

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班  
平成14-16年度 総合研究報告書

平成 17 年 3 月

主任研究者 清 野 佳 紀

# 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。

副甲状腺研究班では、引き続きPTH不応症のメカニズムが検討されました。とくに、PHP1bにおける原因が追究され、世界に先駆けて多くのことが明らかにされました。特発性副甲状腺機能低下症に関しては、その病態におけるカルシウム感知受容体の役割を中心に明らかにされました。また、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の早期診断のための手引書を作成したビタミン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の役割が次々と発見されました。甲状腺研究班では、甲状腺ホルモン不応症における異常TRの役割が明らかにされました。TSH不応症においては、TSH受容体の変異が明らかにされました。また、TSH受容体に対する自己抗体の役割においても引き続き検討されています。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。

この3年間に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14年度から16年度の総合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17年3月

清 野 佳 紀

# 目 次

## I 序 文

II 総合研究報告書	1
主任研究者 清野 佳紀 (大阪厚生年金病院長)	

## III 分担研究報告書

1. 偽性副甲状腺機能低下症におけるPTH分子の存在様式に関する検討	51
高Ca尿症を呈した偽性副甲状腺機能低下症1b症例におけるCa受容体変異に関する研究	
研究協力者 水梨 一利 東北大学医学研究科腎高血圧内分泌内科	
2. 副甲状腺機能異常症の病因・病態解析	56
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	
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	61
分担研究者 松本 俊夫 徳島大学大学院生体情報内科学	
4. カルシウム代謝異常症の病因解明： カルシウム感知受容体の受容機構と役割に関する研究	70
研究協力者 杉本 利嗣 島根大学医学部内分泌代謝・血液腫瘍内科	
5. 骨・カルシウム代謝異常症の病因、病態の解明	75
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	
6. ビタミンDの骨に対する直接作用に関する研究	79
分担研究者 田中 弘之 岡山大学大学院医歯学総合研究科小児医科学	
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	84
分担研究者 加藤 茂明 東京大学分子細胞生物学研究所	
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	93
研究協力者 榎島 誠 日本大学医学部生化学	

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 .....	99
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境影響部門	
10. 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…	103
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	
11. 日本人におけるTSH受容体遺伝子異常症の表現型の特徴について .....	107
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	
12. 非甲状腺細胞のサイトロピンレセプター発現調節機構の解明.....	111
研究協力者 遠藤登代志 山梨大学大学院 医学工学総合研究部	
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.....	114
研究協力者 広松 雄治 久留米大学医学部内分泌代謝内科	
14. TSH受容体抗体産生調節とバセドウ病治療法選択に関する研究 .....	118
分担研究者 網野 信行 医療法人 神甲会 隈病院	
15. TSH受容体抗体病の遺伝素因に関する研究： 疾患感受性遺伝子の同定および家族性バセドウ病全国疫学調査.....	124
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	
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.....	131
分担研究者 中村 浩淑 浜松医科大学 第二内科	
17. 甲状腺ホルモン不応症の病態解明の研究.....	137
—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—	
分担研究者 森 昌朋 群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学	
18. 甲状腺ホルモン不応症発症機序に関する研究.....	146
分担研究者 妹尾 久雄 名古屋大学 環境医学研究所 内分泌代謝分野	
IV 研究成果の刊行に関する一覧表.....	163

## Ⅱ. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総合研究報告書

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 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る。研究の進歩に伴い新たな疾患病態が明らかとなり、これに対応して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。副甲状腺機能低下症に関しては、PHP I b型のSTX16遺伝子欠失と、孤発例のGNAS近傍の遺伝子解析。カルシウム感知受容体異常治療の目安、特異な症状のIHP孤発例の解析。骨芽細胞におけるPTHの分子機構。新規ビタミンD受容体リガンドの発見。VDRの核移行メカニズムの解明。 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な転写抑制機構と共役因子同定。ビタミンDの骨作用の詳細の検討。腫瘍性低リン血症性骨軟化症よりFGF23の同定とXLHなど多様な低リン血症の病態における関与などを明らかにした。甲状腺領域では、甲状腺ホルモン不応症（RTH）の分子病態に関して、①T転写因子Leader binding protein-1c (LBP-1c) ②細胞膜PI3Kの活性化で始まるAkt/PKB→mTOR→p70S6Kのシグナリングカスケード ③TRAP220とGATA2の関与を明らかにした。バセドウ病に関して、①バセドウ病の遺伝的素因、バセドウ病眼症の遺伝的素因。②治療法選択に関しての基準、薬物療法中止の基準を明らかにした。これら成果が今後、疾患の正確な診断と適切な治療法開発に展開していくものとする。

分担研究者	大藪 恵一	大阪大学大学院医学系研究科
網野 信行	医療法人 神甲会隈病院・学術顧問	小児発達医学講座・教授
妹尾 久雄	名古屋大学環境医学研究所 内分泌・代謝分野・教授	田中 弘之 岡山大学大学院医歯学総合研究科 小児医科学・助教授
中村 浩淑	浜松医科大学第二内科・教授	赤水 尚史 京都大学医学部附属病院
森 昌朋	群馬大学大学院医学系研究科 病態制御内科学・教授	探索医療センター・助教授
松本 俊夫	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体情報内科学・教授	福本 誠二 東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科・講師
加藤 茂明	東京大学分子細胞生物学研究所 核内情報分野・教授	皆川 真規 千葉大学大学院医学研究院 小児病態学・助手

## A. 研究目的

本研究は、比較的稀な病態であるホルモン受容機構異常症のなかで、早期の適切な診断治療によって良好な予後が期待され、また病態の解明が頻度の高い疾患の病態解明、治療開発に貢献しうる甲状腺、副甲状腺領域の疾患について、臨床および基礎研究から実態を明らかにすることを目的とする。本研究の対象疾患は偽性副甲状腺機能低下症、特発性副甲状腺機能低下症、ビタミンD抵抗性のくる病（低リン血症性くる病、ビタミンD依存性くる病）、TSH受容体異常症、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病であり、これら疾患のわが国における実態、病態の更なる解明、病態に基づく新規の予防治療法の開発を行う。副甲状腺機能低下症では研究の進歩によりカルシウム感受受容体を中心に新たな病態が発見され、その病態を的確に診断し治療法を選択することが必要となってきた。このため、既に作成した鑑別診断の手引きの妥当性の検討を行うとともに、種々の病態に基づく副甲状腺機能低下症の治療法の開発を試みた。特に、偽性副甲状腺機能低下症においてはIa型は各種ホルモン受容体と共役するGs $\alpha$ 蛋白をコードするGNAS1遺伝子コード領域の母親由来の塩基配列（genetic）異常によることが知られていたが、IbではGNAS1遺伝子の転写調節領域のDNAメチル化パターンに異常（epigeneticな異常）があることが明らかになり、これによりGs $\alpha$ 蛋白の発現が障害されていることが考えられているが、このepigeneticな異常をきたす原因およびこのepigeneticな異常が組織特異的発現異常をきたすメカニズムについては全く不明でありその解明を試みた。また、Ia型の表現型発症機序の解明および薬剤としての副甲状腺ホルモンの可能性を明らかにするために、副甲

状腺ホルモンの骨に対する作用の分子機構につき検討した。一方、ビタミンDは本研究の対象疾患のみならず日常的な各種病態の治療薬としても重要である。その生理作用や薬理作用、受容機構、新しい作用新規ligandについて基礎的研究を進めることは、治療薬としてのビタミンD関連薬剤の適切な使用にとって必須であり、このためビタミンDを中心とする生体反応の全容を解明することも本研究の目的とした。また、ビタミンD抵抗性疾患の代表である低リン血症性くる病の病態を明らかにすることにより、ビタミンD抵抗性の発現機序が明らかになると考え、本病態の解明を試みた。

一方、甲状腺疾患については、TSH不応症における異常TSH受容体と症状連関、甲状腺ホルモン不応症の分子病態を明らかにすることを目的とした。TSH不応症のほとんどは新生児マススクリーニング（MS）にて発見され、本疾患は先天性甲状腺機能低下症（クレチン症）および高TSH血症の鑑別に重要である。その遺伝子型-表現型の関係を明らかにし、クレチン症の分子生物学的分類の確立と適切な管理治療指針の作成を目的とした。甲状腺ホルモン不応症（Resistance to Thyroid Hormone = RTH）は、甲状腺ホルモンに対する応答性の低下した病態で、 $\beta$ 型甲状腺ホルモン受容体（TR $\beta$ ）遺伝子の点突然変異がその原因として報告されてきたが、その分子病態の解明にはTRの転写制御機構の解明は必須である。また、病態に関与する新たな甲状腺ホルモン応答性遺伝子の同定とその病態への関与の解明も行った。最も頻度の高い自己免疫性の甲状腺機能異常（バセドウ病）では眼症の治療法の開発、全国調査による実態調査、遺伝素因の解明を試み、日常臨床に還元することを目的とした。



## B. 研究方法

### 副甲状腺領域

#### 副甲状腺機能低下症に関する研究

- ①偽性副甲状腺機能低下症における血中PTH濃度をBio-PTHに特異的な測定法と従来のintact PTH 測定法 (iPTH) により測定し、両者の差からPTH (7-84) 様fragments濃度を決定した。
- ②偽性副甲状腺機能低下症 I b 型の分子病態を明らかにするため 日本人患者 (孤発例、家族例) でGNAS1遺伝子上流域のDNAメチル化異常パターンと表現型の検討、アンドロゲン受容体遺伝子を用いたX染色体不活性化の偏りの検討、STX16遺伝子欠失の検討、尿中落下近位尿細管由来細胞培養法を用いたGNAS1 mRNA発現の検討をPCRやサザン解析により行った。
- ③鑑別診断の手引きの妥当性の検討する目的で、特発性副甲状腺機能低下症で最も鑑別が重要なカルシウム感知受容体遺伝子の活性型変異による常染色体優性遺伝性低カルシウム血症において、変異の同定と症状の連関、新たな病態、治療目標の設定を検討した。特発性副甲状腺機能低下症症例でカルシウム感知受容体遺伝子に対する自己抗体の関与についても検討した。
- ④骨芽細胞におけるPTHの細胞内シグナルを解明するために、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に注目し転写アッセイにより検討した。

#### ビタミンD作用の基礎的検討とビタミンD抵抗性に関する検討

- ①新規ビタミンD受容体 (VDR) リガンドであ

るリトコール酸のVDR結合様式を、明らかにするために、VDRと最も類似のアミノ酸構造を持つ核内レセプターであるプレグナンXレセプター (PXR) とVDRとのアミノ酸配列及び立体構造を比較し、活性型ビタミンD3の結合に重要なVDRのリガンド結合ポケットのアミノ酸を、相当するPXRのものに変化させたヒトVDR変異体及び遺伝性くる病患者で報告されているリガンド結合ポケットのVDR変異体を作成し、活性型ビタミンD3及びリトコール酸に対する反応性を比較・評価した。VDRの結晶構造解析のデータをもとに、VDRとリトコール酸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。VDR-リトコール酸ドッキングモデルに基づき、より活性の強いリトコール酸誘導体を探索した。リトコール酸誘導体のVDR及びそのリガンド結合ポケット変異体に対する活性を評価した。さらにリトコール酸誘導体の細胞及びマウスへの作用を検討した。

- ②ビタミンD活性発現に重要であるリガンド受容体結合体の核内移行に必要なVDRと相互作用する蛋白質のスクリーニングを行なうため、VDRをbaitとしてyeast two-hybrid systemを行なった。得られた候補蛋白質とVDRの相互作用をin vitro pull down法および免疫沈降法により確認し、VDR核移行における役割をin vitro nuclear transport assayを用いて明らかにする。

- ③ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な転写抑制機構の解明： $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な転写抑制機構において鍵分子であるVDIR、転写共役因子複合体の一つである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の1

$\alpha$ ,25(OH)2D3依存的な転写抑制における機能解析を、ルシフェラーゼ (LUC) 法、免疫沈降法、クロマチン免疫沈降法 (CHIP)、GST pull-down法、MALDI TOF-MSを用いて行った。

④ビタミンDの骨に対する直接作用を明らかにするために、加藤らの作出したVDR欠損マウスの胎仔骨発生過程を骨格標本、骨器官培養により検討した。さらに骨発生に重要なrunx2遺伝子の $\alpha$ ,25(OH)2D3依存的な転写抑制機構をルシフェラーゼ (LUC) 法を用いて検討した。また、生後の骨に対する直接作用を詳細に検討するため、P1ファージ由来のCreリコンビナーゼ (Cre) がloxP配列で挟まれた領域を切り出す性質を利用したCre-loxPシステムによる骨芽細胞特異的VDRKOマウスの作出を試みた。

⑤ビタミンD代謝の鍵段階のひとつである腎における25OHDの再吸収に重要なエンドサイトーシス受容体であるメガリンの役割を明らかにするために以下の検討を行った。マウスのメガリンのポリクローナル抗体を作製し、免疫組織化学的検討を行った。さらに、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、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。

⑥ビタミンD抵抗性くる病/骨軟化症の一種である腫瘍性骨軟化症の惹起因子として、fibroblast growth factor(FGF)-23を同定し、モノクローナル抗体を用いてFGF-23測定系を開発し、各種疾患におけるFGF-23濃度を検討すると共に、FGF-23ノックアウトマウ

スを用い、FGF-23の生理作用を検討した。

## 甲状腺領域

### TSH不応症に関する研究

クレチン症、高TSH血症を同胞・家族内に持つ全国から寄せられた20家系を対象とし、インフォームドコンセントを取得した後に末梢白血球よりゲノムDNAを抽出し、TSHR遺伝子の膜貫通部分を中心にPCRダイレクトシーケンス法による解析をおこなった。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。

### 甲状腺ホルモン不応症 (Resistance to Thyroid Hormone = RTH) の分子病態に関する研究

①TSH  $\beta$  遺伝子の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検討: Pit1、GATA2を発現させたCV1細胞で、高感度にTSH  $\beta$  遺伝子プロモーター活性を調べる系を確立した。ルシフェラーゼ遺伝子にはT3/TRにより転写抑制をうける領域が存在するため、レポーター遺伝子としてはヒトTSH  $\beta$  遺伝子プロモーター (-128/+37) にCAT遺伝子を結合させたものを作成した。種々の変異TR、各種コファクター、変異ないし欠失TSH  $\beta$  遺伝子プロモーターを使用し、ゲルシフト、GSTプルダウン、ChIPアッセイ等の手段を用いた。

②異常TRが甲状腺機能におよぼす可能性の検討: 非常に強いドミナントネガティブ作用をもつ変異TR  $\beta$  F451Xと、相同変異TR  $\alpha$  F397Xをそれぞれサイログロブリンプロモーターに組み込み、トランスジェニックマウスを作成した。得られたマウスの血中T3、T4、

TSHを測定、甲状腺組織を病理組織学的に検討した。

- ③TRH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：TRH遺伝子のnTREに既存の転写因子結合配列が存在するかコンピューター解析を行う。GH4C1細胞核蛋白とnTREとの結合をゲルシフトアッセイにて検討し、結合した核蛋白がコンピューター解析によって得られた転写因子と同一のものであるか確認する。その転写因子にTRが直接結合するか否かを*in vivo*ならびに*in vitro*結合解析で確認する。Histone deacetylase (HDAC) やnuclear receptor corepressorなどのTRの転写共役因子とこの転写因子が*in vivo*においてTRHプロモーターにリクルートされるかクロマチン免疫沈降 (chromatin immuno-precipitation; ChIP) 法を用いて検討する。更に、この新規転写共役因子に対するshort interfering RNA (siRNA) を用いて内因性蛋白を消失させることにより、T3による転写抑制が減弱するか検討した

- ④ヒト皮膚繊維芽細胞からクローニングされた甲状腺ホルモン応答性遺伝子ZAKI-4の甲状腺ホルモン応答機構の解明とRTHの病態におけるZAKI-4の機能解析：ZAKI-4遺伝子転写産物をRACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) により解析しゲノム構造、遺伝子座を決定した。転写産物の解析によりアイソフォームを同定した。ZAKI-4遺伝子産物の機能解析として、DSCR1との構造上の類似からカルシニューリンとの結合および活性抑制効果を免疫沈降法、ZAKI-4のConstitutively active calcineurin ( $\Delta$ CN) の活性に対する影響、IL-2遺伝子を利用したカ

ルシウム-カルモジュリンシグナリン系の活性化によるルシフェラーゼ活性の上昇に対するZAKI-4の作用を検討した。さらにT3によるZAKI-4遺伝子発現調節機構を正常および甲状腺ホルモン不応症 (RTH) 患者から得られたヒト皮膚線維芽細胞や強いドミナントネガティブ作用を発揮するTRG345R (TR $\beta$ の345番目のグリシンがアルギニンに置換されたmutant) を発現するアデノウイルスベクターを用い検討した。

#### 自己免疫性の甲状腺機能異常 (バセドウ病) に関する研究

- ①バセドウ病の遺伝的素因に関する検討：TSH受容体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討した。TSH受容体遺伝子内に存在するSNPの中で、10~50Kbp間隔で12個のSNPを選び、関連解析を行った。有意な関連を認められた領域について、さらに10個のSNPを選んで連鎖不平衡 (LD) 解析を行った。LD係数が0.8以上の領域 (block) 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。家族発症バセドウ病の全国的調査は厚生省特定疾患調査研究事業「特定疾患に関する疫学調査研究」班との共同で第一次調査と第二次調査を行い、岡山大学と順天堂大学の倫理委員会で承認を受けた。家族性バセドウ病とは、「対象者本人がバセドウ

病の診断基準を満たし、兄弟姉妹、実の親、実の子（第一度近親以内）の誰か1人以上にバセドウ病が発病している者」と定義した。全国2367施設の内科（内分泌代謝科、甲状腺科）、小児科、甲状腺専門病院に調査票を送付した。

- ②TSH受容体抗体産生調節に関する研究：バセドウ病におけるスギ花粉症の合併率をみるため、健常対象者766人、バセドウ病126人、無痛性甲状腺炎患者46人及び橋本病患者88人を対象に、スギ花粉症を有しているかどうかを調べた。TRAb産生の検索では、寛解ないし寛解に近いバセドウ病患者10例を対象に経時的に甲状腺機能検査及び各種自己抗体、さらにスギ特異的IgE抗体価の変動を検索した。対象10例中5例はスギ花粉症を合併している患者で（Aグループ）、残り5例はスギ花粉症のない患者（Bグループ）を選んだ。
- ③バセドウ病治療法選択に関する研究：抗甲状腺剤治療効果の予測法に関しては、初診時のTRAb値を5年間経過観察出来た180例のバセドウ患者において、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、予後との関係を調べた。投薬中止の指標に関しては、一般医家でも使用できる簡便な方法を見いだすため、抗甲状腺剤隔日一錠の内服条件を設定し、少なくとも6ヶ月間FT4、TSH値が正常であった57例を対象に解寛、再発の要因を検索した。抗甲状腺剤投与中止後、はじめの6ヶ月は1～2ヶ月毎に、次の18ヶ月は3～4ヶ月毎に甲状腺機能の検査を実施した。
- ④バセドウ病眼症の病態に関する研究；非甲状腺細胞のサイトロピンレセプター発現調節機構の解明においては 以下の方法で研究を

行った。TSHR遺伝子プロモーター(-1707～-1 bp)/Lucおよびその5' 端よりの欠失ミュータントの活性を、甲状腺細胞であるFRTL-5、前脂肪細胞である3T3-L1細胞にて測定し、その比較検討により、これらの制御因子を探り、その性質を明かにする。またTSHR遺伝子プロモーター遺伝子配列に存在する転写因子のconsensus sequenceを検索し、あらたな調節因子を見いだす。一方、バセドウ病眼症はバセドウ病に高率に合併することから、甲状腺と後眼窩組織との共通抗原を自己抗原とする自己免疫疾患と考えられ、リアルタイム定量PCR法にてTSH受容体やサイログロブリンの遺伝子発現について後眼窩組織を用い検討した。

- ⑤バセドウ病眼症の遺伝的素因に関する研究：TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-6、IL-13、IL-18などのサイトカイン遺伝子多型やCTLA-4、CD40、ICAM-1などの免疫応答分子の遺伝子多型の検討、ポーランド人と日本人における遺伝子の比較検討を行った。

（倫理面への配慮）

患者サンプルを用いる検討においては患者への十分な説明と同意の上で行い、遺伝子解析を必要とする研究にあたっては、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。動物実験においては「動物の保護及び管理に関する法律」及び「実験動物の飼養及び保護等に関する基準」を遵守した。

## C. 研究結果及び考察

### 副甲状腺領域

#### 副甲状腺機能低下症に関する研究

①Bio-PTH濃度は、正常者 $22.3 \pm 7.1$  pg/mlに比べ、PHP  $252.5 \pm 124.8$  pg/mlと増加していた ( $P < 0.01$ )。更に、BioPTH/iPTH比は、正常者 $0.77 \pm 0.06$ 、PHP  $0.64 \pm 0.03$ であった ( $P < 0.01$ )。PTH (7-84) 様 fragmentsの濃度も、正常者 $7.2 \pm 4.1$  pg/mlに対し、PHP  $142.5 \pm 76.9$  pg/mlと増加していた ( $P < 0.01$ )。PTH (7-84) /Bio-PTH比は、正常者 $0.30 \pm 0.11$ 、PHP  $0.56 \pm 0.07$ であった ( $P < 0.01$ )。以上より、PHPではPTHの合成分泌と分解のいずれもが亢進していると考えられた。

②偽性副甲状腺機能低下症Ib型の分子病態に関する研究：

A) STX16遺伝子欠失の検討：PHP-Ib日本人孤発例10例では欠失はみとめなかったが、家族例1家系では欠失を証明した。STX16遺伝子の欠失は日本人PHP-Ibにおいても疾患遺伝性の特異度は高いと考えられた。

B) X染色体不活性化の偏りの検討：検討可能であった孤発性PHP-Ibにおいて著しいX染色体不活性化の偏り (skewed X-inactivation) を半数例において認めた。この頻度は一般人口で見られる3%の頻度と比べ明らかに高く、PHP-Ibにみられるepigeneticsの異常が、他の染色体上の他の遺伝子にも及ぶ可能性を示唆する。PHP-Ibの症例にみられた合併症がGNAS1遺伝子以外のepigenetics異常によっている可能性を検討する必要性を導く結果と考えた。

C) 尿中落下近位尿細管由来細胞を用いた

GNAS1アリル特異的mRNA発現の検討：エクソン1Aの発現は健常コントロール (単アリル脱メチル化) では単アリル性で、PHP-Ib (両アリル脱メチル化) では両アリル性であった。エクソン1Aの単アリル性発現がこの細胞で証明され、その単アリル発現はDNAメチル化に強く依存していることが示された。しかし、エクソン1Aの発現は、メチル化状態および発現パターンに関わらず両アリル性であった。このことは、この尿細管由来細胞株ではGs $\alpha$  蛋白の発現はゲノム刷り込みを受けていないことを示し、臨床的遺伝的事実と反する結果となった。この原因は主として細胞をin vitroで培養したことに起因すると考えられ、GNAS1遺伝子の生体内近位尿細管細胞でのゲノム刷り込みには、高度の分化によるtrans-acting elementの発現が必須であると推測される。

D) PHP-IbのDNAメチル化異常パターンと臨床症状との関連：PHP-IbでPHP-Ia類似の臨床像 (精神発達遅滞、中手中足骨の短縮) を示す例がありDNAメチル化解析は、両者の区別に有用であった。PHP-IbでもPHP-Iaと同様に種々の程度のホルモン抵抗性をTSHやLHに対して認めることがあり、これまでヒト甲状腺、性腺においてゲノム刷り込みがみられたとする報告と矛盾しない結果であった。PHP-Iaに類似する臨床像を呈した患者は広い範囲のDNAメチル化異常を示したものに含まれていたが、検討した範囲のDNAメチル化異常のパターンだけでは、臨床像の違いを説明できなかった。

また、臨床的にPHP-Iaに特異度の高い臨床症状は皮下異所性石灰化であった。

### ③カルシウム感知受容体 (Casr) 遺伝子異常に関する検討

A) 胸椎後靭帯骨化症を契機に偽性副甲状腺機能低下症Ib型と診断された症例において、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、Casr遺伝子のcodon592にmissense mutation (Asn→Ser) がヘテロで同定された。これは活性型の変異であることを強制発現系で確認した。少量の $1\alpha$  OHD<sub>3</sub>投与により血清PTHを高値に保つことで、血清および尿中Caを正常化できた。

B) ADH 3 家系においてCaSR遺伝子変異を同定したが、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シ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の投与で、血清カルシウム値は7-7.5mg/dl、尿中Ca/Crが0.2前後のコントロールである。本症の患者における検討では、血清Ca値が8.0mg/dl以上では全例で、7.0mg/dl以上でも多くの場合で高Ca尿症を呈した。血清Ca値が6.0mg/dl以下では、テタニーが出現したので、血清Ca値を6.0mg/dl~7.0mg/dlに維持するのが適当であると考えられた。

C) 自己免疫疾患を合併するIHP弧発例：Western blot法にて患者血清のみでCaSRの分子量レベルにbandを認めた。患者血清はコントロール血清と異なり、

副甲状腺細胞の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CaR抗体が関与する可能性が示された。

D) 2例の副甲状腺ホルモン分泌不全による副甲状腺機能低下症患者に、低カリウム血症や高レニン血症など、バーター症候群様病態の合併を認めた。バーター症候群は、腎尿細管に発現するチャンネルやトランスポーターの異常により惹起される症候群で、従来1型から4型に四型に分類されてきた。これら2例のカルシウム感知受容体遺伝子の検討から、カルシウム感知受容体の強い活性型変異は、ヘンレ上行脚のカリウムチャンネルを抑制することにより、バーター症候群の原因となることが明らかとなった。このことは、従来報告されていなかったカルシウム代謝とナトリウムや体液調節系の関係を示している。

### ④骨芽細胞におけるPTHの細胞内シグナル

A) PTHはfosB/ $\delta$  fosB遺伝子のmRNA発現を転写レベルで、ERK依存性に促進した。

B) PTHはIL-11遺伝子の転写をERK依存性にAP-1結合部位を介して促進した。またPTHによるIL-11転写促進作用はDEXにより強力に抑制された。

C) PTHおよびIL-11はDEXにより誘導される骨芽細胞アポトーシスを約50%に抑制した。この抗アポトーシス効果はERK依存性であった。DEXは抗アポトーシス因子であるbcl-2の発現を低下させたが、PTHおよびIL-11はこの発現低下を抑制した。PTHの効果はIL-11の中和抗体により一部解除された。

D) PTHはERK非依存性にSmad1/5を活性化した。AP-1転写因子の一つでin vivoでの骨形成促進能を有する $\delta$  fosBは、Smad1と協調的にIL-11遺伝子の転写を促進した。

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( $\delta$  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。

### ビタミンD作用の基礎的検討とビタミンD抵抗性に関する検討

#### ①新規ビタミンD受容体 (VDR) リガンドであるリトコール酸のVDR結合様式

A) アミノ酸配列のアラインメント及び立体C $\alpha$ 構造の比較において、VDRとPXRは極めて類似の構造であった。しかし、リガンド結合ポケットを構成するアミノ酸の側鎖の相違から、リガンド結合ポケットの立体構造に大きな相違があった。リガンド結合ポケットを構成するアミノ酸の変異体の検討の結果、VDR-S278Vは活性型ビタミンD3に反応するがリトコール酸には反応せず、VDR-S237Mはリトコール酸に反応するが活性型ビタミンD3には反応しないことが明らかになった。

B) 各種VDR変異体に対する活性型ビタミンD3とリトコール酸との作用の相違を詳細に検討した。リガンド結合ポケットを構成するヘリックス3に位置するS237は活性型ビタミンD3の結合に重要であるがリトコール酸の結合にはあまり関わっていないことなど、活性型ビタミン

D3とリトコール酸とはVDRに対する結合様式が異なることが明らかになった。また、リトコール酸は活性型ビタミンD3と同様に側鎖がヘリックス12の方向でドッキングするが、リトコール酸の代謝産物でVDRリガンドでもある3ケトコラン酸は側鎖が $\beta$ -シート側とリトコール酸とは反対方向に入り込んでいることが明らかになった。

C) リトコール酸誘導体のVDRに対する効果を検討した。リトコール酸の3位の修飾が活性に大きく影響を与えた。3位修飾体リトコール酸アセテートは、少なくともリトコール酸よりも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Farnesoid X receptor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。

D) リトコール酸アセテートは、腸管粘膜細胞や単球におけるVDR標的遺伝子をリトコール酸よりも効果的に誘導した。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。

E) 考察：カルシウム代謝調節性の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。以上の結果は、リトコール酸が作用したVDRが選択的な生理作用を及ぼしている可能性を示唆している。リトコール酸やその誘導体を

利用することによって、VDRの新たな機能及び疾患との関連性の解析が可能であるばかりか、リトコール酸とVDRのドッキングモデルはより活性の強い胆汁酸誘導体の開発が可能であることを示している。VDRのリガンド結合様式の解析を進めることで、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が期待できる。

## ②リガンド受容体結合体の核内移行に必要なVDRと相互作用する蛋白質

yeast two-hybrid systemを用い、VDRと相互作用する蛋白質のスクリーニングを行なった結果、VDRの細胞内輸送に関わる可能性のある遺伝子が二つ同定された。一つは核-細胞質間分子輸送を担うimportin- $\beta$  familyに属する新規分子、他方は核膜孔複合体の構成因子nucleoporinの構成分子であった。いずれもGST-pull down法および免疫沈降法によりVDRと相互作用することが強く示唆された。また、in vitro nuclear transport assayを用いて、VDRの核移行を解析し、VDRにはリガンド依存性および非依存性の2つの核移行メカニズムが存在し、それぞれ異なる領域が関与していることを明らかにした。

## ③ $1\alpha$ (OH)ase遺伝子の $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な転写抑制機構の解明

A) VDIRを強発現することにより、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な転写抑制が顕著に認められたことから、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による転写抑制においてVDRと共に必須であることを確認した。また、TSA添加により、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による転写抑制が阻害されることから、HDAC2の関与の可能性が示唆された。免疫沈降の結

果より、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の存在時、HDAC2およびNCoRがVDIRとVDRを含む複合体に含まれていることが明らかになった。更に、この複合体が実際に $1\alpha$ -nVDRE上で形成されていることをCHIP assayにて確認した。GST-VDIRをbaitとして行ったタンパク精製によりVDIRとVDRが $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的に形成する巨大複合体を形成していることが明らかになり、その複合体の中にHDAC2およびNcoRがやはり含まれていることが確認できた。以上の検討から $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な転写抑制機構において、 $1\alpha$ -nVDREに結合したVDIRが、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的にVDRおよび、HDAC、NCoRを含むco-repressorと複合体を形成することを明らかにした。PTH及びPTHrP遺伝子にも同様な転写抑制分子メカニズムが存在することから、VDIRを介する転写抑制メカニズムは活性型ビタミンDにより発現が抑制される標的遺伝子において共通する転写抑制メカニズムである可能性が示された。

B)  $1\alpha$ -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、VDR、WSTFはプロモーター上にリガンド非依存的に結合することが明らかとなった。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クロマチン結合能を介した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、1 $\alpha$ (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。

#### ④ビタミンDの骨に対する直接作用

A) VDRKOマウスの胎仔より頭蓋冠を採取し寒天培地上で器官培養を行った結果、培養後の頭頂骨はK. Oでは厚さに変化が認められなかった(20 $\pm$ 1 $\rightarrow$ 21 $\pm$ 2  $\mu$ m)一方、Wildでは培養前より厚さが減少していた。(20 $\pm$ 2 $\rightarrow$ 12 $\pm$ 2  $\mu$ m)また、破骨細胞数は両者間で有意な差はなかった。胎仔骨格標本を胎齢をさかのぼって作製したところ、13.5 dpcでKOの頭頂骨及び上、下顎骨のアリザリンレッドによる染色域はWTより広く、ヘテロではその中間型を示し、骨格発生においてVDRが負の制御因子として作用していること、この効果はVDRの遺伝子量に依存していることが明らかとなった。

B) これらの標本における骨代謝関連遺伝子の発現を検討したところrunx2 mRNA発現がKOにおいて増加していることより、runx2遺伝子上流4.6Kbをクローニングしルシフェラーゼアッセイを行い1,25(OH)2D3による負の制御にかかわる領域を同定することを試

みた。その結果、転写開始点上流1.8-1.9Kbの間100bpに負の制御にかかわる領域を同定することが出来た。また、転写開始点上流-98~-84に存在するDR3配列は弱いpositive VDREであることが確認できた。

C) 生後のVDRの骨における作用を明らかにするため骨芽細胞特異的VDRKOマウス(Ob-VDRKO)を作成した。Ob-VDRKOマウスの成長曲線は野生型と有意な差異は見出されず、正常であった。骨量が最大となる16週齢のマウスの大腿骨のX線解析を行なったところ、VDRKOマウスでは著しい骨量の減少が観察されたが、Ob-VDRKOマウスは予想に反し野生型と比較し骨量および骨密度が増加することを見出した。次に骨組織を詳細に解析したところ、Ob-VDRKOマウスは野生型に比べ海綿骨の骨形成および骨吸収が抑制され、皮質骨の骨形成が促進されていることが明らかになった。このことから、骨芽細胞のVDRが骨量および骨代謝の制御、骨芽細胞分化制御に直接関与していることが明らかになった。つまり、VDRは骨組織では負に、他の標的臓器ではカルシウム代謝を調節することにより正に機能し、骨代謝を正常に保つと考えられた。

#### ⑤ビタミンD代謝とメガリン

作製した抗体を用いてメガリンに対する免疫染色を行った結果、メガリンの近位尿細管上皮細胞の刷子縁部分への局在を確認した。可溶性His-RAPリコンビナント蛋白を調製し、マウス腹腔内に投与し、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、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。このことから、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、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たが、これらはメガリンノックアウトマウスで認められた所見であり、His-RAPの腹腔内投与によりメガリン機能を一時的に障害する系が確立されたことが確認された。

#### ⑥ ビタミンD抵抗性くる病の病態

腫瘍性低リン血症性骨軟化症よりFGF23をクローニングし、低リン血症の原因がFGF23であることを明らかにした。FGF-23測定系の開発により、腫瘍性くる病/骨軟化症患者では血中FGF-23は高値を示し、原因腫瘍の摘除によりFGF-23は速やかに低下すること、腫瘍性くる病/骨軟化症に加え、ビタミンD抵抗性くる病/骨軟化症の最も頻度の高い原因であるX染色体優性低リン血症性くる病/骨軟化症においても血中FGF-23濃度の上昇が認められることが示された。さらにMcCune-Albright症候群に伴う低リン血症においても、FGF-23の高値が認められることが報告されており、FGF-23の高値は複数の低リン血症性疾患の病因となっていることが明らかとなった。またFGF-23ノックアウトマウスは、腫瘍性くる病/骨軟化症などとは逆に、高リン血症、高1,25-水酸化ビタミンD血症を示したことから、FGF-23は生理的にもリンやビタミンD代謝に必須の液性因子であることが示された。

## 甲状腺領域

### TSH不応症に関する研究

従来報告されている3家系のTSHR遺伝子異常による不応症例に加え、新たに4家系(R450H/R450H;名古屋・群馬、R450H/R519G;熊本、450H/V473I;群馬)のTSHR遺伝子異常症を同定したが、いずれの家系もR450H変異を有していた。R450H変異は日本人に特有で、“創始者効果”とも考えられた。R450H/R450Hの3症例の表現型は甲状腺の軽度低形成を認めるも位置は正所性を示した。機能解析では、G498S>R519G>R450Hの順に機能喪失の程度が強かった。マススクリーニング時のTSH値は12.6~38.2 $\mu$ U/L、治療開始月齢は1~32か月、ホルモン補充量3~5 $\mu$ g/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、全例に明らかな甲状腺機能低下症状を認めなかった。甲状腺サイズは、R450H/G498Sで低形成であったが、R450H/R450Hの3症例では軽度であった。R450H/R450Hの1例ではホルモン補充後にIQの改善が見られた。変異をヘテロ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が、G498Sをヘテロ接合に有する個体のTSH基礎値は軽度上昇していた。

### 甲状腺ホルモン不応症 (Resistance to Thyroid Hormone = RTH) の分子病態に関する研究

① TSH $\beta$ 遺伝子の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:A) TRアイソフォームの中でTR $\beta$ 2の転写抑制がもっとも強く、TSH産生下垂体細胞株T $\alpha$ T1ではTR $\beta$ 2のみが検出されたことから、TR $\beta$ 2がTSH制御における主体な受容体と考えられた。B) TSH $\beta$ 遺伝子の

プロモーター領域を詳細に検討した結果、従来T3/TRによる負調節に重要とされていた領域は必要ではなく、pit 1、GATA2結合領域のみとしたコンストラクトで十分であること、GATA2結合領域に隣接する約30塩基配列になんらかの抑制機能が存在すること、この領域を除去したレポーター遺伝子ではGATA2のみで活性化されること等を明らかにした。C) TRはそのDNA結合領域でGATA2のZnフィンガーと結合するが、両者の相互作用はT3に依存しないことが分かった。④ChIPアッセイで、T3依存性にヒストンH3の脱アセチル化が起こることが示された。また阻害型TRAP220によりT3/TRの抑制能が失われた。

- ② 甲状腺特異的異常TR発現マウスの解析：同一の異常を持つ変異TRを甲状腺に特異的に発現させたTR $\alpha$  F397X-、 $\beta$  F451X-トランスジェニック (Tg) マウスを作成した。それぞれ1系統のF0からヘテロ接合体F1-Tgマウスを得ることが出来た。異常TR蛋白の発現は、導入遺伝子に組み込んだFLAG配列に対する抗体を用い、免疫組織染色とWestern blot解析で確認した。その後の検討結果で、両系統のマウスに本質的差異はなく、共通の所見として以下の結果を得た。A) 胎生期の発育障害、奇形はなく、致死的でもなかったが、授乳期から徐々に発育不良となり、体重測定可能な離乳期以降は明らかな低体重を示した。成育Tgマウスの血中T4、T3はともに同月齢のNon-Tgマウスより有意に低下、TSHは高値で、原発性甲状腺機能低下症を示した。B) 成熟Tgマウスの甲状腺はびまん性に

軽度腫大し、組織所見は扁平化した濾胞上皮細胞で囲まれコロイドを充満した巨大濾胞が散在、一部の濾胞腔では乳頭状細胞増殖を示した。出生直後のF1-Tgマウスでは、濾胞形成の不十分な未熟な濾胞上皮細胞の集塊像を呈した。C) 免疫組織染色、Western blotで解析したサイログロブリン蛋白、TTF-1、Pax-8、TSH受容体などの発現量は いずれもNon-Tg同腹仔甲状腺と同等であった。④F1-Tgメスマウスの妊娠能は非常に低く、ホモ接合体F2-Tgマウスの作成は不可能であった。

以上より胎生14.5日から異常TRを甲状腺に強制発現させると、甲状腺形成が障害されることが明らかになった。病理所見から、異常TRは甲状腺内ホルモン合成過程を阻害するのではなく、甲状腺濾胞形成そのものを障害すると推測された。

- ③ 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：

コンピューター解析の結果、負の転写制御に必須のプロモーター領域に転写因子Leader-binding protein-1 (LBP-1)のコンセンサス結合配列が3ヶ所存在することが判明した。実際に、LBP-1がnTREに結合するか検討したところ、GH4C1細胞核蛋白ならびに*in vitro*で作製したLBP-1蛋白がこの領域に同様に結合し、両者の結合がLBP-1に対する特異抗体によりスーパーシフトした。この結果より、LBP-1がTRHプロモーターのnTREに実際に結合することが明かとなった。次にTRとLBP-1が結合するか否か確認したところ、LBP-1がTRのDBDに直接結合することが判明し

た。培養細胞を用いた一過性遺伝子導入実験では、LBP-1のcotransfectionはTRの存在下においてTRHプロモーターのTRによるリガンド非依存性活性化を強く増強した。続いてT3による転写抑制にヒストン脱アセチル化が関与するかHDAC阻害剤であるトリコスタチンA (TSA) を用いて検討した。TSAはT3による転写抑制を解除したことより、TRによるTRHプロモーターのリガンド非依存性転写活性化にはヒストンアセチル化が、転写抑制にはヒストン脱アセチル化が関与することが示唆された。次に、LBP-1やTRが*in vivo*においてTRHプロモーターにリクルートされるかChIP法を用いて検討した。T3非存在下では、LBP-1とTRはプロモーターにすでにcorecruitされており、TRHプロモーターはアセチル化ヒストン3に結合していた。一方、T3添加1時間後に内因性HDAC2、3がプロモーターに一過性にリクルートされたが、HDAC1のリクルートは全く認められなかった。HDACのリクルートに伴って、アセチル化ヒストンに結合したTRHプロモーターも減少した。LBP-1特異的siRNAにより、LBP-1 mRNAならびに蛋白量は容量ならびに時間依存性に減少したが、コントロールであるcyclophilin蛋白量に明らかな変化を認めなかった。LBP-1特異的siRNA存在下では、TRによるリガンド非依存性活性化及び依存性抑制が有意に減弱した。In vitro結合解析においてLBP-1とHDAC2ならびに3が直接結合することも明かとなった。

以上の成績から、LBP-1/TR複合体がHDACなどの転写共役因子をTRHプロモ-

ーターにリクルートし、ヒストン蛋白のアセチル化状態を変化させることによりT3非依存性および依存性転写制御を惹起することが明かとなった。

- ④ ヒト皮膚繊維芽細胞からクローニングされた甲状腺ホルモン応答性遺伝子ZAKI-4の甲状腺ホルモン応答機構の解明とRTHの病態におけるZAKI-4の機能解析

甲状腺ホルモン応答性遺伝子ZKI-4の構造とその産物の機能を解明した。ZKI-4遺伝子は第6染色体の短腕に位置し、2つのアイソフォームa、bをコードする。a、bともにカルシニューリン (CN) のcatalytic subunitと結合し、その活性を抑制する。一方、甲状腺ホルモンはaアイソフォームのみを増加し、CN活性を抑制する。この甲状腺ホルモンによるZKI-4 aの誘導とCN活性の抑制は、甲状腺ホルモン不応症患者からえられた皮膚繊維芽細胞には認められず、CNの多彩な機能を鑑みると、不応症患者の多彩な症状の発症機序の一因と考えられた。

甲状腺ホルモン (T3) によるZKI-4aの発現調節機序を詳細に検討した。その結果、甲状腺ホルモン受容体は細胞膜に存在するPI3Kのcatalytic subunit、p85aと結合して存在し、TRにT3が結合するとPI3Kを活性化し、この活性化によりAkt/PKB→mTOR→p70S6Kが段階的に磷酸化を受け活性化され、ZAKI-4a mRNAが増加する。こうしたT3の作用はPI3Kの阻害剤であるwortmanninやLY294002やmTORの阻害剤であるrapamycinによって完全に阻害される。

T3によるPI3→Akt/PKB→mTOR→