

ヒストン修飾を介した Wnt シグナルと核内レセプター PPAR $\gamma$  のクロストーク分子機構の解析

高田伊知郎、須澤美幸、松本邦弘、加藤茂明

第 24 回日本骨代謝学会学術集会

骨芽細胞分化関連因子 Msx2 はビタミン K の標的遺伝子である

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

第 79 回日本内分泌学会学術総会

ビタミン D 受容体転写制御におけるクロマチンリモデリング因子群の役割

北川浩史、藤木亮次、吉村公宏、大矢博之、加藤茂明

【国際】

Keystone Symposia (Nuclear Receptors)

E2F transcriptional activation as a potential mechanism of neurodegeneration of polyglutamine expansion androgen receptor mutants

E. Suzuki, S. Ito, S. Sawatsubashi, Y. Shirode, A. Maki, Y. Zhao, K. Yamagata, T. Furutani, A. Kouzmenko, M. Tanabe, K. Takeyama, S. Kato (2006)

Analysis of a novel VDR interacting chromatin remodeling complex 'WINAC' in vivo

K. Yoshimura, H. Kitagawa<sup>1</sup>, R. Fujiki,

T. Matsumoto, S. Kato (2006)

Drosophila genetic system as a powerful tool for identification of novel co-regulators of human nuclear receptors  
K. Takeyama, S. Ito, S. Sawatsubashi, Y. Shirode, E. Suzuki, Y. Zhao, K. Yamagata, M. Tanabe, A. Kouzmenko, S. Kato (2006)

©Modulation of estrogen signaling by dioxin receptor and associated complexes

A. Baba, F. Ohtake, S. Kato (2006)

Identification and functional analysis of cell-cycle specific co-repressor complex, Dev-CoR complex

A. Yokoyama, S. Takezawa, M. Okada, R. Fujiki, H. Kitagawa, S. Kato (2006)

Isolation of Androgen Receptor Co-regulators regulating the Alteration of Chromatin Structure Using Modified Position Effect Variegation System in Drosophila

Y. Zhao, K. Takeyama, S. Ito, E. Suzuki, S. Sawatsubashi, Y. Shirode, K. Yamagata, A. Kouzmenko, M. Tanabe, S. Kato (2006)

Bone remodeling and the roles of nuclear receptors

S. Kato (2006)

13<sup>th</sup> Workshop on Vitamin D

Ligand-induced transrepression

mechanism by nuclear receptor through chromatin remodeling/modification complexes

S. Kato (2006)

Keystone Symposia (Regulation of Eukaryotic Transcription)

Function of co-regulator complexes for nuclear receptors

S. Kato (2006)

Identification of A Novel Co-regulator of Nuclear Receptors by *Drosophila* Genetic System

S. Ito, K. Takeyama, S. Sawatsubashi, E. Suzuki, A. Kouzmenko, Y. Zhao, K. Yamagata, M. Tanabe, Y. Shirode, T. Tabata, S. Kato(2006)

Functional analysis of ecdysone receptor-mediated transcription through alteration of chromatin structure

S. Sawatsubashi, K. Takeyama, S. Ito, E. Suzuki, M. Tanabe, Y. Zhao, K. Yamagata, Y. Shirode, T. Tabata, S. Kato (2006)

Functional analysis of a novel ATP dependent chromatin remodeling complex 'WINAC'

H. Kitagawa, R. Fujiki, K. Yoshimura, H. Ohya, S. Kato (2006)

ASBMR 28<sup>th</sup> Annual Meeting

1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ -induced DNA methylation mediates the transrepression by VDR

M.-S. Kim, A. Murayama, R. Fujiki, K. Takeyama, S. Kato (2006)

Vitamin K stimulates osteoblastgenesis through PXR/SXR-mediated Msx2 induction

M. Igarashi, Y. Yogiashi, M. Mihara, I. Takada, H. Kitagawa, S. Kato (2006)

International Conference on Progress in Bone and Mineral Research 2006

Bone remodeling and the roles of nuclear receptor

S. Kato (2006)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

### リガンド特異的なビタミン D 受容体活性化機構の解析

研究協力者 榎島 誠 日本大学医学部生化学 教授

#### 研究要旨：

ビタミン D 受容機構異常症の分子病態の解明を目的として、細胞選択的及び作用選択的なビタミン D 受容体 (VDR) 活性化作用の解析を行った。VDR のリガンド結合ドメインの変異体に対する活性型ビタミン D<sub>3</sub> とリトコール酸の作用の解析結果から VDR モジュレーターをデザインして活性を評価した結果、アゴニスト/アンタゴニスト活性が細胞選択的であること、その選択性はコファクターとの相互作用や発現パターン、及びリガンド依存性 VDR 核移行と関連することを見いだした。また、活性型ビタミン D<sub>3</sub> とリトコール酸誘導体とは標的遺伝子の発現誘導効率に相違があり、リトコール酸誘導体はカルシウム代謝に影響を与えにくいことを明らかにした。これらの結果は、VDR の作用選択的な活性化分子機構を示しており、さらに解析することによりビタミン D 受容体機構異常症の病態解明が期待できる。

#### A. 研究目的

カルシウム代謝の重要な調節因子の一つであるビタミン D 受容体 (VDR) には、活性型ビタミン D<sub>3</sub> と胆汁酸であるリトコール酸の少なくとも 2 種類の生理的リガンドが存在する。活性型ビタミン D<sub>3</sub> の VDR を介するカルシウム代謝調節については多くの研究がなされているが、活性型ビタミン D<sub>3</sub> の非カルシウム調節作用の生理的意義および胆汁酸による VDR 活性化の生理的・病的意義はほとんど解明されていない。本研究では、活性型ビタミン D<sub>3</sub> と胆汁酸による VDR の活性化機構の相違点を明らかにして、リガンド特異的な生理機能及び疾病の病態との関連性を解明することを目的とする。

#### B. 研究方法

1. これまでの研究で明らかにした活性型ビタミン D<sub>3</sub> や胆汁酸の VDR リガンド結合ポケットへの結合様式を解析して、VDR アンタゴニストをデザインした。これらの化合物の VDR 活性化作用やコファクター相互作用を HEK 細胞におけるトランスフェクション法により、各種細胞における標的遺伝子の発現に対する影響をリアルタイム PCR 法によって解析した。
2. VDR リガンドとして機能する胆汁酸及び誘導体の各種細胞に対する効果及び動物に対する効果を解析した。
3. 遺伝子組換え実験に関しては、遺伝

子組換え生物等規制法に基づく手続きを行い、機関の承認を得た。

#### C. 研究結果

1. VDR アンタゴニストとして機能するビタミン D<sub>3</sub> 誘導体の効果を詳細に解析した結果、①VDR リガンド結合ポケットに対する結合様式の相違により、選択的なコファクター相互作用が生じること、②アンタゴニストと考えられていた誘導体は、ある細胞株ではアゴニストとして働き、その活性はコファクターの発現量と一部相関していること、③アンタゴニストとして作用する細胞株においてはリガンド依存性の VDR 核移行が生じないこと、などを明らかにした。
2. 活性型ビタミン D<sub>3</sub> と VDR リガンドとして機能する胆汁酸誘導体 (リトコール酸アセテートなど) の各種細胞に対する効果を検討した結果、腸管粘膜由来細胞株において、活性型ビタミン D<sub>3</sub> は、CYP24 の発現誘導に比較し、より効果的に (低濃度で) カルシウムトランスポーター TRPV6 の発現を誘導することを見いだした。胆汁酸誘導体による TRPV6 の発現誘導能は、CYP24 の発現誘導能とほぼ同等であった。次にマウスへビタミン D<sub>3</sub> (1 $\alpha$  (OH) D<sub>3</sub>) と胆汁酸誘導体を腹腔内投与し、腎臓の CYP24 の発現を同程度に誘導する投与量において比較検討を行った。ビタミン D<sub>3</sub> 投与では高カルシウム血症を起こ

したが、胆汁酸誘導体は血中カルシウム濃度を上昇させなかった。

#### D. 考察

1. リガンドと VDR との結合様式の解析により、VDR モジュレーターの開発が可能である。細胞選択的作用には、リガンド依存性のコファクター相互作用及び細胞におけるコファクターの発現パターンが関与していると考えられた。また、アンタゴニスト活性には、VDR のリガンド依存性核移行のメカニズムも重要と考えられ、分子メカニズムの解析が重要である。

2. ビタミン D3 と胆汁酸とでは、標的遺伝子の発現誘導の効率が異なり、生体におけるカルシウム代謝に対する効果に差があることが示された。リガンド選択的作用をさらに研究することで、VDR の生理機構の解明、そして新規 VDR 標的治療法の実現が可能となると考えられる。

#### E. 結論

ビタミン D3 誘導体の細胞選択的アゴニスト/アンタゴニスト活性を見だし、コファクター相互作用や VDR 核移行との相関性を明らかにした。また、ビタミン D3 と胆汁酸誘導体の標的遺伝子選択性、カルシウム代謝に対する影響の相違を見出した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Igarashi, M., Yoshimoto, N., Yamamoto, K., Shimizu, M., Ishizawa, M., Makishima, M., DeLuca, H. F., and Yamada, S. Induction of a highly potent vitamin D receptor antagonist: (25S)-26-Adamantyl-25-hydroxy-2-methylene-22, 23-didehydro-19, 27-dinor-20-*epi*-vitamin D3 (ADMI3). Arch. Bioch. Biophys., in press
2. Inaba, Y., Yamamoto, K., Yoshimoto, N., Matsunawa, M., Uno, S., Yamada, S., and Makishima, M. Vitamin D3 derivatives with adamantane or lactone ring side chains are cell

type-selective vitamin D receptor modulators. Mol. Pharmacol., in press

##### 2. 学会発表

1. 榎島誠, ビタミン D 受容体を標的とする新規治療戦略 (ワークショップ: 核内レセプターを分子標的とした疾患治療法開発の現状と課題). 第 27 回日本炎症・再生医学会、東京、2006.7
2. 吉本暢子、稲葉有香、清水正人、玉村啓和、榎島誠、山田幸子、山本恵子. 側鎖にメチレンラクトンを持つビタミン D 受容体アンタゴニストの合成と活性. 日本レチノイド研究会第 17 回学術集会、東京、2005.11
3. 稲葉有香、吉本暢子、山田幸子、榎島誠、山本恵子. 細胞選択的な VDR モジュレーターとして作用するビタミン D3 誘導体. 日本分子生物学会 2006 フォーラム分子生物学の未来、名古屋、2006.12
4. 道上敏美、阪口奈保子、榎島誠、大菌恵一、宮内芳輝. ビタミン D 受容体機能制御因子としての核膜孔複合体蛋白質 CAN/Nup2124 の同定. 第 314 回脂溶性ビタミン総合研究委員会、熱海、2006.12
5. 榎島誠. 核内受容体によるコレステロール胆汁酸代謝調節. 情報計化学生物学会 (CBI 学会) 第 270 回研究講演会、東京、2006.12
6. 榎島誠、松縄学、西田滋、宇野茂之. ダイオキシン受容体を介する遺伝子特異的 VDR 活性増強作用. 第 315 回脂溶性ビタミン総合研究委員会、東京、2007.3

H. 知的財産権の出願・登録状況  
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）  
協力研究報告書

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

研究協力者 道上 敏美

地方独立行政法人 大阪府立病院機構

大阪府立母子保健総合医療センター研究所 環境影響部長

研究要旨:

近位尿細管上皮細胞刷子縁に局在するエンドサイトーシス受容体メガリンの機能を一時的に攪乱したモデルにおいて、血中 FGF23 値が低下することを見出した。この知見から、ファンconi症候群における血中 FGF23 値の低下にメガリン機能の障害が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

メガリンは 25OHD/ビタミン D 結合蛋白 (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する。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、これらの病態における 25OHD の再吸収障害をもたらす。また、種々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 の排泄増加をもたらし、ビタミン D の活性化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おり、カルシウム・リン代謝におけるメガリンの関与が推察される。当該研究においては、血清カルシウム・リン調節ホルモンの作用機構における近位尿細管上皮細胞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

メガリンのリガンドの一つで、他のすべてのリガンドの結合を阻害する receptor associated protein (RAP)を過剰発現する CHO細胞を樹立し、ヌードマウスに移植することにより、メガリン機能を攪乱することを試みた。小胞体保持シグナルを除いて可溶型としたRAPのヒスチジンタグ融合蛋白質(His-RAP)を恒常的に発現するCHO細胞を樹立した (CHO-His-RAP)。また、メガリン依存性エンドサイトーシスとリン酸再吸収調節ホルモンである FGF23の作用との関連について検討するため、FGF23の機能獲得型変異体である FGF23[R179Q]を恒常的に発現する CHO 細胞 (CHO-FGF23[R179Q])も合わせて樹立した。ヌードマウスにCHO-FGF23[R179Q]およびCHO-His-RAPあるいはCHO親株を移植し、経時的に採血し、血清リン値を測定した。

また、FGF23の血中濃度も測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験については当該施設（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った。

#### C. 研究結果

CHO-HisRAP をヌードマウスの背側皮下に移植することにより、形成された腫瘍から血中に His-RAP が分泌されることを Western blot により確認した。また、CHO-FGF23[R179Q]をヌードマウスの皮下に移植し腫瘍を形成させることにより、血中 FGF23 レベルの上昇、低リン血症を呈することを確認した。ヌードマウスに CHO-FGF23[R179Q]および CHO-His-RAP あるいは CHO 親株を移植し、経時的に採血し、血清リン値を測定したところ、CHO-FGF23[R179Q]と CHO-His-RAP を移植した群で、CHO-FGF23[R179Q]と CHO 親株を移植した群と比較して、移植後 2 週目の血清リン値がより低い傾向を認めた。また、血中 FGF23 値は、CHO-FGF23[R179Q]と CHO-His-RAP を移植した群で CHO-FGF23[R179Q]と CHO 親株を移植した群よりも低い値を示した。

#### D. 考察

種々の遺伝性低リン血症性くる病・骨軟化症や腫瘍随伴性低リン血症の場合と対照的に、メガリン機能の低下を呈するファンconi症候群においては、低リン血症が存在するにもかかわらず、血中 FGF23 値は低下している。今回の CHO-His-RAP のヌードマウスへの移植を用いたメガリン機能攪乱モデルにおいて血中 FGF23 の低下を認めたことは、ファンconi症候群における FGF23 の低下にメガリン機能の障害が関与していることを示唆する。今後、血中 PTH 濃度、ビタミン D 濃度の検討などを行う予定である。

#### E. 結論

ファンconi症候群における血中 FGF23 値の低下は、メガリン機能の障害によることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ozono K, Michigami T, Namba N, Nakajima S, Yamamoto T. Molecular bases of diseases characterized by hypophosphatemia and phosphaturia: new understanding. *Clin Pediatr Endocrinol* 15(4):129-135, 2006

##### 2. 学会発表

木全正彰, 立川加奈子, 大菌恵一, 古郷幹彦, 道上敏美. 初期軟骨細胞の細胞外無機リン酸応答性分子機構—III 型 Na/Pi 共輸送担体のリン酸感知受容体としての妥当性. 第 24 回日本骨代謝学会. 2006.7.6~8 : 東京.

Kimata M, Tachikawa K, Ozono K, Michigami T, Kogo M. Molecular basis of phosphate sensing in the early stage of chondrocyte differentiation . 28th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2006.9.15~19:Pennsylvania, U.S.A.

Kimata M, Tachikawa K, Ozono K, Kogo M, Michigami T. Extracellular inorganic phosphate alters gene expression in early chondrocytes through phosphorylation of ERK. 3rd International Osteoporosis Foundation Asia-Pacific Regional Conference on Osteoporosis and 16th Annual Meeting of the Australian and New Zealand Bone and Mineral Society. 2006.10.22~26:Port Douglas, Australia.

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得：該当なし。
2. 実用新案登録：該当なし。
3. その他：該当なし。

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

低リン刺激によるビタミン D $1\alpha$  水酸化亢進のメカニズム：分泌型 Klotho の役割  
分担研究者 田中弘之 高岩正典 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児医科学

研究要旨：

体液中のリン濃度はビタミン D の活性化に重要な因子である。リンの制限によるビタミン D 活性化のメカニズムを明らかにする目的で、腎臓における Klotho 蛋白の発現とその作用について検討した。その結果、従来生理活性を有しないとされてきた分泌型 Klotho が低リン環境におけるビタミン D 活性化の亢進に関与していることが明らかとなった。

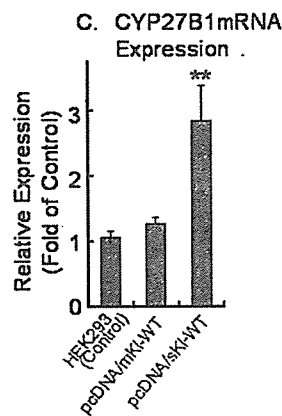
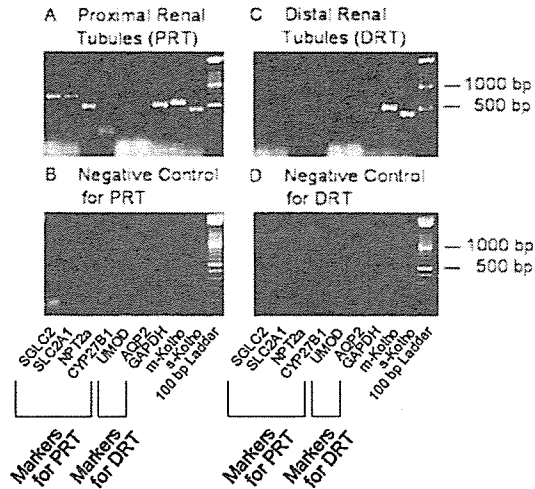
A. 目的：リンの摂取制限によって血中の 1,25 水酸化ビタミン D 濃度が上昇することは良く知られた事実であるが、このメカニズムの詳細は明らかではない。一方、klotho 蛋白が  $1\alpha$  水酸化酵素活性の調節に重要な役割を果たしていることも良く知られている。最近 klotho 蛋白がリン利尿因子である FGF23 と FGFR1 の cofactor として作用することが示され腎におけるリン代謝と klotho の関係も次第に明らかになってきた。そこで、リン制限による  $1\alpha$  水酸化の亢進のメカニズムと klotho 蛋白の関連について検討を行った。

B. 方法：野生型マウスの腎を用い klotho 蛋白の腎における局在を免疫組織化学、単離尿細管を用いた RT-PCR により検討した。さらに、マウスを 10 日間リ

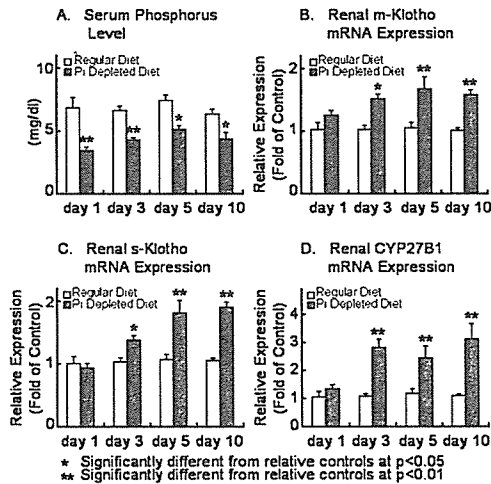
ン制限食にて飼育したのち腎における CYP27B1 ( $1\alpha$  水酸化酵素)、膜型 klotho、分泌型 klotho の遺伝子発現、蛋白発現の変化について RT-PCR、Western blotting にて解析した。さらに、HEK293 細胞に膜型および分泌型 klotho を強制発現、もしくは蛋白の添加を行い CYP27B1 遺伝子の発現変化を検討した。

C. 結果：

野生型マウス腎における klotho 蛋白の分布  
従来より報告されているように遠位尿細管において klotho 遺伝子の発現、蛋白の発現が観察されたが、図 1 に示すように近位尿細管においても、膜型 分泌型の klotho 遺伝子の発現が観察された。

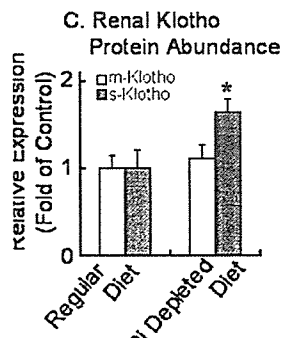


リン制限食の影響 (図 2)  
 マウスをリン制限食で飼育すると食事制限 1 日で低リン血症を発症し、この低リン血症は 10 日間の制限食摂取期間中維持された。この低リン血症に呼応して 膜型、分泌型 klotho の腎における発現量の



増加が示された。しかし、膜型と分泌型を識別できる抗体を用い検討したところ、低リンによる klotho 蛋白の増加は分泌型にのみ観察された (図 3)

低  
 刺



リン  
 激に

よって増加した分泌型 klotho 蛋白の作用 HEK293 細胞に膜型または分泌型 klotho を強制発現させたところ分泌型の強制発現においてのみ CYP27B1 の発現の亢進が観察された。培養液に遺伝子組換え分泌型 klotho 蛋白を添加しても同様の CYP27B1 の発現亢進が観察された。

#### D. 考察

Klotho 遺伝子の発現が遠位尿細管に限局しているとのこれまでの報告は生体のリンの調節メカニズムを考察する際に大きな障害であったが、今回の検討により発現量の差こそあれ有意な遺伝子発現がリン再吸収、ビタミン D1 $\alpha$  水酸化の場である近位尿細管に同定されたことの意義は大きい。



また、従来生理活性について疑問視されていた分泌型 klotho 蛋白が、ビタミン D1  $\alpha$  水酸化酵素活性の正の調節因子であることの発見の意義も大きく、低リン血症とビタミン D 活性化亢進のメカニズムの一端を明らかにできた。

しかし、FGF23 と FGFR1、膜型 Klotho による細胞内シグナルはリン利尿、ビタミン D 活性化の抑制に働くものであり、今回の結果とは全く異なる。この違いがいかなる原因で生じるかは明らかではないが、今後各 klotho 蛋白の極性の検討を行うことによって解明していきたいと考える。

#### E. 結論

低リン食刺激によるビタミン D1  $\alpha$  水酸化の亢進メカニズムの一部には分泌型 Klotho 蛋白の増加が関与している。

F. 健康危険情報：特になし

G. 研究発表

学会発表

Takaiwa et al. The Stimulatory Effects of Phosphate Depletion on 25-Hydroxyvitamin D-1  $\alpha$ -Hydroxylase (Cyp27b1) Expression Are Modulated by the Secreted Form of Klotho Protein. 28<sup>th</sup> ASMBR annual meeting, Philadelphia.

Tanaka H et al. Urinary Excretions of NTx and CTx Are Useful Markers for the Prognosis of the Patients with Osteogenesis Imperfecta. 28<sup>th</sup> ASMBR annual meeting, Philadelphia.

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。一部の FGF23 蛋白は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。実際高リン血症を特徴とする家族性高リン血症性腫瘍状石灰化症の原因遺伝子として、*FGF23* と *GALNT3* が同定された。しかし *GALNT3* 遺伝子変異が高リン血症を惹起する機序は不明であった。そこで *GALNT3* 遺伝子変異を有する患者の病態の検討から、本症患者では FGF23 蛋白のプロセッシングが亢進し、全長 FGF23 が減少することが明らかとなった。さらに *in vitro* の検討により、*GALNT3* 遺伝子産物は FGF23 蛋白を糖化することにより、プロセッシングを阻害することが明らかとなった。これらの成績は、FGF23 がリン代謝に必須の因子であ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)、常染色体劣性低リン血症性くる病/骨軟化症 (autosomal recessive hypophosphatemic rickets/osteomalacia: ARHR) 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、XLH や ARHR、TIO 患者においても 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。実際家族性高リン血症性腫瘍状石灰化症の原因遺伝子として、*FGF23* と *GALNT3* が同定された。しかし *GALNT3* 遺伝子変異が高リン血症を惹起する機序は不明である。そこで *GALNT3* 遺伝子産物と FGF23 との関連を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

*GALNT3* 遺伝子変異による高リン血症性腫瘍状石灰化症患者の血中 FGF23 濃度を測定する

と共に、*GALNT3* 遺伝子産物の FGF23 蛋白プロセッシングに及ぼす効果を *in vitro* で検討した。

(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

検討した腫瘍状石灰化症患者の血中には、全長 FGF23 は殆ど存在しないのに対し、プロセッシングを受けた後の C 端フラグメントは著明に増加していることが明らかとなった。これらの結果は、本患者では FGF23 のプロセッシングと産生が亢進していることを示唆している。また *in vitro* で FGF23 を発現させる実験から、*GALNT3* 遺伝子産物は FGF23 蛋白に糖鎖を付加することにより、FGF23 蛋白プロセッシングを阻害する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。また *FGF23* 遺伝子変異により、高リン血症性腫瘍状石灰化症が惹起されることも明らかにされていた。*FGF23* 遺伝子変異による腫瘍状石灰化症患者でも、FGF23 蛋白のプロセッシングの亢進が報告されている。従って *FGF23* と *GALNT3* 遺伝子変異は、いずれも全長 FGF23 を

減少させるという共通の機序により、同様の病態を惹起するものと考えられた。これらの成績は、*FGF23* ノックアウトマウスの特徴と合わせ、*FGF23* のリン代謝調節における重要性を示している。

#### E. 結論

*FGF23* はリン代謝の維持に必須の、生理的リン調節因子であ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) Urakawa I et al.: Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for *FGF23*. *Nature* 444(7120): 770-774, 2006
- 2) Frishberg Y et al.: Hyperostosis - hyperphosphatemia syndrome: A congenital

disorder of O-glycosylation associated with augmented processing of fibroblast growth factor 23. *J Bone Miner Res* 27(2): 235-242, 2007

3) Fukumoto S et al.: *FGF23* is a hormone regulating phosphate metabolism -Unique biological characteristics of *FGF23*-. *Bone* in press

#### 2. 学会発表

- 1) Ito N et al.: O-Linked glycosylation by ppGalTase-T3 prevents processing of fibroblast growth factor (*FGF*)23. Twenty-Eighth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Philadelphia, USA) *J Bone Miner Res* 21(S1): S90, 2006

#### H. 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

TSH レセプター (TSHR) 異常症の病態に関する研究  
＝糖代謝と甲状腺機能＝

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

A. 研究目的:

ヒト TSHR 異常症は稀な疾患であり、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や骨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<sup>hyt/hyt</sup> マウスは TSHR に遺伝子変異を有しその機能を喪失したモデル動物であるが、飼育中多尿傾向を認めたため、本マウスの病態を糖代謝を中心に検討しヒト TSHR 異常症の病態及び適切な治療法の確立を目的とする。

B. 研究方法

C. RF -Tshr<sup>hyt</sup> マウス (heterozygote mice) はチャールズリバー社より入手した。Tshr<sup>hyt/hyt</sup> マウス (homozygote mice)、および Tshr<sup>-/-</sup> マウス (wild mice) は Tshr<sup>hyt</sup> マウス (heterozygote mice) の交配により作成した。甲状腺機能低下症の対象として wild mice をネンブター麻酔下に甲状腺摘除術を行い作成した (thyroidectomized mice)。

膵島β細胞のインスリン、PDX-1 の免疫染色はそれぞれ抗ヒツジインスリン抗 (Sigma 社)、抗ヒト PDX-1 抗体 (大阪大学、博士より供与) を使用して実施した。

マウスの血糖はフリースタイル測定機 (ニプロ社) にて、血中インスリンは ELISA (森永社) を用いて行った。

C. 研究結果

1 Tshr/hyt マウスのフェノタイプと甲状腺機能および免疫組織学的検討

TSHR が機能しない Tshr<sup>hyt/hyt</sup> マウスの血中 freeT4 は  $0.10 \pm 0.04$  ng/dl, 甲状腺摘除マウス、wild マウスのそれは、それぞれ  $0.57 \pm 0.24$ 、 $1.47 \pm 0.24$  ng/dl であり、Tshr<sup>hyt/hyt</sup> マウスは重症甲状腺機能低下症を、甲状腺摘除マウスは中等度の甲状腺機能低下症を発症していた (表1)。

これらマウスの膵の組織学的検討を行ったところ、Tshr<sup>hyt/hyt</sup> マウスの外分泌組織は著明に変性しており、甲状腺摘除マウスでも軽度変性が認められた。さらに膵島β細胞中のインスリン含量を免疫組織学的に検討した結果、Tshr<sup>hyt/hyt</sup> マウスでは著明に減少しており、甲状腺摘

除マウスでも明らかに減少が認められた。次にインスリン遺伝子発現のマスター転写因子である PDX-1 の発現を同様に免疫組織学的的に検討した。PDX-1 は Tshr<sup>hyt/hyt</sup> マウスでは著明に、甲状腺摘除マウスで

は中等度に低下していた (表 1)。以上より、甲状腺機能低下症では、その重症度に比例してインスリンの発現が低下し、これは PDX-1 を介して抑制を受けている可能性が示唆された。

表 1

n = 7	Free T4 (ng/dl)	Insulin immunoreactivity	PDX-1 immunoreactivity
wild mice	1.47 ± 0.24	++++	+++
Tshr <sup>hyt/hyt</sup> mice	0.10 ± 0.04	+	+
thyroidectomized mice	0.57 ± 0.24	++	++

2 Tshr/hyt マウスのフェノタイプと耐糖能 Tshr<sup>hyt/hyt</sup> マウス、甲状腺摘除マウス、wild マウスに 2 mg/g body weight のブドウ糖を腹腔内に投与し、その耐糖能を調べた。表 2 に示すように、Tshr<sup>hyt/hyt</sup> マウスはブドウ糖負荷前は wild マウスとほ

ぼ同程度の血糖値であったが、負荷後は著明な高血糖を示した。血中インスリンは wild マウスに比し負荷後分泌不全を認めた。甲状腺摘除マウスの負荷後の血糖も高値であり、血中インスリンの低下を認められた。

表 2

	Before glucose (mg/dl) (insulin (pg/ml))	After (60 min) glucose (mg/dl) (insulin (pg/ml))
wild mice (n=7)	98 ± 16 (154 ± 28)	160 ± 17 (1496 ± 316)
Tshr <sup>hyt/hyt</sup> mice (n=5)	93 ± 7 (128 ± 10)	398 ± 73 (344 ± 62)
thyroidectomized mice (n=5)	68 ± 5 (122 ± 27)	396 ± 73 (288 ± 99)

#### D. 考察

今回、TSHR の遺伝子異常を有し甲状腺機能低下症を発症する Tshr<sup>hyt/hyt</sup> マウスに顕著な耐糖能障害が存在することが判明

した。

従来、甲状腺機能低下症は低血糖の危険因子と考えられて来たが、低T4血症では PDX-1 の発現が低下しβ細胞中のインスリン量も低下することより、高血糖、糖尿病の危険因子と考えるべき結果であった。事実、臨床的にも甲状腺機能低下症患者で原因不明にケトアシドーシスを発症することが知られており、このような病態によることが推定される。

一方、マウス膵臓にも TSHR が発現しており（未発表データ）、β細胞中のインスリン量の低下も TSHR 異常による可能性も完全には否定しえないが、インスリン量の低下／耐糖能障害は甲状腺摘除マウスでも観察され、むしろ甲状腺ホルモンの低下による効果と考えるべきである。しかし、今後 TSHR 異常の影響についてもさらに検討すべきと思われる。

#### E. 結論

TSHR の遺伝子異常を有し甲状腺機能低下症を発症する  $Tshr^{hyt/hyt}$  マウスには顕著な耐糖能障害が合併する。ヒト TSHR 異常症患者の耐糖能障害についても詳細に検討すべきと考えられた。

#### G. 研究発表

1 Endo T. Thyrotropin receptor--structure, autoantibody and signal transduction  
Nippon Rinsho. 2006  
Dec;64(12):2203-7.

2 Shimura H, Endo T, Kobayashi T.  
EMO syndrome Nippon Rinsho. 2006,  
28::311-5

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服事業）

分担研究報告書

日本人クレチン症における TSH 受容体遺伝子解析の意義

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：

先天性甲状腺機能低下症（クレチン症）の頻度は、およそ出生 3,000～4,000 人に 1 人とされ、原因は甲状腺の発生異常、あるいはホルモン合成障害による。ホルモン合成障害によるクレチン症は、全体のおよそ 10%程度を占めるにすぎず、約 85%を占める甲状腺の発生異常（無形成、異所性、および低形成）の原因検索は重要である。しかしながら、人種による発生頻度の差異および女児に高頻度であることが知られているが 2%ほどに家族集積性を認めるに過ぎない。我々は TSH 受容体遺伝子異常症が日本人に比較的高頻度であり、特に R450H 変異が日本人に特有であることを報告した。クレチン症の分子遺伝学的病型分類（鑑別診断のためのチャート作成）を進めるにあたり、TSH 受容体遺伝子解析はその中心に位置し、疾患の原因探索とともに管理・治療指針さらに遺伝相談に大きく寄与すると考えられた。

A. 研究目的

先天性甲状腺機能低下症（クレチン症）の約 85%を占める甲状腺の発生異常（無形成、異所性、および低形成）の遺伝的背景は未解決である。その一つの原因である TSH 受容体遺伝子異常症は常染色体劣性遺伝形式をとる稀な疾患単位と考えられていたが、日本人では比較的高頻度であり、特に R450H 変異が日本人に特有であることを見

出した。日本人におけるクレチン症原因遺伝子の

検討をおこない、クレチン症の鑑別診断のためのチャートを作成する。

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 26 家系を対象とした。インフォームドコンセントを得た後に TSH 受容体遺伝子および PAX8 遺伝子（甲状腺の発生異常、

常染色体優性遺伝形式)の解析を行なった。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。二つの遺伝子変異および甲状腺発生異常の原因遺伝子について国内外の報告・文献的再調査を行った。

### C. 研究結果

現在までに, 海外から約20家系のTSH受容体遺伝子異常症の家系が報告されているが, その変異部位は様々であった。わが国におけるTSH受容体遺伝子異常症は14家系, 8ヶ所の遺伝子変異が同定されているが一部の例外はあるもののR450H変異が共通であった。その遺伝子型-表現型に一定の関係はないものの, クレチン症としては比較的軽症(中には高TSH血症として管理)であった。一方, PAX8遺伝子変異(R31H)を一家系に同定したが, この部位は既報の部位と同一であった。PAX8遺伝子異常症の頻度はTSH受容体遺伝子異常症よりも低頻度であるが, 両者に日本人に高頻度である変異を確認した。

### D. 考察

クレチン症の約85%を占める甲状腺発生異常における分子遺伝学的アプローチを行う上で, TSH受容体遺伝子異常症は重要な位置に存在する。およそ出生3,000~4,000人に1人とされるクレチン症は決して稀な疾患ではない。クレチン症の鑑別診断のためのチャートを作成する上で, 日本人に特有な遺伝子変異(TSH受容体遺伝子異常R450H, PAX8遺伝子異常R31H等)をスクリーニングするアプローチは有用である。

### E. 結論

甲状腺発生異常によるクレチン症は, その多くが散発例であり原因検索は容易ではない。しかしながら, 日本人に特有の遺伝子変異からスクリーニングすることにより原因にアプローチ可能である。本研究はクレチン症の鑑別診断のためのチャートに大きく寄与する。

### F. 研究発表(学会発表)

教育講演 「天性甲状腺機能低下症の遺伝学」第16回臨床内分泌代謝: Update 金沢, 2006.

High prevalence of R450H TSH receptor gene mutation in Japanese patients with congenital hypothyroidism who have hypoplastic or normally sized gland in the proper position. The 6<sup>th</sup> meeting of international society for neonatal screening. Awaji, 2006.



厚生労働科学研究費補助金 (特定疾患対策 研究事業)  
分担 研究報告書

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  $\beta$  遺伝子転写抑制における pit 1 の役割

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：

甲状腺ホルモン不応症は甲状腺ホルモン作用機構異常で生じ、その病態の中心は不適切 TSH 分泌 (SITSH) である。TSH は T3 の結合した甲状腺ホルモン受容体 (TR) により転写が抑制されるが、分子生物学的機構は長らくまったく未解決であった。我々は、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  $\beta$  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、得られた実験結果から次のようなモデルを考えている。TSH  $\beta$  遺伝子の活性化因子は GATA2 であり、活性化には TRAP220 複合体が重要な役割を果たしている。主体となる TR は  $\beta 2$  であり、TR  $\beta 2$  は DNA でなく GATA2 複合体と結合している。TR  $\beta 2$  に T3 が結合すると、HDAC3 が呼び込まれる。ヒストンの脱アセチルが生じクロマチン構造が変化、TRAP220 が GATA2 から解離する。この結果、転写は抑制される。

活性化因子は GATA2 であるが、TSH  $\beta$  遺伝子プロモーターの活性化には pit 1 の存在が不可欠である。今回 Pit 1 の果たしている役割について検討を行った。

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  $\beta$  遺伝子の転写抑制機構を検討してきた。サル腎臓由来 CV1 細胞に、下垂体特異的転写因子 Pit1 および GATA2 を発現させると TSH 遺伝子が発現され、T3/TR によって抑制される。これまでの結果から、TSH  $\beta$  遺伝子の活性化因子は GATA2 であることが明らかとなったが、pit 1 の存在が必須である。今回、pit 1 の果たす役割につき検討した。

B. 研究方法

CV1 細胞に pit 1、GATA2、TSH  $\beta$  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 活性を測定することで、TSH  $\beta$  遺伝子の転写活性を求めた。TSH  $\beta$  遺伝子のプロモーター領域

に種々の変異を導入したレポーター遺伝子を作成した。

(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 Pit1、GATA2 を発現させると、導入した TSH  $\beta$  遺伝子を発現させることが出来る。2つの転写因子の作用を調べるため、プロモーター領域に種々の変異を加えたレポーター遺伝子を作り検討する中で、-82/-52 の配列を欠失させると GATA2 単独でも基礎転写活性が著明に上昇し、Pit 1 は必要なくなることを発見した。TR は T3 依存性にこの転写活性を抑制した。このことから① TSH  $\beta$  遺伝子の活性化因子は GATA2 であり、②-82/-52 の配列には GATA2 の活性化作用を阻害するなんらかの抑制因子が存在すると考えられた。この抑制領域 (SR と命名) は

逆向きに配置しても、あるいは pit 1 結合領域のさらに上流に位置させても同様の作用を示し、TATA box からの距離、方向性には無関係に機能することが確認された。

SR の必須領域を同定するため種々の変異を導入して検討した結果、-82/-73 の 9 塩基を欠失させると活性が著しく上昇した。SR の必須領域にこの領域が含まれると考えられる。

Pit 1 と GATA2 の連関を調べると、pit 1 は GATA2 の亜鉛フィンガー領域と結合する。両者の結合部位を 8 塩基まで解離させても構造的な連結は可能であったが、機能的には活性が失われ、TSH  $\beta$  遺伝子上で両者の配置が重要であることが示された。また CBP との結合能がない変異 pit 1 では GATA2 の活性化作用が発揮されず、CBP が関与することが分かった。

正常 TSH  $\beta$  プロモーターでは、GATA2 の活性化作用は pit 1 の用量依存性に増加するが、SR 領域欠失レポーター遺伝子では pit 1 に依存しない。また pit 1 を過剰発現させると T3/TR による転写抑制が減弱した。さらに SR 領域をプローブとし CV1 細胞、下垂体 T $\alpha$ T1 細胞の抽出液とゲルシフトを行うと、SR に特異的に結合する蛋白が存在することが証明された。

#### D. 考察

これまで得た T3/TR による TSH  $\beta$  遺伝子抑制機序に関する成績は次のようになる。① TSH 制御の主体な受容体は TR  $\beta$  2 である。② TSH  $\beta$  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 negative TRE 領域は必要でない。③ TR 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。④ T3 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。⑤ TRAP220 が T3/TR による転写抑制に重要な働きをしている。⑥ GATA2 結合領域に隣接する約 30 塩基配列、なかでも -82/-73 の 9 塩基配列になんらかの抑制蛋白が結合する。

今回 TSH  $\beta$  遺伝子転写制御における pit 1 の作用を検討した。Pit 1 は GATA2 と複合体を形成することで GATA2 を安定化させ、SR 領域に結合している抑制蛋白あるいは T3/TR

からの阻害作用から、GATA2 を保護しているものと考えられた。

#### E. 結論

Pit 1 の役割は GATA2 と複合体を形成し、GATA2 の機能を安定化することである。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Matsushita A, Sasaki S, Kashiwabara Y, Nagayama K, Ohba K, Iwaki H, Misawa H, Ishizuka K, Nakamura H: Essential role of GATA2 in the negative regulation of thyrotropin beta gene by thyroid hormone and its receptors. Mol Endocrinol. 2007 Jan 23; [Epub ahead of print].

中村浩淑：甲状腺ホルモン不応症. 別冊日本臨牀 内分泌症候群 1 : 516-518, 2006.

松下明生、中村浩淑：下垂体性甲状腺機能低下症. 別冊日本臨牀 内分泌症候群 1 : 340-343, 2006.

佐々木茂和 川合弘太郎、本城裕美子、中村浩淑：甲状腺ホルモンと脂質代謝 日本臨床 64(12) : 2323-2329, 2006

##### 2. 学会発表

Sasaki S., Nakamura H. : The functions of Pit1 for the GATA2-dependent transactivation in the thyrotropin promoter. Annual meeting of American Thyroid Association. 2006 年 10 月. (Phoenix, Arizona)

甲状腺ホルモンによる TSH  $\beta$  鎖遺伝子の負の調節に関わる因子の検討. (松下明生、中村浩淑 他) 第 79 回日本内分泌学会総会. 2006 年 5 月 (日本内分泌学会雑誌 82 (1) : 100, 2006 Abst #12)

GATA2 による Pit1 遺伝子プロモーターの活

性化と T3 依存性の転写抑制作用. (佐々木茂和、中村浩淑 他) 第 79 回日本内分泌学会総会. 2006 年 5 月 (日本内分泌学会雑誌 82 (1): 133, 2006 Abst #P42)

皮膚線維芽細胞を用いた甲状腺ホルモン依存性転写活性測定系の開発: 甲状腺ホルモン不応症診断への応用. (大場健司、中村浩淑 他) 第 79 回日本内分泌学会総会. 2006 年 5 月 (日本内分泌学会雑誌 82 (1): 134, 2006 Abst #P46)

T3 受容体に遺伝子異常を認めない甲状腺ホルモン不応症の皮膚線維芽細胞を用いた解析. (大場健司、中村浩淑 他) 第 49 回日本甲状腺学会総会 2006 年 11 月 (日本内分泌学会雑誌 82 (2): 293, 2006 Abst #SS7-2)

TSH  $\beta$  遺伝子の発現制御における甲状腺ホルモン/エストロゲン系のクロストーク (長山浩士、中村浩淑 他) 第 49 回日本甲状腺学会総会 2006 年 11 月 (日本内分泌学会雑誌 82 (2): 293, 2006 Abst #SS7-7)

家系内発症を認めた甲状腺ホルモン不応症の 2 例. (松永英之、中村浩淑 他) 第 49 回日本甲状腺学会総会 2006 年 11 月 (日本内分泌学会雑誌 82 (2): 282, 2006 Abst #YIA4)

甲状腺ホルモンとその受容体は転写因子 GATA2 を介し、Pit1 ならびに TSH  $\beta$  の両遺伝子プロモーターの活性を抑制する. (佐々木茂和、中村浩淑 他) 第 49 回日本甲状腺学会総会 2006 年 11 月 (日本内分泌学会雑誌 82 (2): 295, 2006 Abst #6)

#### 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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

平成18年度分担研究報告書

甲状腺ホルモン不応症（RTH）における下垂体前葉ホルモン遺伝子発現の解析

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 教授

研究要旨 我々は、甲状腺ホルモン（TH）不応症（RTH）の病態解明を目的として、THレセプター（TR） $\beta$ 変異を生理的に発現するTR $\beta$ （ $\Delta$ 337T）ノックイン（TRKI）マウスを解析しているが、昨年度はTRKIマウスのコレステロール代謝について解析を行った。今までRTHにおける下垂体甲状腺系の解析は国内外において精力的に行われて来たが、その他の下垂体前葉系ホルモンについては血中濃度、遺伝子発現などを含め殆ど不明である。今回我々はRTHのモデルマウスであるTRKIマウスを用いて、RTHにおける下垂体前葉系ホルモン遺伝子発現を解析した。

Thyrotropin (TSH)遺伝子では $\alpha$ 、 $\beta$ とも野生型に比して、ヘテロ体で遺伝子発現が増加し、ホモ体で更なる増加を認めた。免疫染色の所見と併せてTSH不適切分泌（SITSH）に合致するものと考えられた。プロラクチン(PRL)、成長ホルモン(GH)はホモ体でのみ遺伝子発現の減少を認めた。ACTH（POMC）遺伝子はホモ体のみならずヘテロ体においてもその発現の減弱を認めた。一方、性ホルモンを規定するLH、FSHには大きな変化を認めなかった。さらにTRH欠損TRKIマウス（KOKIマウス）の解析ではTR $\beta$   $\Delta$ 337T変異体はTRH非存在下でもSITSHを引き起こすと考えられた。一方TSHには閾値があり、一定の値からは末梢のTH値に影響しないことが示唆された。このように本研究により今まで不明であった、RTHにおけるTSH以外の下垂体前葉ホルモン遺伝子発現、およびTRHのTSHの制御に関する役割が明らかとなった。