

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

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

分担研究者 田中 弘之 岡山大学大学院医学系研究科小児科学助教授

研究要旨：

家族性低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病の治療や病態に関する考え方はFGF23の発見とともに大きな変革期を迎えている。従来の治療薬である活性型ビタミンDやリンの補充がFGF23の産生に及ぼす影響をヒトXLH患者とマウス、細胞培養で検討を行った。短期的にはヒトにおいて治療量のDやリンはFGF23の血中濃度を増加させないこと、低リン状態ではFGF23産生が減少することが明らかになった。

A. 研究目的

家族性低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病（XLH）の治療は比較的大量の活性型ビタミンD製剤とリン酸塩の投与によってなされている。本疾患はPHEXの機能喪失変異によって生じるが、類似の病態を示す常染色体優性遺伝性低リン血症性くる病（ADHR）の責任遺伝子産物であるFGF23がXLHにおける低リン血症や骨石灰化障害に関与すると考えられている。FGF23に関する臨床研究の進歩に伴いリンやPTH、活性型ビタミンDがFGF23濃度を増加させることが知られるようになってきたが、そのメカニズムの詳細は明らかではない。本研究はリンやカルシウム調節ホルモンのFGF23産生調節メカニ

ズムを明らかにし、治療とFGF23濃度の関連を明らかにすることによって治療法の最適化を図ることを目的として、①未治療XLH患者における治療経過とFGF23濃度の関連を検討する②血清リン濃度によるFGF23濃度の調節を低リン血症について明らかにする。

B. 研究方法

- ① 当院および大阪厚生年金病院で乳児期より観察中のXLH患者において活性型ビタミンD治療の前後でFGF23の濃度についてC端FGF23アッセイキットを用いて検討した。
- ② 8週齢の野生型雄性C57BL/6Jマウスを低リン食（Ca0.95%、Pi0.002%）

で3日間飼育後屠殺し血清のFGF23濃度の測定を行った。ST2細胞を用いて培養液中のリン濃度とFGF23の遺伝子発現についても検討を加えた。

- ① に関しては治療の開始時に書面による同意を取得し検討を行った。②に関しては動物実験倫理指針に従った。

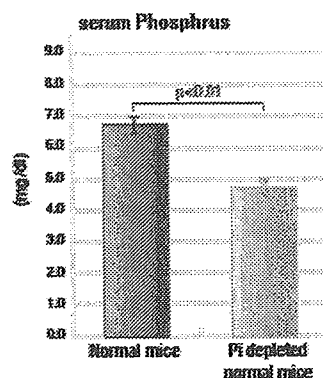
C. 研究結果

- ① 乳児未治療XLH患者に対し $1\alpha\text{OHD}$ を $1.5\mu\text{g}$ を2週間投与し前後でFGF23濃度を測定した。

	性別	年齢	FGF23	FGF23p
			Pre	ost
1	F	1y5m	185	133
2	M	5m	321	220
3	F	1y3m	325	400

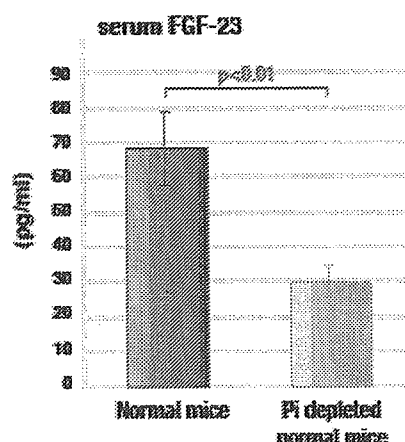
表に示すようにFGF23は未治療のXLHにおいても上昇しており、短期間のビタミンDの投与によっては上昇しなかった。同様に500mg/日のリン酸塩投与によっても明らかな上昇は認めなかった。

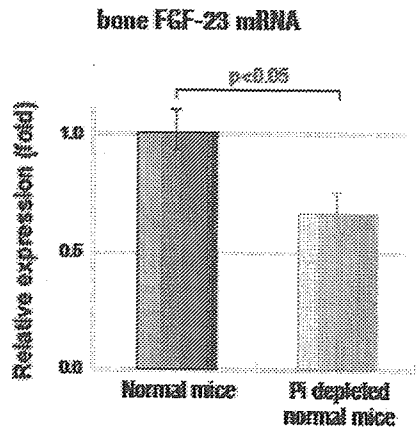
- ② 低リン血症によるFGF23産生の調節について



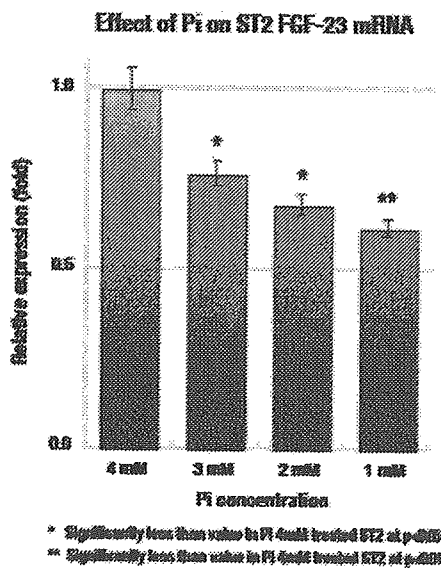
上図に示すように3日間の低リン食飼育によって血清リンの低下を認めた。

このとき血清PTH濃度は約20%低下し、腎の 1α 水酸化酵素mRNAは著しい上昇を示した。血清FGF23濃度と骨におけるFGF23mRNAの発現は下図のように低下を示した。





FGF23 を比較的コンスタントに発現する細胞である ST2 を用い培養液中の Pi 濃度を変化させ、FGF23mRNA の発現を検討したところ、下図のように in vivo と同様細胞外のリン濃度の低下に伴い遺伝子発現は低下を示した。



D. 考察

VDRKO マウスを用いた研究などより活性型ビタミン D とリンは FGF23 の正の調節

因子であることが示されている。これは、現在の XLH の治療主体である 2 薬剤が XLH のリン利尿の中心因子である FGF23 を増加させるということであり、治療によって悪化させる可能性を示唆する。しかしながら、今回のヒトにおける短期的な検討では明らかな変化は見出せず、治療によってさらに悪化する危険は少ないことが示された。

一方、マウスにおける低リンは FGF23 濃度を低下させた。低リンは本研究において示されたように強力な 1α 水酸化促進作用を示す。これによって血中の $1, 25$

(OH) $2D$ 濃度は増加するはずで、この変化は本来ならば FGF23 濃度を増加させる方向に働く。この一見矛盾した結果はビタミン D による FGF23 増加作用とリンによる作用は異なるメカニズムによって生じていると考えられる。

E. 結論

XLH 治療に用いられている 2 薬剤は短期的には FGF23 の増加を介して病態を悪化させることはない。

ビタミン D とリンは異なるメカニズムで FGF23 の遺伝子発現を制御している。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Urakami T, Manki A, Inoue T, Oda M, Tanaka H, Morishima T. Clinical significance of decreased serum concentration of cartilage oligomeric matrix protein in systemic juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol.* (in press)
- Tanaka H. New horizon of X-linked hypophosphatemia: Overview. *Clinical Pediatric Endocrinology.* (Suppl 23) 14, 17-20, 2005.
- Yamanaka Y, Tanaka H, Harada D, Ueda K, Seino Y. Development of novel therapy for achondroplasia: Use of parathyroid hormone. *Clinical Pediatric Endocrinology.* (Suppl 23) 14, 39-44, 2005.
- Harada D, Yamanaka Y, Ueda K, Shimizu J, Inoue M, Seino Y, Tanaka H. An effective case of growth hormone treatment on cartilage-hair hypoplasia. *Bone* 36(2):317-22, 2005.
- 2.学会発表
- K.Hasegawa, H. Tanaka Urinary NTX and CTx excretion in osteogenesis imperfecta: Useful marker for the prognosis 1st Congress of Asian Society for Pediatric Research, Tokyo Japan.
- Aya K, Shimizu J, Takaiwa M, Ohtomo Y, Satomura K, Suzuki H, Yan K, Sado Y, Morishima T, Tanaka H. Genetic and histological analysis of Japanese patients with congenital Nephrotic syndrome of the finnish type. *American Society of Nephrology Renal Week* 2005. Pennsylvania, U.S.A, 2005.
- N.Namba, K. Takahashi, E. Ogura, M. Kawai, S. Kogaki, H. Tanaka, K. Ozono SHP2 Mutations that Cause Noonan Syndrome May Lead to Disorganized Chondrogenesis. 27th Annual Meeting American Society for Bone and Mineral Research, Nashville, USA 2005
- M. Takaiwa, B. Yuan, H. Tanaka, R. Kumar, M. K. Drezner Phosphate Depletion and Hypophosphatemia Directly Regulate FGF-23 Expression. 27th Annual Meeting American Society for Bone and Mineral Research, Nashville, USA 2005
- K. Hasegawa, Y. Seino, S. Kato, H. Tanaka 1,25(OH)2D3 Regulates vascular invasion in long bone development during embryonal period. 27th Annual Meeting American Society for Bone and Mineral Research, Nashville, USA 2005
- Hasegawa K, Seino Y, Kato S, Tanaka H. 1,25(OH)2D3 regulates vascular invasion in long bone development during embryonal period. *European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE)- Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society (LWPES) 7th Joint Meeting Paediatric Endocrinology, Lyon, France, 2005.*
- Aya K, Iwamuro M, Miyai T, Takaiwa M, Morishima T, Tanaka H. 2-year old boy with idiopathic crescentic nephritis. *Japan-Korea The 3rd Pediatric Nephrology Seminar, 2005, Tokyo.*

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・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

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：

Fibroblast growth factor (FGF)23 は、低リン血症を特徴とする疾患の原因因子として同定された。FGF23 蛋白は一部が翻訳後プロセッシングを受け、N 端側と C 端側のフラグメントに分解される。これらの FGF23 フラグメントには活性はなく、全長 FGF23 のみが低リン血症を惹起することが明らかにされている。一方 FGF23 ノックアウトマウスは高リン血症を示すことから、FGF23 は生理的にも血中リン濃度調節に関与している可能性がある。そこで遺伝的に高リン血症を示す tumoral calcinosis 患者の FGF23 遺伝子を検討し、FGF23 遺伝子変異を同定した。In vitro の実験から、この変異 FGF23 蛋白は翻訳後のプロセッシングを受けやすいことが示された。このため本症患者では、全長 FGF23 が血中にほとんど存在せず、FGF23 作用が障害されるものと考えられた。これらの成績は、低リン血症くる病/骨軟化症に加え、高リン血症性疾患の発症にも 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、いずれも腎近位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。一方 FGF23 ノックアウトマウスは高リン血症を示すことから、FGF23 は生理的なリン濃度調節にも関与している可能性がある。しかし、高リン血症性疾患の発症における FGF23 の関与は不明である。そこで本研究では、遺伝性高リン血症性疾患と FGF23 作用の関連を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

高リン血症を示す tumoral calcinosis 患者の FGF23 遺伝子 DNA 配列を決定すると共に、変異 FGF23 蛋白を *in vitro* で発現させ、ウェスタンブロットにより検討した。

(倫理面への配慮) 当研究は、当該施設の倫理委員会の承認を受け、対象者の同意を得た上で行った。

C. 研究結果

検討した tumoral calcinosis 患者は、FGF23 遺伝子変異のホモ接合体であることが明らかとなった。一方 FGF23 蛋白は、一部が翻訳後プロセッシングを受け、N 端側と C 端側のフラグメントに分解される。これらの FGF23 フラグメントには活性はなく、全長 FGF23 のみが低リン血症を惹起することが明らかにされている。本変異蛋白を *in vitro* で発現させる実験から、変異 FGF23 蛋白は翻訳後のプロセッシングを受けやすいことが示された。実際 FGF23 濃度の測定により、患者血中には、プロセッシングを受けていない全長 FGF23 はほとんど存在しないことが明らかとなった。

D. 考察

FGF23 は、低リン血症性疾患の惹起因子として同定され、実際 *in vivo* で低リン血症惹起作用を有することが明らかにされていた。一方本研究により、FGF23 蛋白の翻訳後修飾の異常により FGF23 活

性が障害され、高リン血症が惹起されることが明らかとなった。このことは、FGF23 がヒトにおいても生理的な血中リン濃度調節因子であることを示している。ただし、FGF23 遺伝子変異が、どのような機序により FGF23 蛋白の翻訳後修飾に影響するかについては、現状では不明である。今後、FGF23 蛋白のプロセッシングの機序、およびその調節機構につき、さらに検討を進める必要がある。

E. 結論

低リン血症くる病/骨軟化症に加え、高リン血症性疾患の発症にも 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) Araya K et al.: A novel mutation in fibroblast growth factor (FGF) 23 gene as a cause of tumoral calcinosis. *J Clin Endocrinol Metab* 90(10): 5523-5527, 2005

2) Fukumoto S: Posttranslational modification of fibroblast growth factor (FGF)-23. *Ther Apher Dial* 9(4): 319-332, 2005

3) Ito N et al.: Comparison of two assays for fibroblast growth factor (FGF)-23. *J Bone Miner Metab* 23(6):

435-440, 2005

4) Yamashita H et al. : Fibroblast growth factor (FGF)-23 in patients with Graves' disease before and after antithyroid therapy: Its important role in serum phosphate regulation. J Clin Endocrinol Metab 90(7) : 4211-4215, 2005

2nd Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and Mineral Society (Geneva, Switzerland) Bone 36(S2) : S229-S230, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

2. 学会発表

1) Fukumoto S et al. : Comparison of two assays for fibroblast growth factor-23.

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 (TSHR) 異常症の病態に関する研究
-TSHR 遺伝子変異マウスを用いた検討-

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

研究要旨：

TSHR は甲状腺以外の組織にも発現しているがその機能は不明の点が多い。C. RF-Tshr^{hyt/hy} (hyt) マウスは TSHR に遺伝子変異を有する甲状腺機能低下症モデルであり、ヒト TSHR 異常症と類似する。hyt マウスの甲状腺は低形成で褐色脂肪組織の発達は悪く UCP-1 の発現も極めて低値である。このため 4℃環境下で直腸温は 24℃まで低下する。一方、腎臓の形成は wild タイプと差を認めないが脾臓は褐色脂肪組織と同様の形成不全が認められた。これらが低 T3 によるものか TSH 異常に起因するかを今後検討することによりヒト TSHR 異常症の適切な治療に寄与しうる。

A 研究目的

ヒト TSHR 異常症では潜在性ないし顕性に甲状腺機能低下症が発症し通常甲状腺ホルモン製剤により治療されるが、TSHR は甲状腺以外に脂肪組織などにも発現しており、甲状腺機能を保つのみでは補正されない機能が存在する可能性がある。C. RF-Tshr^{hyt/hy} マウスは TSHR に遺伝子変異を有する甲状腺機能低下症発症モデルであり、今回本モデルマウスの病態を詳細に検討しヒト TSHR 異常症の適切な治療法の確立を目的とする。

B 研究方法

C. RF-Tshr^{hyt/-} マウスは Jackson laboratory より入手し、これらヘテロマウスの交配により Tshr^{hyt/hy} (ホモマウス) を作成した。TSHR の genotype は tail

DNA の PCR 産物の direct sequencing によりコドン 556 が CCG か CTG かを決定した。褐色脂肪組織の uncoupling protein (UCP)-1 は抗 UCP-1 抗体 (Sigma-Aldrich 社) を用いて免疫染色にて行った。FT3, FT4 の測定はロッシュダイアグノスティック社 ECLusis system により測定した。

C 研究結果

① Tshr^{hyt/hy} (ホモマウス) は甲状腺の形成不全があり肉眼的にその存在を確認することはできなかった。ホモマウスの血中 freeT4 は 0.10 ± 0.04 ng/dl (n=6)。一方、wild タイプは 1.47 ± 0.24 ng/dl (n=7) であり極めて重篤な甲状腺機能低下症を発症する。

ng/dl (n=7)であり極めて重篤な甲状腺機能低下症を発症する。

- ② Tshr^{hyt/hy} (ホモマウス) の褐色脂肪組織は委縮性であり、細胞内に脂肪滴の貯留をほとんど認めない。また細胞内にUCP-1免疫活性もほとんど確認されない。褐色脂肪組織重量/体重 $\times 10^3$ はwildタイプで 6.71 ± 0.4 , ホモタイプで 3.30 ± 1.0 であった。
- ③ Tshr^{hyt/hy} (ホモマウス) を4℃環境下に置くと90分後の直腸温は 24 ± 0.9 ℃, wildタイプは 36.5 ± 1.0 ℃であり、ホモマウスでは一部死亡例が認められた。
- ④ 褐色脂肪組織と同様なホモマウスで委縮を認めた臓器は膵臓であり、腎臓などはhytとwildで差異を認めなかった。

D 考案

Tshr^{hyt/hy} (ホモマウス) は甲状腺形成不全、低T4血症など重症型ヒトTSHR異常症に極めて類似する。甲状腺ホルモンの補充なしに成長させることは困難とされたが、今回補充なしに飼育が可能であることが判明し、本症の甲状腺機能低下症の病態が継続的に観察可能である。

Tshr^{hyt/hy} マウスの褐色脂肪組織は委縮し、UCP-1の発現も低下しているため、極めて容易に低体温症に移行する。この主な原因は低T4血症によるUCP-1発現抑制と考えられるが、褐色脂肪組織のTSHRがこれにどの様に関与しているかが今後の課題であり、に褐色脂肪組織特異的にTSHRの遺伝子導入動物の作成等により判明しうるものと考えられる。

E 結論

TSHR遺伝子変異マウスである は

UCP-1発現抑制を認め甲状腺、褐色脂肪組織、膵臓の形成不全が生ずる。これらの成因が低T3・T4によるものかTSHRがどの程度関与するかの検討が今後の課題である。

G 研究発表

I Tamaoki T, Tezuka H, Okada Y, Ito S, Shimura H, Sakamoto M, Endo T, Ozaki Y, Kanba S, Maeda S. Avoiding the effect of linked genes is crucial to elucidate the role of Apcs in autoimmunity. Nat Med. 2005;11-2

2 バセドウ病 臨床分子内分泌学 3 11
6-121, 日本臨床 63巻: 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

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

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：

甲状腺疾患と骨塩量の関係について様々な報告があるが、甲状腺ホルモン値と骨塩量との関連に一定の見解はない。甲状腺ホルモン受容体ノックアウトマウスの検討では、骨成熟は遅延するが骨塩量には関係ないとされる。2003年に TSH 受容体ノックアウトマウスにおいて骨塩量の低下が報告され、甲状腺ホルモン補充後も骨塩量の改善が見られないことから TSH が骨代謝に直接的に関与することが示された。今回、ヒトの TSH 受容体遺伝子異常症における骨塩量と骨代謝マーカーを測定し、ヒトにおける TSH と骨代謝の関係について検討した。R450H/R519C 変異を有する3例（男児 0.58 g/cm²、女児 0.79 g/cm²）、および R450H/G498S 変異1例（女児 0.50 g/cm²）において骨塩量の低下を認めた。変異 TSH 受容体の機能解析では、G498S > R519C > R450H の順に機能喪失の程度が強いことが証明されている。また、osteocalcin 値は 28.7～53.5 ng/ml と高値を示し、血中 BAP および NTX 値も基準値を上回っていた。ヒトにおいても TSH が骨代謝に関与することが示唆された。

A. 研究目的

甲状腺疾患における骨塩量について多くの検討がなされているが、甲状腺ホルモン値と骨塩量との関連に一定の見解は出していない。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も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。ヒトにおける TSH と骨代謝の関連を明らかにするために、TSH 受容体遺伝子異常症における骨塩量と骨

代謝マーカーを測定した。

B. 研究方法

ヒト TSH 受容体遺伝子異常症 8 例（R450H/R519C；3例、R450H/G498S；2例、R450H/R450H；3例：8～17歳）の骨塩量、および4例（R450H/G498S；2例、R450H/V473I：1例、R450H/R450H；1例：8～17歳）骨代謝マーカーを測定した。QDR4500による第2～4腰椎の骨塩量（g/cm²）を評価し、日本人小児の標準骨塩量曲線と比較した。骨代謝マーカー

として、血清 **osteocalcin** (mg/ml), 血清骨型アルカリフォスファターゼ: **BAP** (U/L), および血清 **NTX** (nmol BCE/L)を測定し、小児の基準値と比較した。さらに、甲状腺ホルモン不応症 (甲状腺ホルモン受容体異常症) 2 名の骨塩量を測定し、**TSH** 受容体遺伝子異常症の測定値と比較検討した。以上の検討は、本人あるいは保護者のインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

R450H/R519C 変異を有する 3 例 (男児 0.58 g/cm², 女児 0.79 g/cm²), および **R450H/G498S** 変異 1 例 (女児 0.50 g/cm²) において骨塩量の低下を認めたが、**R450H/R450H** を有する 3 例の骨塩量は基準値内であった。なお、甲状腺ホルモン不応症の 2 例の骨塩量は標準値を示した。血清 **osteocalcin** 値は 28.7~53.5 ng/ml と高値を示したが、**R450H/G498S** 変異症例に顕著であった。血中 **BAP** (120~280 U/L) および **NTX** (40~80 nmol BCE/L) も基準値を上回っていたが、思春期症例に顕著であった。

D. 考察

変異 **TSH** 受容体の機能解析では、**G498S** > **R519C** > **R450H** の順に機能喪失の程度が強いことが証明されている。今回、この機能喪失の程度の強い変異 **TSH** 受容体を有する個体において、骨塩量が低く、また骨代謝マーカーの高値が認められた。対象が最終身長に達しておらず、成人に達した段階での再評価が重要である。

E. 結論

ヒトの **TSH** 受容体遺伝子異常症において、骨塩量低下と骨代謝マーカー上昇が見られた。この傾向は機能解析における機能喪失程度との関連を示唆した。日本人に高頻度の **R450H** 変異症例の検討は、日本人の骨塩量低下の原因と治療に繋がると考えられる。

F. 研究発表 (学会発表)

TSH receptor gene mutations in hyperthyrotropinemia and congenital hypothyroidism. The Endocrine Society's 87th Annual Meeting. San Diego, USA, 2005.

シンポジウム 「骨疾患研究の新たな展開-動物病態モデルから臨床応用へ」 甲状腺刺激ホルモン (**TSH**) と骨代謝—**TSH** 受容体ノックアウトマウスとヒト **TSH** 受容体遺伝子異常症— 第 23 回日本骨代謝学会 大阪, 2005.

Bone mineral density in human cases with TSH receptor gene mutations. ESPE-LWPES 7th joint meeting. Lyon, France, 2005.

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：
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

分担研究者 中村浩淑 浜松医科大学第二内科 教授

研究要旨：

甲状腺ホルモン作用機構異常で生じる甲状腺ホルモン不応症は、甲状腺ホルモン受容体 (TR) 異常が見出せない症例もかなりあり、発症機序や病態について未だ不明な点が多い。病態の中心をなすのは不適切 TSH 分泌 (SITSH) であるが、この分子生物学的機構は未解決である。これを解明するため、TR による T3 依存性の TSH 遺伝子転写抑制機序を追求している。遺伝子発現実験に適した CV1 細胞に、TSH 産生下垂体細胞の分化に必須の転写因子、Pit1 および GATA2 を発現させることにより、T3/TR による TSH β 遺伝子プロモーター転写抑制を高感度に観察できる系を開発した。多くの実験結果から TSH β 遺伝子の抑制機序に関して次のモデルを考えている。TSH β 遺伝子の活性化因子は GATA2 で、活性化に TRAP220 複合体が重要な役割を果たしている。TR $\beta 2$ に T3 が結合すると、HDAC3 が呼び込まれてヒストンの脱アセチルが生じ、クロマチン構造が変化して TRAP220 が GATA2 から解離し転写が抑制される。

今回は TSH α サブユニット遺伝子に対する T3/TR の抑制機序を検討した。CV1 細胞に Ptx1、Lhx3 α 、CREB、GATA2 を導入することで、TSH α プロモーター活性を発現することが出来た。それぞれの転写因子はプロモーター活性を刺激するが、T3/TR によって抑制されるは GATA2 のみであり、この抑制は TSH α プロモーターにおける GATA2 結合部位を欠失させると消失した。TR はプロモーターに直接結合せず、既報の nTRE は関係しなかった。TSH α と β は類似の機構で T3/TR の抑制を受けると考えられた。

A. 研究目的

A. 研究目的

甲状腺ホルモン不応症の最も中心的な病態である不適切 TSH 分泌状態 (SITSH) の機序を解明するために、T3/TR による TSH

β 遺伝子および TSH α サブユニット遺伝子の転写抑制機構を明らかにする。これまで研究が非常に困難であった理由の一つが、TSH 遺伝子活性の抑制を十分観察できる適切な細胞系がないことであった。

遺伝子実験に適したサル腎臓由来 CV1 細胞に、下垂体特異的転写因子を発現させることで、TSH 遺伝子発現を高感度で測定できる系を確立した。この系で、今回は TSH α サブユニット遺伝子の転写抑制機構につき検討した。

B. 研究方法

CV1 細胞に Ptx1、Lhx3 α 、CREB、GATA2、レポーター遺伝子、受容体の各発現プラスミドを導入し、リガンド添加後 24 時間培養し CAT 活性を測定した。種々の変異を導入したレポーター遺伝子、TR などを用いた。

(倫理面への配慮) In vitro の実験であり、倫理面では問題がない。

C. 研究結果

CV1 細胞に Ptx1、Lhx3 α 、CREB、GATA2 を導入することで、TSH α サブユニット遺伝子活性を発現させることが出来た。Ptx1、Lhx3 α も用量依存性に活性を刺激したが、T3/TR によって影響されず、GATA2 による活性化のみが明らかな抑制を受けた。各核内受容体のなかで、抑制効果を発揮したのは TR のみであった。TSH α サブユニット遺伝子活性は cAMP により刺激されるが、T3/TR は CREB/forskolin による転写活性を抑制しなかった。このことから、TSH α サブユニット遺伝子においても、T3/TR によるネガティブフィードバック機構に関与するのは GATA2 であると考えられた。TSH α サブユニットプロモータ

一上の GATA2 結合部位に変異を導入したところ、T3/TR による抑制が消失し、GATA2 の重要性が確認された。さらに、これまで TR が結合し転写抑制に必須の部位として 2 個所の nTRE がプロモーター上で想定されていたが、これらを欠失させても T3/TR による転写抑制は完全に保たれ、従来考えられていた nTRE は不必要であることが明らかとなった。

D. 考察

これまで T3/TR による TSH β 遺伝子抑制機構に関しては以下の成績を得ている。①TSH 制御の主体な受容体は TR $\beta 2$ である。②TSH β 遺伝子のプロモーター領域において、従来重要とされていた領域は必要ではない。③TR の DNA 結合領域は GATA2-Znフィンガー領域と T3 非依存性に結合する。④T3 が TR に結合するとすみやかにヒストンの脱アセチル化が生じる。⑤TRAP220 が T3/TR による転写抑制に重要な働きをしている。⑥GATA2 結合領域に隣接する約 30 塩基配列になんらかの抑制蛋白が結合する。Pit 1 はこの抑制蛋白の作用を解除している。

今回の TSH α サブユニット遺伝子に対する作用機構も、TSH β 遺伝子に対する作用と多くの点で共通しており、基本的な作用機構は同じであろうと考えられる。したがって次のようなモデルが立てられるであろう。TSH 遺伝子制御にもっとも主要な TR は TR $\beta 2$ であり、TR $\beta 2$ は TSH β および α 遺伝子の活性化因子である

GATA2 と関連している。T3 が TR に結合すると、HDAC 3 が呼び込まれてヒストンの脱アセチルが起こる。クロマチン構造の変化が生じ、GATA2 の活性化に重要な働きをなしている TRAP220 が GATA2 から解離し、転写活性が抑制される。

E. 結論

TSH 遺伝子の転写活性因子は GATA2 であり、TR は T3 依存性にヒストンの脱アセチル化を起こし、TRAP 複合体を解離して、GATA2 の転写促進作用を阻害する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Honjo Y, Sasaki S, Kobayashi Y, Misawa H, Nakamura H: 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its receptor inhibit the chenodeoxycholic acid-dependent transactivation by farnesoid X receptor, FXR
J Endocrinol in press.

中村浩淑：甲状腺ホルモンシステムの発見と意義. 日本臨床 臨床分子内分泌学 3 63(増刊号): 11-15, 2005.

佐々木茂和、中村浩淑：甲状腺ホルモン受容体とシグナル伝達. 日本臨床 臨床

分子内分泌学 3 63(増刊号):41-51, 2005

松下明生、中村浩淑：甲状腺ホルモン不応症. 日本臨床 臨床分子内分泌学 3 63(増刊号):99-104, 2005

2. 学会発表

Negative regulation of TSH β gene by T3 and thyroid hormone receptor. (Nakamura H & Sasaki S) 13th International Thyroid Congress. (Buenos Aires, Argentina) 2005 年 11 月

The negative regulation of thyrotropin promoters by thyroid hormone and its receptors. (Sasaki S & Nakamura H) International Workshop on Resistance to Thyroid hormone. (Lyon, France) 2005 年 9 月

エストロゲンおよびその受容体による TSH β 鎖プロモーターへの負の調節 (長山浩士、中村浩淑 他) 第 77 回日本内分泌学会総会 2005 年 7 月 (日本内分泌学会雑誌 81 (1): 92, 2005 Abst #10)

TRH ならびに TPA は GATA2 の Zn フィンガー領域を介し TSH α 、 β 鎖の転写活性を刺激する. (佐々木茂和、中村浩淑 他) 第 77 回日本内分泌学会総会 2005 年 7 月 (日本内分泌学会雑誌 81 (1): 170,

2005 Abst #P274)

TSH β 鎖遺伝子の転写制御における GATA2 の機能. (柏原裕美子、中村浩淑 他) 第 77 回日本内分泌学会総会 2005 年 7 月 (日本内分泌学会雑誌 81 (1): 170, 2005 Abst #P275)

ホタルルシフェラーゼ遺伝子における甲状腺ホルモン依存性「負の調節」媒介領域の同定. (三澤啓子、中村浩淑 他) 第 77 回日本内分泌学会総会 2005 年 7 月 (日本内分泌学会雑誌 81 (1): 170, 2005 Abst #P276)

TSH β 鎖遺伝子の転写制御機構に関する検討. (松下明生、中村浩淑 他) 第 48 回日本甲状腺学会総会 2005 年 11 月 (日本内分泌学会雑誌 81 (2): 313, 2005 Abst #04)

TSH β 鎖遺伝子発現における Pit1-GATA2 相互作用の分子メカニズム. (柏原裕美子、中村浩淑 他) 第 48 回日本甲状腺学会総会 2005 年 11 月 (日本内分泌学会雑誌 81 (2): 311, 2005 Abst #Y1A1)

3,5,3'-triiodothyroacetic acid 治療を行った、新規甲状腺ホルモン受容体 β 鎖遺伝子に異常による甲状腺ホルモン不応症の一家系. 日本甲状腺学会総会. 2005. 11. (大場健司、中村浩淑 他) 第 48 回日本甲状腺学会総会 2005 年 11 月 (日本内分

泌学会雑誌 81 (2): 311, 2005 Abst #T06)

エストロゲンおよびその受容体による TSH β 鎖プロモーターへの負の調節 (長山浩士、中村浩淑 他) 第 48 回日本甲状腺学会総会 2005 年 11 月 (日本内分泌学会雑誌 81 (2): 320, 2005 Abst #P04)

甲状腺ホルモン不応症の 2 家系から同定した甲状腺ホルモン受容体 β コドン 453 における異なるアミノ酸変異の検討. (三澤啓子、中村浩淑 他) 第 48 回日本甲状腺学会総会 2005 年 11 月 (日本内分泌学会雑誌 81 (2): 336, 2005 Abst #P99)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

甲状腺ホルモン不応症（RTH）の病態解明の研究-

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

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 教授

研究要旨：

これまで私達は、RTHの病態解明を目的として、甲状腺ホルモン受容体（TR）によるTRH遺伝子のネガティブフィードバック調節分子機構の解析を*in vitro*で行ってきた。その中でRTHの病態の本態が変異TRによるヒストン修飾異常にあることを明らかにし、さらにTRによるTRH遺伝子の転写抑制に転写因子LBP-1cとヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)2ならびに3が関与することを報告した。RTH患者にはこれまで様々なTR β の変異が同定されているが、我々は最近TR β 変異を生理的に発現するTR β (Δ 337T) ノックイン(KI)マウスの樹立に成功した。高コレステロール(CH)血症は甲状腺機能低下症及びRTHに共通する代表的な臨床所見であるが、その病態へのTRの分子生物学的作用は未だ明確ではない。本年度はこのRTHのモデルマウスであるTRKIマウスのCH代謝異常について解析を行った。TRKIマウスはCHの胆汁排出の律速酵素であるCYP7A1のmRNA発現が増加しているため、CH負荷後も高CH血症を示さないことが明らかになった。さらにCYP7A1遺伝子プロモーター上のDR4配列上でTR β とLiver X receptor(LXR α)が競合してRXR α とヘテロダイマー形成を行うことが判明し、TR β Δ 337T変異体はRXR α とのヘテロダイマー形成能が障害されているため、TRKIマウスではRXR α -LXR α ヘテロダイマー形成が促進されることでCH負荷後にCYP7A1のmRNA発現が増加すると考えられた。本研究によりCH代謝における*in vivo*でのTR β 変異体とLXR α のクロストークが初めて示された。このようにRTHのモデルマウスの解析はRTHの分子病態の解明のみならず、甲状腺ホルモンおよびその受容体の新たな機能を見だし、今後のホルモン受容体機構異常の治療に大きく貢献するものと考えられる。

A. 研究目的

高コレステロール血症は甲状腺機能低下症および甲状腺ホルモン不応症（RTH）に

共通する代表的な臨床所見であるが、その病態への甲状腺ホルモン受容体（TR）とくにリガンド非結合性のTRの分子生物

の病態への甲状腺ホルモン受容体 (TR) とくにリガンド非結合性の TR の分子生物学的作用は未だ明確ではない。我々は近年 TR β に Δ 337T 変異を持ちリガンド非結合性の TR β を生理的に発現する RTH のモデル動物を樹立した (Hashimoto K, et al PNAS. 2001)。本研究では TR β Δ 337T ノックイン (KI) マウスのコレステロール代謝について検討し、肝臓に於けるコレステロール代謝関連遺伝子の発現を解析することにより甲状腺機能低下症と RTH との分子病態の変動を解明する。

B. 研究方法

まず KI マウスで認められる血中甲状腺ホルモン高値を是正するために野生型及び KI マウスを MMI/PTU によって hypothyroid とした。その上で、(1) 通常食を与えた群、(2) 2%コレステロール食を与えた群、(3) T3 投与で euthyroid として通常食を与えた群、(4) 2%コレステロール食のみを与えた群の 4 群を作成し、血中総コレステロール、肝臓内コレステロール、胆汁酸プールを測定し、肝組織の CYP7A1, HMGCoA reductase (HMGCoAr)、LDL receptor (LDL-R)、Liver X receptor (LXR) α , 5' deiodinase (5' DI) mRNA 発現を Northern blotting で解析した。さらにマウス CYP7A1 遺伝子プロモーターをサブクローニングし (-601nt 上流まで) pGL3 Luc ベクターに組み込み、肝細胞由来の HepG2 細胞に LXR α 、TR β 、TR β Δ 337T と共導入した。

その上で TR β と LXR α に共通の結合配列である Direct repeat (DR)4 配列を持つ CYP7A1 プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにより検討した。DR4 配列上での変異 TR β および LXR α と RXR α との結合能を EMSA (ゲルシフト) 法にて解析した。さらにコレステロール負荷した野生型および KI マウスの肝組織を用いた *in vivo* クロマチン免疫沈降法 (ChIP) を行い、内因性の CYP7A1 プロモーターの DR4 配列上での変異 TR β および LXR α の作用を検討した。

(倫理面への配慮)

全ての研究は、組み換え DNA 実験に関する指針に則って、当学倫理委員会にて承認を得た上で遂行した。

C. 研究結果

(1) MMI/PTU によって hypothyroid とした状態もしくは T3 投与で euthyroid とした状態では野生型と KI マウス間で血中総コレステロールに有意な差は認められなかった。しかし興味深いことにコレステロールを与えた群では血中、肝臓内コレステロールともに野生型より、ヘテロ体、さらにホモ体と減少した。一方胆汁酸プールは、コレステロール負荷後、野生型より、ヘテロ体、さらにホモ体と有意に増加した。(2) CYP7A1 遺伝子発現は KI マウスにおいてコレステロール負荷により強く誘導されたが、その発現は野生型より、ヘテロ体、さらにホモ体と有意に増加した。(3) HMGCoAr, LDL-R 遺伝子発現

ほどの群においても、野生型より、ヘテロ体、さらにホモ体と増加し、KI マウスにおいて拮抗的状况にあることが判明した。LXR α 遺伝子発現は、hypothyroid ならびに euthyroid では genotype 間の差異を認めず、その発現に甲状腺ホルモンが影響していることが示唆された。興味深いことにコレステロール投与は LXR α 遺伝子発現を誘導しなかった。(4) 5' DI 遺伝子発現は T3 投与により野生型では誘導されたが、KI マウスでは殆ど誘導されず、同マウスの末梢での甲状腺ホルモンの作用低下を示唆した。またコレステロール負荷は野生型、KI マウスともに 5' DI 遺伝子発現に影響を与えなかった。(5) ルシフェラーゼアッセイでは、LXR α を HepG2 細胞に導入し、オキシステロールを添加すると CYP7A1 遺伝子プロモーター活性は著明に増加した。しかしその活性化は、野生型 TR β の導入量に依存的に減弱し、同プロモーター上での TR β は LXR α の競合的阻害を示唆した。一方変異 TR β の導入は CYP7A1 遺伝子プロモーター活性を阻害しなかった。(6) EMSA 法では DR+4 配列上、野生型 TR β は LXR α に比して RXR α との結合が強いが、変異 TR β は著しく弱く、変異 TR β 存在下では LXR α -RXR α ヘテロダイマーが形成された。(7) *in vivo* ChIP 法では CYP7A1 遺伝子プロモーター上の DR+4 配列に関与する TR β は野生型に比して KI マウスのヘテロ体、さらにホモ体にて減少し、LXR α は野生型に比して KI マウスのヘテロ体、さらにホモ体

において増加した。RXR α の関与は genotype 間で差異を認めなかった。

D. 考察

今回のモデルマウスの解析により、KI マウスは食餌性コレステロールに抵抗性を示すことが判明した。この paradoxical な現象はコレステロール負荷下の KI マウスにおける CYP7A1 の遺伝子発現増加に因るものと考えられた。CYP7A1 遺伝子プロモーター上の DR+4 配列上では通常 TR β と LXR α は競合的に作用することが判明した。一方 KI マウスでは、TR β 変異のため、同遺伝子プロモーター上の DR+4 配列に LXR α -RXR α ヘテロダイマーが多く形成されることにより、コレステロール投与によって CYP7A1 の遺伝子発現増加が起こると考えられた。

in vivo での変異 TR β の機能を解析することによって今回初めてコレステロール代謝に於ける TR β と LXR α のクロストークが存在することが判明した。KI マウスの解析は甲状腺ホルモン不応症の真の病態解明ならびに甲状腺機能低下症との差異の解明に大きく貢献するものと考えられ、今後他の核内受容体異常による種々の疾患の病態解明や治療にも応用可能と予想される。

E. 結論

(1) RTH における変異 TR β の作用は TR β の標的遺伝子によって異なる。則ち TR β Δ 337T の dominant negative 効果の遺

伝子発現に対する影響は各遺伝子毎に様々である。(2)TR β Δ 337T KI マウスの肝におけるコレステロール代謝と、key factorであるCYP7A1遺伝子発現はコレステロールによる影響が強く、LXR α -TR β のクロストークの存在を *in vivo* で証明した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hashimoto K, Cohen RN, Yamada M, Markan KR, Monden T, Satoh T, Mori M, Wondisford FE.

Cross-Talk between Thyroid Hormone Receptor and Liver X Receptor Regulatory Pathways is Revealed in a ThyroidHormone Resistance Mouse Model
J Biol Chem **281**:295-302, 2006

Tomaru T, Satoh T, Yoshino S, Ishizuka T, Hashimoto K, Monden T, Yamada M, Mori M.

Isolation and Characterization of a Transcriptional Cofactor and its Novel Isoform that Bind the DNA-Binding Domain of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

Endocrinology **147**:377-388, 2006

Yamada M, Shibusawa N, Ishii S,

Horiguchi K, Umezawa R, Hashimoto K, Monden T, Satoh T, Hirato J, Mori M. Prolactin Secretion in Mice with Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Deficiency.

Endocrinology in press

2. 学会発表

森 昌朋

核内転写因子としての甲状腺ホルモン受容体 (教育講演)

第78回日本内分泌学会学術総会

渋谷信行、橋本貢士、橋田 哲、佐藤哲郎、山田正信、Wondisford FE、森 昌朋
甲状腺ホルモン不応症における遺伝子変異と表現型：TR- β E457A ノックインマウスの作製と解析

第78回日本内分泌学会学術総会

松本俊一、橋本貢士、吉野 聡、梅澤良平、登丸琢也、橋田 哲、渋谷信行、佐藤哲郎、山田正信、森 昌朋

甲状腺ホルモン受容体(TR) β Δ 337T 変異ノックインマウスにおける下垂体前葉ホルモン遺伝子発現の解析

第78回日本内分泌学会学術総会

梅澤良平、山田正信、石井角保、登丸琢也、橋田 哲、渋谷信行、橋本貢士、佐藤哲郎、森 昌朋

甲状腺ホルモンによる遺伝子発現抑制機構：クロマチン上におけるダイナミクス
第78回日本内分泌学会学術総会

吉野 聡、佐藤哲郎、登丸琢也、石塚高広、渋谷信行、橋田 哲、橋本貢士、山田正信、森 昌朋

マウス PPAR γ -DNA-binding domain-interacting protein1 のクローニングとその機能解析
第78回日本内分泌学会学術総会

佐藤哲郎、登丸琢也、石塚高広、吉野 聡、橋本貢士、門傳 剛、山田正信、森 昌朋

Tat binding protein-1 は Tat binding protein-1-interacting protein と協調的にアンドロゲン受容体の転写活性型共役因子として機能する
第78回日本内分泌学会学術総会

橋本貢士、松本俊一、吉野 聡、梅澤良平、登丸琢也、橋田 哲、渋谷信行、佐藤哲郎、山田正信、森 昌朋

マウス glycoprotein α -subunit (α GSU) 遺伝子の Thyrotropin-releasing hormone (TRH) による新たな特異的転写機構
第78回日本内分泌学会学術総会

山田正信、渋谷信行、石井角保、橋田 哲、橋本貢士、佐藤哲郎、森 昌朋
下垂体プロラクチン産生細胞における

TRH の役割：TRH ノックアウトマウスの解析
第32回日本神経内分泌学会 (Brain-Pituitary 2005)

石塚高広、佐藤哲郎、山田正信、森 昌朋

甲状腺ホルモン受容体による転写抑制には NcoR/HDAC3 が必須である
第48回日本甲状腺学会

渋谷信行、橋本貢士、佐藤哲郎、山田正信、森 昌朋

甲状腺ホルモン受容体 AF-2 領域変異体 E457A ノックインマウスの解析
第48回日本甲状腺学会

佐藤哲郎、石塚高広、登丸琢也、吉野 聡、渋谷信行、橋本貢士、門傳 剛、山田正信、森 昌朋

甲状腺ホルモン受容体による転写調節機構における 26S プロテアソームの 19S 制御サブユニット構成蛋白 TBP-1 の役割
第48回日本甲状腺学会

吉野 聡、佐藤哲郎、登丸琢也、石塚高広、渋谷信行、橋本貢士、山田正信、森 昌朋

マウス PPAR γ -DNA-binding domain-interacting protein1 は甲状腺ホルモン受容体の活性型共役因子として機能する
第48回日本甲状腺学会