

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

ホルモン受容機構異常に関する調査研究
平成17年度 研究報告書

主任研究者 松本 俊夫

平成 18 年 3 月

I. 序 文

序 文

このたび、「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研究班」を平成 17 年度より引き継ぐこととなりました。

長い伝統を持つこのホルモン受容機構異常に関する研究班は、ホルモン受容機構の解明や、その異常に基づく一群の難病の予防および治療のために多大な貢献をしてきました。6 年間にわたり本研究班をリードされてきた前主任研究者の清野佳紀先生から引き継ぎ新たにスタートした本研究班も、初年度の成果のまとめをするに至りました。

平成 17 年度には、偽性及び特発性甲状腺機能低下症、ビタミン D 抵抗性くる病とその類縁疾患、甲状腺ホルモン不応症、TSH 受容体異常症および受容体抗体病を主な対象疾患として、偽性副甲状腺機能低下症の効率的な遺伝子診断法の開発、PTH の新たな作用や FGF23 の各種リン代謝異常症における病態生理学的意義の解明、VDR や TR による正・負の転写調節機構や non-genomic 作用についての検討、TSH 受容体遺伝子変異の迅速解析法の確立や疾患モデル動物の導入と解析などの研究が進められ、数々の新しい成果が得られました

多くの重要な成果を出して頂いた分担研究者ならびに研究協力者各位のご協力に対し、深謝いたします。また、厚生労働省健康局疾病対策課には暖かいご指導ならびにご支援を頂きまして、感謝に堪えません。

ここに、平成 17 年度の研究報告書がまとまりました。この報告書が今後のホルモン受容機構異常に関する研究に参考となり、少しでもその発展に貢献することを心より願っております。

平成 18 年 3 月

松本 俊夫

目 次

I.	序文	
II.	平成 17 年度総括研究報告書	1
III.	平成 17 年度分担研究報告	
1.	特発性副甲状腺機能低下症の病因におけるカルシウム感知受容体の関与	5
	島根大学医学部内分泌代謝・血液腫瘍内科	杉本 利嗣
2.	偽性副甲状腺機能低下症の病因・病態・臨床像解析	8
	—methylation-specific PCR による偽性副甲状腺機能低下症 Ib の 診断とメチル化異常部位の特定—	
	千葉大学大学院医学研究院小児病態学	皆川 真規
3.	副甲状腺ホルモンの作用機序に関する研究	12
	徳島大学大学院生体情報内科学	井上 大輔
4.	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—	16
	大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学小児科学講座	大菌 恵一
5.	ビタミンD受容体を介した遺伝子発現調節機構の解明	20
	東京大学分子細胞生物学研究所	加藤 茂明
6.	リガンド特異的なビタミンD受容体活性化機構の解析	27
	日本大学医学部生化学	槇島 誠
7.	受容体依存性エンドサイトーシス異常症に おけるカルシウム・リン調節機構の解析	31
	大阪府立母子保健総合医療センター研究所	道上 敏美
8.	家族性低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病における FGF23 濃度調節機構	34
	岡山大学大学院医学系研究科小児科学	田中 弘之

9. 骨・ミネラル代謝調節機構およびその異常による疾患に関する研究	38
東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科	福本 誠二
10. TSH レセプター (TSHR) 異常症の病態に関する研究	41
—TSHR 遺伝子変異マウスを用いた検討—	
山梨大学大学院医学工学総合研究部	遠藤 登代志
11. 日本人の TSH 受容体遺伝子異常症における骨密度と骨代謝マーカーの検討	43
群馬大学大学院医学系研究科 小児生体防御学分野	鬼形 和道
12. 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	45
甲状腺ホルモン受容体による TSH α サブユニット遺伝子転写抑制機構	
浜松医科大学第二内科	中村 浩淑
13. 甲状腺ホルモン不応症 (RTH) の病態解明の研究	49
—甲状腺ホルモン不応症 (RTH) における脂質代謝異常の分子生物学的解析	
群馬大学大学院医学系研究科 病態制御内科学	森 昌朋
14. 受容体を介した甲状腺ホルモンの non-genomic action と	55
甲状腺ホルモン不応症発症機序	
名古屋大学環境医学研究所 内分泌・代謝分野	妹尾 久雄
15. バセドウ病眼症の病因・病態の解明と診断・治療法の開発に関する研究	62
—バセドウ病眼症と ICAM-1、PTPN22 遺伝子多型について—	
久留米大学医学部内分泌代謝内科	広松 雄治
16. 自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性遺伝子に関する検討	65
京都大学医学部附属病院 探索医療センター	赤水 尚史
IV. 研究成果の刊行に関する一覧	71
V. 班構成員名簿	99

II. 総括研究報告

ホルモン受容機構異常に関する調査研究

主任研究者 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 教授

研究要旨：

本研究は、ホルモン受容機構異常に起因する難病（副甲状腺関連疾患として偽性及び特発性副甲状腺機能低下症、ビタミンD抵抗性くる病とその類縁疾患、甲状腺関連疾患として甲状腺ホルモン不応症、TSH受容体異常症、バセドウ病を含むTSH受容体抗体病など）を対象に、患者実態を把握すると共に基礎・臨床両面からの研究を発展・融合させることにより原因・病態の解明、診断基準の作成、治療法の確立を行うことを目的に行われた。

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

井上 大輔

徳島大学大学院ヘルスバイオ

サイエンス研究部講師

大菌 恵一

大阪大学大学院医学系研究科教授

加藤 茂明

東京大学分子細胞生物学研究所

核内情報研究分野教授

妹尾 久雄

名古屋大学環境医学研究所

分子細胞適応部門教授

田中 弘之

岡山大学大学院医歯学総合研究科助教授

中村 浩淑

浜松医科大学第二内科教授

福本 誠二

東京大学医学部附属病院

腎臓・内分泌内科講師

皆川 真規

千葉大学大学院医学研究院助手

森 昌朋

群馬大学大学院医学系研究科教授

A. 研究目的

本研究は、副甲状腺関連疾患として偽性及び特発性副甲状腺機能低下症、ビタミンD抵抗性くる病とその類縁疾患、甲状腺関連疾患として甲状腺ホルモン不応症、TSH受容体異常症、TSH受容体抗体病（バセドウ病）などのホルモン受容機構異常に起因する難病とその関連疾患について、患者実態を把握すると共に、基礎・臨床両面からの研究を発展・融合させることにより原因・病態の解明、診断基準の作成、治療法の確立を行うことを目的に行われた。これらのホルモン受容機構異常症は、早期発見・治療により良好な予後が期待されるため、的確な診断・治療指針が求められる。またこれらの疾患病態の解明は、ホルモン作用の異常に基

づく広汎な疾患の病態解明や診断・治療法の開発にも寄与し、幅広い社会的貢献が期待し得るものと考えられる。

B. 研究方法

副甲状腺ホルモン(PTH)、活性型ビタミンD、甲状腺ホルモン、TSHなどのホルモン作用による細胞内情報伝達系の *in vitro* 解析およびこれらの受容機構異常症の疾患モデルとなる遺伝子操作動物の解析に基づき疾患病態の理解や新規治療法の開発への基盤を築くとともに、これらの情報に立脚して臨床症例の病態解析、遺伝子異常の診断法やホルモン血中濃度測定系の確立、疾患感受性遺伝子の解明などを行った。副甲状腺、甲状腺両分野における基礎・臨床面の情報の統括や臨床サンプルの共有などについての調整は主に主任研究者が行った。

C. 研究結果

1) 偽性副甲状腺機能低下症 (PHP) と関連疾患

・メチル化特異的 PCR 法を用いた PHP-Ib 型の簡便な診断法を開発し、PHP-Ib 患者における GNAS 遺伝子のメチル化異常は、一部の細胞で正常パターンのモザイク状態である可能性を明らかにした。

・特発性副甲状腺機能低下症 (IHP) 孤発例の 14 名について抗 CaSR (Ca 感知受容体) 抗体の存在を検討した結果、血中 Ca 濃度に動揺性を呈し自己免疫異常を合併した 1 例の血清中に、刺激型 CaSR 抗体を見出した。

・PTH の新たな作用として、BMP の下流転

写因子 Smad1 や Wnt シグナルの下流因子 β カテニンの活性化を明らかにした。

2) ビタミン D 抵抗性くる病 (VDDR II) およびその類縁疾患

・VDR のリガンド非依存的核移行が importin4 によることを見出した。

・XLH 患者などの FGF23 血中濃度の測定を行い、臨床的意義の解明を進めた。また高リン血症を示す tumoral calcinosis 患者において FGF23 遺伝子変異を同定し、FGF23 蛋白の翻訳後プロセスの異常により全長 FGF23 が減少してその作用が低下していることが明らかとなった。

・VDR のリガンド特異的な作用、non-genomic 作用の解析を進めた。また VDR による負の転写調節機構の解明を進め、リガンド非依的に形成される VDR/WSTF 複合体がアセチル化ヒストンに結合する過程が必須であることなどを明らかにした。

・25(OH)D の代謝調節因子メガリンの機能阻害マウスモデルを確立した。

3) TSH 受容体 (抗体) 異常症

・TSH 受容体遺伝子 R450H 変異について、マス・スクリーニングに有用な SSPCE-FCS 法による迅速解析法を確立した。

・TSH 受容体異常症 (P556L) のモデルである *hyt* マウスを導入し、褐色脂肪組織の萎縮や UCP-1 の発現低下を確認した。

・TSH 受容体異常症の患者において、骨塩量低下および骨代謝マーカーの上昇が認められることを見いだした。

・甲状腺クリーゼの診断基準作成と全国

疫学調査の準備を進めた。

・バセドウ眼症の疾患感受性遺伝子として ICAM-1, PTPN22 遺伝子多型に注目し、解析を進めた。

4) 甲状腺ホルモン不応症 (RTH)

- ・ RTH のモデル動物である変異 TR β (Δ 337T) ノックインマウスの解析によりコレステロール代謝系における変異 TR β と LXR α とのクロストークを見出した。
- ・ T3 による正負の転写制御機構を解析するための実験系を構築し、外因性に導入した Lhx3 α 、CREB, GATA2 に依存性の TSH α 遺伝子プロモーター活性が T3/TR により抑制され、その機序に GATA2 が重要な役割をもつことが示唆された。
- ・ TR β の non-genomic 作用による PI-3K \rightarrow PKB/Akt \rightarrow mTOR \rightarrow p70S6K シグナルを同定し、この作用低下が RTH の発症にも関与している可能性を示した。

D. 考察

1) 偽性副甲状腺機能低下症 (PHP) と関連疾患

PHP-1b の発症に GNAS1 遺伝子のメチル化異常が関与していることはほぼ確立されたが、その原因は多様と考えられ、一部の家族例で解明されたにすぎない。今後特に孤発例におけるメチル化異常パターンの解析を進めることにより、その原因究明に有用な情報が得られるものと考えられる。

副甲状腺機能異常症と CaSR 遺伝子異常あるいは CaSR 抗体とは密接な関係があり、今後さらに本邦における CaSR 異常症の現

状を明らかにして適切な診断基準や治療指針の策定を目指す必要がある。

2) ビタミン D 抵抗性くる病 (VDDR II) およびその類縁疾患

VDR の新たなリガンド依存的・非依存的な作用や正・負の転写調節機構が明らかになりつつあり、これらの情報は VDDR II の病態解明や新規治療法の開発に有用であると思われる。

FGF23 は XLH や TIO などにおいてその作用過剰が低リン血症をもたらすのみならず、逆に FGF23 作用の低下が高リン血症性疾患の原因となることが明らかとなった。したがって、ノックアウト動物モデルの解析結果からも支持されるように FGF23 は生理的に重要なリン利尿促進因子であることが明らかとなった。今後は様々なリン異常をきたす病態における FGF23 の意義を明らかにしていく必要がある。

3) TSH 受容体 (抗体) 異常症

TSH 受容体異常症のうち日本人に多くみられる R450H 変異のスクリーニング系は、患者実態の把握に有用であると考えられる。また動物モデルで見出された TSH の骨代謝に対する新たな作用を支持する結果が、実際の症例において初めて示された。一方 Graves 眼症は未だ有効な治療法が限られている難病であり、これに関わる疾患感受性遺伝子の同定は重要な意義を有するものと考えられる。また、甲状腺クリーゼは現在でも生命に関わる重篤な疾患であり、患者実態を把握した上

で適切な診断基準、治療指針の確立を図る必要がある。

4) 甲状腺ホルモン不応症 (RTH)

甲状腺ホルモン不応症の病態は多様であり、変異受容体 TR の機能に関する解析は十分なされていない。T3/TR による TRH/TSH 遺伝子転写抑制機構の解析や non-genomic 作用の解明は、RTH 自体の治療のみならず広く甲状腺ホルモン作用異常症の治療に貢献し得るものと考えられる。

E. 結論

副甲状腺、甲状腺機能に関わるホルモン受容体シグナルの解析とその不全状態・抵抗性病態の分子機序の解明は、様々なホルモン受容機構異常症、受容体異常症の診断・治療に有用な情報となる。遺伝子診断としての PHP におけるエピジェネティックな遺伝子異常の解析法や TSH 受容体遺伝子変異のスクリーニング法の確立、リン代謝の臨床に多大な変化をもたらし得る FGF23 の血中濃度測定法の確立とリン代謝異常症における意義の解明、疾患発症の予防や早期発見に貢献し得る Graves 病・Graves 眼症の疾患感受性遺伝子の同定、などの成果は病態の理解、診断、治療の面から直接的に日常臨床に還元し得るものと考えられる。

III. 分担研究報告

特発性副甲状腺機能低下症の病因におけるカルシウム感知受容体の関与

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 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。IHPの14名について、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遺伝子異常がIHPの病因である症例は検討し得た範囲で認めなかった。1例の血清中に抗CaSR抗体を認め、患者血清がヒト副甲状腺培養細胞のPTH分泌を抑制し、IHPの病因として刺激型抗CaSR抗体が関与する可能性が示唆されたが、他の症例には抗CaSR抗体は認めなかった。孤発性のIHPの病因として、CaSRの遺伝子異常や抗CaSR自己抗体が関与する例は、本邦ではまれと考えられた。

A. 研究目的

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、特発性副甲状腺機能低下症(IHP)の病因におけるCa感知受容体(CaSR)の関与について、CaSR遺伝子異常および抗CaSR抗体が関与するか否かを明らかにする。

B. 研究方法

病因が明らかとなっていないIHP孤発例の14名について、以下の検討を行った。

a) CaSR遺伝子異常についての検討

検討可能であった11例の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よう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) 血中Ca濃度に動揺性を認め、自己免疫疾患の合併を認める1例においてCaSR遺伝子に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。一方、IHPの他10症例では、検討し得た範囲に遺伝子異常を認めていない。

b) Western blotting法にて、CaSRに遺伝子異常を認めた症例のみに精製した患者血清でCaSRの分子量レベルにimmunoblotを認めた。しかし、他の症例にはimmunoblotを認めなかった。

c) Western blotting法にて抗CaSR抗体の存在を示唆した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。また、臨床的経過から自己免疫機序の関与が疑われるIHP2例についても同様の検討を行ったが、PTH分泌の抑制は認めなかった。

以上より、IHP弧発例の1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が、それ以外の症例では抗CaSR抗体の関与は否定的であった。

D. 考察

IHP 弧発例 11 症例について CaSR の遺伝子変異の検討を行った。1 名に遺伝子多型

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。他の 10 症例については検討し得た範囲で遺伝子変異を認めず、CaSR の遺伝子異常が IHP の病因と考えられる症例は認めなかった。欧米において CaSR の遺伝子異常が病因の孤発性低 Ca 血症例は、約 20% におよぶとされているが、本邦において IHP 孤発例のうち CaSR 遺伝子変異が病因である例は極めてまれであると考えられた。

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も CaSR に変異を認めない例が存在し、これらの病態のうちの一部は CaSR に対する自己抗体による CaSR の機能障害が考えられている。副甲状腺機能低下症症例においても、CaSR の刺激型抗体が原因である症例が報告された。今回我々は、弧発性の IHP 例につき、抗 CaSR 抗体がその病因に関わる可能性を検討した。14 例検討しそのうち 1 例のみに抗 CaSR 抗体の関与が考えられた。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が、その割合は極めてまれと考えられた。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。

E. 結論

IHP の病因の検討として、CaSR 遺伝子変異の検討と抗 CaSR 抗体の関与の検討を

IHP14名について行った。CaSR 遺伝子異常が IHP の病因である症例は検討し得た範囲で認めなかった。1 例の血清中に抗 CaSR 抗体を認め、IHP の病因として刺激型抗 CaSR 抗体が関与する可能性が示唆されたが、他の症例には抗 CaSR 抗体は認めなかった。IHP の病因として、CaSR の遺伝子異常や抗 CaSR 自己抗体が関与する例は、本邦では頻度は低いが存在し、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

なし

2. 学会発表

山内美香、山口徹、梶博史、矢野彰三、千原和夫、杉本利嗣：特発性副甲状腺機能低下症の病因の検討：カルシウム感受容体抗体の関与（第一報）．第78回日本内分泌学会学術総会（東京）2005年7月1-3日

偽性副甲状腺機能低下症の病因・病態・臨床像解析

—methylation-specific PCRによる偽性副甲状腺機能低下症 Ib の診断
とメチル化異常部位の特定—

分担研究者 皆川 真規 千葉大学大学院医学研究院小児病態学 助手

研究要旨

methylation-specific PCR法を用いたPHP-Ibの分子生物学的診断法を確立した。この方法は少量のDNAから短時間で実施可能であり、PHP-Ibの診断に有用である。また、末梢血由来のDNAを用いた場合、GNAS1遺伝子エクソン1A内はPHP-Ib特異的にメチル化DNAの消失がみられたが、上流、下流ではメチル化DNAがある程度存在しており、メチル化異常がモザイク状態になっている可能性が示された。

A. 研究目的

偽性副甲状腺機能低下症 (PHP) は古典的なホルモン不応症である。PHPは臨床的に特有の骨格徴候 (Albright hereditary osteodystrophy) を有するIa型 (PHP-Ia) と有しないIb (PHP-Ib) に分類されるが、PHP-IbにおいてGNAS1遺伝子転写調節領域のエピジェネティック異常が疾患の病因に関連していることが示されて以来、臨床的診断と病因論的診断 (分子生物学的診断) の間に乖離を認める症例のあることが明らかになってきた。PHPを正確に

(分子生物学的に) 診断することの必要性は、PHP-IaとPHP-Ibの次世代における遺伝的影響の違いにある。すなわち、PHP-Iaでは父から子に変異遺伝子が伝えられた場合に偽性偽性副甲状腺機能低下症を発症しうること、母から子に伝えられた場合、母が精神発達遅滞を伴わないPHP-Iaであっても子に精神発達遅滞を伴う可能性があることが特に重要な点である。また、PHP-Ib患者の子の発症前診断により早期治療や不必要な定期的フォローアップ検査の回避が可能となる。

PHP-Ib のエピジェネティック異常は、GNAS1 遺伝子の転写調節領域と考えられているエクソン 1A(A/B)の母性アリルにおける脱メチル化であるがこの検索方法は従来メチル化特異的サザン解析によってなされてきた。しかし、この方法は多量のゲノム DNA が必要であることおよびやや時間がかかることから、簡便な方法の開発が必要であると考えられた。Methylation-specific PCR 法 (MSP 法) は、DNA を bisulfite 処理することにより非メチル化シトシンがウラシルに変換されることを利用し、メチル化 DNA 特異的ないし非メチル化特異的な PCR プライマーを設定することにより DNA の特定の領域にメチル化 DNA あるいは非メチル化 DNA が存在するかを検出する方法である。この方法では使用する DNA の量が少なくてすむことと方法が簡便である利点がある。これまでにこの方法を用いて DNA メチル化異常症である Prader-Willi 症候群と Angelman 症候群の診断 (Kosaki K et al, Am J. Med. Genet. 73:308-313, 1997) に臨床応用がなされており、また、癌と DNA メチル化異常の関連から癌の診断法の 1 つとして気管支吸引細胞を用いた肺癌の診断 (Schmiemann V et al, Clin Cancer Res. 11(21):7728-34, 2005) などへの臨床応用が検討されている。本研究において MSP 法による PHP-Ib の DNA メチル化異常の解析方法について検討した。

B. 研究方法

【対象】日本人孤発性 PHP-Ib 14 例、常染色体優性遺伝性 PHP-Ib (*STX16* 欠失を証明したもの) 2 家系 5 例、正常コントロール 6 例を対象とした。PHP-Ib では、あらかじめメチル化特異的サザン解析によりエクソン 1A 領域の母性アリル特異的メチル化の消失を確認している。

【方法】Zymo EZ DNA methylation Kit® により末梢血由来ゲノム DNA の bisulfite 処理した後、GNAS1 エクソン 1A 内 (7) と上流域 (1), 下流域 (6) にメチル化アリル特異的プライマー (M) および非メチル化アリル特異的プライマー (U)を用いて PCR を行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

健常コントロール 6 例では (1), (7), (6) の領域いずれもですべて M と U のプライマーセットでの PCR 増幅を認めた。

(1) の領域の検討では、14 例の孤発性 PHP-Ib のうち 11 例で M の PCR 増幅

が認められなかった（メチル化 DNA の消失）が 3 例ではコントロールと同様の増幅を認めた。また、家族性 PHP-Ib のうち 1 家系では 2 例とも M の増幅がなかったのに対し、1 家系では、3 例中 1 例でコントロールには及ばないレベルであるが有意ととれる増幅を認めた。

(7) の領域の検討では、14 例の孤発性 PHP-Ib および 5 例の家族性 PHP-Ib で M の増幅が認められなかった。

(6) の領域の検討では、孤発性 PHP-Ib の半分と家族性 PHP-Ib の 1 家系 3 例でコントロールと比較して低レベルであるが増幅を認めた。

D. 考察

エクソン 1A 内にプライマーを設定することにより MSP 法で PHP-Ib 特異的にメチル化異常が判定できることが示された。エクソン 1A の上流域、下流域については（既知のゲノム異常がない）孤発性であっても *STX16* 欠失が証明されている家族性であっても症例によりレベルの違いはあれメチル化 DNA が存在することが示された。MSP 法は従来のメチル化特異的サザン解析に比べ感度が高いため、ごくわずかなメチル化 DNA でも検出するためこれらの領域にプライマーを設定することは PHP-Ib の MSP 法による診断では有用ではない。しかし、この結果から PHP-Ib のメ

チル化異常は、一部の細胞で正常パターンのモザイクを有している可能性が示唆された。従来 PHP-Ib では体細胞のすべてで同様の DNA メチル化異常があるものと信じられてきたが患者から様々な組織をサザン解析に十分な量得ることが不可能なため実証されていない。MSP 法は少量の検体由来のごく少量の DNA からでも実施できるため、生体から侵襲なく容易に採取可能な毛根、口腔粘膜、尿中落下細胞などを利用して 1 人の患者から多組織での DNA メチル化状態の違いがあるかの検討を行うことが可能となる。

E. 結論

本研究により MSP によって迅速かつ簡便に PHP-Ib の診断が可能であることが示された。また、PHP-Ib のメチル化異常は、一部の細胞で正常パターンのモザイクを有している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Minagawa M, Kazukawa I, Kinoshita K, Minamitani K, Someya T, Kohno Y.

Clinical features in epigenetically defined pseudohypoparathyroidism type Ib. Horm Res 64 (Suppl 1): 30, 2005.

Minagawa M. Pseudohypoparathyroidism. Clin Pediatr Endocrinol 14(Suppl 23): 9-16, 2005

皆川真規, 下橋京子, 佐藤裕美子. 血中ホルモン. 小児科 46 巻別冊:85-87, 2005

皆川真規, 染谷知宏. 副甲状腺機能低下症. 藤枝憲二編 成長曲線は語る. 診断と治療社, 東京, 174-175, 2005

皆川真規, 木下香. 偽性副甲状腺機能低下症. 藤枝憲二編 成長曲線は語る. 診断と治療社, 東京, 176-177, 2005

2. 学会発表

Minagawa M, Kazukawa I, Kinoshita K, Minamitani K, Someya T, Kohno Y. Clinical features in epigenetically defined pseudohypoparathyroidism type Ib. LWPES/ESPE 7th Joint Meeting Paediatric Endocrinology in collaboration with APEG, APPES, JSPE and SLEP. Lyon, Sep 21-24, 2005

Kinoshita K, Kazukawa I, Minagawa M, Kohno Y. Methylation-specific PCR for rapid molecular diagnosis of pseudohypoparathyroidism type Ib. 1st Congress of Asian Society for Pediatric

Research. Tokyo, Nov 24-26, 2005

堀尚明, 天野直子, 井ノ口美香子, 皆川真規, 長谷川奉延, 高橋孝雄. TSH およびゴナドトロピン不応を合併した偽性副甲状腺機能低下症 Ib の兄妹例. 第 108 回日本小児科学会学術集会 平成 17 年 4 月 22 日

皆川真規, 数川逸郎, 木下香, 南谷幹史, 河野陽一. 孤発性偽性副甲状腺機能低下症 Ib におけるシスエレメント欠失の検討. 第 78 回日本内分泌学会学術総会 平成 17 年 7 月 2 日

数川逸郎, 皆川真規, 木下香, 南谷幹史, 河野陽一. 孤発性偽性副甲状腺機能低下症 Ib における skewed X-inactivation. 第 78 回日本内分泌学会学術総会 平成 17 年 7 月 2 日

南谷幹史, 皆川真規, 河野陽一. PTH 不足性副甲状腺機能低下症, 癲癇と診断加療し, 3 年経過後不随意運動を呈した 6 歳女児例. 第 39 回日本小児内分泌学会 平成 17 年 10 月 22 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

副甲状腺ホルモンの作用機序に関する研究

分担研究者 井上 大輔 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 講師

研究要旨：

副甲状腺ホルモン（PTH）はGs, Gq などから複数のシグナルを介して作用を発揮するが、腎臓、骨などの古典的標的臓器においてもその生物学的効果と細胞内シグナルとの関連については不明な点が多く残されている。本研究では骨の細胞に対するPTH作用を解析し、PTHが複数の独立したシグナル経路を介してAP-1、Smad1、 β カテニンなどを活性化することを明らかにした。骨におけるPTHの時間・シグナル依存的なアナボリック作用およびカルシウム動員作用のメカニズムの解析は、骨のPTH抵抗性の機序解明や、副甲状腺機能低下症に対する新たな代替療法の開発につながるものと考えられる。

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PTHが果たすべき腎近位尿細管におけるリン再吸収抑制作用および活性型ビタミンD産生促進作用、遠位尿細管におけるカルシウム再吸収促進作用、骨からのカルシウム動員作用の低下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。

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することである。これまでの研究により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てきたが、本研究ではさらにBMP下流の転写因子であるSmad1およびWnt canonical経路の下流因子である β カテニンに対するPTH作用について検討を行った。

B. 研究方法

- 1) PTHの β カテニンに対する効果をWestern blotを用いて解析した。
- 2) β カテニン活性に対するPTHの効果をTOPFLASHを用いたreporter遺伝子解析により検討した。
- 3) FLAG-Smad1を発現するアデノウイルスベクターを用いて、Smad1の活性化に対するPTHの効果を調べた。
- 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ずに安楽死させた。

C. 研究結果及び考察

<結果>

- 1) PTHは β カテニンの総蛋白量および核内における蛋白発現量を用量・時間依存性に増加させた。
- 2) PTHの β カテニンに対する効果はマウ

ス頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞およびヒト骨芽細胞株SaOS-2で認められた。

3) PTHは β カテニンと協調的に作用するLEF/TCF転写活性を増強した。

4) PTHは単独でSmad1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。

D. 考察

以上の検討により、骨芽細胞においてPTHがERK依存性のAP-1(δ fosB)の誘導と、ERK非依存性のSmad1の活性化および β カテニンの蓄積をもたらすことが明らかとなった。これらの複数の経路の活性化とその協調的な作用がPTHの骨形成促進作用に寄与しているものと思われる。

今後、各々の活性化シグナルの詳細や相互の協調的作用を明らかにするとともに、骨吸収促進作用を媒介するRANK ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG)に対する作用との関連性と両者の時間依存性についても解析を進める必要がある。

E. 結論

PTHがERK依存性のAP-1(δ fosB)の誘導と、ERK非依存性のSmad1の活性化および β カテニンの蓄積をもたらすことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1 Ito Y, Inoue D, Kido S and Matsumoto T. c-Fos degradation by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in osteoclast