

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、リトコール酸の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。

## D. 評 価

### 1) 達成度について

活性型ビタミンD3と新規生理的リガンドであるリトコール酸とのVDRに対する結合様式の相違を明らかにして、より活性の強い胆汁酸誘導体の開発を成功させた。リガンド選択的なVDR生理作用及びVDR受容機構の異常が関与する疾病の病態メカニズムの解析は今後の仮題であるが、当初の目標をほぼ80%達成したと考えられる。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

これまで活性型ビタミンD3の受容体として考えられていたVDRが、胆汁酸にも反応し胆汁酸代謝酵素の発現を調節することを見出したが、この発見はVDR研究へ新たな視点を与えるものとして国際的に高く評価されている。カルシウム代謝以外にも、コレステロール胆汁酸代謝及び生体異物代謝などでVDRが何らかの機能を有していることを示唆しており、VDR受容機構異常症の概念が拡大させる可能性がある。活性型ビタミンD3に抗腫瘍効果や免疫調節作用があることから、VDRを標的とする薬剤開発はこれまで活性型ビタミン

D3の構造をもとに進められてきた。しかし、カルシウム代謝に対する作用とその他の作用を分離することは困難であった。本研究により、VDRに対する新規生理的リガンドであるリトコール酸が活性型ビタミンD3とは異なる結合様式でVDRに作用すること、胆汁酸の構造に基づくVDR作用薬の開発が可能であること、が明らかにされ、研究成果は創薬においても注目される。

### 3) 今後の展望について

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 における作用の相違などに着目して、活性型ビタミンD3とリトコール酸に対するVDR受容機構の選択性を解明したい。また、活性型ビタミンD3の投与が有効とされているある種の悪性腫瘍や皮膚疾患などのいわゆる“VDR機能異常症”の病態メカニズムを解明し、分子病態に基づいた理論的な治療戦略を構築したい。

### 4) 研究内容の効率性について

平成16年4月に大阪大学から日本大学への異動があったが、共同研究者の協力も得られ、効率的に研究を進められたと考えられる。今後は、当該研究班において築いた研究者ネットワークを利用し、更に効率的に研究を進めたいと考えている。

## E. 結 論

1) 胆汁酸であるリトコール酸がVDRのリガンドとして作用することを見出し、活性型ビタミンD3とリトコール酸とではVDRリガンド

結合ポケットに対する結合様式が異なることを明らかにした。活性型ビタミンD3及びリトコール酸それぞれに選択的なVDR変異体を作成した。

2) リトコール酸のVDRへのドッキングモデルの解析から、より強力なVDRアゴニストである胆汁酸誘導体リトコール酸アセテートを見出した。

3) リトコール酸アセテートは、腸管粘膜細胞や単球由来細胞においてリトコール酸よりも効果的にVDR標的遺伝子を誘導し、また骨髄性白血病細胞THP-1細胞の単球への分化を誘導することを明らかにした。

## F. 研究発表

### 1) 国内

口頭発表	20件
原著論文による発表	0件
それ以外（レビュー等）の発表	13件

#### そのうち主なもの

##### 論文発表

- 1) 榎島誠。核内レセプターと生体異物代謝。遺伝子医学 6: 595-599, 2002
- 2) 榎島誠。脂質代謝と核内レセプター。生化学 75: 391-395, 2003
- 3) 榎島誠。核内レセプターによる生体異物・脂質代謝調節。医学のあゆみ 206: 911-914, 2003

##### 学会発表

- 1) 榎島誠。胆汁酸センサーとして働く核内レセプター群（シンポジウム：脂溶性リガンド受容体を介する情報伝達機構）。第25回日本分子生物学会年会、

横浜、2002.12

- 2) 榎島誠。胆汁酸センサーとしてのビタミンD受容体（シンポジウム：細胞環境情報センサー研究の最前線、化学的刺激から物理的刺激まで）。第80回日本生理学会大会、福岡、2003.3
- 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（シンポジウム：生物を化学で語る、ポストゲノム時代の新たな挑戦）。第123回日本薬学会、長崎、2003.3
- 4) 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

### 2) 海外

口頭発表	14件
原著論文による発表	8件
それ以外（レビュー等）の発表	1件

#### そのうち主なもの

##### 論文発表

- 1) Makishima, M., Lu, T. T., Xie, W., Whitfield, G. K., Domoto, H., Evans, R. M., Haussler, M. R., and Mangelsdorf, D. J. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. Science 296: 1313-1316, 2002
- 2) Choi, M., Yamamoto, K., Itoh, T., Makishima, M., Mangelsdorf, D. J., Moras, D., DeLuca, H. F., and Yamada,

- S. Interaction between vitamin D receptor and vitamin D ligands: two-dimensional alanine scanning mutational analysis. *Chemistry & Biology* 10: 261-270, 2003
- 3) Adachi, R., Shulman, A. I., Yamamoto, K., Shimomura, I., Yamada, S., Mangelsdorf, D. J., and Makishima, M. Structural determinants for vitamin D receptor response to endocrine and xenobiotic signals. *Molecular Endocrinology* 18: 43-52, 2004
- 4) 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. *Journal of Lipid Research*, in press
- vitamin D action). 1st Joint Meeting of International Bone and Mineral Society and Japanese Society of Bone and Mineral Research, Osaka, Japan, 2003.6
- 2) Yamada, S., Yamamoto, K., Shimizu, M., Choi, M., Abe, D., Mihori, M., Makishima, M., 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
- 3) Makishima, M. Bile acid derivatives acting on VDR and their effects on leukemia. The US-Japan Workshop on: The Role of Nuclear Receptors in Carcinogenesis, Makena, Hawaii, 2004.3

#### 学会発表

- 1) Makishima, M. New function of vitamin D receptor as a bile acid sensor (Lunch Symposia: New aspects of

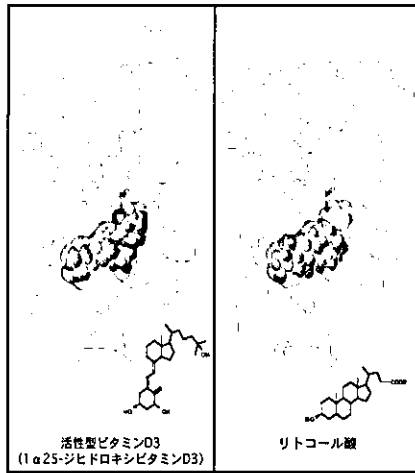
#### G. 知的所有権の出願・取得状況

(予定を含む)

なし

## 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

- ・ 活性型ビタミンD3の受容体として知られていたビタミンD受容体(VDR)は、胆汁酸であるリトコール酸にも反応することが明らかになった。VDRには胆汁酸代謝酵素の誘導作用も認められた。
- ・ 活性型ビタミンD3とリトコール酸とでは、VDRのリガンド結合ポケットに対する結合様式がことなることが明らかになった(図)。
- ・ VDRの新規生理機能及びそれと関連する疾病(“VDR機能異常症”)の病態メカニズムの研究への展開、胆汁酸の構造に基づいた作用選択的なVDRリガンドの開発への応用が期待される。



VDRのリガンド結合ポケットにドッキングする  
活性型ビタミンD3とリトコール酸

<難治性疾患克服研究事業>

(解説)

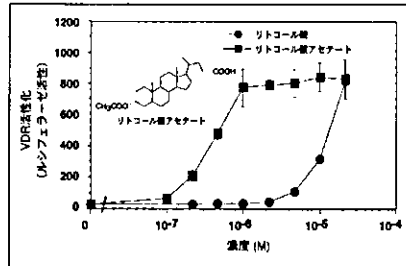
1. コレステロール胆汁酸代謝に関連する核内レセプターの研究の過程で、これまで活性型ビタミンD3の受容体として知られていたビタミンD受容体(VDR)が、腸内細菌が作り出す二次胆汁酸であるリトコール酸にも反応することを発見した。リトコール酸が作用したVDRは、リトコール酸代謝酵素CYP3Aの発現を誘導した。

2. VDRと最も構造の類似するpregnane X receptor(PXR)も、リトコール酸に反応しCYP3Aの遺伝子発現を誘導する。そこでVDRとPXRのアミノ酸配列及び立体構造を比較したところ、リガンド結合ポケットを構成する一部のアミノ酸残基の相違により、VDRとPXRのリガンド結合ポケットの構造の違いが生じることが明らかになった。そこでVDRのリガンド結合ポケットのアミノ酸を相当するPXRのもとと交換させるなどして、VDRリガンド結合ポケット変異体を作成し検討した。その結果、活性型ビタミンD3とリトコール酸とでは、VDRのリガンド結合ポケットに対する結合様式が異なることが示された(図)。

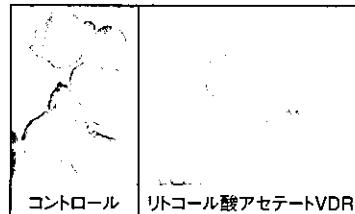
3. 実験結果は、活性型ビタミンD3とリトコール酸とでは、VDRへの異なる作用様式を介して、選択的な生理作用を及ぼしている可能性を示唆している。活性型ビタミンD3とリトコール酸によるVDR活性化機構を解明することは、VDRの新規生理機能及びそれと関連する疾病(“VDR機能異常症”)の病態メカニズムの研究へ展開でき、また胆汁酸の構造に基づいた作用選択的なVDR作用薬の開発へと導くことができる。

## 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

- ・ 生理的VDRリガンドである胆汁酸リトコール酸のVDRへの結合様式の検討によって、VDR活性化作用のより強力な胆汁酸誘導体リトコール酸アセテートを見出した(上図)。
- ・ リトコール酸アセテートは、胆汁酸反応性核内レセプターfarnesoid X receptor(FXR)やpregnane X receptor(PXR)に対してはほとんど効果はなく、VDR選択的な胆汁酸誘導体であった。
- ・ リトコール酸アセテートは、リトコール酸よりも効果的に腸管粘膜や単球由来細胞におけるVDR標的遺伝子の発現を誘導し、リトコール酸には認められない骨髄性白血病THP-1細胞の分化誘導効果を有していた(下図)。
- ・ 胆汁酸誘導体の開発は、VDRを標的とする新規治療戦略として期待できる。



VDRに作用する胆汁酸誘導体リトコール酸アセテート



リトコール酸アセテートによる  
骨髄性白血病THP-1細胞の単球への分化誘導

<難治性疾患克服研究事業>

(解説)

1. リトコール酸のVDRへのドッキングモデルの検討により、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予測した。胆汁酸誘導体のVDRに対する活性をルシフェラーゼアッセイにて検討したところ、リトコール酸よりも少なくとも30倍以上強力にVDRへ作用する胆汁酸誘導体リトコール酸アセテートを見出した(上図)。リトコール酸の3位の修飾が、VDRに対する活性に重要であることが明らかになった。

2. Farnesoid X receptor(FXR)やpregnane X receptor(PXR)などの核内レセプターもリトコール酸などの胆汁酸に反応する。リトコール酸のアセテートエステル化は、FXRやPXRへの効果は増強させなかった。つまり、リトコール酸アセテートは、VDR選択的な胆汁酸誘導体であった。

3. リトコール酸アセテートを細胞及びマウスへ投与し、内在性のVDR標的遺伝子の発現を評価した。リトコール酸アセテートはリトコール酸よりも効果的に腸管粘膜及び単球由来の細胞において、VDR標的遺伝子の発現を誘導した。活性型ビタミンD3には、骨髄性白血病細胞を単球系へ分化誘導する効果があることが知られていた。骨髄性白血病細胞THP-1細胞は、リトコール酸アセテートによって単球系へ分化することが明らかになった(下図)。リトコール酸には、この作用はなかった。

4. 実験結果は、胆汁酸誘導体が新規VDR作用薬として有望であることを示している。種類の異なるリガンドによって、カルシウム代謝、胆汁酸代謝、白血病などの悪性細胞の分化・増殖などにおけるVDRの作用を選択的に誘導できれば、VDRの機能障害の関与が疑われている様々な疾患の治療へ応用できる。

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門 部長

**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は低分子量蛋白尿、25位水酸化ビタミンD(25OHD)の再吸収障害を呈することから、メガリンは25OHD/ビタミンD結合蛋白(DBP)複合体に対してもエンドサイトーシス受容体として機能することが明らかとなった。当該研究においては、メガリン機能を一時的に障害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**

マウスのメガリンの細胞内ドメインに存在する195アミノ酸を抗原としてポリクローナル抗体を作製し、免疫組織化学的検討を行い、近位尿細管上皮細胞の刷子縁におけるメガリンの発現を確認する。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)を付加したりコンビナント蛋白を調製する。また、調製したHis-RAPを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する。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する。

倫理面への配慮として、動物実験についてはすべての実験プロトコールについて当該施設(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う。

**C. 研究結果及び考察**

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。可溶型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。

**D. 評価**

1) 達成度について

His-RAPのマウス腹腔内投与により、メガリ

ン機能を一時的に障害し、ビタミンD代謝に対する急性効果について検討した。現在、論文投稿中であり、ほぼ研究目的を達したと考える。

## 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

論文投稿中であるので、最終評価は今後にゆだねられる。

## 3) 今後の展望

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。

## 4) 研究内容の効率性

本研究は、新たな設備や機器の購入を必要とせず、効率的に課題が遂行されたと考える。

## 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. 研究発表

### 1) 国内

口 頭 発 表	8 件
原著論文による発表	0 件
それ以外(レビュー等)の発表	4 件

そのうち主なもの

論文発表

道上敏美。ビタミンDによる石灰化の調節。CLINICAL CALCIUM。14:64-69, 2004.

学会発表

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、大藪恵一。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回に本骨代謝学会2004.8. 大阪。

### 2) 海外

口 頭 発 表	2 件
原著論文による発表	3 件
それ以外(レビュー等)の発表	0 件

そのうち主なもの

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.

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. 26<sup>th</sup> annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004.10. Seattle, U.S.A.

#### **G. 知的所有権の出願・取得状況**

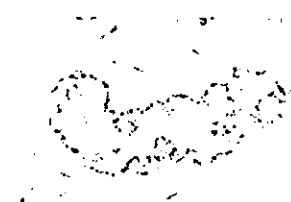
- 1) 特許取得：特になし。
- 2) 実用新案登録：特になし。
- 3) その他：特になし。

## エンドサイトーシス受容体メガリンとビタミンD代謝

◆メガリンは近位尿細管上皮細胞刷子縁に局在し、25位水酸化ビタミンD(25OHD)とビタミンD結合蛋白(DBP)の複合体に対するエンドサイトーシス受容体として機能する。

◆Receptor Associated Protein (RAP)の可溶型His-tag融合蛋白を用いて、メガリン機能の解析を試みた。

◆マウス腹腔内に投与したHis-RAPは近位尿細管上皮細胞に取り込まれ、DBPの尿中排泄増加、血清25OHD値の低下をもたらした。



腹腔内投与後、近位尿細管刷子縁下に取り込まれたHis-RAP

	血清 25OHD (ng/ml)	
	投与前	投与後
His-sRAP (n=7)	53.4±2.6	31.9±3.1*
Vehicle (n=4)	53.7±1.3	52.4±0.6

<難治性疾患克服研究事業>

表 His-sRAP投与による血清25OHD値の低下

(解説)

メガリンは近位尿細管刷子縁に局在し、25位水酸化ビタミンDの取り込みに関わるエンドサイトーシス受容体である。ビタミンD作用の受容機構におけるメガリンの機能を解析する目的で、receptor associated protein (RAP)の小胞体保持シグナルを除いて可溶型としたヒスチジンタグ融合蛋白を調製し、実験に用いた。調製した可溶型のHis-RAPとメガリンとの結合をリガンドプロットにて確認した後、マウスの腹腔内への投与を行った。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(図)。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(表)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。



厚生科学研究費補助金（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

本研究は1. ビタミンD受容体（VDR）の核局在を担う分子の探索、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の2つからなるので、各項目この順に記す。

#### 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。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の中には核局在に異常のある型があると考えられているが実態は不明である。本研究では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。

常染色体優性低カルシウム血症（ADH）は、カルシウムセンシング受容体（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。ADHの遺伝子変異と表現型の検討、治療法の検討を行う。

#### B. 研究方法

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を行なう。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する。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。

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。

倫理面では、課題1はin vitro studyであり、患者材料を使用しておらず、特に問題ない。課題2の遺伝子診断においては、本学倫理委員会にて承認済みであり、患者保護者からのinformed consentを得ている。

#### C. 研究結果及び考察

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GSY-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。

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の投与を他病院で受けている。血清カルシウム値は7-7.5mg/dlで、尿中Ca/Crが0.2前後のコントロールである。家族歴を有する症例を含めて、副甲状腺ホルモン分泌不全を伴う低Ca血症を示した7例においてCaSR遺伝子の異常を認めなかった。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。

#### D. 評 価

達成度について：現在、importin- $\beta$  familyに属する新規分子によるVDRの核移行については論文投稿中で、もう一方の核膜孔蛋白質については論文執筆中である。論文が受理された段階で達成度100%と考えている。CaSR異常症については低カルシウム血症の鑑別診断に寄与し、治療基準も示したので本事業にマッチした成果と考える。分子機序については引き続き実験が必要である。

研究成果の学術的・国際的・社会的意義につ

いて：論文が受理されていないので最終評価は今後にゆだねられるが、国際学会での発表では口頭発表やplenary posterに選ばれたので高い評価を受けたといえる。

今後の展望について：VDRの核移行とVDDRIIなどとの疾患との関連について現在研究中であり、最終結論をえる必要がある。CaSRのPTH分泌に及ぼす作用を詳細に検討する必要がある。ADHの症例のさらなる蓄積が必要である。

研究内容の効率性について

本研究によりカルシウム維持機構に関する理解が進み、カルシウム代謝異常症の管理に貢献するものと思われるが、そのためには成果の公報活動も大切である。研究者は講演や総説執筆を通じて成果の広報に努め、実地医療に活かせるようにすれば効率性はより高まるものと考えている。

#### E. 結 論

VDRにはリガンド非依存性および依存性の核移行システムが存在する。VDRのリガンド非依存性核移行はimportin-4によって担われる。ADHでは血清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る。

#### F. 研究発表

国内

口頭発表	38件
原著論文による発表 邦文は	0件
それ以外（レビュー等）の発表	15件
そのうち主なもの	

論文発表

カルシウム・リン代謝異常症 大藺恵一  
日本小児科学学会雑誌, 106 (10) : 1345-

1354, 2002

学会発表

ビタミンD受容体の核移行に関わる分子の解析

宮内芳輝、道上敏美、大藪恵一。第20回日本骨代謝学会2002.7；岡山

常染色体優性低Ca血症の3家系

平井治彦、山藤陽子、島雅昭、里村憲一、志水信彦、中島滋郎、大藪恵一。第20回日本骨代謝学会2002.7；岡山

カルシウム・リン代謝異常症. 大藪恵一. 第106回日本小児科学学術集会、教育講演：03.04.25-27, 福岡

海外

口頭発表	12件
原著論文による発表	20件
それ以外（レビュー等）の発表	0件

そのうち主なもの

論文発表

Kamao M, Tatematsu S, Hatakeyama S, Ozono K, Kubodera N, Reddy GS, Okano T. Two novel metabolic pathways of 22-

oxacalcitriol(OCT):C-25 dehydration and C-3 Epimerization, and biological activities of novel OCT metabolites. *J Biol Chem*, 278(3): 1463-1471, 2003

Kurihara N, Reddy S, Araki N, Ishizuka S, Ozono K, Cornish J, Cundy T, Singer F, Roodman D. Role of TAFII-17, a VDR binding protein, in the increased osteoclast formation in Paget's Disease. *J Bone Miner Res*, 19(7), 1154-1164, 2004

学会発表

Identification of oncogenic nucleoporin CAN/Nup214 as a regulator of vitamin D receptor-mediated transcription. Miyauchi Y, Michigami T, Ozono K. 20th Annual Meeting of American Society of Bone and Mineral Research. 2002.9;USA

### G. 知的所有権の出願・取得状況

特許取得：特になし。

実用新案登録：特になし。

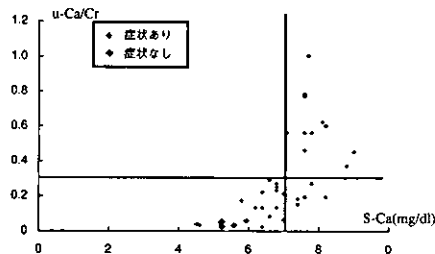
その他：特になし。

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—

➤カルシウム感知受容体異常症である常染色体優性低カルシウム血症 (ADH)は副甲状腺機能低下症類似の疾患であるが鑑別すべき疾患である。ADHの遺伝子変異解析および臨床像の解析を行い以下の結論を得た。

副甲状腺機能低下症ではビタミンD投与による血清カルシウム値の正常化が治療の基本であるのに対し、ADHでは、血清カルシウム値のコントロール範囲を6.0~7.0 mg/dlにすることが推奨される。日本小児科学会雑誌の総説などで注意を喚起している。

血清カルシウム値と尿中カルシウム/クレアチニン比  
臨床症状との関係



<難治性疾患克服事業>

カルシウム感知受容体異常症である常染色体優性低カルシウム血症(ADH)は副甲状腺機能低下症類似の疾患であるが鑑別すべき疾患である。

ADHの遺伝子変異解析および臨床像の解析を行い以下の結論を得た。

副甲状腺機能低下症ではビタミンD投与による血清カルシウム値の正常化が治療の基本であるのに対し、ADHでは、血清カルシウム値のコントロール範囲を6.0~7.0 mg/dlにすることが推奨される。日本小児科学会雑誌の総説などで注意を喚起している。

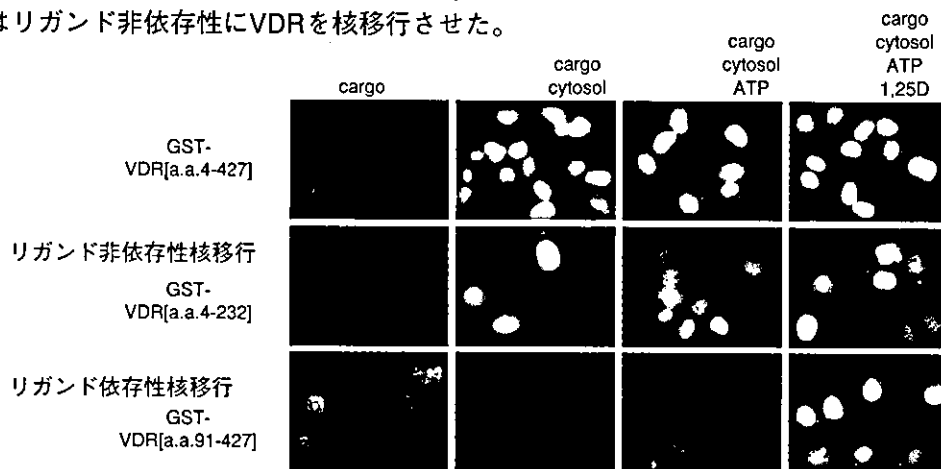
血清カルシウム維持機構—ビタミンD受容体および  
カルシウム感知受容体に関する研究—

➤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の結果、VDRの細胞内輸送に関わる可能性のある遺伝子を2つ同定した。

➤一つは核—細胞質間分子輸送を担うimportin-b familyに属するimportin-4、他方は核膜孔複合体の構成因子nucleoporinの構成分子であった。

➤in vitro nuclear transport assayを用いて、VDRにはリガンド依存性、非依存性の2つの核移行メカニズムが存在することを明確にした。

➤importin-4はリガンド非依存性にVDRを核移行させた。



In vitro nuclear transport assay

<難治性疾患克服事業>

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

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

### A. 研究目的

TSH受容体遺伝子の機能喪失型変異によるTSH不応症は常染色体劣性遺伝形式をとる疾患である。1995年に初めて報告されて以来、我々の報告した1家系を含めて現在までに15家系、計20の変異が報告されている。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。日本人におけるTSH受容体遺伝子異常症を同定し、その遺伝子型－表現型の関係を検討する。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寄せられた20家系を対象とした。インフォームドコンセントを取得した後に、TSH受容体遺伝子を解析した。遺伝子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。また、R450H変異を簡便に同定する方法を確立する。

### C. 研究結果

5例（R450H/G498S、R450H/R519C、450H/V473I、450H/R450H：2例）のTSH受容体遺伝子異常を同定したが、2学会報告

（R450H/R450H、R450H/R519G）にもR450H変異が見られ、欧米から報告されていない変異であり日本人特有と考えられた。変異受容体の機能解析では、G498S>R519G>R450Hの順に機能喪失の程度が強いことが示された。表現型の検討では、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、正所性甲状腺（一部低形成）、XP上大腿骨遠位端に骨核あり、評価時点でも成長障害は見られなかった。アレル特異的蛍光プライマーを用いたSSPCE-FCS法によるTSH受容体遺伝子解析は特異度・感度ともに良好であった。

### D. 考察

日本時におけるTSH受容体遺伝子異常症は比較的高頻度であり、R450H変異中心としたTSH受容体遺伝子解析はクレチン症の確定診断、および遺伝相談に大きく寄与すると考えられた。今後、日本人におけるR450H変異ヘテロ接合を有する頻度、ハプロタイプ解析による創始者効果などについて検討予定である。

### E. 結論

TSH受容体遺伝子R450H変異は日本人に特有な変異と考えられる。その表現型は比較的軽症の甲状腺機能低下を示し、正所性甲状腺（一部低形成）を呈した。本検討は、クレチン症の分

子生物学的分類の確立の第一歩である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Mochizuki M, et al. Association of the CTLA-4 gene 49 A/G polymorphism with type 1 diabetes and autoimmune thyroid disease in Japanese children. *Diabetes Care*. 26:843-7, 2003.

Ishii S, et al. Aberrant dynamics of histone deacetylation at the thyrotropin-releasing hormone gene in resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol*. 18:1708-20, 2004.

鬼形和道、他。高TSH血症におけるTSH受容体遺伝子解析 日本人におけるR450H変異の意義。ホルモンと臨床 51:999-1003, 2003。

鬼形和道、他。日本人に高頻度に認められるTSH受容体遺伝子機能喪失型変異(R450H)。ホルモンと臨床 52:249-252, 2004。

鬼形和道。【小児内分泌・代謝疾患の分子基盤】甲状腺 先天性甲状腺機能低下症。小児科診療 67:1631-1636, 2004。

### 2. 学会発表

Onigata K, et al. High Prevalence of R450H Thyrotropin Receptor Gene Inactivating Mutation in Japanese Cases with Resistance to Thyrotropin. 10th Internatinal Symposium on Molecular Thyroidology. Matsumoto, April, 2003.

Onigata K, et al. High Prevalence of R450H Thyrotropin Receptor Gene Inactivating Mutation in Japanese Cases with Resistance to Thyrotropin. The Endocrine Society's 85th Annual Meeting, Philadelphia, 19-22 June, 2003.

Onigata K, et al. The R450H mutation of the thyrotropin receptor gene is common in Japanese patients with resistance to thyrotropin. 75th Annual Meeting of the America Thyroid Association. West Palm Beach, 16-20 September, 2003.

Onigata K, et al. A case of congenital hypothyroidism due to ectopic thyroid gland associated with RTH (R316C). The Endocrine Society's 86th Annual Meeting. New Orleans, June, 2004.

鬼形和道、他。ミニシンポジウム クレチン症 マスクリーニングの問題点・注意点 高TSH血症におけるTSH受容体遺伝子解析 ー日本人におけるR450H変異の意義ー 第35回日本小児内分泌学会、広島、2002。

鬼形和道。高TSH血症におけるTSH受容体遺伝子解析 ー日本人におけるR450H変異の意義ー 第45回日本甲状腺学会 浜松、2002。

鬼形和道、他。クレチン症4例におけるTSH受容体遺伝子変異の同定。第106回日本小児科学会、福岡、2003。

鬼形和道。高TSH血症の鑑別診断ーTSH受容体遺伝子解析の意義ー 第46回日本甲状腺学会、名古屋、2003。

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。

常川勝彦、他。本邦におけるTSH不応症において認められた変異TSH受容体の解析。第77回日本内分泌学会、京都、2004。

鬼形和道、他。ヒトTSH受容体遺伝子異常症における骨塩量の検討。第38回日本小児内分泌学会、神戸、2004。

水野春夫、他。TSH受容体遺伝子にR450H変異ホモ接合体を認めた4例の臨床的検討。第38回

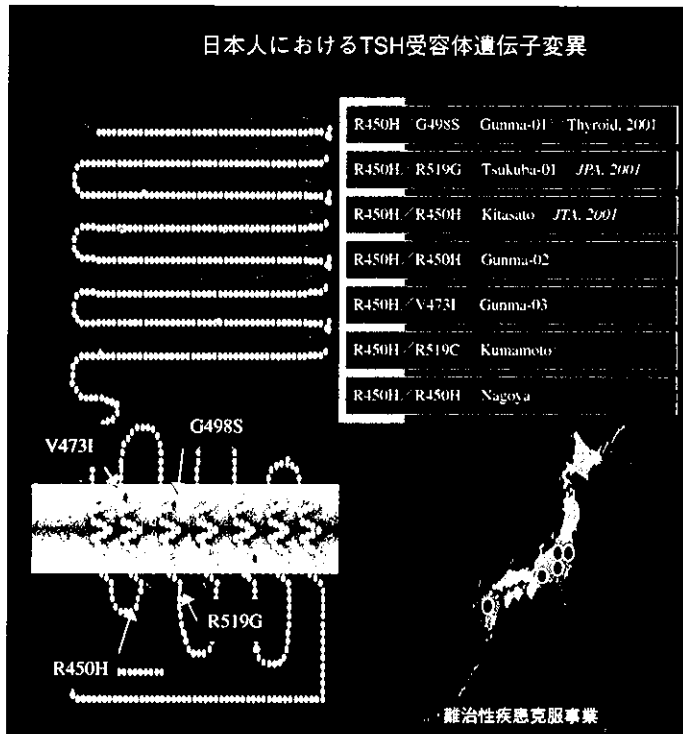
日本小児内分泌学会、神戸、2004。

請園なぎさ、他。MSで発見できなかった姉妹例を含むTSHレセプター遺伝子異常症の4例。第38回日本小児内分泌学会、神戸、2004。

鬼形和道。シンポジウム クレチン症のマススクリーニング：その到達点と今後の課題 クレチン症の遺伝学。第32回日本マススクリーニング学会、仙台、2004。

鬼形和道、他。ヒトTSH受容体遺伝子異常症における骨塩量の検討。第47回日本甲状腺学会、前橋、2004。

日本人におけるTSH受容体遺伝子変異



わが国では3家系（1論文<自験例>：R450H/G498S；群馬、2学会報告：R450H/R450H；神奈川、R450H/R519G；茨城）のTSHR遺伝子異常による不応症が報告されている。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あり、いわゆる“創始者効果”とも考えられた。また、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。変異受容体の機能解析では、G498S>R519G>R450Hの順に機能喪失の程度が強いことが示された。

遺伝子型と表現型

遺伝子型	マススクリーニング TSH(μU/ml)	TRH負荷試験 TSH(μU/ml)	ホルモン補充 (開始年齢、量)
R450H/G498S	38.2	41.3 +175.9	1ヶ月、5μg/kg
R450H/R519C	22.9	55.1	1ヶ月、2μg/kg
R450H/V473I	10.4	21.9 +117.9	3ヶ月、3μg/kg
R450H/R450H (Gunma)	12.6	17.1 +81.3	32ヶ月、5μg/kg
R450H/R450H (Nagoya)	15.0	ND	4ヶ月、5μg/kg
R450H/R450H (Kitasato)	10-30	prolonged	36ヶ月、?
R450H/R519G (Tsukuba)	26.5	ND	6ヶ月、?

(甲状腺位置、正所性、大腿骨XP遠位骨端 +)

難治性疾患克服事業

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。表現型の検討では、MS時のTSH値は12.6~38.2mU/L、治療開始月齢は1~32か月、ホルモン補充量3~5mg/体重(kg)、TRH負荷に対するTSHの過剰遅延反応、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状を認めなかった。また、いずれの症例も検討した年齢（4~15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が、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の改善が見られた。



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

## 非甲状腺細胞のサイトロロピンレセプター発現調節機構の解明

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 助教授

### A 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。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、前けい骨部粘液水腫など眼症以外の随伴症の発症にもTSHR抗体が中心的役割を果たしていることを提唱してきた。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、これら甲状腺外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り、TSHR遺伝子プロモーターの甲状腺・非甲状腺細胞での相違、調節機構の差異、および関与する転写因子の解明を目的とする。

### B 研究方法

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、その性質を明らかにする。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。

### C 研究結果及び考察

脂肪細胞では甲状腺細胞に比し、CREより3'側(-122bp~-106bp)にTSHR遺伝子発現に重要な因子が結合し、その中心配列(TTCCT)付近は細胞の分化に伴い脱メチル化され、この部位にEts familyである) GA binding proteinが結合することが確認された。さらに転写開始点に近い部位には転写抑制因子の結合が示唆され、この部位にRunt-related transcription factorの結合配列が存在することが明かとなった。またこのRunt-related transcription factorは甲状腺乳頭癌細胞で発現が亢進していることを確認できた。これらの調節因子、特にRunt-related transcription factorは骨組織の形成に重要とされ、バセドウ病でのfinger acropachyの発症と関連する可能性がある。また、これらの因子のさらなるはバセドウ病での甲状腺外症状の病態解明に重要と考えられた。

### D 評 価

#### 1) 達成度について

TSHR遺伝子プロモーター活性の検討により、甲状腺以外の細胞での新たな転写因子を特定ないし推定できたことにより、当初の目的は達成された。しかし、TSHR遺伝子プロモーター/GFP遺伝子のトランスジェニックマウスを作成し、in vivoレベルでTSHR遺伝子やこれらの転写因子の機能を解析する目的は、脂肪組織

で十分なGFP蛍光活性が得られず、不十分な結果に終わった。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

最近、TSHR遺伝子のノックアウトマウスでは骨形成不全が惹起されるとの報告がCell誌上に発表されているが、今回の我々の結果はバセドウ病でのfinger acropachyの発症のみならず、骨芽細胞でのTSHR遺伝子発現とRunt-related transcription factorの関与を示唆するものであり、骨代謝の観点よりも重要な意義があると考ええる。

#### 3) 今後の展望について、

Runt-related transcription factorは骨芽細胞、前脂肪細胞、甲状腺で発現していることより、TSHR遺伝子高発現組織に共通の転写因子である可能性があり、バセドウ病における甲状腺中毒症、甲状腺外症状の発症に重要と考えられ、この因子を介した治療の確立が望まれる。

#### 4) 研究内容の効率性について

骨芽細胞、前脂肪細胞、甲状腺で発現してTSHR遺伝子発現に関与しうる因子が推定され、バセドウ病のみならず骨粗しょう症等への効率性が期待される。

### E 結 論

甲状腺以外の細胞でのTSHR遺伝子発現に関与する転写因子を特定ないし推定した。これらの因子は骨代謝にも関与するものであり、バセドウ病での骨代謝異常、ならびに骨粗しょう症などの病態解明・治療に重要と考えられた。

### F 研究発表

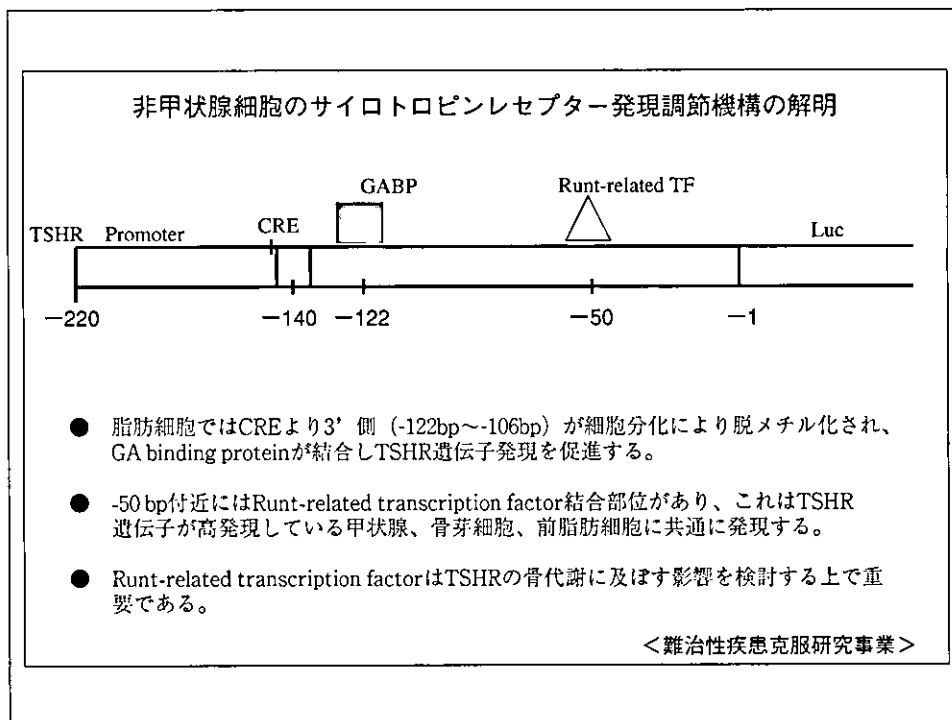
1 Furuya F, Shimura H, Suzuki H, Haraguchi K, Onaya T, Endo T, Kobayashi T. Histone deacetylase inhibitors restore radioiodide uptake and retention in poorly differentiated and anaplastic thyroid cancer cells by expression of the sodium/iodide symporter, thyroidperoxidase and thyroglobulin.

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

3 Ohta K, Endo T, Haraguchi K, Hershman JM, Onaya T. Ligands for peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  inhibit growth and induce apoptosis of human papillary thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab 86, 2170-2177, 2001

4 Kogai, K Hershman JM, Motomura K, Endo T, Onaya T, Brent GH. Differential regulation of the human sodium/iodide symporter gene promoter in papillary thyroid carcinoma cell lines and normal thyroid cells. Endocrinology 142, 3369-3379, 2001.



TSHR遺伝子の-140 bp付近にはcyclic AMP responsive element(CRE)があり、本遺伝子のkey elementである。甲状腺ではこれより上流にthyroid transcription factor (TTF-1)などが結合するが、脂肪細胞では下流にGA binding protein (GABP, □)が結合、さらに下流にはRunt-related transcription factor (△)が結合すると考えられた。

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

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

**A. 研究目的**

- 1) バセドウ病眼症の遺伝因子の解析
- 2) バセドウ病眼症の病態解析
- 3) 悪性眼球突出症の診断・治療の手引き書の作製

バセドウ病眼症はバセドウ病に高率に合併し、眼球突出、複視、視力低下などをきたし、患者のQOLを著しく損なう自己免疫疾患であり、病因・病態の解明と治療法の確立が早急に望まれている。自己抗原としてTSH受容体や1D、SDH、G2sなどの外眼筋抗原などが提唱されているが、未だ確立されていない。さらにこれらの抗原の発現調節や機能ならびに眼症発症のメカニズムもほとんど解明されていない。また眼症の自然発症動物モデルや実験的な動物モデルも確立されていない。経験的に免疫抑制剤などが治療法として選択されているが、保険適応など無く、治療効果に関するエビデンスなどの集積が必要とされている。

**B. 研究方法**

- 1) バセドウ病眼症の遺伝因子の解析

私どもはこれまでにHLA-DR、HSP-72、アポトーシス関連分子の発現、サイトカイン遺伝子の発現が病態と関連していることを報告してきた。そこで今回は、病態より推察された候補遺伝子について、case control studyを行った。具体的には、① 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、② ポーランド人と日本人における遺伝因子の比較検討、③ 重症例での検討を進めた。

- 2) バセドウ病眼症の病態の解析

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ているが、まだ自己抗原は確立していない。今回、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検討した。

- 3) 悪性眼球突出症の診断・治療の手引き書の作製

臨床的には手引き書の作製と多施設での共同研究の開始は急務である。1991年、厚生省研究班の「悪性眼球突出症マニュアル」をベースにより使いやすい診断・治療の手引き書を作製したい。

(倫理面への配慮)

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. 研究結果及び考察**

- 1) 眼症の遺伝因子の同定

TNF- $\alpha$  遺伝子のプロモーター領域の遺伝子多型が日本人およびポーランド人に共通して眼