

ERR $\alpha$ 新規転写共役因子の同定と解析  
松山玲子、高田伊知郎、北川浩史、矢野  
哲、加藤茂明

未知クロマチンバウンダリー制御因子の  
新たな探索法確立の試み  
鈴木絵里子、沢津橋 俊、伊藤紗弥、趙  
越、山形 薫、田辺真彦、木村周平、藤  
山沙理、上田 崇、村田拓哉、松川紘之、  
Alexander Kouzmenko、武山健一、加  
藤茂明

日本農芸化学会 2007 年度大会  
筋芽細胞を用いた PPAR $\delta$ 転写共役因子の  
精製と同定  
村上友浩、高田伊知郎、北川浩史、山岡  
一良、加藤茂明

Notch シグナル伝達依存的な新規転写抑  
制因子の同定と機能解析  
武山健一、伊藤紗弥、沢津橋俊、  
Alexander Kouzmenko、鈴木絵里子、  
山形薫、趙越、田辺真彦、木村周平、上  
田崇、村田拓也、藤山沙理、加藤茂明

Wnt シグナル依存的な PPAR $\gamma$  活  
性制御機構の解析  
高田伊知郎、三原政朋、加藤茂明

未知クロマチンバウンダリー制御因子の  
新たな探索法確立の試み  
鈴木絵里子、沢津橋俊、伊藤紗弥、田辺  
真彦、木村周平、趙越、山形 薫、上  
田 崇、村田拓也、Alexander  
Kouzmenko、武山健一、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、井上和樹、松本高広、盛 真  
友、北川浩史、加藤茂明

第 95 回日本泌尿器科学学会総会  
前立腺におけるアンドロゲンレセプター  
の高次機能解析  
武政（高橋）さゆり、渡辺資之、松本高  
広、北村唯一、加藤茂明

第 27 回日本内分泌学会  
核内受容体を介する細胞内情報伝達機構  
に関する研究  
加藤茂明

第 25 回日本骨代謝学会  
性ホルモン受容体群の骨組織での高次機  
能  
加藤茂明

間葉系幹細胞における PPAR $\gamma$  と  
Non-canonical Wnt シグナルのクロス  
トーク分子機構の解析  
高田伊知郎、三原正朋、松本邦弘、加藤  
茂明

エストロゲンの骨量維持機構は Fas  
Lignd シグナルを介した破骨細胞寿命の  
調節である  
今井祐記、中村 貴、竹田 秀、福田 亨、  
山本陽子、高岡邦夫、松本高広、加藤  
茂明

## F. 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

## 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及び新規治療法の解析を目的として、作用選択的なビタミンD受容体（VDR）の活性化機構の解析を行った。VDRリガンドとして機能するリトコール酸誘導体の腸管粘膜由来細胞及び動物に対する効果をビタミンD3によるものと比較検討した結果、ビタミンD3はリトコール酸誘導体に比べ、より効果的にカルシウム代謝関連遺伝子の誘導を起こすことが明らかになった。リトコール酸誘導体は、VDRの作用選択性の解析に有用であり、新規治療薬のモデルとなることが示唆された。

### 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D3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D3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D3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・病理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D3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. 腸管粘膜由来 SW480 細胞へ活性型ビタミンD3またはリトコール酸誘導体（リトコール酸アセテート、リトコール酸プロピオネート）の処理を行い、カルシウムチャンネル TRPV6 及びビタミンD代謝酵素 CYP24 の遺伝子発現をリアルタイムPCRにて検討した。
2. マウスへビタミンD3（ $1\alpha$ ヒドロキシビタミンD3）またはリトコール酸誘導体を腹腔内または経口による投与を行い、体重変化、血中カルシウム濃度、腎臓や小腸粘膜におけるVDR標的遺伝子の発現を解析した。
3. 遺伝子組換え実験に関しては、カルタヘナ法に基づく手続きを行い、機関の承認を得た。動物実験に関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」及

び「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に基づく学内手続きを行った。

### C. 研究結果

1. SW480細胞におけるCYP24及びTRPV6のmRNA発現に対する活性型ビタミンD3及びリトコール酸誘導体の濃度依存性効果を検討した結果、活性型ビタミンD3はCYP24の発現を誘導するよりも低濃度でTRPV6の発現を誘導すること、リトコール酸アセテート及びリトコール酸プロピオネートがTRPV6の発現を誘導する濃度はCYP24の発現を誘導する濃度と大きな差がないこと、を見いだした。
2. マウスへビタミンD3、リトコール酸アセテート及びリトコール酸プロピオネートを、腹腔内または経口投与した。腹腔内投与でも経口投与でも、ビタミンD3は、体重減少、血中カルシウム濃度の上昇、腎臓CYP24、TRPV5、TRPV6及びcalbindin D9kの発現を誘導した。腎臓のCYP24の発現において、ビタミンD3と同程度の効果を示すリトコール酸誘導体の濃度を決定し、効果を検討した。リトコール酸誘導体は、腎臓CYP24の発現を効果的に誘導したが、TRPV5、TRPV6及びcalbindin D9kの発現誘導を起こさず、体重減少も高カルシウム血症も誘導しなかった。

### D. 考察

VDRは、活性型ビタミンD3の骨・カルシウム代謝調節作用のメディエーターと考えられている。VDRの生理的リガンドと

して胆汁酸であるリトコール酸が見いだされたが、胆汁酸が脂溶性ビタミンであるビタミンD3の消化管での吸収に必要な因子である点を除き、胆汁酸と骨・カルシウム代謝を関連付ける報告はほとんどない。そこで、リガンド選択的なVDR作用の存在を解析した。実験結果は、ビタミンD3に比較して、胆汁酸誘導体はカルシウム代謝関連遺伝子の発現誘導をおこしにくく、血中カルシウム濃度の変化も起こしにくいことを示している。これは、カルシウム代謝関連遺伝子の発現調節には、ビタミンD3特異的なメカニズムの存在を示唆している。今後、ビタミンD3と胆汁酸（誘導体）の効果を比較することにより、リガンド選択的な作用の解明、及び新規治療法の開発が期待できる。

## E. 結論

VDRリガンドとして機能するビタミンD3と胆汁酸誘導体の効果を比較した結果、ビタミンD3は胆汁酸誘導体よりもカルシウム代謝関連遺伝子を誘導すること、胆汁酸誘導体の動物への投与は血中カルシウム濃度を変化させにくいことが明らかになった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Yoshimoto N, Inaba Y, Yamada S, Makishima M, Shimizu M, Yamamoto K. 2-Methylene 19-nor-25-dehydro-1  $\alpha$ -hydroxyvitamin D3 26,23-lactones: synthesis, biological activities and molecular basis of passive antagonism. *Bioorg Med Chem* 16: 457-473, 2008

(2) Ishizawa M, Matsunawa M, Adachi R, Uno S, Ikeda K, Masuno H, Shimizu M, Iwasaki K, Yamada S, Makishima M. Lithocholic acid derivatives act as selective vitamin D receptor modulators without inducing hypercalcemia. *J Lipid Res* 49: 763-772, 2008

(3) Horie A, Akimoto M, Tsumura H, Makishima M, Taketani T, Yamaguchi S,

Honma Y. Induction of differentiation of myeloid leukemia cells in primary culture in response to lithocholic acid acetate, a bile acid derivative, and cooperative effects with another differentiation inducer, cotylenin A. *Leuk Res*, in press

### 2. 学会発表

(1) 西田滋、小倉道一、榎島誠. ビタミンD3のマウス胆汁酸代謝に及ぼす影響. 第317回脂溶性ビタミン総合研究委員会、東京、2007.9

(2) 石澤通康、松縄学、宇野茂之、増野弘幸、清水正人、山田幸子、榎島誠. リトコール酸誘導体の作用選択的VDR活性とその有用性. 日本レチノイド研究会第18回学術集会、東京、2007.11

(3) 榎島誠. 胆汁酸センサーとして機能する核内受容体（特別講演）. 第29回胆汁酸研究会、つくば、2007.11

(4) 榎島誠. 胆汁酸応答性核内レセプターによる生体機能調節（招待講演）. 第13回Hindgut Club Japanシンポジウム、東京、2007.12

(5) 石澤通康、松縄学、安達竜太郎、池田和正、増野弘幸、清水正人、山田幸子、榎島誠. 作用選択的ビタミンD受容体効果を有するリトコール酸誘導体（ワークショップ：脂溶性ビタミンの分子生物学、公募）. 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007.12

(6) 松縄学、稲葉有香、山本恵子、吉本暢子、宇野茂之、山田幸子、榎島誠. 細胞選択的ビタミンD受容体モデュレーター的作用機構. 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007.12

(7) 松縄学、宇野茂之、榎島誠. 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482回日大医学会例会、東京、2008.3

(8) 小倉道一、榎島誠. 閉塞性黄疸モデルマウスに対する1 $\alpha$ (OH)D3投与の検討. 第482回日大医学会例会、東京、2008.3

(9) 西田滋、小倉道一、槇島誠. マウスにおける胆汁酸代謝に及ぼすビタミンDの影響. 第482回日大医学会例会、東京、2008.3

(10) 石澤通康、松縄学、山田幸子、槇島誠、安達竜太郎、増野弘幸、清水正人. ビタミンD受容体のリガンド選択的作用発現機構の解析. 第319回脂溶性ビタミン総合研究委員会、東京、2008.3

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

出願番号：特願 2007-147866

発明者：槇島誠、石澤通康、松縄学、山田幸子

発明の名称：作用選択的ビタミンD受容体作用剤

出願人：学校法人日本大学

出願日：平成19年6月4日

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

これまでのところ、リン酸利尿ホルモンである fibroblast growth factor 23 (FGF23)の血中レベルと血清リン値との間に明確な相関性は認められていない。種々の遺伝性低リン血症においては FGF23 値の上昇が認められるが、近位尿細管における受容体依存性エンドサイトーシスの障害を伴うファンconi症候群などにおいては、血中 FGF23 値がむしろ低下しているのにも関わらず、過リン酸尿を呈する。FGF23 作用はさまざまな因子により調節されると考えられるが、今回、尿細管由来細胞株を用いて細胞外無機リン酸濃度そのものが FGF23 に対する感受性に影響を与える可能性を検討した。細胞外無機リン酸濃度の上昇は、ナトリウム・リン酸共輸送担体 extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) のリン酸化をもたらし、FGF23 の標的遺伝子の一つである early growth response-1(Egr-1)の発現を誘導した。このリン酸応答性には、ナトリウム・リン酸共輸送担体が関与していることが示唆された。以上より、細胞外無機リン酸濃度変化が尿細管細胞の FGF23 に対する応答性に影響を与える可能性が示唆された。

A. 研究目的

腎近位尿細管は、活性型ビタミンDの産生のある場であるとともにリン酸再吸収の場であり、カルシウム・リン恒常性維持において中心的な役割を担う。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、エンドサイトーシス受容体であるメガリンの機能が障害されており、これらの病態における 25OHD の再吸収障害をもた

らす。我々はこれまで、メガリンのリガンドの一つである receptor associated protein (RAP)を利用したメガリン機能攪乱モデルを用いて、メガリンが尿細管における IIa 型ナトリウム・リン酸共輸送担体の細胞内局在制御リン酸再吸収量の調節に関わることを明らかにしてきたが、さらに、本マウスにおいてはファンconi症候群患者の場合と同様に血中 FGF23 値の低下が認められた。

これまでのところ、血中 FGF23 値と血清リン値との間に明確な相関性が報告されていないことから、FGF23 に対する応答性にはさまざまな因子が影響を与えることが推察される。今回、細胞外無機リン酸濃度そのものが FGF23 に対する感受性に影響を与える可能性を検討するため、尿細管由来細胞株を用いて解析を行った。

## B. 研究方法

ヒト胎児腎尿細管由来細胞株 HEK293 細胞とブタ近位尿細管由来細胞株 LLCPK1 を用いて以下の検討を行った。

- 1) 培地にリン酸ナトリウム緩衝液を添加することにより種々の濃度の細胞外無機リン酸を含む培地を調製し、これらの培地を用いて処理した細胞から経時的に細胞抽出物を回収し、蛋白質群のリン酸化レベルを Western blot により解析した。
- 2) 種々の濃度の細胞外無機リン酸で処理した細胞より RNA を調製し、FGF23 の標的遺伝子である Egr-1 の発現を解析した。
- 3) ナトリウム・リン酸共輸送担体に対する阻害剤である phosphonoformic acid (PFA) を用いて、尿細管由来細胞における細胞外無機リン酸応答性に対する影響を検討した。
- 4) 分解に対して抵抗性を有する機能獲得型 FGF23 変異体 [R179Q] を恒常的に発現する CHO 細胞を樹立し、その培養上清として調製した FGF23 [R179Q] とリン酸を細胞に同時に添加することにより、FGF23 シグナル伝達に対する細胞外無機リン酸濃度変化の影響を検討した。

(倫理面への配慮)

すべての実験は、当該施設（大阪府立母子保健総合医療センター研究所）の組換え DNA 実験委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

- 1) 通常、細胞外液中には約 1 mM のリン酸が存在する。HEK293 細胞や LLCPK1 細胞に 4~10 mM の高濃度リン酸刺激を与えたところ、いずれの細胞においても、30 分以内に ERK1/2 のリン酸化を認めた。細胞外無機リン酸刺激による ERK1/2 のリン酸化は、上流に存在する MEK に対する阻害剤である PD98059 の添加により抑制された。また、さらに上流に存在する c-Raf についても検討したところ、細胞外無機リン酸濃度の上昇が c-Raf の Ser338 のリン酸化を引き起こすことが明らかとなった。
- 2) 細胞外無機リン酸濃度の上昇と FGF23 がともに ERK のリン酸化を引き起こすことから、細胞外無機リン酸濃度変化が FGF23 の標的遺伝子の一つである Egr-1 の発現に及ぼす影響を検討した。その結果、4~10 mM の高濃度リン酸刺激は、30 分以内に Egr-1 の発現を誘導した。
- 3) ナトリウム・リン酸共輸送担体阻害剤である PFA による前処理を行ったところ、細胞外無機リン酸濃度の上昇により誘導される ERK1/2 のリン酸化、Egr-1 の発現増加はいずれも解除された。
- 4) 細胞に FGF23 [R179Q] と高濃度リン酸を細胞に同時に添加したところ、ERK1/2 のリン酸化、Egr-1 の発現増加は相加的に増強した。

## D. 考察

尿細管由来細胞株において、細胞外無機リン酸濃度変化がシグナルとして細胞内に伝達され、遺伝子発現の変化をもたらすことが示された。PFA で処理することにより細胞外無機リン酸応答性が解除されたことから、ナトリウム・リン酸共輸送担体の関与が推察される。また、細胞外無機リン酸濃度の上昇と FGF23 による刺激がいずれも ERK1/2 のリン酸化、Egr-1 の発現誘導をもたらすことから、これらの 2 つのシグナルが下流のネットワークを共有する可能性が推察され、細胞外無機リン酸濃度の変化が

FGF23 応答性に影響を与える可能性が考えられる。我々のこれまでの研究から、メガリンの機能攪乱モデルにおいて IIa 型ナトリウム・リン酸共輸送担体の細胞内内在化をもたらすことが示されており、メガリン機能の異常はナトリウム・リン酸共輸送担体の局在変化を介して間接的に FGF23 に対する応答性にも影響を与えることが推察される。

#### E. 結論

細胞外無機リン酸濃度変化はナトリウム・リン酸共輸送担体を介して細胞内にシグナルとして伝達され、FGF23 応答性に影響を与える。エンドサイトーシス受容体異常症においては、ナトリウム・リン酸共輸送担体の細胞内内在化が亢進することから、FGF23 に対する応答性も変化している可能性がある。

#### F. 健康危険情報

該当無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamamoto T, Michigami T, Aranami F, Segawa H, Yoh K, Nakajima S, Miyamoto KI, Ozono K. Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria: a study for the phosphate transporter gene IIc and osteoblastic function. *J Bone Miner Metab*, 25:407-413, 2007

##### 2. 学会発表

Yamazaki M, Kimata M, Tachikawa K, Ozono K, Michigami T. Extracellular inorganic phosphate induces ERK1/2 phosphorylation and up-regulates a target gene of FGF23 in renal proximal tubule cells via type IIa sodium-phosphate co-transporter. 29th annual meeting of the American Society

for Bone and Mineral Research. 2007.9.16~19 : Honolulu, U.S.A.

山崎美和, 木全正彰, 立川加奈子, 大菌惠一, 道上敏美. 腎近位尿細管細胞における無機リン酸シグナルと FGF23 シグナルの共通性. 第 25 回日本骨代謝学会学術集会. 2007. 7. 19-21 : 大阪.

#### 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。



## 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

FGF23作用障害による疾患の解析、あるいはFGF23ノックアウトマウスの病態から、FGF23は生理的なリン濃度調節因子と考えられる。一方このFGF23産生調節機序には、不明な点が多い。そこで急性の血中リン濃度の変化がFGF23濃度を変化させるかどうかを検討した。リン製剤の経静脈投与、および炭水化物の経口投与は、それぞれ血中リン濃度を低下、上昇させた。一方これらの処理により、血中FGF23濃度は6時間以内には変化しなかった。従って急性の血中リン濃度の変化は、FGF23濃度に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

### A. 研究目的

FGF23作用障害による疾患患者、あるいは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因子と考えられる。一方血中FGF23濃度がどのような機序により調節されているのかは、不明である。そこで血中リン濃度の変化が、FGF23濃度に影響を及ぼすかどうかを検討した。

### B. 研究方法

健常成人4名に、リン酸2カリウムを4時間点滴静注した。また別の日に、トレーランGを経口摂取させた。これらの操作開始後6時間後まで1時間ごとに採血し、血中リン、およびFGF23濃度を測定した。

（倫理面への配慮）

各対象者から同意を得たのち、行った。

### C. 研究結果

リン酸2カリウムの点滴静注により、血中リン濃度は有意に上昇した。逆にトレーランGの投与により、血中リン濃度は有意に低下した。一方これらの操作により、血中FGF23濃度は有意な変化を示さなかった。

### D. 考察

血中カルシウム濃度調節に中心的役割を果たす副甲状腺ホルモンの血中濃度は、血中カルシウム濃度の変化により分の単位で変動する。これに対しFGF23濃度は、血中リン濃度の変化に対し迅速には変動しないことが明らかとなった。一方FGF23は生理的な血中リン濃度の調節因子として作用することから、FGF23濃度は厳密に調節を受けているものと考えられる。FGF23の産生や血中濃度の調節機

構については、さらに検討が必要である。

### E. 結論

FGF23の血中濃度は、血中リン濃度の変化に対し数時間以内には変動しない。

### F. 健康危険情報

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Ito N et al.: Effect of acute changes of serum phosphate on fibroblast growth factor (FGF)23 levels in human. *J Bone Miner Metab* 25(6): 419-422, 2007

2) Ito N et al.: Fibroblast growth factor (FGF)23 in patients with acromegaly. *Endocr J* 54(3): 481-484, 2007

3) Endo I et al.: Clinical usefulness of measurement of fibroblast growth factor 23 (FGF23) in hypophosphatemic patients - Proposal of diagnostic criteria using FGF23 measurement-. *Bone in press*

#### 2. 学会発表

Ito N et al.: Regulatory mechanism of production and circulatory level of FGF23 in human. Twenty-Ninth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Honolulu, USA) *J Bone Miner Res* 22(S1): S393, 2007

### H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

TSH レセプター (TSHR) 異常症の病態に関する研究  
＝甲状腺外 TSHR の熱産生に関する検討＝

研究協力者 山梨大学医学工学総合研究部

遠藤登代志 准教授

研究要旨

TSHR は甲状腺以外の組織にも発現しているがその機能は不明の点が多い。C.RF-Tshr<sup>hy/hy</sup> (hyt) マウスは TSHR に遺伝子変異を有する甲状腺機能低下症モデルであり、ヒト TSHR 異常症と類似する。hyt マウスの甲状腺は低形成で褐色脂肪組織の発達は悪く UCP-1 の発現も極めて低値である。このため 4℃環境下で直腸温は 2-4℃まで低下する。そこで in vivo electroporation 法にて褐色脂肪組織に TSHR を強制発現させたところ、4℃環境下で直腸温は 3-4℃の低下に留まった。従って褐色脂肪組織の TSHR は体温の調節に関与し、甲状腺機能低下症に際して、体温のさらなる低下を阻止する様に作用する。

A 研究目的

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

B 研究方法

C.RF-Tshr<sup>hy/hy</sup> マウスは Jackson

laboratory より入手し、これらヘテロマウスの交配により Tshr<sup>hy/hy</sup> (ホモマウス) を作成した。TSHR の genotype は tail DNA の PCR 産物の direct sequencing によりコドン 556 が CCG か CTG かを決定した。褐色脂肪組織の uncoupling protein (UCP)-1 は抗 UCP-1 抗体 (Sigma-Aldrich 社) を用いて免疫染色にて行った。FT3, FT4 の測定はロッシュダイアグノスティック社 ECLusis system により測定した。Rat TSHR cDNA の in vivo electroporation 法による組織導入は NEPA GENE Co. Chiba 社の CUY21 を用いて行った。

## C 研究結果

- ①  $Tshr^{hy/hy}$  (ホモマウス) は甲状腺の形成不全があり肉眼的にその存在を確認することはできなかった。ホモマウスの血中freeT4は $0.10 \pm 0.04$  ng/dl (n=6)。一方, wildタイプは $1.47 \pm 0.24$  ng/dl(n=7)であり極めて重篤な甲状腺機能低下症を発症する。
- ②  $Tshr^{hy/hy}$  (ホモマウス) の褐色脂肪組織は委縮性であり、細胞内に脂肪滴の貯留をほとんど認めない。また細胞内にUCP-1免疫活性もほとんど確認されない。褐色脂肪組織重量/体重 $\times 10^3$ はwildタイプで $6.71 \pm 0.4$ , ホモタイプで $3.30 \pm 1.0$ であった。
- ③  $Tshr^{hy/hy}$  (ホモマウス) を $4^\circ\text{C}$ 環境下に置くと90分後の直腸温は $24 \pm 0.9^\circ\text{C}$ , wildタイプは $36.5 \pm 1.0^\circ\text{C}$ であり、ホモマウスでは一部死亡例が認められた。
- ④  $Tshr^{hy/hy}$  (ホモマウス) の褐色脂肪組織に rat TSHR cDNA を導入し、3週後に再度 $4^\circ\text{C}$ 環境下に置くと90分後の直腸温は $34.6 \pm 0.34^\circ\text{C}$ にまで上昇した。

## D 考案

$Tshr^{hy/hy}$  (ホモマウス) は甲状腺形成不全、低T4血症など重症型ヒトTSHR異常症に極めて類似する。 $Tshr^{hy/hy}$ マウスの褐色脂肪組織は委縮性でUCP-1の発現も低下しているため、極めて容易に低体温症に移行す

る。この主な原因は低T4血症によるUCP-1発現抑制と考えられるが、褐色脂肪組織

に機能性TSHRを強制発現させたところ、血中の甲状腺ホルモン値は変化せず、かつ直腸温は $34.6 \pm 0.34^\circ\text{C}$ にまで上昇したことは、褐色脂肪組織のTSHRは体温の調節に関与し、甲状腺機能低下症に際して、体温のさらなる低下を阻止する様に作用することを意味する。また、以上の事実は甲状腺外TSHRがエネルギー代謝や肥満等にも関与している事を示唆する。

## E 結論

TSHR遺伝子変異マウスである $Tshr^{hy/hy}$ は低体温症を発症するが、これには褐色脂肪組織のTSHRも一部関与し、甲状腺機能低下症に際して、体温のさらなる低下を阻止する様に作用する。

## G 研究発表

1. Endo, T. and Kobayashi T. Thyroid stimulating hormone receptor in brown adipose tissue is involved in the regulation of thermogenesis. *Endocrinology*, in press
2. Toyoshi Endo, Kazuyasu Ohta and Tetsuro Kobayashi. Expression and function of *Cbfa-1/Runx2* in thyroid papillary carcinoma cells *J Clin Endocrinol. Metab.* in pres

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

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 $\beta$ のDNA結合領域の変異による  
不応症発症の可能性

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(T3)の作用機構異常で生じる先天性遺伝性疾患で、多くの甲状腺ホルモン受容体(TR) $\beta$ 変異が同定されている。これらの変異はすべてエクソン8,9,10のホットスポットに局限し、DNA結合領域(DBD)には見いだされていない。従来、変異TRが正常TRに対しドミナントネガティブ作用を発揮するにはDNA結合能が必要であり、これを欠いた異常TRは正常TRを競合的に障害できないと考えられてきた。しかし我々のこれまでの研究から、TR $\beta$ のT3依存性TSH $\beta$ 遺伝子転写抑制作用には、DBDは重要であるものの、TRのDNA結合能は必須でないことが明らかとなった。興味深いことにTRと同じく核受容体に属する転写因子SF-1は、そのDBDにおける変異(G35E)がsex reversalを来す。すなわちSF-1のこのDBD変異体は野生型に対しドミナントネガティブ作用を発揮する。そこでSF-1(G35E)に相同する変異をTR $\beta$ 2に導入し、TSH $\beta$ 遺伝子への負の調節において正常TR $\beta$ 2に対するドミナントネガティブ作用が発揮されるか否かを検討した。

#### A. 研究目的

これまでに、thyrotrophの分化を決定する転写因子Pit1とGATA2を共発現させれば、腎由来CV1細胞でもT3/TRによるTSH $\beta$ への負の調節が観察可能であることを報告してきた。詳細な解析の結果、TRのDBDはTSH $\beta$ 遺伝子プロモーター上のT3応答配列(TRE)ではなく、GATA2のZnフィンガーと蛋白-蛋白相互作用することが分かった。一方、核受容体SF-1はGATAファミリーの転写因子の一つであるGATA4と相乗的に働いてミューラー管阻害因子(MIS)遺伝子の発現を活性化する。Sex reversalを来した患者からSF-1 DBDのGlyからGluへの変異が見出され、この変異体G35Eは野生型SF-1の機能をドミナントネガティブに抑制することが報告されている。そこで今回、SF-1(G35E)の相同部位に同一変異を導入したTR $\beta$ 2(G182E)を作製し、TSH $\beta$ 遺伝子への負の調節への作用を検討した。

#### B. 研究方法

ラットTR $\beta$ 2発現プラスミドを鋳型にsite-directed mutagenesisを用いてG182Eの発現プラスミドを作製した。CV1細胞にPit1、GATA2、TSH $\beta$ レポーター遺伝子、野生型TR $\beta$ 2、変異TR-G182Eの各発現プラスミドを導入し、リガンド添加後24時間培養してCAT活性を測定、TSH $\beta$ 遺伝子の転写活性を求めた。

(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

正の調節におけるTRとTREの相互作用の特異性はDBD、中でもPbox、Dboxとよばれる数アミノ酸で決定され、特にPboxはTRをはじめとする核受容体で極めて高い保存性を示す。このようなPboxの変異であるG182Eは、予想通りダイレトリピート4型TREであるDR4を活性化しなかった。Pit1とGATA2を発現させたCV1細胞でTSH $\beta$ プロモーターに対する作用を検討したところ、やはりG182E自身はT3依存性

の抑制を示さなかった。しかし G182E を野生型 TR $\beta$ 2 と共発現させると、野生型 TR $\beta$ 2 が T3 依存性に示す TSH $\beta$  プロモーターの抑制を解除した。すなわち DBD 領域の変異体である G182E は、正常 TR に対しドミナントネガティブ作用を発揮した。GST プルダウンアッセイで GATA2 との結合性を検討すると、G182E は野生型 TR $\beta$ 2 と同様の結合能を示した。コントロールとして作製した G182A(Gly から Ala への置換)は、それ自身が負の調節機能を保持しており、ドミナントネガティブ作用は発揮しなかった。G182E は T3 結合能を維持しているため、甲状腺ホルモン不応症患者から同定された T3 結合領域の変異である K443E を導入して G182E/K443E を作成した。G182E/K443E も G182E 同様、野生型 TR $\beta$  による TSH $\beta$  遺伝子への負の調節を解除したことから、G182E のドミナントネガティブ作用は T3 結合能には依存しないことが確認された。

#### D. 考察

従来甲状腺ホルモン不応症患者の TR 変異はすべてエクソン 8,9,10 のホットスポットに限局し、DBD の変異は不応症を引き起こさないものと考えられてきた。今回我々が作成した G182E が TSH $\beta$  遺伝子抑制作用において野生型 TR $\beta$ 2 にドミナントネガティブ作用を発揮したことは、このような甲状腺ホルモン不応症患者が存在する可能性を示すものである。事実、SF-1 の G35E 変異は sex reversal の症例として実在する。今後、甲状腺ホルモン不応症のうちとくに従来下垂体型と称されてきたような症例、あるいは TSH 産生腫瘍の一部において、このような DBD の変異がないか検討していく必要がある。

#### E. 結論

TR $\beta$ 2 の DNA 結合領域の変異である 182E は野生型 TR $\beta$ 2 の T3 依存性の負の調節に対しドミナントネガティブ作用を発揮し、TSH 不適切分泌を来し得ることが示唆された。あらたな甲状腺ホルモン不応症発症

機序に関係する可能性がある。

#### 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.* 21:865-884, 2007

##### 2. 学会発表

Nakamura H. : (DAIICHI Prize Lecture)

Negative regulation of thyrotropin  $\beta$  gene by thyroid hormone and its receptor. 8th Congress Asia & Oceania Thyroid Association. 2007 年 2 月 (Manila, Philippines)

Nakamura H, Matsushita A, Kashiwabara Y, Sasaki S: What is the role of Pit1 in the negative regulation of TSH  $\beta$  gene by T3 and its receptors? 32nd Annual Meeting of European Thyroid Association. 2007 年 9 月 (Leipzig, Germany)

Sasaki S, Nakamura H. et al : Inhibition of GATA2-dependent transactivation of the thyrotropin  $\beta$  gene by ligand-bound estrogen receptor  $\alpha$  78th Annual meeting of American Thyroid Association. 2007 年 10 月. (New York, USA)

佐々木茂和、中村浩淑 他

甲状腺ホルモン受容体  $\beta$ 2 の DNA 結合領域の変異体(G182E)は T3 依存性の TSH $\beta$  遺伝子への負の調節に対しドミナントネガティブ作用を発揮する 第 80 回内分泌学会総会 2007 年 6 月 (日本内分泌学会雑誌 83 (1): 127, 2007 Abst #O-3-7-7)

佐々木茂和、中村浩淑 他

甲状腺ホルモン受容体の DNA 結合領域の変異による TSH 不適切分泌の可能性に関する検討 第 50 回日本甲状腺学会総会 2007

年 11 月 (日本内分泌学会雑誌 83 (2): 325,  
2007 Abst #O-10-3)

**G. 知的所有権の取得状況**

1. 特許取得   なし
2. 実用新案登録   なし
3. その他   なし

甲状腺ホルモン不応症（RTH）における  
Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) 作用の解析

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** 甲状腺ホルモン (TH) 不応症 (RTH) では種々の視床下部—下垂体—甲状腺 (HPT) 系の異常が生ずるが、その病態は不明の点が多く、その病態の解明は、RTHの診断と治療に不可欠である。私達はTHレセプター (TR)  $\beta$  変異を発現するTR $\beta$  ( $\Delta 337T$ ) ノックイン (TRKI) マウスを解析しており、昨年度は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。HPT系の調節においてThyrotropin (TSH) は、Thyrotropin-releasing hormone (TRH) による合成、分泌促進と、TR $\beta$  によるネガティブフィードバック機構という二重機構により制御されているが、RTHにおいてはHPT系のネガティブフィードバックの破綻からTSH不適切分泌 (SITSH) が認められる。TRH ノックアウト (KO) マウス (TRH $^{-/-}$ ) とTR $\beta$  KOマウス (TR $\beta^{-/-}$ ) を交配させ、TRHTRKOマウス (TRH $^{-/-}$ TR $\beta^{-/-}$ ) を樹立し解析した結果、HPT系の制御にはTRHがTR $\beta$  より優位であることが判明した (JBC 281:5000, 2006)。今年度はTR $\beta$  変異の際におけるTRHとTR $\beta$  のHPT系調節の優位性について検討するために、TRHKOマウスと、TRKIマウスを交配させKOKマウス (TRH $^{-/-}$ TR $\beta^{mut/mut}$ ) を樹立し、TR $\beta$   $\Delta 337T$  変異体におけるTSH遺伝子発現及び分泌制御へのTRHの影響を検討した。その結果 TR $\beta$  欠損と異なり、TR $\beta$   $\Delta 337T$  変異体ではTRH非存在下でも、野生型と比較して過剰なTSH $\beta$  遺伝子発現および血清TSH値を認め、TRH非存在下の末梢のFT4値等はTRH存在下と有意差を認めなかった。変異TR $\beta$  によるRTHのSITSHはTRHにかかわらず、変異TR $\beta$  により制御されていることが判明した。

## A. 研究目的

甲状腺ホルモン (TH) 不応症 (RTH) はTHの標的組織での反応性が低下もしくは欠如した状態であり、TH高値にも関わらずThyrotropin (TSH) の高値を呈するTSH不適切分泌 (SITSH) を認める。視床下部-下垂体-甲状腺 (HPT) 系の調節において Thyrotropin (TSH) は、Thyrotropin-releasing hormone (TRH) による合成、分泌促進と、TR $\beta$  によるネガティブフィードバック機構という相反する機構により制御されているがRTHにおいてはHPT系のネガティブフィードバックの破綻からTSH不適切分泌 (SITSH) が認められる。我々のグループはTRHノックアウト (KO) マウス (TRH $^{-/-}$ ) とTR $\beta$  KOマウス (TR $\beta^{-/-}$ ) を交配させ、TRH-TR $\beta$  KOマウス (TRH $^{-/-}$ -TR $\beta^{-/-}$ ) を樹立し解析した結果、TSHの合成分泌にTRHは不可欠であり、HPT系の制御にはTRHがTR $\beta$  より優位であると報告した (JBC 281:5000-5007, 2006)。今回TR $\beta$  が欠損するのではなく、変異をもった場合はTRHとTR $\beta$  のどちらがHPT系の調節に優位に働くのかを検討するために、我々はTRHKOマウスと、RTHのモデルマウスであるTHとの結合能が欠失したTR $\beta$   $\Delta$  337T変異を生理的に発現するTR $\beta$   $\Delta$  337Tノックインマウスを交配させ TRHKO-TRKIマウス (TRH $^{-/-}$ -TR $\beta^{mut/mut}$ ) を樹立し、TR $\beta$   $\Delta$  337T変異体存在下におけるTSH遺伝子発現及び分泌制御へのTRHの影響を検討した。

## B. 研究方法

RTHのモデルマウスであるTR $\beta$   $\Delta$  337Tノックイン (TR $\beta$   $\Delta$  337T $^{mut/mut}$ ) マウスとTRHノックアウト (TRH $^{-/-}$ ) マウスを交配させ、WT (野生型)、KIヘテロ (TR $\beta$   $\Delta$  337T $^{mut/+}$ )、KI (TR $\beta$   $\Delta$  337T $^{mut/mut}$ )、TRHKO (TRH $^{-/-}$ )、KOKIヘテロ (TRH $^{-/-}$ -TR $\beta$   $\Delta$  337T $^{mut/+}$ )、KOKI (TRH $^{-/-}$ -TR $\beta$   $\Delta$  337T $^{mut/mut}$ ) を作成した。これらをすでに報告したTRKO (TR $\beta^{-/-}$ )、TRHTRKO (TRH $^{-/-}$ -TR $\beta^{-/-}$ ) と比較検討した。

(倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### 1) TSH $\beta$ 遺伝子発現

下垂体でのTSH $\beta$  遺伝子発現は、野生型と比較してTRHTRKOにおいて約2倍、KOKIにおいて約18倍と増加していた。甲状腺低下状態ではKI (TR $\beta$   $\Delta$  337T $^{mut/mut}$ ) およびKOKI (TRH $^{-/-}$ -TR $\beta$   $\Delta$  337T $^{mut/mut}$ ) は成育しなかったため、KIヘテロ (TR $\beta$   $\Delta$  337T $^{mut/+}$ ) ならびにKOKIヘテロ (TRH $^{-/-}$ -TR $\beta$   $\Delta$  337T $^{mut/+}$ ) を用いて検討した。TSH $\beta$  遺伝子発現は、TRHTRKO (TRH $^{-/-}$ -TR $\beta^{-/-}$ ) では野生型の約16%と著明に減少していたのに対し、KOKIヘテロ (TRH $^{-/-}$ -TR $\beta^{mut/+}$ ) では野生型と比較し約1.7倍と増加していた。

### 2) 血清TSH値



血清 TSH 値は、野生型と比較して TRHTRKO (TRH<sup>-/-</sup>TRβ<sup>-/-</sup>) で約 2 倍に増加し、KOKI (TRH<sup>-/-</sup>TRβ Δ337T<sup>mut/mut</sup>) では約 10 倍と著明に増加した。甲状腺低下状態では、TRHTRKO では野生型の約 10% に減少したのに対し、KOKI ヘテロ (TRH<sup>-/-</sup>TRβ mut<sup>+</sup>) では野生型と比較し、約 1.7 倍に増加していた。

### 3) 免疫組織染色

下垂体の TSH 陽性細胞数は、TRHTRKO では野生型の約 30% へと減少したのに対し、KOKI では KI と同等に野生型の約 2 倍に増加した。

### 4) 血清 T4 およびフリー (F) T4 値

血清 T4 値は TRH<sup>-/-</sup>TRβ<sup>-/-</sup>にて野生型の約 60% へと減少したのに対し、KOKI と KI の血清 FT4 値は、それぞれ野生型の約 2 倍に増加しており、ほぼ同等であった。

### 5) 甲状腺面積および重量

甲状腺面積は TRHTRKO において野生型の約 40% 減少したのに対し、KOKI と KI の甲状腺重量は、それぞれ野生型の約 1.5 倍に増加しており、ほぼ同等であった。

## D. 考察

1) TRβ 欠損下では下垂体の TSH 制御は TRH によって規定されていた。しかし、TRβ Δ337T 変異体存在下では、TRH 非存在下においても、野生型と比較して TSH β 遺伝子発現は約 18 倍、血清 TSH 値は約 10 倍と、過剰に TSH 遺伝子発現、分泌が誘導されることが判明した。

2) TRβ 欠損と異なり、TRβ Δ337T 変異体存在下では TRH 非存在下の末梢の FT4 値等は TRH 存在下と有意差を認めないことが判明した。

## E. 結論

変異 TRβ による RTH において、TSH 不適切分泌 (SITSH) は、TRH にかかわらず、変異 TRβ により制御されている。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Hashimoto K, Matsumoto S, Yamada M, Satoh T, Mori M  
Liver X Receptor- $\{\alpha\}$  Gene Expression Is Positively Regulated by Thyroid Hormone.  
*Endocrinology* 148:4667-4675, 2007

2) Shibusawa N, Hashimoto K, Yamada M  
Thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the cerebellum. *Cerebellum*:1-12, 2007

### 2. 学会発表

1) 佐藤哲郎, 石塚高広, 吉野聡, 橋田哲, 橋本貢士, 山田正信, 森昌朋  
マウス TRH 遺伝子の甲状腺ホルモンによる転写抑制分子機構の解析

第34回日本神経内分泌学会

2) 橋本貢士, 松本俊一, 石田恵美, 佐藤哲郎, 山田正信, 森昌朋

変異 TR $\beta$  存在下の視床下部-下垂体-甲状腺系における TRH 作用の解析

第34回日本神経内分泌学会

3) 吉野聡, 佐藤哲郎, 石塚高広, 渋谷信行, 橋本貢士, 山田正信, 森昌朋

甲状腺ホルモン受容体によるリガンド依存性転写制御における 26S プロテアソームの 19S 制御サブユニット構成蛋白 Tat binding protein-1 の役割

第34回日本神経内分泌学会

4) 佐藤哲郎, 石塚高広, 吉野聡, 渋谷信行, 橋本貢士, 山田正信, 森昌朋

TR による T3 依存性転写活性化における 26S プロテアソームの 19S 制御サブユニットの役割

第80回日本内分泌学会学術総会

5) 松本俊一, 橋本貢士, 石田恵美, 堀口和彦, 吉野聡, 梅澤良平, 中島康代, 石塚高広, 佐藤哲郎, 山田正信, 森昌朋

甲状腺ホルモン不応症(RTH)において、変異 TR $\beta$  は Thyrotropin-releasing

hormone(TRH) に拘わらず Thyrotropin(TSH)不適切分泌を引き起こす

第50回日本甲状腺学会

12) 佐藤哲郎, 石塚高広, 吉野聡, 渋谷信行, 橋本貢士, 山田正信, 森昌朋

TR による T3 依存性転写活性化における 26S プロテアソームの 19S 制御サブユニットの役割

第80回日本内分泌学会学術総会

13) 橋本貢士  
高コレステロール血症と甲状腺疾患(教育講演)

第50回日本甲状腺学会

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

Hypotriglycemia and Resistance to High Fat Diet-Induced Obesity in PRIC285 Null Mice.

THE ENDOCRINE SOCIETY'S 89TH ANNUAL MEETING, Toronto, Canada (ENDO 2007 Annual Meeting)

H. 知的所有権の出願、取得状況  
現在のところなし。

厚生労働科学研究費補助金（難治疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

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

分担研究者 妹尾 久雄 名古屋大学・環境医学研究所・内分泌系分野・教授

**研究要旨：**甲状腺ホルモンは、中枢神経系の分化・成熟に重要な役割を果たしている。本研究では、我々は、これまで本補助金により、甲状腺ホルモンがヒト繊維芽細胞と神経細胞株においてPI3K-Aktシグナリングカスケードを活性化することを明らかにしてきた。本年度の研究では①このカスケードの活性機序をあきらかにし、②マウス脳の器官培養を用い、中枢神経系におけるこのカスケードの活性化の意義を明らかにした。

**A. 研究目的**

甲状腺ホルモン受容体 (TR) は、核内に存在し、標的遺伝子の転写を調節すると考えられてきた。一方、甲状腺ホルモン不応症 (Resistance to Thyroid Hormone = RTH) は、甲状腺ホルモンに対する応答性の低下した病態で、多くは常染色体優性遺伝を示し、 $\beta$ 型甲状腺ホルモン受容体 (TR $\beta$ ) 遺伝子の点突然変異がその原因として報告されてきた。突然変異の多くは、リガンド結合領域に存在し、甲状腺ホルモン ( $T_3$ ) との結合を欠き、正常の受容体による転写調節機能を阻害するドミナントネガティブ作用がその発症機序であることが多くの *in vitro* の研究により示されてきた。我々は、 $T_3$  が転写調節を介さない、non-genomic 作用により PI3K  $\rightarrow$  Akt/PKB  $\rightarrow$  mTOR のキナーゼカスケードを活性化することをヒト皮膚繊維芽細胞において明らかにし、RTH患者から得られた皮膚繊維芽細胞では、 $T_3$  によるこのキナーゼカスケードの活性化が認め

られないことを報告した (Mol Endocrinol 19:102-12 2005)。更にDNA結合能を欠く変異TRを発現するプラスミドを用いた研究から、このカスケードの活性化にはリガンド結合能が必須であり、転写活性調節に必須のDNA結合は必要とされないことも明らかにした。本年度の研究では $T_3$ によるPI3Kの活性化機序を詳細に検討し、更に、器官培養を用いて大脳皮質におけるこの系の活性化の意義を検討する。

**B. 研究方法**

1.  $T_3$ によるPI3Kの活性化機序の検討  
これまで、PI3Kの調節サブユニットp85 $\alpha$ と $T_3$ -TR複合体の結合がPI3Kを活性化することを明らかにしたため、p85 $\alpha$ の各機能ドメインとGSTとの融合蛋白を合成し、ヒスチジンでタグしたTRの機能ドメインを放射性アミノ酸で標識し、p85 $\alpha$ との結合を免疫沈降法により検討した。
2. 大脳皮質器官培養を用いた検討  
新生仔マウスの大脳皮質を5%胎児牛血清とN2 supplementを含むDMEM/F12中で1日培養し、次いで血清を除去した培養液に換え、24時間培養した後 $T_3$ を加えて1時間培養し、組織学的検討に供した。神経細胞は、抗NeuN抗体や、ニッスル小体を認識するNeuroTraceを用いて検出し、細胞死は活性化され

の発症に関与していることが明らかにされたため、RTHの中枢神経症状の発症にこのカスケードの活性化の欠如が関与している可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 論文発表

1. KJA. Davies, G. Ermark, et al. H. Seo, X. Cao et al. Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: regulators of calcineurin. The FASEB Journal 21(12):3023-3028, 2007.
2. Y. Kozaki, F. Kambe, Y. Hayashi, S. Ohmori, H. Seo, T. Kumazawa, K. Mizumura: Molecular cloning of prostaglandin EP3 receptors from canine sensory ganglia and their facilitatory action on bradykinin-induced mobilization of intracellular calcium. Journal of Neurochemistry, 100(6): 1636-1647, 2007.
3. X. Lu, F. Kambe, X. Cao, M. Yamachi, H. Seo: Insulin-like growth factor-1 activation of Akt survival cascade in neuronal cells requires the presence of its cognate receptor in caveolae. Exp. Cell Res. 314(2):342-351, 2007.
4. R-q. Shi, J-K. Lee, Y. Hayashi, Y. Takeuchi, F. Kambe, S. Futaki, H. Seo, Y. Murata, I. Kodama: Long-term amiodarone treatment causes cardioselective hypothyroid-like alteration in gene expression profile. Eur. J. Pharmacol., 578: 270-278, 2008.
5. M. Yamauchi, F. Kambe, X. Cao, X. Lu, Y. Kozaki, Y. Oiso, H. Seo: Thyroid hormone activates AMP-activated protein kinase via intracellular calcium mobilization and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase. Molec. Endocrinol., 22:760-771, 2008.

6. R. Mirza, S. Hayasaka, F. Kambe, K. Maki, T. Kaji, Y. Murata, H. Seo: Increased expression of aquaporin-3 (AQP3) in the epidermis of DHCR24 knockout mice. Br. J. Dermatol. in press, 2008.

### 学会発表 (国内)

1. 芦 秀麗、神部福司、曹 霞、妹尾久雄: IGF-1 stimulates neuronal cell survival by activating Akt through IGF-1R present in caveolae. 第80回日本内分泌学会学術総会抄録集, P-3-17-2, 2007.
2. 日比八束、神部福司、水野 豊、世古哲平、伊藤朝子、山本晴大、神保 慎、富永芳博、今井常夫、岩瀬克己、妹尾久雄: 原発性上皮小体機能亢進症線腫におけるPRKAR1a蛋白の発現とPKA活性の検討. 第80回日本内分泌学会学術総会抄録集, 0-2-6-20, 2007.
3. 山内雅子、神部福司、曹 霞、芦 秀麗、大磯ユタカ、妹尾久雄: 細胞内Ca上昇、CaMKK-beta活性化を介したT3によるAMPKの活性化. 第80回日本内分泌学会学術総会抄録集, 0-3-07-03, 2007.
4. 山内雅子、神部福司、曹 霞、芦 秀麗、大磯ユタカ、妹尾久雄: T3によるAMPKの活性化における甲状腺ホルモン受容体の関与. 第50回日本甲状腺学会抄録集, P-B1-4, 2007.
5. 曹 霞、神部福司、妹尾久雄: 神経細胞に対する新たなT3作用とそのメカニズムの検討. 第50回日本甲状腺学会抄録集, 0-10-1, 2007.
6. KOZAKI Yasuko, KAMBE Fukushi, KATANO OSAKA Kimiaki, SEO Hisao, MIZUMURA Kazuo: Activation of prostaglandin receptor EP3 inhibits the bradykinin-induced B2 receptor sequestration. Neuroscience Research, S125, 2007.

### 学会発表 (国外)

1. LU Xiuli, KAMBE Fukushi, CAO Xia, SEO Hisao: Insulin-like growth factor-1 stimulates neuronal cell survival by activating Akt through its cognate receptor present in caveolae.