山ひとみ、今村洋一、三宅育代、香野修介、高根直子、小路眞護、山田研太郎：バセドウ病の経過中に抗GAD抗体価が上昇し1型糖尿病を発症した1例。臨床と研究 81：1189-1192、2004
9. 三宅育代、広松雄治：Graves' ophthalmopathy. 成人病と生活習慣病 34：1227-1230、2004
10. 広松雄治：バセドウ病眼症 ソマトスタチン・アナログ薬。阿部好文・西川哲男（編）臨床に直結する内分泌・代謝疾患治療のエビデンス。文光堂63-65、2004
11. 広松雄治：バセドウ病眼症の治療と選択基準。森昌朋（編）新しい診断と治療のABC25 内分泌2 甲状腺疾患。最新医学社 230-239、2004.

## 2. 学会発表

- 1) Michiko Ichimura, Tomoka Fukutani, Tokunori Mukai, Hiroo Kaku, Ikuyo

Miyake, Shingo Shoji, Kentaro Yamada, Yuji Hiromatsu : Interleukin-18 gene polymorphism and Graves's disease. 第11回国際分子甲状腺シンポジウム 平成16年 3月19日～20日、那覇

- 2) 広松雄治、迎徳範、一村美智子、福谷知香、賀来寛雄、三宅育代、小路眞護、山田研太郎：CD40遺伝子多型とバセドウ病眼症 第108回日本眼科学会総会 平成16年 4月 15日～18日、東京
- 3) 広松雄治、福谷知香、一村美智子、迎徳範、高田和奈、賀来寛雄、今村洋一、三宅育代、香野修介、高根直子、小路眞護、山田研太郎：GAD抗体陽性バセドウ病患者における遺伝的素因に関する研究 第47回日本糖尿病学会年次学術集会 平成16年 5月13日～15日、東京
- 4) 広松雄治、福谷知香、一村美智子、迎徳範、中村弥生、高田和奈、賀来寛雄、今村洋一、三宅育代、香野修介、高根直子、小路眞護、山田研太郎：バセドウ病診療における高感度TRAb測定 of 臨床的有用性 第77回日本内分泌学会学術総会 平成16年 6月24日～26日、京都
- 5) 一村美智子、迎徳範、福谷知香、賀来寛雄、三宅育代、今村洋一、香野修介、高根直子、小路眞護、山田研太郎、広松雄治：バセドウ病とIL-18遺伝子多型 第77回日本内分泌学会学術総会 平成16年 6月24日～26日、京都
- 6) 迎徳範、一村美智子、福谷知香、賀来寛雄、三宅育代、小路眞護、山田研太郎、広松雄治 バセドウ病とCD40遺伝子多型について 第77回日本内分泌学会学術総会 平成16年 6月24日～26日、京都

7) 広松雄治、一村美智子、福谷知香、迎徳範、  
中山ひとみ、高田和奈、賀来寛雄、今村洋  
一、三宅育代、小路眞護、山田研太郎：  
GAD抗体陽性バセドウ病患者のIL-18遺伝  
子多型 第47回日本甲状腺学会 平成16年

11月11日～13日、前橋

#### H. 知的財産の出願・登録状況

なし

表1 CTLA-4遺伝子49A/G多型 (東京)

	N	Genotype			
		GG	GA	AA	
重症眼症	314	143 (46%)	139 (44%)	32 (10%)	$\chi^2=7.848$
健常者A	112	34 (30%)	63 (56%)	15 (13%)	<b><math>P=0.0198</math></b>

	Allele		Allele	
	G	A		
重症眼症	425 (68%)	203 (58%)		$\chi^2=6.155$
健常者A	131 (58%)	93 (42%)		<b><math>P=0.0131</math></b>

表2 TNF- $\alpha$  遺伝子多型 (東京)

	N	Genotype at -1,031			
		TT	TCC	C	
重症眼症	314	314 (65%)	94 (30%)	15 (5%)	$\chi^2=4.769$
健常者B	575	405 (70%)	156 (27%)	14 (3%)	$P=0.0921$

	Allele at -1,031		
	T	C	
重症眼症	504 (80%)	124 (20%)	$\chi^2=3.978$
健常者B	966 (84%)	184 (16%)	<b><math>P=0.0461</math></b>



表3 CD40 遺伝子-1C/T多型 (久留米)

	N	Genotype			
		CC	CT	TT	
バセドウ病	324	121 (37%)	152 (43%)	51 (16%)	<i>n.s.</i>
健常者	229	80 (35%)	108 (47%)	41 (41%)	

	N	Genotype			
		CC	CT	TT	
眼症(+)	102	41 (40%)	48 (47%)	13 (13%)	<i>n.s.</i>
眼症(-)	222	80 (36%)	104 (47%)	38 (17%)	

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受容体抗体の定量的測定法とバセドウ病治療法選択に関する研究

分担研究者 網野 信行 医療法人 神甲会 隈病院

研究要旨

バセドウ病で初診時のTRAb値測定に定量法を導入し5年間での寛解との関係を調べた。TRAb50IU/L以上の患者では87.5%が寛解せず、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。

A. 研究目的

バセドウ病における甲状腺機能亢進症はTSH受容体抗体（TRAb）の刺激により発生し、我が国においては抗甲状腺剤による治療が主流である。しかし3～5年しても寛解しない難治性の症例が少なからず存在するが、初診時の検査で抗甲状腺剤の治療効果の予測をすることは現在不可能である。従来TRAb測定は結合阻害百分率で表示されており、この方法では80%以上の値は頭打ちのことが多く正確に抗体活性を表示していない。そこで今回、初診時におけるTSH受容体抗体の定量的測定法を検討し、その値と抗甲状腺剤治療効果との関係を検討した。

B. 研究方法

初診時から少なくとも5年間経過観察出来た180例のバセドウ患者を対象に初診時のTRAb値と抗甲状腺剤治療による寛解との関係を調べた。TRAb測定はヒトTSH受容体を用いた高感度法による定量的な測定値（IU/L）を用いた。

（倫理面への配慮）

検索は患者の了解のもとに実施した。

C. 研究結果及び考察

5年間経過観察出来たバセドウ病180例中53例（29.4%）は寛解し、127例（70.6%）は寛解しなかった。非寛解群の初診時のTRAb値は、寛解群に比し有意の高値を示した。TRAb値が50IU/L以上を示したものは32例あったが、うち28例（87.5%）は非寛解群であった。

D. 考 察

初診時における定量的TRAb測定で50IU/L以上の症例は、5年間の抗甲状腺剤治療で寛解する率は12.5%と低く5年以内の寛解を希望する場合はアイソトープ治療または手術療法を選択するほうが良いと考えられた。

E. 結 論

バセドウ病で初診時のTRAb値が50IU/L以上の患者では、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。

6. 研究発表

1. 論文発表

竹岡啓子他 古代二世代TSHレセプター抗体 (TRAb) 測定試薬の評価。

医学と薬学 51 : 173-178、2004.

Izumi Y, et al. Simple and practical parameters for differentiation between destruction-induced thyrotoxicosis and Graves' thyrotoxicosis. Clin Endocrinol 57: 51-58, 2002.

Kashiwai T et al. Practical treatment with minimum maintenance dose of anti-thyroid

drugs for prediction of remission in Graves' disease. Endocr J 50: 45-49, 2003.

Takeoka K et al. Increase in serum levels of autoantibodies after attack of seasonal allergic rhinitis in patients with Graves' disease. Int Arch Allergy Immunol 132:268-274, 2003.

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

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

## 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バセド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ポジシ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幾つか見出し、同ローカスに存在するマイクロサテライト多型マーカとの有意な相関を認めた。そこで、今回の研究においては、候補遺伝子の一つであるTSHレセプター遺伝子内に10~50Kbp間隔で分布する多数のSNPで関連解析を行った。その結果、イントロン8に存在するSNPで有意な相関を認めた。さらに、エクソン7から8付近に分布する連鎖不平衡解析にあるいくつかのSNPにおいてもバセドウ病との相関が認め、これらのSNPを用いたハプロタイプ解析でもMajor Haplotype頻度の有意な上昇が見られた。従って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。

### 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。我々はこれまでに、多因子性疾患の一つであるバセド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ポジシ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幾つか見出している。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を用いてうち数個において有意な相関を認めた。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受容体遺伝子のSNPを用いて、Blockの存在と同病との相関の検討を行った。2) 全ゲノムスクリーニングで見出された同病疾患感受性遺伝子存在領域である5q23-q33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やマイクロサテライト多型マーカ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