

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

Tumoral Calcinosis における FGF23 の関与の検討：糖化異常と分泌障害

研究協力者 杉本利嗣 島根大学医学部内科学第一 教授

共同研究者 山内美香 島根大学医学部内科学第一 助手

研究要旨：

Tumoral Calcinosis (TC) の病因の検討として、*FGF23* 遺伝子変異の検討と *FGF23* 機能低下の機序の検討を行った。TC 症例において *FGF23* 遺伝子に S129P となる新規の変異を認めた。正常及び変異を有する *FGF23* 遺伝子を導入した HEK293 細胞における *FGF23* 産生と分泌の検討により、正常 *FGF23* は O 結合型糖化修飾をうけることにより、効率よく分泌されるが、P129 変異型 *FGF23* はこれをうけないことにより intact *FGF23* の分泌能が障害され、*FGF23* 機能低下をきたす。以上のことから *FGF23* 遺伝子の S129P 変異は TC の原因遺伝子変異であることが示された。また、治療については *GALNT3* 遺伝子変異と同様 *FGF23* 遺伝子変異による TC においても Acetazolamide は有効な対症療法であることを示した。

A. 研究目的

Tumoral Calcinosis (TC) はこれまで原因不明の疾患であったが、リン代謝における *FGF23* の役割が明らかとなり、その原因が *FGF23* 遺伝子の活性減弱型変異によることが明らかとなった。そこで我々の経験した TC 症例において、*FGF23* 変異の有無と *FGF23* 機能障害の機序を明らかにする。

B. 研究方法

高リン血症と異所性石灰化を有する 44 歳男性の TC 症例について、以下の検討を行った。

a) *FGF23* の血中濃度の検討

本症例の血中 intact *FGF23* および C 端 *FGF23* の濃度を測定した。

b) *FGF23* 遺伝子変異の検討

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

FGF23 遺伝子変異の有無を確認した。

c) 正常および変異 *FGF23* の産生と分泌についての検討

正常ヒト *FGF23* と TC の原因遺伝子変異である G71、F129 変異と本症例の変異である P129 変異を有した *FGF23*、および TC の鏡像的疾患である常染色体優性低リン血症くる病 (ADHR) の原因遺伝子変異である Q176 変異を有した *FGF23* を HEK293 細胞に遺伝子導入を行った。様々な *FGF23* を導入した HEK293 細胞の cell lysates と Medium を用いて、抗 *FGF23* C 端 (51-69) 抗体と抗 *FGF23* N 端 (206-222) 抗体により Western blotting 法を行った。

d) *FGF23* における糖化修飾の検討

正常ヒト *FGF23* を導入した HEK293 細胞より分泌された *FGF23* がどのような糖化修飾をうけているかを検討した。様々な脱糖化酵素を反応させた後の Medium を用いて、抗

FGF23C端抗体と抗N端抗体によりWestern blotting法を行った。

e) *FGF23*遺伝子変異によるTCにおける治療についての検討

本例の異所性石灰化に対する治療としてAcetazolamide (ACZ)を投与し、投与前後で血中リン濃度、尿細管リン再吸収率(%TRP)、異所性石灰化の程度を測定した。

(倫理面への配慮)

検討した患者からinformed consentを取得している。

C. 研究結果

a) 本症例の血中intact *FGF23*は38 pg/ml (15-60)と高リン血症を認める割に低値を示し、C端*FGF23*は20233 RU/ml (50±51)と著明な高値を示した。既報のTC症例と同様の所見を認めた。

b) 本症例に*FGF23*遺伝子のS129Pとなるホモの変異を認めた。この変異部位は既報のものと同部位であったが、prolineへの変異は新規のものであった。無症状の母に同様の変異をヘテロで認めたが、コントロール群には認めず遺伝子多型ではなかった。

c) cell lysatesによるWestern blotting法にて、Wildでは既報のとおり、*FGF23*全長に値するレベルと蛋白修飾をうけたと考えられるレベルに2バンドのimmunoblotを認めた。しかし、TCの原因遺伝子変異であるG71、F129、P129変異を有した*FGF23*を導入したcell lysatesでは*FGF23*全長に値するレベルにのみimmunoblotを認めた。Medium中の蛋白での検討において、Wildは蛋白修飾をうけた*FGF23*のレベルに

immunoblotを認めたが、G71、F129、P129変異では認めなかった。そこで50倍に濃縮し同様の検討を行うとGこれらの変異でもわずかにimmunoblotを認めた。Q176との共発現の検討でG71とF129変異ではimmunoblotの増強を認めたが、本例のP129変異ではみられなかった。

d) PNGase F、 β -1,4-Galactosidase、Sialidase A、 β -N-Acetylglucosaminidaseの投与時にはimmunoblotのシフトは認めなかったが、O-Glycosidase投与時にimmunoblotのシフトを認めた。

e) ACZ投与により、血中リン濃度を変えることなく、%TRPを低下させ、異所性石灰化の縮小をきたした。

D. 考察

TC例について*FGF23*の遺伝子変異の検討を行い、遺伝子多型でない新規のホモ変異を確認した。母に同様の変異をヘテロで認め、父は検討できていないが、両親が又従兄弟婚であることから父もヘテロ変異を有すると考えられた。

正常および変異型*FGF23*を導入したHEK293細胞を用いた検討において、TCの原因遺伝子変異であるG71とF129、P129変異では修飾された*FGF23*が産生されず、細胞外への分泌の低下を認めたことより、*FGF23*が正常に細胞外に分泌されるには糖化修飾をうけることが必要であり、本P129変異は既報の変異と同様、糖化修飾の障害が*FGF23*機能低下の原因と考えられた。また、正常*FGF23*はO-glycosidase前処置によりWestern blotting法におけるimmunoblotのシフトを認めたことから、*FGF23*はO結合

型糖化修飾をうけることが明らかとなった。TCの他の原因としてGALNT3(UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine-polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase 3)遺伝子の変異による症例も報告されている。GALNT3は蛋白質に糖鎖を付加する酵素をコードし、Golgiにおいて特定のserineやthreonine残基のOH基にN-acetylgalactosamineを付加するO-結合型糖鎖付加に関与する。GALNT3の変異、FGF23のG71、F129、P129変異のいずれにおいても、FGF23の糖化修飾が障害され、intact FGF23が分泌されないことでFGF23活性低下をきたす。血中のC端FGF23は生理活性を有さないが、既報のFGF23変異とGALNT3変異によるTCにおいても高値を示すことが知られており、糖化修飾されず分解されたC端の断端は細胞外に分泌されるが、N端は断端となっても糖化修飾されないと分泌されないと考えられる。

また、G71、F129変異におけるFGF23の分泌低下は、Q176変異(この変異によりFGF23の179と180の間に生じるプロセッシングが生じない)との共発現により一部レスキューされたが、本P129変異ではレスキューされなかった。つまりG71、F129変異は179と180間に生じるプロセッシング亢進にも影響を及ぼす可能性があるが、P129変異はこのプロセッシングに直接影響を及ぼさない可能性が考えられた。

GALNT3遺伝子変異が証明されたTCにおいて、SevelamerとACZ投与により、血中リンやカルシウム濃度を変動させることなく異所性石灰化の縮小を認めることが報告されているが、FGF23変異を認めた本症

例においても異所性石灰化の縮小に対してACZ治療は効果的であったことより、GALNT3とFGF23のいずれの遺伝子変異であってもACZ治療への反応性に差はないことが示された。

E. 結論

TCの病因の検討として、FGF23遺伝子変異の検討を行い、S129Pとなる新規変異を認めた。*in vitro*の検討によりFGF23はO結合型糖化修飾をうけることにより、効率よく分泌されるが、P129変異型FGF23は、O結合型糖化修飾をうけないことによりintact FGF23の分泌能が障害されることでFGF23機能低下をきたす。以上のことからFGF23遺伝子のS129P変異はTCの原因遺伝子変異であることが示された。

GALNT3遺伝子変異とFGF23遺伝子変異によるTCではACZに対する反応性に差は認めず、いずれの場合も有効な対症療法である。

本検討によりFGF23の産生、分泌に関わる機序の一部を明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

Inokuchi G, Tanimoto H, Ishida H, Sugimoto T, Yamauchi M, Miyauchi A, Nibu K. A paranasal tumor associated with tumor-induced osteomalacia.

Laryngoscope. 116(10):1930-3, 2006

飛松崇子、梶博史、井上喜文、内藤純子、余美慧、山内美香、鹿股直樹、宮内章光、今西康雄、杉本利嗣、千原和夫：活性型ビタミンD高値が遷延した副鼻腔腫瘍による腫瘍性低リン血症性骨軟化症の一例。ホル

モンと臨床 興味ある症例集 *in press*

2. 学会発表

飛松崇子、梶博史、井上喜文、内藤純子、
余美慧、山内美香、鹿股直樹、宮内章光、
今西康雄、杉本利嗣、千原和夫：活性型ビ
タミンD高値が遷延した副鼻腔腫瘍による
腫瘍性低リン血症性骨軟化症の一例．第
79 回日本内分泌学会学術総会(神戸)2006
年5月19-21

偽性副甲状腺機能低下症の病因・病態解析

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 講師

研究要旨

偽性副甲状腺機能低下症の PTH 抵抗性には $Gs\alpha$ 蛋白をコードする *GNAS* 遺伝子の組織特異的 imprinting がキーとなっているが、その組織特異的 imprinting 機構の解明は *in vitro* で検討に用いられる細胞株がこれまでなかったためにほとんど進んでいない。巨核芽球性白血病由来細胞株である CFS は *GNAS* 遺伝子の imprinting をみとめ、今後この組織特異的 imprinting 機構の解析に有用な細胞株であることが明らかになった。また、*GNAS* 遺伝子の新規変異である A366T 変異を中枢性思春期早発症、性腺機能低下症を伴った AHO の 1 例において同定した。

A. 研究目的

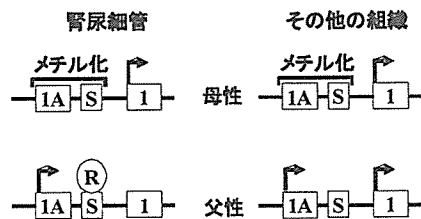
偽性副甲状腺機能低下症 (PHP) は古典的なホルモン不応症である。PHP は臨床的に特有の骨格徴候 (Albright hereditary osteodystrophy) を有する Ia 型 (PHP-Ia) と有しない Ib (PHP-Ib) に分類されるが、いずれの病型においても分子生物学的病因は PTH 受容機構に介在する $Gs\alpha$ 蛋白をコードする遺伝子である *GNAS* の構造異常によることが明らかにされてきた。

GNAS 遺伝子の imprinting は組織特異的であり、多くの組織では両アリル性の発現であるが、これまでに下垂体、甲状腺、性腺、血小板、巨核球のヒト由来組織で

$Gs\alpha$ 蛋白の母性アリル単独あるいは優位な発現が証明されている。この imprinting には、*GNAS* 遺伝子のエクソン 1A 領域のアリル特異的 DNA メチル化が必須であるが、組織特異的な imprinting の機構と生理的意義は明らかにされていない。PTH の標的組織である腎尿細管では、組織特異的 imprinting があり、母性アリルからの $Gs\alpha$ 蛋白の発現が障害されることが PHP の PTH 抵抗性の原因となっているが、こうした組織に特異的に発現している転写調節因子 (R) が最終的に imprinting を制御していると推測されている (図 1)。しかし、これまでのところ

GNAS 遺伝子の imprinting がみとめられる細胞株は同定されておらず, *in vitro* での解析は進んでいない. われわれは, 巨核球由来の細胞株が今後の *in vitro* 解析に有用ではないかと考え, *GNAS* 遺伝子の発現パターンを解析した.

図 1 : 腎尿細管とその他の組織での *GNAS* 遺伝子の発現調節モデル (仮説)



また, PHP-Ia の原因として *GNAS* 遺伝子のコード領域の変異はすでに多数同定されているが, 思春期早発症と続発性無月経をきたした Albright osteodystrophy の症例における *GNAS* 遺伝子変異についても検討した.

B. 研究方法

(1) *GNAS* の imprinting 機構の解明

【対象】巨核芽球性白血病由来である CFK, CFS, CFY の 3 種類の細胞株を対象とした.

【方法】巨核芽球性白血病由来細胞株よ

り抽出したゲノム DNA と RNA を用いて, PCR および RT-PCR により *GNAS* 遺伝子発現パターンを検討した. *GNAS* 遺伝子の片アレル性発現を検討するためには, エクソン 5 の FokI 多型がヘテロである細胞株を用いることが必要であることから, エクソン 4 と 5 にまたがるように以下のプライマー対を用いてゲノム DNA を増幅した後, 制限酵素 FokI で消化し, アガロースゲル電気泳動で泳動パターンを検討した.

E4/5F: 5' -TACTCCTAACTGACATGGTG-3'

E4/5R: 5' -ATATGGACACTGTGCTCAGG-3'

さらに, *GNAS* 遺伝子から転写された RNA の発現パターンを解析するために, 以下のプライマーを用いて RT-PCR を行った.

1A7F: 5' -AGCGAGCCCCTGTTCCCGCG-3'

E6 (522)R:

5' -CCTTGGCATGCTCATAGAATTC-3'

E1 (67)F:

5' -CCATGGGCTGCCTCGGGAACA-3'

1A7F と E6 (522)R の組合せからは, エクソン 1A, エクソン 2 からエクソン 6 にわたる転写産物の増幅が期待され, E1 (67)F と E6 (522)R の組合せからは, $Gs\alpha$ 蛋白をコードするエクソン 1 からエクソン 6 にわたる転写産物の増幅が期待される. これらの PCR 産物を FokI 消化前後でアガロースゲル電気泳動を行い, 泳動パターンの検討を行った.

(2) Albright osteodystrophy の症例における新規の GNAS 遺伝子変異

【対象】 Albright osteodystrophy (AHO) と診断された 16 歳の女性。AHO の家族歴はみとめない。Small for gestational age で出生, 低形成腎 (UN 19.5mg/dl, Cre 0.98 mg/dl) を指摘されている。中枢性思春期早発症として 8 歳 5 ヶ月から 9 歳 2 ヶ月まで LHRH agonist で治療され, 初経は 10 歳 4 ヶ月であったが, 月経不順でその後, 続発性無月経となっている。中手骨短縮, 中足骨短縮, -3.4SD の低身長, BMI 27 の肥満をみとめ, 精神発達遅滞はみとめない。カルシウム代謝には異常をみとめていない。

【方法】 ゲノム DNA の PCR 増幅には, Ahrens らによる既報 (J Clin Endocrinol Metab 86:4630, 2001) の GNAS コード領域の 13 個のエクソンとエクソン-イントロン接合領域すべてを含む 10 組のプライマー配列を用いた。PCR 産物を直接シーケンス法により塩基配列を検討した。

(倫理面への配慮)

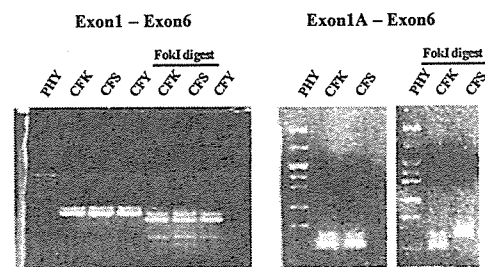
研究にあたっては, 施設の倫理委員会の承認のもとで個人情報の保護と研究対象者の人権を最優先として, 患者に対し十分に説明を行い書面による承諾を得ておこなった。

C. 研究結果

(1) GNAS 遺伝子の imprinting 機構の解明

検討した 3 種類の巨核芽球性白血病由来細胞株のうち, CFS のみにおいて GNAS 遺伝子エクソン 5 の FokI 多型がヘテロであることが示された。CFS から抽出した RNA を用いた RT-PCR では, 1A7F と E6(522)R のプライマーによる PCR 産物では FokI により切断されるバンドは出現せず, E1(67)F と E6(522)R のプライマーによる PCR 産物は FokI により切断されるバンドのみが検出された。

図 2 : 巨核芽球性白血病由来細胞株の RNA の GNAS 遺伝子 RT-PCR



(2) Albright osteodystrophy の症例における新規の GNAS 遺伝子変異

AHO の 1 症例において, エクソン 13 に A366T のヘテロの遺伝子変異を同定した。本変異は両親にはみとめなかった。

D. 考察

(1) GNAS 遺伝子の imprinting 機構の解明

巨核芽球性白血病由来細胞株 CFS は、エクソン 1A の発現アリルとは逆のアリルからエクソン 1 が発現している。この発現パターンは GNAS 遺伝子の組織特異的 imprinting を再現している。CFS を用いて、今後 in vitro の系によりメチル化アリル特異的な転写調節因子の解析を進めることができる。

(2) Albright osteodystrophy の症例における新規の GNAS 遺伝子変異

A366T 変異はこれまでに報告されていない新規の遺伝子変異であった。同じ位置のアミノ酸の置換である A366S 変異は、AHO with testotoxicosis (Iiri T et al. Nature 1994) としてすでに報告されており、この変異蛋白は in vitro では constitutive active な Gs α 蛋白であり、in vivo では、精巢の温度では安定な蛋白 (testotoxicosis), 37°C では不安定な蛋白 (受容体シグナルへの不応性) であるとされている。A366T 変異における中枢性思春期早発症、性腺機能低下症との関連は不明であるが現在発現実験を準備中である。

E. 結論

巨核芽球性白血病由来細胞株である CFS は GNAS 遺伝子の発現パターンに

imprinting をみとめ、今後この組織特異的 imprinting 機構の解析に有用な細胞株であることが明らかになった。また、GNAS 遺伝子の新規変異である A366T 変異を中枢性思春期早発症、性腺機能低下症を伴った AHO の 1 例において同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kinoshita K, Minagawa M, Anzai M, Sato Y, Kazukawa I, Shimohashi K, Ota S, Kohno Y. Characteristic height growth pattern in patients with pseudohypoparathyroidism: comparison between type 1a and type 1b. Clin Pediatr Endocrinol 16(1): 31-36, 2007
皆川真規, 猪股弘明. 先天性甲状腺機能低下症. 小児科臨床 59(4): 619-626, 2006

皆川真規. 副甲状腺機能低下症. 小児科診療 69 巻増刊:584-587, 2006

皆川真規. 偽性副甲状腺機能低下症. ホルモンと臨床 54(7): 611-619, 2006

皆川真規. 偽性副甲状腺機能低下症. 内分泌・糖尿病科 23 巻増刊:228-233, 2006

皆川真規, 河野陽一. 甲状腺自己抗体 (抗サイログロブリン抗体: TgAb, 抗甲状腺マイクロゾーム/ペルオキシダーゼ抗体: TPOAb, 抗甲状腺刺激ホルモン受容体抗体: TRAb). 五十嵐隆, 水口雅編 小児臨床検査ガイド. 文光堂, 東京, 523-526, 2006

皆川真規. 副甲状腺機能亢進症. 大関武彦, 古川漸, 横田俊一郎編今日の小児治療指針第14版. 医学書院, 東京, 194-195, 2006

井上祐三朗, 鈴木修一, 有馬孝恭, 富板美奈子, 皆川真規, 下条直樹, 河野陽一. 二次性骨粗鬆症の小児に対する治療と対策 ビスフォスフォネート製剤を含めて. 臨床リウマチ 18(2):197-200, 2006

2. 学会発表

南谷幹史, 今田進, 皆川真規, 河野陽一. 3年後に甲状腺機能亢進症に進展した, 成長障害, 粘液水腫を伴った橋本病の1 女児例. 第40回日本小児内分泌学会学術集会 平成18年9月28日

木下香, 高谷具純, 数川逸郎, 下橋京子, 皆川真規, 河野陽一. STX16 遺伝子欠失が証明された偽性副甲状腺機能低下症 Ib の家族例. 第40回日本小児内分泌学会学術集会 平成18年9月29日

高谷里依子, 染谷知宏, 皆川真規, 河野陽一. 思春期早発症を来した視床下部過誤腫の8ヶ月女児例. 第40回日本小児内分泌学会学術集会 平成18年9月29日

高谷具純, 数川逸郎, 下橋京子, 木下香, 皆川真規, 河野陽一. 当科でマスキリーニング陽性にて精密検査を受けた症例の検査時血清TSH値とその後の経過についての検討. 第40回日本小児内分泌学会学術集会 平成18年9月29日

皆川真規. Meet-The-Expert Ca代謝についての最近の話題. 第40回日本小児内分泌学会学術集会 平成18年9月29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 帝京大学ちば総合医療センター第三内科 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 依存的な AP-1 (δ fosB) の誘導と、ERK 非依存的な 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 依存的な AP-1 (δ fosB) の誘導と、ERK 非依存的な 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. Yoichi Tanaka, Masahiro Abe, Masahiro Hiasa, Asuka Oda, Hiroe Amou, Ayako Nakano, Kyoko Takeuchi, Kenichi Kitazoe, Shinsuke Kido, Daisuke Inoue, Keiji Moriyama, Toshihiro Hashimoto, Shuji Ozaki, and Toshio Matsumoto.
Myeloma cell-osteoclast interaction enhances

angiogenesis together with bone
resorption: a role for VEGF and osteopontin.

Clin Cancer Res 13(3): 816-823, 2007.

2. 井上大輔： 副甲状腺機能低下症。
今日の治療指針 2007 (医学書院) : 543,
2007.

2. 学会発表

1. 第79回日本内分泌学会学術総会
(5/19-21/2006、神戸)

PTH は骨芽細胞において *deltafosB* の発
現誘導と共に *Smad1* の活性化をもたらす。
栗若里佳、木戸慎介、海野友香、今村健
志、宮園浩平、井上大輔、松本俊夫

2. 第79回日本内分泌学会学術総会
(5/19-21/2006、神戸)

グルココルチコイド過剰による骨形成低
下の機序

木戸慎介、井上大輔、伊藤祐司、松本俊
夫

3. 第21回老化促進モデルマウス(SAM)研
究発表会 (7/27/2006、名古屋)

シンポジウム「老化のバイオロジー
(3) : 骨粗鬆症-動物モデルからの展開」

加齢と骨粗鬆症 井上大輔

4. 第8回日本骨粗鬆症学会
(11/12-14/2006、東京)

シンポジウム2 (11/14/2006)骨強度関連
~骨粗鬆症の診断・治療および骨折予防
から 骨強度評価を考える~
骨代謝回転と骨質・骨強度

井上大輔

5. 3rd IOF Asia-Pacific Regional Conference
on Osteoporosis and 16th Annual Meeting of
the Australian & New Zealand Bone &
Mineral Society (22-26 October 2006 - Port
Douglas, Australia)

Plenary Lecture: Mechanical stress-induced
AP-1 and Smad signalling for osteoblastic
differentiation

Daisuke Inoue, Shinsuke Kido, Toshio
Matsumoto

H. 知的所有権の出願・取得状況
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

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 大菌恵一 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。VDRは、核孔の構成分子であるNUP214とも相互作用をすることを見出したが、この蛋白質を過剰発現すると、VDR依存性転写活性が増強した。骨形成不全症等7例に対して、パミドロネートの経静脈的投与を行ない、治療前後でのカルシウム・リン調節ホルモンの変動を検討した。血清カルシウム値およびリン値は減少し、血中副甲状腺ホルモン、1,25(OH)₂D値は上昇した。血清FGF23値の減少が最も早く観察され、骨吸収抑制とFGF23放出との関連性が示唆された。

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ことから、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、VDRの機能異常によってもたらされる疾患であり、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、DNA結合及びホルモン結合の異常は実際に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遺伝子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することは、VDDRIIの病態解析を行う上で必要である。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の解析を試みた。

B. 研究方法

Yeast two-hybrid systemによりVDRと相互作用する分子のスクリーニングを行った。同定された分子が、実際にVDRと相互作用するかどうかはFLAGタグをつけた蛋白質を合成させ、immunoprecipitation-western

blotting(IP-western)法で検討した。同定された分子が VDR の転写活性化能に及ぼす影響について、VDR 応答配列を有する reporter assay により検討した。

C. 研究結果

Yeast two-hybrid 法により同定された分子の一つである核孔の構成分子である NUP214 の VDR との相互作用を、IP-western 法により確認した。この相互作用には、VDR の DNA 結合領域および NUP214 の C 末端 FG 繰り返し構造が必要であった。NUP214 を過剰発現すると、VDR の転写活性を増強したが、NUP214 の C 末端側のみの過剰発現では、VDR の転写活性を抑制した。

D. 考察

NUP214 は核膜孔の構成分子であり、この欠失は核内および核外輸送に障害を与えることが知られている。今回、NUP214 と相互作用する核内受容体として始めて VDR を同定した。さらに、NUP214 の過剰発現は VDR の機能を高め、NUP214 の C 末端側の過剰発現は VDR 機能を阻害したことから、NUP214 は VDR の機能に積極的に関与していることが考えられた。興味深いことに一部の骨髄性白血病では NUP214 遺伝子に異常があり、ビタミン D が骨髄細胞の分化に関わることから、NUP214 と VDR の相互作用は生理的、病理的意義があるものと期待される。

E. 結論

VDR と相互作用する蛋白質として、核膜孔の構成成分である NUP214 を同定した。NUP214 は VDR の機能に影響を与えたことから、この相互作用は骨髄細胞の分化を含む生理機能において何らかの役割を持つものと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

VDR と NUP214 の相互作用に関する成果は論文として投稿した。

2. 学会発表

今年度はなし

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

2. 血清カルシウム・リン値の制御機構関する研究

A. 研究目的

パミドロネートはビスフォスフォネート製剤のひとつで、小児科領域では骨形成不全症や McCune-Albright 症候群の線維性骨異形性症などに対する治療報告がある。治療により骨吸収は阻害され、低カルシウム (Ca)・低リン (P) 血症が一過性に認められる。また近年、リン利尿因子のひとつとして FGF23 が同定されたが、その産生部位や分泌調節機構について

ては不明な点が多い。今回我々は、パミドロネート治療によるカルシウム・リン代謝の変動について検討した。

B. 方法

対象：3～4ヶ月毎のパミドロネート治療を行っている骨形成不全症5名、McCune-Albright症候群1名、特発性高カルシウム尿症1名で、計7例について検討した。パミドロネート治療(1mg/kg/day連日3日間)の前後での血中Ca、P、intact PTH(iPTH)、1,25(OH)₂D、intact FGF23値について検討した。

C. 結果

パミドロネート治療によりCa値は全例で低下傾向(-1.08 mg/dl, p<0.05)を示し、iPTH、1,25(OH)₂D値は上昇した。正常範囲を超えたiPTHの上昇を認めた。P値についても治療により全例で低下傾向(-1.17 mg/dl, p<0.05)を示し、FGF23値も7例中6例で低下していた(-16.4 pg/ml, p<0.05)。

D. 考察

骨吸収抑制により血清Ca値が低下した結果、iPTHおよび1,25(OH)₂D値が上昇したと考えられるが、骨吸収抑制効果は、これらCa代謝調節ホルモンに対するCa値上昇反応を低下させるため、低Ca血症が持続すると考えられた。パミドロネート治療によりFGF23値が低下することが示されたが、血清P値の低下に対してリン利尿を抑制するように制御反応したものと考えられる。しかし、時間経過より骨吸収の低下に伴う骨からのFGF23の分

泌の低下の可能性が考えられ、さらなる検討が必要である。

E. 結論

パミドロネート静注療法後、血清Ca値、P値低下より早期から血清FGF23値の減少が観察され、骨吸収抑制とFGF23放出との関連性が示唆された。

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なし。他のCa骨代謝関連の論文は別紙記載。

2. 学会発表

第40回日本小児内分泌学会、第4回アジア太平洋小児内分泌学会(APPE)で口演発表を行った。

H. 知的所有権の取得状況

特になし。

平成 18 年度 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

ビタミン D 受容体を介した遺伝子発現調節機構の解明

分担研究者 加藤 茂明

東京大学分子細胞生物学研究所・教授

研究要旨

ビタミン D 受容体 (VDR) を介するリガンド依存的な転写抑制機構に関しては、リガンド依存的転写活性化機構と比較し、依然として不明な点が多い。特に転写抑制に関係する因子群の実態は未知である。現在までに、ビタミン D₃ 1 α 水酸化酵素 [1 α (OH)ase] 遺伝子のプロモーター領域に E-box 型の VDR 転写抑制エレメント (nVDRE) を見出し、これを認識・結合する bHLH 型転写因子 VDIR を同定した。本研究では、代表的なビタミン D 応答性抑制遺伝子である PTH および PTHrP 遺伝子のプロモーター上に E-box 型 nVDRE を新たに見出し、VDIR がこれら遺伝子群の転写抑制機構に重要な役割を担うことを見出した。従って、VDIR を介するリガンド依存的 VDR 転写抑制機構は、生体内カルシウム代謝制御に重要な役割を担うと考えられた。

A. 研究目的

ビタミン D は、カルシウム代謝の主要制御ホルモンである。その生理的重要性については広く認められており、更にビタミン D 剤は臨床的にも汎用されている。ビタミン D の作用はその核内レセプター (VDR) を介して発揮されると考えられているが、VDR を介する転写制御の分子機構や VDR 発現組織での特異的高次機能に関しては、未だ不明な点が多い。特に、ビタミン D 応答遺伝子群の発現を負に制御する機構は未知である。

我々は、1 α (OH)ase 遺伝子プロモーター領域に E-box 型の VDR 転写抑制エレメント (nVDRE) を見出し、これを認識・結合する bHLH 型転写因子 VDIR を同定した。しかしながら、VDIR および E-box 型 nVDRE を介するリガンド依存的 VDR 転写抑制機

構が、1 α (OH)ase 遺伝子以外のビタミン D 抑制遺伝子に寄与するのかは不明であった。そこで本研究では、代表的なビタミン D 抑制遺伝子である PTH および PTHrP 遺伝子に着目し、解析を行った。

B. 研究方法

VDIR による VDR 転写抑制の分子機構を明らかにする目的で、以下の実験を行った。

1) VDR 欠損マウスを用いた PTH 遺伝子発現解析により、本遺伝子のビタミン D 依存的な転写抑制機構における VDR の重要性を、生体内において検討する。

2) ルシフェラーゼ (LUC) 法で、PTH および PTHrP 遺伝子プロモーターの欠失変異体を作製し、E-box 型 nVDRE を探索する。

解析には、ビタミンD依存性VDR転写抑制が顕著に見られる、マウス腎臓近位尿細管由来のMCT細胞を用いる。

3) PTH遺伝子のE-box型nVDREを用いたLUC法により、VDIR強制発現がビタミンD転写抑制に及ぼす影響を検討する。

4) Gel shift assayにより、in vitroにおいてVDIRがPTHおよびPTHrP遺伝子E-box型nVDREに直接結合することを確認する。

5) PTH遺伝子のE-box型nVDREオリゴDNAをストレプトアビジンビーズ上に固定化し、エレメント上での転写共役抑制因子複合体の形成をin vitroにおいて評価する。

C. 研究結果および考察

まず、VDR欠損マウスにビタミンD投与および非投与処理を行ない、これら検体群から副甲状腺および腎臓を摘出した。各々組織より全RNAを調整したのち、ビタミンD応答遺伝子群の発現解析をRT-PCR法により評価した。その結果、生体内において、 1α (OH)ase遺伝子のみならず、PTHおよびPTHrP遺伝子に関しても、VDRはビタミンD応答性の遺伝子発現抑制機構に不可欠であることを見出した。そこで、PTH遺伝子およびPTHrP遺伝子プロモーター領域の欠失変異体を含むLUCレポーター遺伝子系列を作製し、プロモーター領域に存在するnVDREを探索した。その結果、 1α (OH)ase遺伝子と同様、PTHおよびPTHrP遺伝子プロモーター上に、当研究グループが見出した新規E-box型nVDREを同定することに成功し

た(PTHnVDREおよびPTHrPnVDRE)。VDIRは 1α nVDREを認識・結合することから、Gel shift assayを用い、PTHnVDREおよびPTHrPnVDREにおいてもVDIRが直接結合することを確認した。実際に、これらE-box型nVDREを認識・結合するVDIRを強制発現すると、これら転写抑制のリガンド感受性が増強することを見出した。最後に、PTHnVDRE上でリガンド依存的に転写共役抑制因子複合体が形成することをin vitroにおいて証明した(Kim MS et al., Mol Endocrinol 21, 334-342)。

D. 結論

本年度の研究においては、PTHおよびPTHrPの2つの遺伝子プロモーター上に、bHLH型転写因子のVDIRが認識するE-box型nVDREを同定した。これらの結果は、本研究グループが同定したVDIRがビタミンD依存性VDR転写抑制機構において中心的な役割を担う可能性を示すものである。

E. 健康危険情報

国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報は特に無い。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S.: Dioxin receptor is a ligand-dependent E3

ubiquitin ligase. *Nature*, 2007. (in press)

Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Nakamura, T., Akimoto, C., Yamamoto, Y., Katagiri, T., Foulds, C., Takezawa, S., Kitagawa, H., Takeyama, K., O' Malley, B. W., Kato, S.: DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of MicroRNAs. *Nat. Cell Biol.*, 2007. (in press)

Takezawa, S., Yokoyama, A., Okada, M., Fujiki, R., Iriyama, A., Yanagi, Y., Ito, H., Takada, I., Kishimoto, M., Miyajima, A., Takeyama, K., Umesono, K., Kitagawa, H., Kato, S.: A cell cycle-dependent co-repressor for photoreceptor cell-specific nuclear receptor (PNR). *EMBO J.*, 2007. (in press)

Kim, M.-S., Fujiki, R., Kitagawa, H., Kato, S.: 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ -induced DNA methylation suppresses the human CYP27B1 gene. *Mol. Cell Endocrinol.*, 2007. (in press)

Yamaoka, K., Shindo, M., Iwasaki, K., Yamaoka, I., Yamamoto, Y., Kitagawa, H., Kato, S.: Multiple co-activator complexes support ligand-induced transactivation function of VDR.

Arch. Biochem. Biophys., 2007. (in press)

Memezawa, A., Takada, I., Takeyama, K., Igarashi, M., Ito, S., Aiba, S., Kato, S., Kouzmenko, A.P.: Id2 gene targeted crosstalk between Wnt and retinoid signaling regulates proliferation in human keratinocytes. *Oncogene*, 2007. (in press)

Kim, M.-S., Fujiki, R., Murayama, A., Kitagawa, H., Yamamoto, K., Yamamoto, Y., Mihara, M., Takeyama, K., Kato, S.: 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ -induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter. *Mol. Endocrinol.*, **21**, 334-342, 2007.

Shiina, H., Matsumoto, T., Sato, T., Igarashi, K., Miyamoto, J., Takemasa, S., Sakari, M., Takada, I., Nakamura, T., Metzger, D., Chambon, P., Kanno, J., Yoshikawa, H., Kato, S.: Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 224-229, 2006.

Oishi, H., Kitagawa, H., Wada, O., Takezawa, S., Tora, L., Kouzu-Fujita, M., Takada, I., Yano, T., Yanagisawa, J., Kato, S.: An hGCN5/TRRAP HAT complex coactivates BRCA1 transactivation function through

- histone modification. *J. Biol. Chem.*, **281**, 20-26, 2006.
- Yamaoka, K., Kim, M.-S., Takada, I., Takeyama, K., Kamimura, T., Kato, S.: Culture serum-induced conversion from agonist to antagonist of a Vitamin D analog, TEI-9647. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **100**, 177-183, 2006.
- Kishimoto, M., Fujiki, R., Takezawa, S., Sasaki, Y., Nakamura, T., Yamaoka, K., Kitagawa, H., Kato, S.: Nuclear receptor mediated gene regulation through chromatin remodeling and histone modifications. *Endocrinol. J.*, **53**, 157-172, 2006.
- Yamada, T., Kawano, H., Koshizuka, Y., Fukuda, T., Yoshimura, K., Kamekura, S., Saito, T., Ikeda, T., Kawasaki, Y., Azuma, Y., Ikegawa, S., Hoshi, K., Chung, U., Nakamura, K., Kato, S., Kawaguchi, H.: Carminerin contributes to chondrocyte calcification during endochondral ossification. *Nature Medicine*, **12**, 665-670, 2006.
- Yamamoto, K., Sokabe, T., Matsumoto, T., Yoshimura, K., Shibata, M., Ohura, N., Fukuda, T., Sato, T., Sekine, K., Kato, S., Isshiki, M., Fujita, T., Masuda, H., Kobayashi, M., Kawamura, K., Kamiya, A., Ando, J.: Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nature Medicine*, **12**, 133-137, 2006.
- Li, M., Hener, P., Zhang, Z., Kato, S., Metzger, D., Chambon, P.: Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. US A.*, **103**, 11736-11741, 2006.
- Tateishi, Y., Sonoo, R., Sekiya, Y., Sunahara, N., Kawano, M., Wayama, M., Hirota, R., Kawabe, Y., Murayama, A., Kato, S., Kimura, K., Yanagisawa, J.: Turning off estrogen receptor beta-mediated transcription requires estrogen-dependent receptor proteolysis. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 7966-7976, 2006.
- Katsu, Y., Kohno, S., Oka, T., Mitsui, N., Tooi, O., Santo, N., Urushitani, H., Fukumoto, Y., Kuwabara, K., Ashikaga, K., Minami, S., Kato, S., Ohta, Y., Guilette, L. J. Jr., Iguchi, T.: Molecular cloning of estrogen receptor alpha (ER ; ESR1) of the Japanese giant salamander, *Andrias japonicus*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **257-258**, 84-94, 2006.
- Ma, Y., Khalifa, B., Yee, Y. K., Lu, J., Memezawa, A., Savkur, R. S., Yamamoto, Y., Chintalacheruvu, S. R., Yamaoka, K., Stayrook, K. R., Bramlett,

K. S., Zeng, Q. Q., Chandrasekhar, S., Yu, X. P., Linebarger, J. H., Iturria, S. J., Burris, T. P., Kato, S., Chin, W. W., Nagpal, S.: Identification and characterization of noncalcemic, tissue-selective, nonsecosteroidal vitamin D receptor modulators. *J. Clin. Invest.*, **116**, 892-904, 2006.

Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Okabe, T., Nomura, M., Daitoku, H., Fukamizu, A., Kato, S., Takayanagi, R., Nawata, H.: IGF1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of FOXO1 with androgen receptor. *J. Biol. Chem.*, 2007. (in press)

Yokota, K., Shibata, H., Kurihara, I., Kobayashi, S., Suda, N., Murai-Takeda, A., Saito, I., Kitagawa, H., Kato, S., Saruta, T., Itoh, H.: Coactivation of the N-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor by Ubc9. *J. Biol. Chem.*, **282**, 1998-2010, 2007.

2. 学会発表

【国内】

2006年度日本農芸化学会

DEAD Box RNA helicase p72/p68 による miRNA processing の機能解析

山形 薫、福田 亨、藤山沙理、越田伊織、武山健一、松本高広、北川浩史、加藤茂明

新規ビタミンDレセプター (VDR) 相互

作用因子複合体 WINAC の生体内高次機能の解析

吉村公宏、北川浩史、竹澤慎一郎、高田伊知郎、古谷善幸、八木寿人、福田 亨、山本陽子、渡辺智之、中村 貴、椎名博子、宮本純子、田中佐依子、松本高広、松岡瑠美子、加藤茂明

ビタミンKはエストロゲンと協調的に骨芽細胞形成を促進する

五十嵐庸、過足芳子、三原正朋、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明

肝臓特異的 FXR 転写共役因子複合体精製の新たな試み

馬場敦史、大竹史明、三木ひろみ、北川浩史、高田伊知郎、加藤茂明

◎細胞周期依存的な ER α の機能解析

岡田麻衣子、竹澤慎一郎、目崎善弘、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明

分子遺伝学的アプローチによるヒト核内レセプター新規転写共役因子 BAHD1 の機能解析

伊藤紗弥、武山健一、沢津橋俊、鈴木絵里子、Yue Zhao、山形 薫、田辺真彦、Alexander Kouzmenko、城出裕子、多羽田哲也、加藤茂明

クロマチン構造を介したエクダイソンレセプター転写制御機構の解明に関する研究

沢津橋俊、武山健一、伊藤紗弥、鈴木絵里子、田辺真彦、趙 越、山形 薫、城出裕子、多羽田 哲也、加藤茂明