

単独副甲状腺機能低下症の全例で遺伝子検査を行うことが推奨されるとの記載がある。続発性の単独副甲状腺機能低下症においては抗CaSR抗体検査をすべきとの意見もある。しかし、前者に関しては、マンパワー・時間・費用の点から全例施行できる施設は限られること、後者に関しては確実な検出法が確立されていないことより現実的には困難である。そこで、本研究では日常診療で常用される検査またはその組み合わせを用い、発症にCaSR活性亢進の関与している確率の高い群を選別するためのカットオフ値を設定することを目的とした。

B.方法

「ホルモン受容機構異常に関する調査研究」班員にアンケートを送付し、現在治療中の患者データを収集した。患者データよりCaSR変異あり群、CaSR変異なし群を抽出し、両群における各種パラメーターを比較検討した。遺伝子検査については各班員が患者あるいは保護者よりインフォームドコンセントを得た上で施行した。検査所見等のデータは集積された段階で既に個人の特定に結びつく情報は含まれておらず、以後通し番号で管理している。研究発表の場では対象全体の統計解析データのみ呈示するため、個々のデータから個人が特定されることはない。また、集積したデータは本研究以外の目的には使用しない。

C.結果

昨年度報告したように治療前後の尿中Ca/Cr比、治療前後の血清Ca、治療前後の血清Caと尿中Ca/Cr比との相関のいずれもオーバーラップが大きくCaSR変異あり群を識別することは困難であった。一方、アルファカルシドール投与量と治療後尿中Ca/Cr比の検討において、変

異あり群では0.05 $\mu\text{g/kg/day}$ 以上投与されている症例がないこと、ほぼ全例でサイアザイドが投与されていることが判明した。

治療前からの鑑別方法を見出すため、今年度は治療前後のFECaと血清intact PTH、血清Ca、アルファカルシドール投与量、サイアザイド投与の有無との相関について、また治療前後の血清Mgについて検討した。以下に結果を列挙する。

a) 変異の有無と治療前後のFECa：治療前は変異あり群、変異なし群の間に差は認められず、治療後はアルファカルシドール投与量を反映するためかむしろ変異あり群で低値を示したが、有意差は認められなかった。

b) 治療前後の血清Ca、intact PTHとFECa：治療前後ともに変異あり群、変異なし群の間に一定の傾向は認められなかった。

c) 治療後FECaとアルファカルシドール投与量：昨年度の解析と同様変異あり群でアルファカルシドール投与量が少ないこと、ほぼ全例でサイアザイド投与が行われていることを除けば一定の傾向は認められなかった。

d) 治療前後の血清Mg値：症例の半数はオーバーラップするが、変異あり群において治療前、治療後ともに低い傾向が認められ、治療前血清Mg値が正常下限を下回った症例は全例変異あり群であった。また、治療前Mg値はt検定で変異あり群、変異なし群との間に有意差が認められた。

D.考察

本研究の最大の目的は、日常診療で常用される検査により発症にCaSR活性亢進の関与している確率の高い群を選別し、早期の治療・管理方針の決定に寄与することである。したがって治療前のパラメーターの検討に重点を置いた。

血清 Ca、intact PTH、尿中 Ca/Cr 比、FECa では変異あり群と、変異なし群との識別は困難であった。一方、今回の検討では血清 Mg 値が正常下限を下回った症例全例が CaSR 変異あり群であったことより、副甲状腺機能低下症で Mg 値が正常下限未満の場合は、原発性低 Mg 血症の除外は必要だが、CaSR の機能亢進による可能性が高いと考えられる。ただし、CaSR 変異あり群の半数は変異なし群とオーバーラップするので、血清 Mg 値が基準値内であっても慎重に治療を進める必要がある。

治療後のパラメーターの検討では、血清 Ca、intact PTH、尿中 Ca/Cr 比、FECa では変異あり群と、変異なし群との識別は困難であった。血清 Mg 値に有意差は認められなかったものの、やはり変異なし群で低い傾向を示した。また、ADH を活性型ビタミン D で尿中カルシウム排泄 (Ca/Cr 比) が過剰とならないように治療する場合、投与量を少なく抑え、サイアザイドを併用する必要があることが明らかとなった。

E. 結論

血清 Mg 値は CaSR 変異あり群で治療前・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 (あるいは自己免疫性の CaSR 活性亢進) の可能性が高いと考えられる。

尿中カルシウム排泄 (Ca/Cr 比) が過剰とならないように治療した場合、CaSR 活性化による副甲状腺機能低下症では、活性型ビタミン D の投与量が少なく、大多数でサイアザイドの併用療法が行われている。

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以下に記載。

1. 論文発表
 - 1) Ohata Y, Yamamoto T, Kitai Y, Mizoguchi Y, Iwaki M, Sumi K, Fujikawa Y, Koga M, Sugao H, Shimotsuji T, Ozono K., A case of primary hyperparathyroidism in childhood found by a chance hematuria., *Clin Pediatr Endocrinol*,16(1):11-16,2007
 - 2) Yamamoto T, Michigami T, Aranami F, Segawa H, Yoh K, Nakajima S, Miyamoto K, Ozono K., Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria: a study for the phosphate transporter gene type IIc and osteoblastic function., *J Bone Miner Metab*, 25(6):407-13,2007
 - 3) Arahori H, Tamura A, Wasada K, Shimoya K, Wada K, Murata Y, Ozono K., Sonographic femur length to trunk cross area ratio: prediction of fetal outcome in 30 cases in which micromelia was suspected., *J Obstet Gynaecol Res*, 33(3):248-53,2007
 - 4) Namba N, Etani Y, Kitaoka T, Nakamoto Y, Nakacho M, Bessho K, Miyoshi Y, Mushiaki S, Mohri I, Arai H, Taniike M, Ozono K., Clinical phenotype and endocrinological investigations in a patient with a mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter., *Eur J Pediatr*, Sep 25; [Epub ahead of print],2007
 - 5) 大藪恵一, カルシウム感知受容体遺伝子異常と副甲状腺機能低下症、日本内科学会雑誌 96(4):702-706,2007
 - 6) 三善陽子, 大藪恵一, てんかんと誤診される副甲状腺機能低下症, 小児内科

39(5):729-732,2007

- 7) 窪田拓生,大藪恵一,ビタミンD依存症,骨粗鬆症治療 6(3):221-225,2007
- 8) 大藪恵一,偽性副甲状腺機能低下症 I a 型における Gs α 遺伝子異常,CLINICAL CALCIUM.17(8):1214-1219,2007

2. 学会発表

- 1) 大藪恵一,小児科からみた Ca・P 代謝異常症、第 13 回徳島内分泌研究会,2007.11.30,徳島市
- 2) Kitaoka T, Namba N, Miura H, Hirai H, Nakajima S, Yamamoto T, Ozono K.,Intravenous administration of pamidronate decreases serum levels of FGF23 rapidly in patients with osteogenesis imperfecta.,29th Annual meeting of the American society for bone and mineral research.,Hawaii,U.S.A. Sept.16-19,2007

H. 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

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(APPES)で口演発表を行った。

H. 知的所有権の取得状況

特になし。

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

分担研究者 杉本利嗣 島根大学医学部内科学第一 教授
山内美香 島根大学医学部内科学第一 助教

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。自己免疫機序が考えられるIHP弧発例について、その病因に抗Ca感知受容体(CaSR)抗体が関与するか否かを検討した。免疫蛍光染色および免疫沈降反応を加えたWestern blotting法にて患者血清中に抗CaSR抗体は認めなかった。本症例の血清およびIgGはCaSR導入HEK293細胞のErkのリン酸化に影響を及ぼさなかったが、ヒト副甲状腺培養細胞のPTH分泌を抑制した。本例のIHPの病因として、抗CaSR抗体以外の未知のPTH分泌を抑制させる因子の関与の可能性が示唆された。

A. 研究目的

特発性副甲状腺機能低下症(IHP)をはじめとする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、抗Ca感知受容体(CaSR)抗体が関与するか否かを明らかにする。

B. 研究方法

自己免疫疾患を合併し、血中Ca値が著明な動揺性を示し、IHPの病因に自己免疫機序の関与が考えられるIHP弧発例について、以下の検討を行った。

a) 抗CaSR抗体の存在の有無についての検討

①蛍光免疫染色法

患者IgGおよび既知の抗CaSR抗体を用いて、ヒトCaSRを過剰発現させたHEK293細胞を蛍光免疫染色し、患者血清中にCaSR

に対する抗体が存在するか否かを検討した。同様の検討をその他のIHP症例と原因不明の後天性高Ca血症(AHH)を示した1例について検討した。

②Western blotting法

患者IgGおよび既知の抗CaSR抗体と、CaSRを導入したHEK293細胞から抽出した蛋白を免疫沈降反応させ、免疫複合体を形成させた。IgGを吸着するビーズを用いて、免疫複合体を形成した蛋白のみを抽出し、蛋白電気泳動を行った。導入したヒトCaSRには標識としてFLAGを導入しているため、これを一次抗体の抗原としてWestern blotting法を行い、抗CaSR抗体の有無を確認した。同様の検討をその他のIHP症例についても行った。

b) ヒトCaSR導入HEK293細胞における患者血清およびIgGのErk1/2のリン酸化に対

する影響

ヒトCaSRを導入したHEK293細胞にCaを投与すると、CaSRを介してCa濃度依存的にErk1/2がリン酸化される。患者血清およびIgGの投与がErkのリン酸化にどのような影響を及ぼすかを検討した。

c) ヒト副甲状腺培養細胞における患者血清のPTH分泌に対する影響

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した。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) ①免疫蛍光染色法にて、既知の抗CaSR抗体でHEK293細胞の膜表面に一致して染色を認め、CaSRの導入が確認された。患者IgGおよびその他のIHP6症例、AHH症例のIgGでは染色されなかった。

②Western blotting法にて、既知の抗CaSR抗体で免疫沈降反応を行ったCaSR導入HEK293細胞蛋白では、抗FLAG抗体にてCaSRの分子量レベルにimmunoblotを認めた。患者IgGおよびその他のIHP6症例、AHH症例のIgGで免疫沈降反応を行ったCaSR導入HEK293細胞蛋白では、

immunoblotを認めなかった。

b) ヒトCaSRを導入したHEK293細胞にCaを投与すると、Ca濃度依存的にErk1/2がリン酸化された。IHPの本例では細胞外Ca低濃度においてもリン酸化がみられる可能性が想定されたが、患者血清およびIgGの添加はコントロール血清およびIgGの添加と差を認めなかった。

c) 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。

D. 考察

CaSRの同定後、1996年にLiらは自己免疫性多内分泌不全症(APS)I型を含む後天性副甲状腺機能低下症の約半数に抗CaSR抗体が存在すると報告した。しかし、この抗CaSR抗体の病因としての意義は不明であった。2004年にKiforらはIHPの2症例について抗CaSR抗体が存在し、これがCaSR機能を刺激することを*in vitro*で証明した。IHPにおける抗CaSR抗体の陽性率は報告によって様々であり、この原因として人種差に加えて、実験手技的な特異度の差が示唆されていた。最近、副甲状腺機能低下症を伴う代表的疾患であるAPS I型の症例において、免疫沈降反応を加えた方法で抗CaSR抗体の存在を詳細に検討した報告がGavalasらによってなされた。APS I型の8割以上に抗CaSR抗体が存在することと、この検討法が疾患特異性を有することが示された(J Clin Endocrinol Metab 92: 2107, 2007)。本検討も、免疫沈降反応を加えたWestern blotting

法で検討を行い、本症例および他の IHP 症例、AHH 症例には抗 CaSR 抗体を認めなかった。

Kifor らは、IHP 患者血清中の抗 CaSR 抗体が、ヒト CaSR を導入した HEK 細胞において 0.5mM/L の低 Ca^{2+} 条件下でイノシトールリン酸の蓄積や Erk のリン酸化の亢進をもたらし、CaSR 情報伝達系に影響を及ぼす、刺激型抗体であることを示した。我々は Erk のリン酸化への影響について検討したが、本症例の IgG は影響を及ぼさなかった。また、IgG 以外で患者血清中に存在する molecule が CaSR の機能に影響を及ぼす可能性を考え、患者血清の Erk のリン酸化に及ぼす影響を検討したが、コントロールと差を認めなかった。

CaSR の抑制型変異により家族性低 Ca 尿性高 Ca 血症 (FHH) をきたし、活性型変異により常染色体優性高 Ca 血症をきたすが、これらの 1/3 の症例には CaSR に変異を認めず、CaSR 以外の Ca 代謝調節に関わる因子が想定されている。FHH 症例における遺伝子解析では、第 19 染色体の長腕と短腕に原因遺伝子が存在する可能性が考えられている。本症例ではこれら未知の PTH 分泌に関わる因子により、低 Ca 血症をきたした可能性が考えられた。

E. 結論

自己免疫機序の存在が考えられる IHP 弧発例における病因の検討を行った。患者血清中に抗 CaSR 抗体は認められず、本症例の病因として、抗 CaSR 抗体以外の未知の

PTH 分泌を抑制させる因子の可能性が示唆された。検討した範囲では IHP および AHH 症例において抗 CaSR 抗体は認められず、カルシウム代謝異常症の病因として抗 CaSR 抗体の関与は極めてまれである可能性が考えられた。

本検討は、抗 CaSR 抗体の存在およびその機能を検出する方法を確立するための一助となりうる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kanazawa I, Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Yano S and Sugimoto T. A case of magnesium deficiency associated with insufficient parathyroid hormone action and severe osteoporosis. *Endocr J* 54(6):935-940, 2007

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* 印刷中

山本昌弘、矢野彰三、金沢一平、山内美香、栗岡聡一、西木正照、山口徹、杉本利嗣. PTH 標的組織の不応性による低 Mg 血症性低 Ca 血症の一例. *日本内分泌学会雑誌* 83 特集:133-135, 2007

2. 学会発表

山本昌弘、矢野彰三、金沢一平、山内美香、栗岡聡一、西木正照、山口徹、杉本利嗣. 骨の PTH 不応性が原因と考えられた低 Mg 血症性低 Ca 血症の 1 例. 第 94

回日本内科学会中国地方会(出雲) 2007
年6月3日

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

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ホルモン抵抗性はホルモン受容機構の介在因子である $Gs\alpha$ 蛋白の量的減少によって生じる。本疾患の新規治療法開発を目指して $Gs\alpha$ 蛋白をコードする遺伝子である *GNAS* の組織特異的インプリンティングの制御機構の解析を行った。今回検討したエクソン 1A とエクソン 1 の間の領域には組織特異的インプリンティングを制御する塩基配列は特定されなかったが、今後エクソン 1A 上流を含めた DMR を網羅的に解析する必要があることがわかった。また、臨床像の検討により、これまで低カルシウム血症以外の症状がないとされてきた PHP-Ib で成長パターンの異常がみられることがわかり、*GNAS* 遺伝子のインプリンティング異常が PTH 抵抗性以外の症状にも関与していることが判明した。

A. 研究目的

偽性副甲状腺機能低下症 (PHP) は代表的なホルモン受容機構異常症である。

PHP は Albright Hereditary

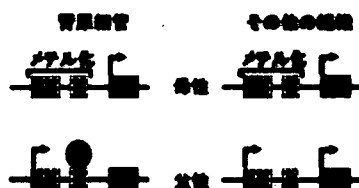
Osteodystrophy (AHO: 低身長、中手中足骨短縮、皮下異所性石灰化、肥満、円形顔貌) を伴う Ia 型 (PHP-Ia) と AHO を伴わない Ib 型 (PHP-Ib) に臨床的に分類されてきた。PHP-Ia は各種ホルモン受容体と共役する $Gs\alpha$ 蛋白をコードする *GNAS* 遺伝子コード領域の母親由来の塩基配列 (genetic) 異常によることが知られてい

る。一方、PHP-Ib では *GNAS* 遺伝子の転写調節領域の DNA メチル化パターンの異常 (epigenetic な異常) があることが明らかになり、これにより $Gs\alpha$ 蛋白の発現が組織特異的に障害されることがホルモン受容機構障害の原因であると推測されている。しかし、この epigenetic な異常をきたす原因およびこの epigenetic な異常が組織特異的発現異常をきたす機序については未だ明らかでない点が多い。

GNAS 遺伝子のインプリンティング機構にはプロモーター領域 differentially

methyated region (DMR) の存在の他に未知の組織特異的因子が必須であると考えられている。

腎臓細胞とその他の組織でのGNAS遺伝子の発現調節モデル(仮説)



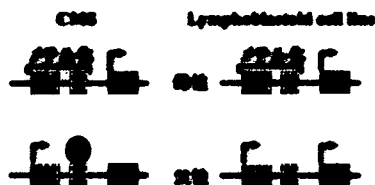
現在、PHP の症状のうち低カルシウム血症については、活性型ビタミンDの内服治療で確立されているが、それ以外の低身長、皮下異所性石灰化、精神発達遅滞などの症状については有効な治療法がない。GNAS 遺伝子の組織特異的インプリンティングを制御する因子の同定、解析は PHP の新規治療法の開発に不可欠である。そこで本研究において、GNAS 遺伝子プロモーターでの組織特異的インプリンティング因子の結合配列を特定することを目的とした。また、PHP-Ib の臨床症状はこれまで低カルシウム血症のみであるとされてきたが、多数例を検討した報告はなかった。そこで、PHP-Ib での臨床的問題を明らかにする目的で PHP-Ib の成長パターンについて PHP-Ia と比較検討を行った。

B. 研究方法

1) GNAS 遺伝子プロモーターの解析

これまでの本研究でヒト巨核芽球性白血病由来細胞株では GNAS 遺伝子の組織特異的インプリンティングが成立していることを確認している。一方、リンパ芽球様細胞株ではインプリンティングがないことを確認した。この2種類の細胞株では、GNAS の組織特異的発現に必須の因子の発現に差があると考えられるため、これら細胞株より抽出した核蛋白の結合する領域の違いを DNaseI footprinting 法により検討した。

巨核芽球性白血病由来細胞株(CM9)とリンパ芽球様細胞株(Lymphoblastoid cell line)でのGNASの発現パターン



2) PHP 症例の成長パターンの検討

分子生物学的に診断を確認した PHP-Ia および PHP-Ib 症例の成長曲線を男女ごとに解析し、成長パターンの差異を検討した。

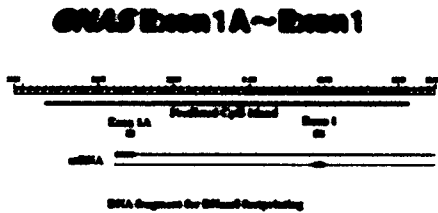
(倫理面への配慮)

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* 遺伝子プロモーターの解析

下図の DNA フラグメント (片端をテキサスレッドで標識) を PCR により合成し巨核芽球性白血病由来細胞株とリンパ芽球様細胞株由来の核蛋白と結合反応させたのち、DNaseI で消化しオートシーケンサーで電気泳動した。



結果は、下図のごとくいずれの細胞株由来蛋白でも同じパターンであり、本検討領域には組織特異的インプリンティング調節因子の結合配列が含まれていないことがわかった。

DNaseI footprintingの例



2) PHP 症例の成長パターンの検討

PHP-Ia 症例では、男女ともに前思春期

の成長率の低下と成長期の成長が少ないことにより成人において低身長となることが示された。一方、PHP-Ib では女性は完全に正常と同等の成長パターンを示していたのに対し、男性では成長期の早発傾向により成人では低身長傾向となることが示された。

D. 考察

GNAS 遺伝子プロモーターの解析では、この領域には組織特異的インプリンティング制御因子の結合配列がないことがわかったが、今後エクソン 1A の上流を含めて網羅的に検討する必要があることが示された。また、成長パターンの検討では、PHP-Ia については従来の報告と合致する結果であったが、これまで検討されてこなかった PHP-Ib の成長については男性において成長パターンの軽度の障害がみられることが初めて示された。

E. 結論

偽性副甲状腺機能低下症の治療において低カルシウム血症の治療以外にまだ克服されるべき課題が残されている。また、その臨床症状の治療法の開発のために *GNAS* 遺伝子のインプリンティング制御機構の解析を進める必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

数川逸郎, 皆川真規, 渡辺智之, 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 I b における skewed X-inactivation. ホルモンと臨床 55 巻増刊:137-141, 2007

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. ホルモンと臨床 55 巻増刊:131-136, 2007

皆川真規. 偽性副甲状腺機能低下症. 日本内科学会雑誌 96(4):713-718, 2007

皆川真規. 偽性偽性副甲状腺機能低下症と遺伝子刷り込み現象. Clinical Calcium 17(8):1229-1232, 2007

皆川真規. カルシウム、骨異常. 小児科診療 70(10):1689-1695, 2007

皆川真規. 副甲状腺機能低下症. 小児科 48(11):1651-1656, 2007

2. 学会発表

皆川真規. 副甲状腺機能低下症・偽性副甲状腺機能低下症. 第 80 回日本内分泌学会学術総会 平成 19 年 6 月 15 日

高谷具純, 高谷里依子, 数川逸郎, 染谷知宏, 皆川真規, 河野陽一. 経過中に尿路感染を繰り返し水腫症が判明した先天性副腎過形成症の 1 例. 第 41 回日本小児内分泌学会学術集会 平成 19 年 11 月 7 日

木下香, 染谷知宏, 皆川真規, 河野陽一. インスリン浮腫を発症した 1 型糖尿病の 1 例. 第 41 回日本小児内分泌学会学術集会 平成 19 年 11 月 9 日

染谷知宏, 皆川真規, 高谷里依子, 数川逸郎, 下橋京子, 南谷幹史, 上瀧邦雄, 今田進, 渡辺智之, 眞山和徳, 佐藤浩一, 諏訪園靖, 杉原茂孝, 佐々木望, 河野陽一. 小児期発症パセドウ病における薬物療法—抗甲状腺薬による甲状腺機能正常化までの期間と副作用出現率の差—. 第 41 回日本小児内分泌学会学術集会 平成 19 年 11 月 9 日

高谷里依子, 数川逸郎, 染谷知宏, 皆川真規, 河野陽一. パセドウ病治療初期に骨折を繰り返した 1 例. 第 41 回日本小児内分泌学会学術集会 平成 19 年 11 月 9 日

下橋京子, 南谷幹史, 皆川真規, 堀川玲子, 吉井啓介, 本名敏郎. 小児 Plummer 病の 2 例. 第 41 回日本小児内分泌学会学術集会 平成 19 年 11 月 9 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

<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 は 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し、これらが協調的に PTH の骨作用などに寄与している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 (3 件)

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.

Hirofumi Tomiyama, Ryo Okazaki, Daisuke Inoue, Hiromi Ochiai,

Kazuki Shiina, Yoshifumi Takata, Hideki Hashimoto, Akira Yamashina

LINK BETWEEN OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA AND INCREASED BONE RESORPTION IN MEN. **Osteoporos Int** in press, 2008

Hiromi Ochiai, Hikari Ooka, Chiho Shida, Toshio Ishikawa, Daisuke Inoue and Ryo Okazaki. Acarbose Treatment Increases Serum Total Adiponectin Levels in Patients with Type 2 Diabetes.

Endocr J in press, 2008.

2. 学会発表 (国際 3 件、国内 8 件)

The Endocrine Society 89th Annual Meeting Endo 07 (Toronto, Canada, June 2-5, 2007) In Vitro Activities of T₄ Preparations from Different Manufacturers.

Toshio Ishikawa, Hiroko Okinaga, Hiromi Ochiai, Chiho Shida, Hikari Ooka, Daisuke Inoue, Makoto Kinoshita, Tamio Teramoto, Ryo Okazaki

ASBMR 29th Annual Meeting (Honolulu, Hawaii, 9/16-19/07)

Calcitriol Inhibits Marrow Stromal Cell Differentiation into Osteoblasts in A Mannner Cooperative with But

Independent of TGF-beta.

Daisuke Inoue, Hiromi Ochiai and Ryo Okazaki.

第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会 (5/24-26/07、仙台)

2 型糖尿病患者におけるアカルボースおよびピオグリタゾンの血中アディポネクチン濃度に対する効果。

落合裕美、井上大輔、大岡光、志田千穂、岡崎亮

第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会 (5/24-26/07、仙台)

2 型糖尿病患者の血中オステオプロテジェリン (OPG) 濃度は、血糖の改善およびアディポネクチン濃度の上昇により変化しない。

井上大輔、落合裕美、大岡光、志田千穂、岡崎亮

第 80 回日本内分泌学会学術総会 (6/14-16/07、東京国際フォーラム)

種々のサイロキシン試薬の活性の比較
石川敏夫、沖永寛子、落合裕美、志田千穂、大岡光、井上大輔、木下誠、寺本民生、岡崎亮

第 80 回日本内分泌学会学術総会 (6/14-16/07、東京国際フォーラム)

低リン血症性骨軟化症を来した腫瘍合併の成人 2 症例

遠藤逸朗、近藤剛史、重清友理、木内美瑞穂、栗飯原賢一、藤中雄一、井上大輔、工藤英治、福本誠二、松本俊夫

第 25 回日本骨代謝学会学術集会 (7/19-21/07、大阪国際会議場、大阪)

閉塞性睡眠時無呼吸症候群（OSA）では重症度に依存した骨吸収の亢進がみられ、CPAP（持続陽圧呼吸）により改善する。

井上大輔、富山博史、山科章、落合裕美、岡崎亮

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

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] 遺伝子やビタミン D 応答性抑制遺伝子である PTH および PTHrP 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) と結合する転写因子 VDIR を同定した。今回更に VDIR 機能を制御する因子として DNA メチル化酵素と脱メチル化酵素の存在を見出した。従って、生体内カルシウム代謝制御における新たなビタミン D 依存的転写抑制の分子機構の一端の解明に成功した。

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 転写抑制の分子機構について不明であった。そこで

本研究では、生化学的な手法を用いて VDIR と相互作用する複合体タンパク質群の単離・同定を試みた。

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) FLAG タグを含む VDIR 発現ベクターを細胞内で強制発現させ、大量培養を行った。細胞株にはマウス腎臓近位尿細管由来である MCT 細胞を用いた。

2) 抗 FLAG 抗体アガロースビーズを用いて細胞核タンパク質から VDIR 相互作用因子群を単離し、SDS-PAGE 後質量分析計 (MALDI-TOF/MS) を用いて単離したタンパク質群の同定を行った。

3) 同定タンパク質と VDIR、VDR の相互作用を、免疫沈降法にて検討を行った。

4) 同定因子のビタミンD依存的な 1α (OH)ase 遺伝子 mRNA 発現制御への効果を、ChIP アッセイ、ルシフェラーゼアッセイで検討した。

C. 研究結果および考察

まず、FLAG タグ付 VDIR 発現ベクターを MCT 細胞内に強制発現させる事に成功した。更にこれら細胞を大量培養後、抗 FLAG 抗体アガロースビーズを用いて FLAG-VDIR 相互作用因子群の精製を行った。その結果、幾つかのタンパク質について同定する事が出来た。なかでも DNA メチル化酵素 Dnmt3b に着目し、ビタミンD依存的な VDIR と VDR 相互作用について免疫沈降法にて検討を行った所、Dnmt3b と VDIR、VDR の相互作用を確認した。また、Dnmt3b の RNAi によって、ビタミンD依存的な 1α (OH)ase 遺伝子 mRNA 発現抑制の解除が観察された。更に 1α (OH)ase 遺伝子プロモーター上のメチル化 DNA 分布を検討した結果、ビタミンD依存的なメチル化 DNA の上昇が観察された。またビタミンD除去後の 1α (OH)ase 遺伝子プロモーター上のメチル化 DNA についても検討した所、除去後数時間でメチル化が解除される事を見出し、ビタミンD依存的な DNA のメチル化・脱メチル化サイクルの存在を、初めて見出す事が出来た。

D. 結論

本年度の研究においては、VDIRの相互作用因子としてDNAメチル化酵素を同定した。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. 研究発表

1. 論文発表

Kitagawa, H., Yamaoka, I., Akimoto, C., Kase, I., Mezaki, Y., Shimizu, T. and Kato, S. A reduction state potentiates the glucocorticoid response through receptor protein stabilization. **Genes to Cells** 12, 1281-1287, 2007.

Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Ohtake, F., Igarashi, M., Takeyama, K., Nakamura, T., Mezaki, Y., Takezawa, S., Yogiashi, Y., Kitagawa, H., Yamada, G., Takada, S., Minami, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K. and Kato, S. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signaling suppresses PPAR- γ transactivation. **Nat. Cell Biol.** 9, 1273-1285, 2007.

Igarashi, M., Yogiashi, Y., Mihara, M., Takada, I., Kitagawa, H. and Kato, S. Vitamin K induces osteoblast differentiation through PXR-mediated transcriptional control of the Msx2 gene. **Mol. Cell. Biol.** 27, 7947-7954, 2007.

Kitagawa, H., Ray, W. J., Glantschnig, H., Nantermet, P. V., Yu, Y., Leu, C. T., Harada, S. I., Kato, S. and Freedman, L. P. A regulatory circuit mediating convergence between nurrl transcriptional regulation and Wnt Signaling. **Mol. Cell. Biol.** 27, 7486-7496, 2007.

Nakamura, T., Imai, Y., Matsumoto, T., Sato,

- S., Takeuchi, K., Igarashi, K., Harada, Y., Azuma, Y., Krust, A., Yamamoto, Y., Nishina, H., Takeda, S., Takayanagi, H., Metzger, D., Kanno, J., Takaoka, K., Martin, T. J., Chambon, P. and Kato, S. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* 130, 811-823, 2007.
- Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., Fujii-Kuriyama, Y. and Kato, S. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562-566, 2007.
- 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. and 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.* 9, 604-611, 2007.
- 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. and Kato, S. A cell cycle-dependent co-repressor for photoreceptor cell-specific nuclear receptor function. *EMBO J.* 26, 764-774, 2007.
- Miyamoto, J., Matsumoto, T., Shiina, H., Inoue, K., Takada, I., Ito, S., Itoh, J., Minematsu, T., Sato, T., Yanase, T., Nawata, H., Osamura, R. Y. and Kato, S. Pituitary function of androgen receptor constitutes a glucocorticoid production circuit. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4807-4814, 2007.
- Kim, M.-S., Fujiki, R., Kitagawa, H. and Kato, S. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced DNA methylation suppresses the human CYP27B1 gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 265-266, 168-173, 2007.
- Kim, M.-S., Fujiki, R., Murayama, A., Kitagawa, H., Yamamoto, K., Yamamoto, Y., Mihara, M., Takeyama, K. and Kato, S. $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter. *Mol. Endocrinol.* 21, 334-342, 2007.
- Yamaoka, K., Shindo, M., Iwasaki, K., Yamaoka, I., Yamamoto, Y., Kitagawa, H. and Kato, S. Multiple co-activator complexes support ligand-induced transactivation function of VDR. *Arch. Biochem. Biophys.* 460, 166-171, 2007.
- Memezawa, A., Takada, I., Takeyama, K., Igarashi, M., Ito, S., Aiba, S., Kato, S. and Kouzmenko, A. P. Id2 Gene targeted crosstalk between Wnt and retinoid signaling regulates proliferation in human keratinocytes. *Oncogene* 26, 5038-5045,

2007.

Kimura, S., Matsumoto, T., Matsuyama, R., Shiina, H., Sato, T., Takeyama, K. and Kato, S. Androgen receptor function in folliculogenesis and its clinical implication in premature ovarian failure. **Trends Endocrinol. Metab.** 18, 183-189, 2007.

Kato, S., Fujiki, R., Kim, M.-S. and Kitagawa, H. Ligand-induced transrepressive function of VDR requires a chromatin remodeling complex, WINAC. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 103, 372-380, 2007.

Matsumoto, T., Kawano, H., Shiina, H., Sato, T. and Kato, S. Androgen receptor functions in male and female reproduction. **Reproductive Med. Biol.** 6, 11-17, 2007.

Fuse, H., Korenaga, S., Sakari, M., Hiyama, T., Ito, T., Kimura, K. and Kato, S. Non-steroidal antiandrogens act as AF-1 agonists under conditions of high androgen-receptor expression., **Prostate** 67, 630-637, 2007.

Sato, S., Kojima, M., Hanada, R., Kimura, A.1., Abe, T., Matsumoto, T., Iwasaki, M., Inose, H., Ida, T., Mieda, M., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Fujita, T., Kato, S., Kangawa, K., Shinomiya, K. and Takeda, S. Central control of bone remodelling by Neuromedin U: a mediator of the leptin-dependent regulation of bone formation. **Nat. Med.** 13, 1234-1240, 2007.

Aihara, K., Azuma, H., Akaike, M., Ikeda, Y., Sata, M., Takamori, N., Yagi, S., Iwase, T., Sumitomo, Y., Kawano, H., Yamada, T., Fukuda, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Sato, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Yoshimura, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Oomizu, A., Tsukada, M., Hayashi, H., Sudo, T., Kato, S. and Matsumoto, T. Strain-dependent embryonic lethality and exaggerated vascular remodeling in heparin cofactor II-deficient mice. **J. Clin. Invest.** 117, 1514-1526, 2007.

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

Mezaki, Y., Yoshikawa, K., Yamaguchi, N., Miura, M., Imai, K., Kato, S. and Senoo, H. Rat hepatic stellate cells acquire retinoid responsiveness after activation *in vitro* by post-transcriptional regulation of retinoic acid receptor alpha gene expression. **Arch. Biochem. Biophys.** 465, 370-379, 2007.

2. 学会発表

第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会

レチノイン酸誘導性血球分化を制御する核内受容体転写共役因子群の探索
藤木亮次、赤石葉月、北川浩史、加藤茂

明

ビタミン D 一位水酸化酵素遺伝子の活性型ビタミン D 依存的な転写抑制解除には DNA 脱メチル化機構が関与する
金 美善、高田伊知郎、武山 健一、加藤 茂明

エストロゲン応答 miRNA 発現のプロファイリング
山形 薫、鈴木絵里子、沢津橋 俊、伊藤紗弥、藤山沙理、田辺真彦、上田 崇、村田拓哉、趙 越、松川紘之、武山健一、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、目崎喜弘、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明

オーファン核内受容体 TLX の、転写共役因子複合体の同定による転写抑制機構の解明
横山 敦、竹澤慎一郎、北川浩史、加藤茂明

グルカゴン/PKA シグナル依存的な FXR 新規転写共役因子複合体の解析
馬場敦史、大竹史明、高田伊知郎、加藤茂明

染色体構造変換を介した新規転写共役抑制因子の探索と機能解析
伊藤紗弥、沢津橋 俊、鈴木絵里子、趙越、山形 薫、田辺真彦、木村周平、上田 崇、藤山沙理、村田拓哉、松川紘之、武山健一、加藤茂明

Identification of MDC1 that enhances androgen receptor transactivation
Yue Zhao, Ken-ichi Takeyama, Shun Sawatsubashi, Saya Ito, Eriko Suzuki, Kaoru Yamagata, Yuko Shirode, Masahiko Tanabe, Shuhei Kimura, Sari Fujiyama, Takashi Ueda, Takuya Murata, Hiroyuki Matsukawa, Alexander P. Kouzmenko, Shigeaki Kato

酸化還元刺激によるグルココルチコイドレセプター転写制御メカニズムの解析
山岡育子、北川浩史、秋本千央、加瀬郁子、目崎善弘、清水崇史、加藤 茂明

遺伝学的アプローチとプロテオミクスを連携した新規活性化クロマチン構造調節因子の網羅的探索と機能解析
藤山沙理、沢津橋 俊、鈴木絵里子、伊藤紗弥、田辺真彦、趙 越、木村周平、上田 崇、山形 薫、村田拓哉、松川紘之、武山健一、加藤茂明

ダイオキシン受容体による脂肪細胞分化抑制作用機構の解明
三木ひろみ、大竹史明、高田伊知郎、藤井義明、加藤茂明

Y染色体遺伝子TSPYと男性ホルモン受容体の機能的相互作用の解析
秋本千央、上田 崇、山岡育子、井上和樹、松本高広、盛 真友、北川浩史、加藤茂明