

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19年度 研究報告書

主任研究者 松本 俊夫

平成 20 年 3 月

I. 序 文

序 文

「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」は長い伝統を持ち、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。平成 17 年に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、最終年度のまとめをするに至りました。

平成 19 年度も副甲状腺分科会と甲状腺分科会が、前者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を中心として、後者は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、多角的な研究を展開してきました。その結果、副甲状腺分科会では分泌低下型副甲状腺機能低下症の鑑別診断指針を改訂し、リン代謝異常症における血中 FGF23 濃度による FGF23 異常症の診断指針を策定し論文発表したほか、偽性副甲状腺機能低下症 Ib 型における GNAS 遺伝子転写制御機構の解明、ビタミン D 受容体を介する負の転写制御系を解明した。また甲状腺分科会では TSH 受容体遺伝子異常の遺伝子診断とクレチン症の鑑別指針の検討を進めると共に、バセドウ病による甲状腺クリーゼの診断基準を策定し、バセドウ病眼症の診断・治療指針の策定に向けた検討を開始した。また甲状腺ホルモン不応症における甲状腺ホルモン受容体を介する転写制御機構の解明を進めるなど、多くの新しい成果が得られました。

貴重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、深謝致しますと共に、厚生労働省健康局疾病対策課からの暖かいご指導ならびにご支援に対し厚く御礼を申し上げます。

ここに、平成 19 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 20 年 3 月

松本 俊夫

目 次

I.	序文	
II.	平成 19 年度総括研究報告書	1
III.	平成 19 年度分担研究報告	
1.	副甲状腺機能低下症の診断指針の策定について	9
	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部	松本 俊夫 遠藤 逸朗
	東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科	福本 誠二
2.	FGF23 作用過剰による低リン血症性疾患の診断指針の策定について	11
	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部	松本 俊夫 遠藤 逸朗
	東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科	福本 誠二
3.	血清カルシウム・リン維持機構に関する研究	13
	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 難波 範行
4.	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抗体の関与に関する研究	18
	島根大学医学部内分泌代謝・血液腫瘍内科	杉本 利嗣 山内 美香
5.	偽性副甲状腺機能低下症の病因・病態解析	22
	千葉大学大学院医学研究院小児病態学	皆川 真規
6.	副甲状腺ホルモンの作用機序に関する研究	26
	帝京大学ちば総合医療センター第三内科	井上 大輔
7.	ビタミン D 受容体を介した遺伝子発現調節機構の解明	30
	東京大学分子細胞生物学研究所	加藤 茂明
8.	リガンド特異的なビタミン D 受容体活性化機構の解析	37
	日本大学医学部生化学	槇島 誠

9. 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	40
大阪府立母子保健総合医療センター研究所	道上 敏美
10. 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	43
東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科	福本 誠二
11. TSH レセプター (TSHR) 異常症の病態に関する研究	44
= 甲状腺外 TSHR の熱産生に関する検討 =	
山梨大学大学院医学工学総合研究部	遠藤 登代志
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	46
甲状腺ホルモン受容体 β の DNA 結合領域の変異による不応症発症の可能性	
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) における Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) 作用の解析	49
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 と甲状腺ホルモン不応症発症 機序に関する研究	53
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	56
—バセドウ病眼症の疾患感受性遺伝子の検索—	
久留米大学医学部内分泌代謝内科	廣松 雄治
19. 甲状腺クリーゼの全国疫学調査に向けての同診断基準作成	60
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	65
V. 班構成員名簿	91

II. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

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とその関連疾患（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研究を遂行した。

分担研究者

赤水 尚史
京都大学医学部附属病院
探索医療センター教授
井上 大輔
帝京大学ちば総合医療センター
第三内科講師
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
岡山済生会病院小児科
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講師
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

- ・分泌低下型副甲状腺機能低下症のうち新たな遺伝子異常に基づくものなど原因が明らかとなった疾患を鑑別するための診断指針を策定した (図 1, 2)。

- ・分泌低下型副甲状腺機能低下症のうちカルシウム感知受容体 (CaSR) 遺伝子の活性化変異に起因し治療が困難な常染色体優性低カルシウム血症 (ADH) 患者の臨床的鑑別法を見いだすため調査を行い、血清 Mg 濃度も ADH 患者では活性型ビタミン D 治療の有無に拘わらず低値であり、治療

前値が 1.7 mg/dl 以下の場合には ADH の可能性が高いことを示した。

- ・偽性副甲状腺機能低下症 Ia 型では低身長となるが Ib 型ではこれらの身体徴候を呈さないと考えられてきた。しかし、Ib 型でも女性では全く成長パターンに異常がないものの男性では成人で低身長傾向となることが示された。

- ・特発性副甲状腺機能低下症 (IHP) 孤発例について抗 CaSR 抗体測定法を確立し、その存在を検討した結果、刺激性抗 CaSR 抗体は認められず、他の原因による可能性が考えられた。

2) ビタミン D 抵抗性くる病 (VDDR II) およびその類縁疾患

- ・低リン血症性くる病・骨軟化症患者において、血中 FGF23 濃度を用いた FGF23 異常症の診断指針を策定した (図 3)。

- ・生理的な血清リン濃度調節因子としての重要性が明らかとなった FGF23 の分泌調節機構を明らかにするため、急性の血清リン濃度の変化が血中 FGF23 濃度に及ぼす影響を検討し、リン濃度の変化後 6 時間以内には血中 FGF23 濃度は変化しないことを示した。

- ・FGF23 が FGF 受容体 I 型と共に Klotho 蛋白を共受容体として作用を発揮することを明らかにし、FGF23 欠損と Klotho 欠損との間で多くの表現型に類似性があることの機序を明らかにした。

- ・ 1α 水酸化酵素遺伝子プロモーター上の E-box 型ビタミン D 受容体 (VDR) 転写抑制エレメント (nVDRE) と結合する転写因子

VDIR を同定した。更にビタミン D による転写抑制因子複合体中に DNA メチル化酵素が、PTH によりリクルートされる転写共役因子複合体中に DNA 脱メチル化酵素が存在することを示し、ビタミン D 依存的な転写抑制機構を解明した。

3) TSH 受容体 (抗体) 異常症

・バセドウ病による甲状腺クリーゼのわが国で初めての診断基準を策定した (表 1)。この診断基準に基づいた全国疫学調査に向け、調査組織の構築などを進めた。

・バセドウ眼症の診断・治療指針の策定に向けて小委員会を組織し、検討を開始した。

・バセドウ病眼症と各種の免疫制御系遺伝子多型との関連性を検討し、NF κ B 遺伝子 94delATTG 多型と眼症との間に有意な関連を見いだした。

・TSH 受容体異常症 (P556L) のモデルである hyt マウスを用い、褐色脂肪組織に野生型 TSH 受容体を強制発現させることにより低温環境でも体温低下が阻止されることを示し、褐色脂肪組織において TSH が直接体温保持に関与することを示した。

4) 甲状腺ホルモン不応症 (RTH)

・TRH 欠損マウスと RTH のモデル動物である変異 TR β (Δ 337T) ノックインマウスを交配させたマウスを用い、TSH 遺伝子発現および分泌制御への TRH の影響を検討した。TR β (Δ 337T) 変異体では TR β 欠損と異なり TRH 非存在下でも過剰の TSH 遺伝子発現および分泌を示すことから、変異 TR β は TRH に関わらず TSH 不適

切分泌を来すことが明らかとなった。

・TR β (G182E) 変異が T3 による TSH β 遺伝子の負の転写制御に対しドミナントネガティブ作用を発揮し TSH 不適切分泌を来すことを見だし、新たな RTH 発症に関与する可能性を示した。

・TR β の non-genomic 作用による PI-3K \rightarrow PKB/Akt 活性化シグナルを同定し、このカスケード活性化の障害が RTH の中枢神経症状の発症に関与する可能性を示した。

D. 考察

1) 偽性副甲状腺機能低下症 (PHP) と関連疾患

近年、副甲状腺機能低下症の原因に関わる遺伝子異常が次々に明らかにされ、分泌低下型副甲状腺機能低下症から続発性副甲状腺機能低下症を除外した全てを特発性副甲状腺機能低下症と総称することに多くの問題が生じてきた。本研究班により、新たに分泌低下型副甲状腺機能低下症の詳細な分類と鑑別指針が策定されたことは、本症の臨床的体系づけを進める上で重要な一歩といえる。

組織特異的なインプリンティング異常によると考えられ低身長などの身体徴候は有しないとされてきた偽性副甲状腺機能低下症 1b 型において、男性では低身長傾向が認められたことから、本症におけるインプリンティング異常の解明と合わせ今後更に検討を進める必要がある。

CaSR 遺伝子の活性化変異による ADH あるいは CaSR 刺激性自己抗体による副甲状腺機能低下症は、何れもビタミン D 治療

に対する反応性が他の分泌低下型副甲状腺機能低下症と異なり高カルシウム血症や腎機能障害を来しやすいことから、簡便な鑑別診断法の開発は重要な臨床的課題である。今後低 Mg 血症と CaSR 異常との関係を更に詳細に検討し、鑑別診断への応用の可能性を検討する必要がある。

2) ビタミン D 抵抗性くる病 (VDDR II) およびその類縁疾患

血中 FGF23 値の測定により、低リン血症性くる病・骨軟化症が FGF23 異常症によりもたらされるかそれ以外の原因に基づくかが明確に鑑別できることを明らかにしたことは今後の治療法の開発などを進める上で重要な成果と考えられる。今後は FGF23 濃度測定の保険適用とその普及をはかる必要がある。

VDR を介する負の転写調節機構にこれまで不可逆的変化と考えられてきた DNA メチル化が関与すること、さらに脱メチル化により可逆的に転写促進がもたらされることが明らかにされたことは、遺伝子の転写調節における新たな制御機構の存在を示すものであり、画期的な成果であるといえる。

3) TSH 受容体 (抗体) 異常症

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、適切な診断基準を確立した上で、患者実態を把握しこれに基づき適切な治療指針を策定する必要がある。今年度初めて診断基準が策定されたことにより、今後は全国調査に向けた準備を進める必要がある。

4) 甲状腺ホルモン不応症 (RTH)

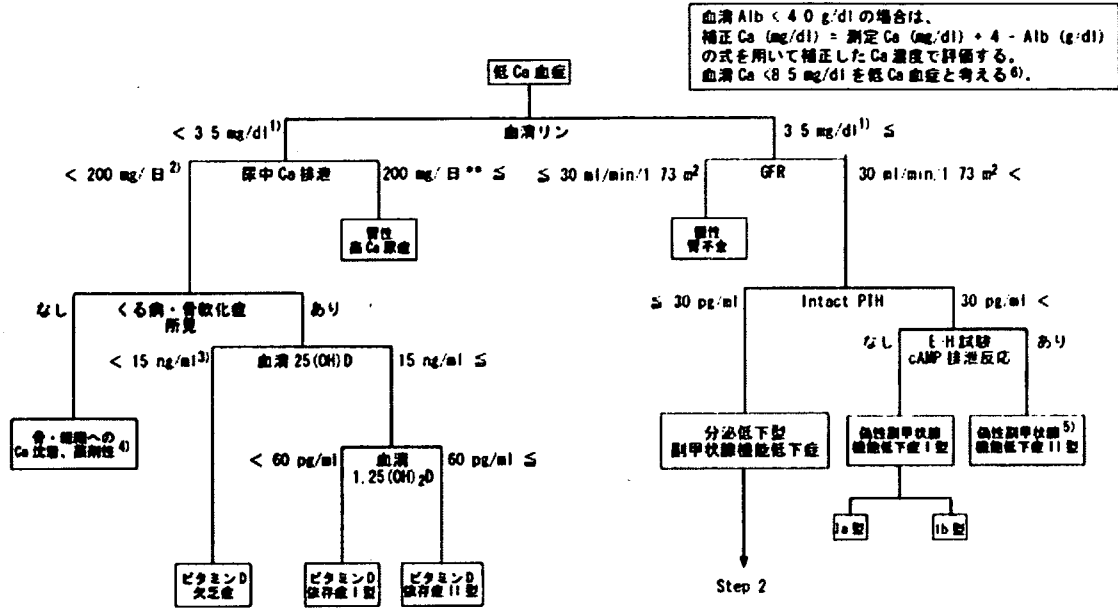
甲状腺ホルモン不応症の病態は多様であり、変異 TR の機能に関する解析は充分進んでいるとは言い難い。T3/TR による TSH 遺伝子転写抑制機構の解明やモデル動物における病態の解析は、RTH の治療のみならず広く甲状腺ホルモン作用異常症の治療にも貢献し得るものと考えられる。

E. 結論

分泌低下型副甲状腺機能低下症の分類と鑑別診断法の策定により、これらの病態の疾患概念の理解が進むと共に適切な治療法の選択にも貢献しうるものと考えられる。

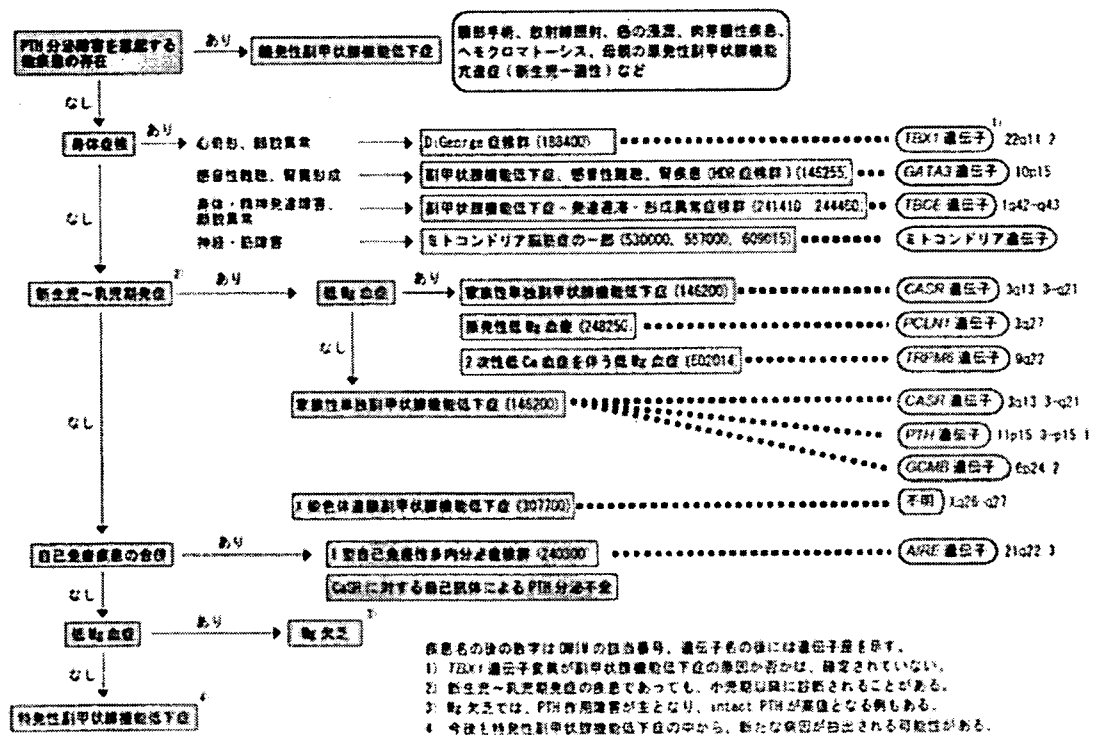
副甲状腺ホルモンおよび甲状腺ホルモンや、ビタミン D 更にはリン代謝調節に関わる新しい因子 FGF23 などのホルモン受容体シグナルの解析とその不全状態・抵抗性病態の分子機序の解明は、様々なホルモン受容機構異常症の診断・治療の開発に欠かせない。ビタミン D による標的遺伝子のエピジェネティックな転写制御機構の解明や、FGF23 の作用および作用機序、分泌調節機構の解明、血中濃度測定法の確立はリン代謝異常症の病態解明に多大な貢献をもたらすと期待される。未だ高い死亡率を示す甲状腺クリーゼの診断指針の策定により今後疫学調査の実施が可能となることにより、その実態解明や早期診断・治療による予後の改善なども可能となるものと期待される。

図1. 低Ca血症の鑑別診断フローチャート



- 1) 乳児では5.5 mg/dl、小児では4.5 mg/dlを基準に判断する。
- 2) 小児では、4 mg/kg/日を基準に判断する。
- 3) 特に小児の場合は、15 ng/ml以上でもビタミンD欠乏による場合があるので、疑わしい場合は必ずビタミンD補充への反応を検討するのが好ましい。
- 4) 原発性副甲状腺機能亢進症術後などのHungry bone症候群、骨形成性骨転移、急性腎炎、ビスフォスフォネート使用など。
- 5) 急性副甲状腺機能低下症II型は、糖尿病(尿糖管理)、抗糖尿病薬の副作用(特にSGLT阻害薬)以外に発症する可能性がある。
- 6) 血清総Ca値には異常がなくても、イオン化Caの低下により低Ca血症の病態を呈する可能性がある(クエン酸を含む保存血の大量輸血など)。

図2. 分泌低下型副甲状腺機能低下症の分類



- 疾患名の後の数字はMIMの疾患番号、遺伝子名の後には遺伝子座を示す。
- 1) TCF7L1遺伝子欠損が副甲状腺機能低下症の原因か否かは、確定されていない。
 - 2) 新生児-乳児期発症の疾患であっても、小児期以降に診断されることがある。
 - 3) 低Ca血症では、PTH作用障害が主となり、intact PTHが高値となる例もある。
 - 4) 今後特発性副甲状腺機能低下症の中から、新たな原因が抽出される可能性がある。

図3. 血中リンとintact FGF23による低リン血症の鑑別

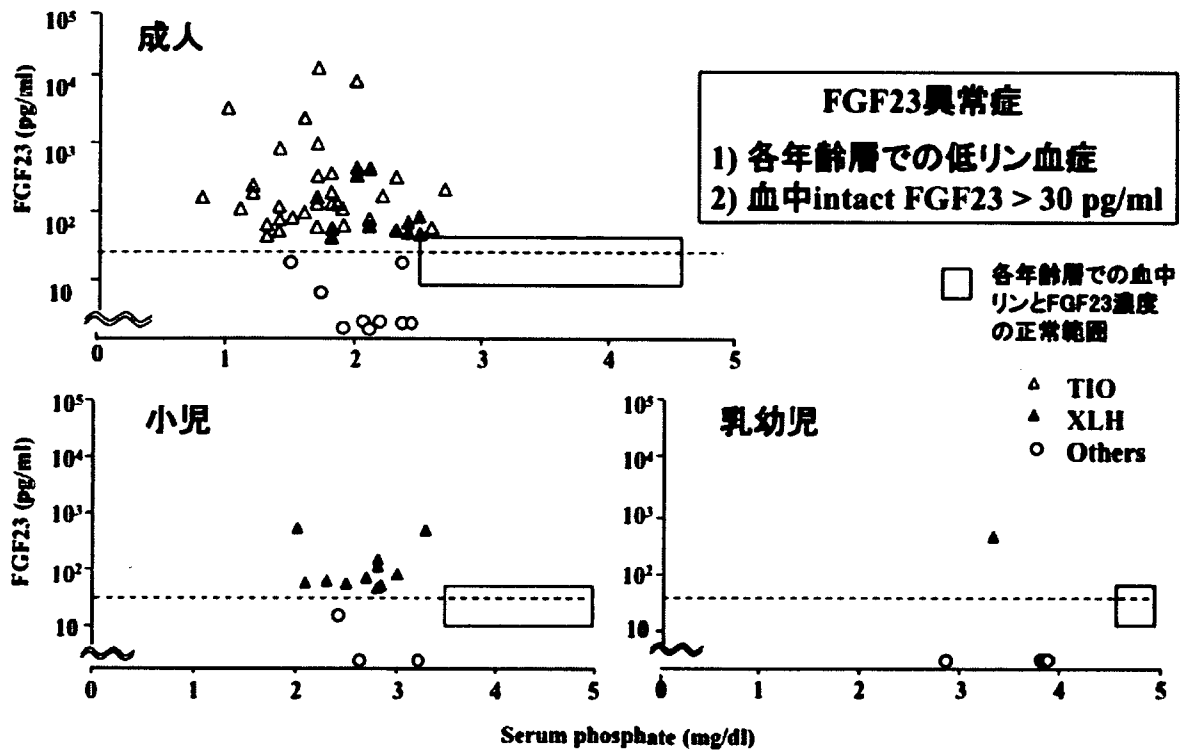


表1. 『甲状腺クリーゼの診断基準（第1版）』（2008年1月25日）

定義

甲状腺クリーゼ (Thyrotoxic storm or crisis) とは、甲状腺中毒症の原因となる未治療ないしコントロール不良の甲状腺基礎疾患が存在し、これに何らかの強いストレスが加わった時に、甲状腺ホルモン作用過剰に対する生体の代償機構の破綻により複数臓器が機能不全に陥った結果、生命の危機に直面した緊急治療を要する病態をいう。

必須項目

甲状腺中毒症の存在（遊離 T3 および遊離 T4 の少なくともいずれか一方が高値）

症状（注1）

1. 中枢神経症状（注2）
2. 発熱（38度以上）
3. 頻脈（130回/分以上）（注3）
4. 心不全症状（注4）
5. 消化器症状（注5）

確実例

必須項目および以下を満たす（注6）。

- a. 中枢神経症状+他の症状項目1つ以上、または、
- b. 中枢神経症状以外の症状項目3つ以上

疑い例

- a. 必須項目+中枢神経症状以外の症状項目2つ、または
- b. 必須項目を確認できないが、甲状腺疾患の既往・眼球突出・甲状腺腫の存在があって、確実例条件のaまたはbを満たす場合（注6）。

（注1）明らかに他の原因疾患があって発熱（肺炎、悪性高熱症など）、意識障害（精神疾患や脳血管障害など）、心不全（急性心筋梗塞など）や肝障害（ウイルス性肝炎や急性肝不全など）を呈する場合は除く。しかし、このような疾患の中にはクリーゼの誘因となるため、クリーゼによる症状か単なる併発症か鑑別が困難な場合は誘因により発症したクリーゼの症状とする。

このようにクリーゼでは誘因を伴うことが多い。甲状腺疾患に直接関連した誘因として、抗甲状腺剤の服用不規則や中断、甲状腺手術、甲状腺アイソトープ治療、過度の甲状腺触診や細胞診、甲状腺ホルモン剤の大量服用などがある。また、甲状腺に直接関連しない誘因として、感染症、甲状腺以外の臓器手術、外傷、妊娠・分娩、副腎皮質機能不全、糖尿病ケトアシドーシス、ヨード造影剤投与、脳血管障害、肺血栓塞栓症、虚血性心疾患、抜歯、強い情動ストレスや激しい運動などがある。

（注2）不穏、せん妄、精神異常、傾眠、けいれん、昏睡。Japan Coma Scale (JCS)1 以上または Glasgow Coma Scale (GCS)14 以下。

（注3）心房細動などの不整脈では心拍数で評価する。

（注4）肺水腫、肺野の50%以上の湿性ラ音、心原性ショックなど重度な症状。New York Heart Association (NYHA)分類4度またはKillip分類III度以上。

（注5）嘔気・嘔吐、下痢、黄疸を伴う肝障害

（注6）高齢者は、高熱、多動などの典型的クリーゼ症状を呈さない場合があり (apathetic thyroid storm)、診断の際注意する。

III. 分担研究報告

副甲状腺機能低下症の診断指針の策定について

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
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
共同研究者 遠藤 逸朗 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 助教

研究要旨

近年の副甲状腺機能低下症の病因に関する進歩には、めざましいものがある。すなわち、従来特発性副甲状腺機能低下症と診断されてきた病態の、責任遺伝子や自己免疫機序を含む病因が明らかになりつつある。これらのエビデンスをふまえ、新たな副甲状腺機能低下症の分類、診断指針の策定を行った。

A. 研究目的

副甲状腺機能低下症、とくにその原因遺伝子変異が解明されたものを中心に、低 Ca 疾患の臨床的鑑別診断指針、副甲状腺機能低下症の新たな分類を確立する。

B. 研究方法

2003 年度厚生労働省ホルモン受容機構異常に関する調査研究（清野班）により作成された副甲状腺機能低下症の分類をもとに、新たに明らかになった副甲状腺機能低下症の原因遺伝子異常をもちこみ診断指針の改訂を行う。本研究は、分担研究者として大藪恵一、田中弘之、皆川真規、井上大輔、研究協力者として道上敏美、杉本利嗣、共同研究者として難波範行、山内美香と共にを行った。

C. 研究結果

副甲状腺機能低下症の鑑別診断フローチャート修正案を作成した（総括研究報告・図 1, 2）。

昨年度案からの変更点としては、

1. Step 1 において血清 Ca 濃度の補正について表記した。
2. Step 1 において、血清リン濃度、尿中 Ca 排泄、血清 25(OH)D 濃度、血清 1,25(OH)₂D 濃度、GFR の具体的な数値を加えた。
3. Step 1 において、乳児、小児の低リン血症の基準、小児の尿中 Ca 排泄および 25(OH)D 濃度の基準を明記した。
4. Step 1 において、従来、Hungry bone 症候群としていた部分は、“骨・組織への Ca 沈着、薬剤性”として、

付記で“hungry bone 症候群、骨形成性骨転移、急性膵炎、ビスホスホネート投与など”と追記した。

5. Step 1 において、“血清総 Ca の低下がなくても、イオン化 Ca の低下により低 Ca 血症の病態を呈する場合がある(クエン酸を含む保存血の輸血など)”を追記した。
6. Step 1 において、低リン血症、GFR 30ml/min/1.72m² 以上、intact PTH 30pg/ml 以下であれば“分泌低下型副甲状腺機能低下症”として Step2 に詳細を明記した。
7. Step2 では、PTH 分泌障害を惹起する多疾患の存在の有無、身体所見の有無、発症時期、自己免疫疾患の合併、低 Mg 血症の有無により鑑別を行う。
8. Step2 において、責任遺伝子の染色体上の局在を示すとともに、OMIN 番号を明記し、TBX1 遺伝子異常、GCMB 遺伝子異常を加えた(注釈あり)。
9. Step2 において、小児期発症、Mg 欠乏性副甲状腺機能低下症についての注釈を加えた。

D, E. 考察と結論

特発性副甲状腺機能低下症と分類されてきた疾患の遺伝子異常や病態が、近年次々に明らかにされつつある。本検討では、清野班の調査研究報告書に新たな知見を加えることにより、低 Ca 疾患の臨床的鑑別診断指針、副甲状腺機能低下症の新たな分類を作成し、これに基づく鑑別指針を策定した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

Fukumoto S, Namba N, Ozono K, Yamauchi M, Sugimoto T, Michigami T, Tanaka H, Inoue D, Minagawa M, Endo I, Matsumoto T. Causes and differential diagnosis of hypocalcemia -Recommendation proposed by expert panel supported by Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan – Endocrine J, in press

H. 知的所有権の取得状況

特になし。

FGF23 作用過剰による低リン血症性疾患の診断指針の策定について

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
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
共同研究者 遠藤 逸朗 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 助教

研究要旨

腫瘍性くる病/骨軟化症(tumor-induced rickets/osteomalacia: TIO)や 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)は、FGF23 作用過剰による低リン血症を特徴とするビタミンD抵抗性くる病/骨軟化症である。一方これらの疾患の診断や、低リン血症性疾患の鑑別における FGF23 の測定意義については、不明である。そこで、TIOあるいはXLH患者60名、およびその他の原因による低リン血症患者16名の、FGF23 濃度を含む生化学所見を横断的に検討した。その結果、治療の有無にかかわらず低リン血症の存在下で、血清 FGF23 濃度 30 pg/ml をカットオフとして、FGF23 作用過剰による疾患と、それ例外の原因の低リン血症を明確に鑑別できることが明らかとなった。従って FGF23 の測定は、臨床的に低リン血症性疾患の鑑別に有用であることが示された。

A. 研究目的

腫瘍性くる病/骨軟化症(tumor-induced rickets/osteomalacia: TIO)や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)は、FGF23 作用過剰による低リン血症を特徴とするビタミンD抵抗性くる病/骨軟化症である。一方これらの疾患の診断や低リン血症性疾患の鑑別における FGF23 の測定意義については、不明である。そこで、これらの疾患の診断における血中 FGF23 測定の意義を明らかにすることを目的とし、横断的検討を行った。

B. 研究方法

厚生労働省難治性疾患克服事業ホルモン受容機構異常に関する調査研究班員を中心にアンケート調査を行い、TIO、XLH およびその他の原因による慢性低リン血症患者の臨床像を検討した。また、これらの患者の FGF23 濃度を含む生化学所見を集計した。血中 FGF23 濃度は、生物活性を有する全長 FGF23 のみを測定する ELISA キットで測定した。本キットによる健常成人の FGF23 の基準値は 10-50 pg/ml、その平均値は約 30pg/ml であることが既に報告されている(n=104)。本研究は、分担研究者として大藪恵一、田中弘之、皆

川真規、井上大輔、研究協力者として道上敏美、杉本利嗣、共同研究者として難波範行、山内美香と共に行った。

C. 研究結果

対象は TIO 32 例(男性 16 例、女性 16 例、年齢 20-85 歳)、XLH 28 例(男性 12 例、女性 16 例、年齢 1-71 歳)およびビタミンD欠乏や Fanconi 症候群など、TIO や XLH 以外の低リン血症 16 例(男性 4 例、女性 12 例、年齢 1-75 歳)である。このうち無治療例は、TIO 16 例、XLH 12 例、その他の疾患 13 例であった。

TIO 患者の血清リン濃度は 1.67 ± 0.08 mg/dl と低下しており、無治療群 (1.59 ± 0.09 mg/dl) と、活性型ビタミン D₃ 製剤やリン製剤による治療群 (1.74 ± 0.12 mg/dl) で有意差は認められなかった。腎近位尿細管リン再吸収閾値 (TmP/GFR) も 1.24 ± 0.08 mg/dl と低下し、無治療群 (1.27 ± 0.11 mg/dl) と治療群 (1.20 ± 0.12 mg/dl) で有意差を認めなかった。血中 1,25-水酸化ビタミン D 濃度は、基準値下限 (21.0 ± 3.3 pg/ml) 程度にまで低下していた。一方血中 FGF23 濃度は 1149 ± 541 pg/ml と著明に上昇しており、全ての症例で 30 pg/ml 以上であった。またこれらの指標には、治療群と無治療群で有意差は認められなかった。

XLHでもTIOと同様に低リン血症(全例 2.36 +/- 0.10 mg/dl、無治療群 2.54 +/- 0.15 mg/dl、治療群 2.23 +/- 0.14 mg/dl)とTmP/GFRの低下(全例 2.14 +/- 0.17 mg/dl、無治療群 2.56 +/- 0.34 mg/dl、治療群 1.84 +/- 0.13 mg/dl)が認められた。血中FGF23濃度も高値(全体: 155 +/- 31 pg/ml、治療群: 209 +/- 46 pg/ml、無治療群: 85 +/- 27 pg/ml)であり、TIO類似の所見を示した。なお、血清FGF23濃度は全ての症例で30 pg/mlを超えていた。

一方ビタミンD欠乏、Fanconi症候群や異所性ACTH産生腫瘍による慢性低リン血症では、血中FGF23濃度は大部分で測定感度(3 pg/ml)以下であった。血中FGF23が測定感度以上の場合でも、健常成人の平均値である30 pg/ml未満であった。

D. 考察

TIOおよびXLHは、低リン血症、高FGF23血症を特徴とする疾患であることが確認できた。このFGF23の高値は、治療の有無に拘わらず観察された。一方ビタミンD欠乏やFanconi症候群など、FGF23作用過剰以外の原因に基づく低リン血症では、血中FGF23はむしろ低値であることが明らかとなった。このことは、生理的なFGF23産生が低リン血症、あるいはこれに伴う代謝異常により抑制されることを示唆している。従って血中FGF23の測定により、TIOやXLHなどのFGF23作用過剰による疾患と、ビタミンD欠乏やFanconi症候群などの他の低リン血症性疾患の鑑別が可能であること、さらにリンや活性型ビタミンD₃製剤による治療中であっても、病態の把握に有用であることが明らかとなった。なお、現時点ではFGF23測定は保険適用外であり、今後その保険適用による普及と、一般診療の場での診断への応用をはかることが今後の重要な課題である。

E. 結論

低リン血症の存在下で、血中FGF23濃度が30 pg/ml以上であれば、活性型ビタ

ミンD₃製剤あるいはリン製剤による治療の有無にかかわらず、FGF23作用過剰による疾患であると診断することができる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Endo I, Fukumoto S, Ozono K, Namba N, Tanaka H, Inoue D, Minagawa M, Sugimoto T, Yamauchi M, Michigami T, Matsumoto T. Clinical usefulness of measurement of fibroblast growth factor 23 (FGF23) in hypophosphatemic patients. A proposal of diagnostic criteria using FGF23 measurement. Bone in press, 2008.

2. 学会発表

本年度はなし。

H. 知的所有権の取得状況

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・リン維持機構に関する研究

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に関する2つの解析を行った。まず、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、NUP214の全長を過剰発現すると、VDR依存性転写活性が増強した。NUP214のC端側のみの過剰発現ではVDRの核局在性を減弱させるとともに機能を抑制した。2番目に班員にアンケートを送付し、常染色体性優性低カルシウム血症(ADH)患者の調査を行った。血清Mg値はADH群で治療前・治療後ともに低値であり、特に治療前値が1.7 mg/dl以下の場合、ADHの可能性が高いと考えられた。

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。

上記方法で核膜孔の構成成分であるCAN/Nup214の一部がクローニングされた。CAN/Nup214の全長、及びYeast-two hybrid screeningにおいてVDRとの相互作用が同定されたC端側のFGリピートを含む領域をコードする発現ベクターを構築し、以下の実験を行った。

1) ビタミンD応答配列を有するルシフェラーゼプラスミドを用いたレポーターアッセイにより、ビタミンD依存性転写活性化が

CAN/Nup214 全長の過剰発現により増強され、C 端 FG リピート領域の発現により抑制されることを見出した。この CAN/Nup214 の VDR 依存性転写活性化増強作用における、VDR の DNA 結合領域の必要性を検討するため、VDR の DNA 結合領域を転写因子 GAL4 の DNA 結合領域に置換したキメラ受容体(GAL4-VDR)を用いた解析を行った。

2) VDR と同様にステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属する受容体であるグルココルチコイド受容体(GR)やレチノイン酸受容体(RAR)を介する転写活性化に対する CAN/Nup214 全長及び C 端 FG リピート領域の影響について検討した。

3) 細胞に VDR とともに CAN/Nup214 全長、あるいは C 端 FG リピート領域を発現させ、蛍光抗体法により、VDR の細胞内局在への影響を検討した。

C. 研究結果

1) GAL4-VDR を用いたレポーターアッセイにおいては、CAN/Nup214 全長あるいは C 端 FG リピート領域の過剰発現はリガンド依存性転写活性化に影響を与えなかった。

2) GR 依存性転写活性化は、VDR の場合と同様、CAN/Nup214 の過剰発現により増強され、C 端 FG リピート領域の発現により抑制された。RAR 依存性転写活性化においても同様の傾向を認めたが、その効果は弱かった。

3) C 端 FG リピート領域の共発現は、VDR の核局在性を低下させた。

D. 考察

CAN/Nup214 による VDR 依存性転写活性化の制御に、VDR の DNA 結合領域が必要である

ことが推察された。また、GR や RAR においても、CAN/Nup214 が同様の作用を示すことが示唆された。この、CAN/Nup214 による VDR 依存性転写活性化の制御には、VDR の核局在性の変化が関与している可能性がある。

E. 結論

核膜孔複合体の構成因子である CAN/Nup214 は VDR と相互作用し、その機能を制御する。

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。現在、revise のための実験を実施中。

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・リン値の制御機構に関する研究

A. 研究目的

副甲状腺機能低下症のうち、カルシウム感知受容体 (CaSR) 活性亢進によるものは、活性型ビタミン D 治療により高カルシウム尿症を来しやすく、そのため腎石灰化、腎・尿路結石、さらには腎不全のリスクが高くなる。したがって、活性型 VD による治療を進める上で CaSR の活性化の有無は臨床的に非常に重要な問題である。CaSR の活性亢進は、恒常活性型の遺伝子変異によるもの常染色体性優性低カルシウム血症 (autosomal dominant hypocalcemia、以下 ADH)、あるいは活性型の自己抗体によるものが知られており、欧米の教科書には散發性の