

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
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 大藪恵一 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
研究協力者 難波範行 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助教

研究要旨：

血清リン維持機構に関する FGF23 の役割を検討した。低リン血症性くる病/骨軟化症においては、低リン血症が確実であれば、血清 FGF23 値 30 pg/ml 以上は、ビタミン D 欠乏性くる病、Fanconi 症候群などの他の低リン血症との鑑別が可能であった。このことは、正常リン値が成人に比し高い、小児を対象に検討しても同様であった。活性型ビタミン D 投与により、血清 FGF23 値は上昇するが、リン利尿とは相関せず、活性型ビタミン D 投与による血清 FGF23 値の上昇はリン利尿という病態の悪化につながるものではない可能性が考えられた。

1. 血清カルシウム・リン値の制御機構関する研究

A. 研究目的

線維芽細胞成長因子 23 (fibroblast growth factor 23; FGF23) は、近位尿管でのリン再吸収閾値を下げてリン利尿を惹起し、その結果、低リン血症をもたらす。最近、FGF23 の産生部位は主として骨細胞であること、IIIc 型 FGF 受容体 I (FGFR1IIIc) および抗老化因子として発見された Klotho が受容体であることが報告され、FGF23 はリン代謝調節ホルモンであることが確立された。本因子をコードする遺伝子は、常染色体性優性低リン血症性くる病 (ADHR) の責任遺伝子であり、また、X 連鎖性低リン血症性くる病 (XLH)、腫瘍原性骨軟化症 (OOM/TIO) を含む種々の低リン血症性くる病においても、FGF23 の産生が過剰となることが病因の主体となる。

血清 FGF23 値の測定系が樹立され、臨床的な意義が検討されつつある。低リン血症の鑑別診断として、FGF23 の測定は

重要であることを本研究班の共同研究として発表した(参考文献 1)。

しかしながら、小児においては、成人に比し正常リン値が高いことおよび低リン血症をきたす疾患が異なる場合があることから、小児における検討をさらに対象数を増やして行う必要がある。

B. 研究方法

FGF23 の測定に対し informed consent を得た例を対象とした。低リン血症児に対する血清 FGF23 の測定に関しては倫理委員会の承認を得た。対象：治療前 XLH: 5 名 (含：成人 1 例)、VD 欠乏症: 7 名 (うち 3 例は血清リン値正常範囲内)、Fanconi 症候群: 2 名

治療後 XLH: 8 名 (含：前出のうち 3 例)、ビタミン D 欠乏症: 6 名 (うち 3 例は血清リン値正常範囲内)、Fanconi 症候群: 1 名 対照例 (血清リン値、腎機能正常範囲内の例、うち分けは、満期産児の臍帯血、低身長児、骨系統疾患児、XLH 患児の兄弟、健常ボランティア (成人) など: 104 例)

C. 研究結果

小児の血清 FGF23 値は、成人とほぼ同様であるが、臍帯血の FGF23 値は低く、乳児も低い傾向にあり、年齢と弱い正の相関が得られた。

治療前のデータでは明瞭に XLH 群とそれ以外の群に分かれた。自験例でも、FGF23 値が 30 pg/ml を超える者は FGF23 過剰による低リン血症と考えられた。

ビタミン D により FGF23 の産生が亢進することが知られているので、治療前後で血清 FGF23 値を経時的に検討した。その結果、XLH でも、ビタミン D 欠乏症でも血清 FGF23 値は上昇することが一部の例外を除いて示された。ビタミン D 投与後においても、血清リン値が正常化していない段階では、血清 FGF23 値は 30 pg/dl をカットオフ値とする事が可能であった。

D. 考察

治療前に低リン血症が確定している場合は、治療開始後でも FGF23 が 30 pg/ml を超えていれば XLH と診断できるが、治療前に（食事などの影響で）低リン血症と確定できていない場合は、FGF23 値のカットオフ値は、40-50 pg/ml と上昇した。血清 FGF23 値は年齢と弱い正の相関を示したが、各年齢における検討数を増やす必要がある。

XLH の小児例では治療中も血清 FGF23 値は 55 pg/ml 以上を示し、正常時およびビタミン D 欠乏性くる病と鑑別可能であるのに対し、無治療 XLH 成人例では健常ボランティアの中程の値を示した。

XLH において、血清 FGF23 値と血清 P 値は相関し、FGF23 産生は血清 P 値に対する応答性を保持している可能性が示された。

XLH において、血清 FGF23 値と VD 投与量は相関したが、TRP および TmP/GFR とは相関しなかった。このことは、治療による FGF23 値の上昇は、尿細管からのリン喪失促進、病態の悪化に必ずしもつながら

ない可能性を示唆する。今後この機序を解明する必要がある。

E. 結論

1. 治療前の低リンが既知であれば、カットオフ FGF23 30 pg/ml 以上を、FGF23 値が上昇していると判定可能であることが確認された。

2. 新生児・小児期～若年成人期までの FGF23 値の正常値の設定には再検討の余地がある。

3. 治療による FGF23 値の上昇は必ずしも XLH の病態を悪化させないことが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

本プロジェクトに関する論文はなし。

他の Ca 骨代謝関連の論文は以下に記載。

1. 論文発表

- 1) 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: proposal of diagnostic criteria using FGF23 measurement. *Bone*. 2008 Jun;42(6):1235-9.
- 2) Kubota T, Michigami T, Sakaguchi N, Kokubu C, Suzuki A, Namba N, Sakai N, Nakajima S, Imai K, Ozono K, Lrp6 hypomorphic mutation affects bone mass through bone resorption in mice and impairs interaction with Mesd/J Bone Miner Res. 2008 Oct;23(10):1661-71
- 3) Suzuki A, Ozono K, Kubota T, et al. PTH/cAMP/PKA Signaling Facilitates Canonical Wnt Signaling Vial Inactivation of Glycogen Synthase Kinase-3 β in Osteoblastic saos-2 Cells *J Cell Biochem*. 104:304-317, 2008
- 4) 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, Endocr J. 2008 May 19. [Epub ahead of print]

- 5) 大藪恵二,くる病、今日の治療指針-私はこう治療している-, 1039-1040, 2008
- 6) 大藪恵二,低リン血症性疾患の病態と治療-クル病/骨軟化症を含めて-, THE BONE Vol.22 No.6 2008

2. 学会発表

- 1) 大藪恵一,くる病の診断と治療-日本の現状をふまえて-, 第46回 枚方・交野小児懇話会; 2008.7.5, 大阪
- 2) 大藪恵一,北岡 太一,難波 範行,三浦 弘司,窪田 拓生,平井 治彦,山本 威久,骨形成不全症に対するパミドロネート治療におけるFGF23の変動, 第81回日本内分泌学会 2008.4.20 青森

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(APPE)で口演発表を行った。

I. 知的所有権の取得状況

特になし。

カルシウム代謝異常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)代謝異常症の病因に Ca 感知受容体(CaSR)抗体が関与するか否かを検討した。PTHの相対的高値を伴う高Ca血症の2症例の血清は、ヒト副甲状腺培養細胞のPTH分泌を促進した。しかし、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CaSR抗体は認めなかった。さらに患者血清および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。今回検討した高Ca血症2症例の病因として、CaSR抗体以外のPTH分泌を促進する因子の関与の可能性が示唆された。また、特発性副甲状腺機能低下症の18症例についても同様にCaSR抗体の存在の有無の検討を行った。17症例においてCaSR抗体は認められなかったが、1例について、full lengthでないCaSRに対する抗体を有する可能性が示唆され、さらなる検討を要する。本邦における原因不明のCa代謝異常症の病因におけるCaSR抗体の関与はまれであると考えられた。

A. 研究目的

カルシウム(Ca)代謝に関わる様々な遺伝子や機序の検討が進み、Ca代謝異常症の病因となる様々な責任遺伝子や自己免疫機序が明らかにされつつある。Ca代謝調節機構において主要な役割を担うCa感知受容体(Ca-sensing receptor:CaSR)は、その不活性型変異が家族性低Ca尿性高Ca血症(FHH)と新生児重症副甲状腺機能亢進症(NSHPT)をきたし、活性型変異は常染色体優性低Ca血症(ADH)をきたす。一方、CaSR遺伝子異常による場合と同様の臨床症状を示すにも関わらずCaSR遺伝子に異常を認めない症例の一部に、CaSRに対する抑制

型あるいは刺激型抗体による病態が存在するとされる。機能抑制型抗体はPTHの相対的高値を伴う高Ca血症をきたし、自己免疫性低Ca尿性高Ca血症(autoimmune hypocalciuric hypercalcemia: AHH)と呼ばれる。機能活性型抗体による低Ca血症も報告されており、PTHの相対的低値を伴った低Ca血症をきたす。また、副甲状腺機能低下症を伴う代表的疾患である自己免疫性多内分泌不全症(APS) I型の症例において、免疫沈降反応を加えた方法でCaSR抗体の存在を検討した報告がなされ、APS I型の8割以上に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。原因不明のCa代謝異常症において、CaSR抗体が関与する病態が本邦でどの程度存在するのかわからず、未だ明らかになっていない。そこで、PTHの相対的高値を伴った原因不明の高Ca血症と、孤発例の特発性副甲状腺機能低下症(IHP)の病因を解明するにあたり、CaSR抗体が関与するか否かを明らかにする。

B. 研究方法

血中Ca値が高値でPTHの相対的高値を認め、PTHや尿中Ca排泄が動揺性を示した高Ca血症の2症例(1例はベーチェット病を合併)について、以下の検討を行った。

a) CaSR遺伝子異常についての検討

患者末梢血より得た白血球よりDNAを抽出し、ダイレクトシーケンス法によりCaSR遺伝子変異の有無を確認した。

b) ヒト副甲状腺培養細胞における患者血清のPTH分泌能に対する影響

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。これが原因不明の高Ca血症を示した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。

c) 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CaSR抗体を用いて、ヒトCaSRを過剰発現させたhuman embryonic kidney (HEK) 293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。

②Western blotting法

患者IgGおよび既知の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、CaSR抗体の有無を確認した。同様の検討を孤発例の特発性副甲状腺機能低下症(IHP) 18症例についても行った。

d) 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。

(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) 2症例のいずれもCaSRの遺伝子変異は認めなかった。

b) ヒト副甲状腺培養細胞におけるPTH分泌は、コントロール血清投与時に比較し、患者の血清投与時に、有意に高値を示した。高Ca血症2症例いずれも同様の結果であった。

c) ①免疫蛍光染色法にて、既知の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。一

方、患者IgGを用いた検討では、いずれの症例も染色を認めなかった。

②既知の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。一方、高Ca血症2症例の患者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。同様の検討を行ったIHP17症例の患者IgGにおいても、immunoblotを認めなかった。しかし、後天性と考えられる副甲状腺機能低下症孤発例で、腎結石を合併した44歳女性のIgGで検討したところ、CaSRの分子量レベルより小分子量のレベルにimmunoblotを認め、これは正常コントロールでは認めなかった。

- d) 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。高Ca血症2症例の患者IgGの添加は、いずれもコントロールのIgGの添加時と差を認めなかった。

D. 考察

PTHの相対的高値を伴う高Ca血症のうち、多くの原因は原発性副甲状腺機能亢進症であるが、家族性に発症するもの原因としてCaSRの不活性型変異があげられる。今回検討した2症例は高Ca血症の家族歴は有していないが、CaSR遺伝子異常による孤発例の報告もあるためCaSR遺伝子異常の検索を行ったが、いずれの症例にも変異は認めなかった。ヒト副甲状腺培養細胞におけるPTH分泌能に対する検討から、高Ca血症をき

たず2症例において患者血清中にPTH分泌を促進する何らかの因子が存在する可能性が考えられた。そこで、CaSRに対する機能抑制型自己抗体の関与について検討を行った。Western blotting法による抗体の存在の証明はこれまでの報告でも結果が様々であり、実験方法の違いによって異なる結果となる可能性についても議論されている。今回は疾患特性と一致した検出方法であるとされる、免疫沈降反応を加えた方法で検討したが、いずれの症例も抗体の存在は確認できなかった。また、細胞内情報伝達としてはGi蛋白を介してErkのリン酸化をきたすことが、PTHの分泌抑制に関わると考えられているため、これへの影響を検討したが、コントロールと差を認めなかった。Erk以外のPTH分泌に関わる情報伝達機構として、Gqを介するイノシトールリン酸の蓄積があるが、AHHの日本人症例での検討において、患者血清中にCaSR抗体が存在し、Gqを介するイノシトールリン酸の蓄積を増強させるが、Giを介するErkのリン酸化を抑制することが示されている。機能抑制型CaSR抗体の作用には多様性が存在する。本症例においてもGqを介する系にどのような影響を及ぼすか今後検討する必要がある。

IHPの孤発例18例についてもCaSR抗体の有無について検討を行った。本症例の中にはIgA欠損症やバセドウ病など自己免疫疾患を合併した症例も存在する。このうち11例についてはCaSRの遺伝子変異の検討を行っており、遺伝子多

型と考える変異以外は異常を認めなかった。いずれの症例にも Western blotting 法により抗体は認めなかったが、一例、full length でない CaSR に対する抗体の存在が疑える結果であった。本例は孤発例で CaSR 遺伝子変異の有無は確認できていないが、full length でない CaSR を有する可能性も考えられ、今後検討を要する。

今回検討した高 Ca 血症の 2 症例については CaSR 抗体以外の PTH に影響を及ぼす何らかの因子の存在が考えられた。FHH 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存在するとされ、FHH 症例における遺伝子解析により、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。近年、ビタミン D の合成制御や腎における Ca 再吸収の制御に関わる α Klotho が PTH の分泌制御にも関わることが報告されている。また、IHP を合併する APS I 型における副甲状腺の抗原として NACHT leucine-rich-repeat protein5 (NALP5) が同定され、孤発例の IHP においても抗原となりうる可能性が考えられる。今後、CaSR 以外に α Klotho や NALP5 の関与についても検討を要する。

E. 結論

PTH の相対的高値を伴う高 Ca 血症の孤発例 2 症例における病因の検討を行った。患者血清中に CaSR 抗体は認められず、本 2 症例の病因として、CaSR 抗体以外の未知の PTH 分泌に関わる因子の関与の可能性が示

唆された。検討した範囲では IHP17 症例において CaSR 抗体は認められなかったが、1 例について、full length でない CaSR に対する抗体を有する可能性が示唆され、さらなる検討を要する。本邦において CaSR 抗体が病因となる Ca 代謝異常症がどの程度存在するかは明らかとなっていないが、Ca 代謝異常症の病因として CaSR 抗体の関与はまれである可能性が考えられた。今後、副甲状腺における CaSR 以外の抗原となりうる因子や、 α Klotho 等 CaSR 以外の Ca 調節に関わる因子による Ca 代謝異常症の検討を要する。

G. 研究発表

1. 論文発表

飛松崇子、梶博史、井上喜文、内藤純子、余美慧、山内美香、鹿股直樹、宮内章光、今西康雄、杉本利嗣、千原和夫. 活性型ビタミン D 高値が遷延した副鼻腔腫瘍による腫瘍性低リン血症性骨軟化症の一例. ホルモンと臨床. 56:172-177, 2008

多田裕子、山内美香、小川典子、山本昌弘、矢野彰三、山口徹、福本誠二、杉本利嗣. 含糖酸化鉄の静脈内投与にて低 P 血症性骨軟化症をきたした 1 例. 日本内分泌学会雑誌 84 Suppl:54-56, 2008

杉本利嗣. 臨床内分泌代謝・最近の進歩: 骨・カルシウム. 日本内分泌学会雑誌 84 Suppl:17-19, 2008

山内美香、杉本利嗣. 新版 処方計画法: 副甲状腺機能低下症. 総合臨床 57: 1200-1202, 2008

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。遺伝子転写制御に関わるヒストン蛋白のアセチル化、メチル化修飾が細胞のインプリンティング状態によって変化していることを明らかにし、未知の *GNAS* インプリンティング規定因子の影響が、片アリの転写抑制のみならず、反対のアリの転写促進にも関わっている可能性を示唆する結果であった。

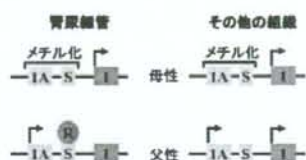
A. 研究目的

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 の病因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* 遺伝子の異常によるとされている。*GNAS* コード領域の機能喪失型変異は、変異遺伝子の母系遺伝では、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) に加え $Gs\alpha$ 蛋白と共役する受容体をもつホルモンに対しての組織抵抗性を伴う Ia 型 (PHP-Ia) を生じ、父系遺伝で

はホルモン抵抗性を示さない偽性偽性副甲状腺機能低下症 (PPHP) を惹起する。一方、臨床的に AHO を伴わないことから区別される偽性副甲状腺機能低下症 Ib 型 (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 (エピジェネティックな異常) がみられ、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。現在、PHP の症状のうち低カルシウム血症の治療については、活性型ビタミン D の内服により確立されているが、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機構の解析は PHP の新規治療法の開発に不可欠である。

胃原細管とその他の組織でのGNAS遺伝子の発現調節モデル(仮説)



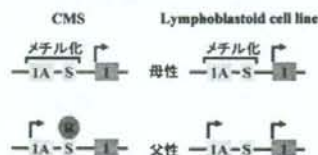
GNAS 遺伝子のインプリンティング機構にはプロモーター領域 differentially methylated region (DMR) の存在の他に未知の組織特異的因子が必須であると考えられているが、その制御の仕組みおよび父性アリル特異的インプリンティングの生理的意義は不明である。近年のエピジェネティクス研究の進歩により、遺伝子転写調節には遺伝子のクロマチン構造の変化を惹起するヒストン蛋白修飾が重要な役割をはたしていることが明らかにされてきている。そこで本研究において、GNAS 遺伝子の組織特異的インプリンティング機構におけるヒストン修飾の関与について検討した。

B. 研究方法

GNAS の組織特異的インプリンティング

は強い細胞特異性があることが示されており、in vitro の検討が可能な実験系がまず必要である。私どもはこれまでの本研究でヒト巨核芽球性白血病由来細胞株 (CMS) 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 (LCL63) ではインプリンティングがないことを確認した。

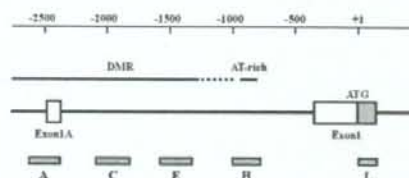
巨核芽球性白血病由来細胞株 (CMS) と lymphoblastoid cell line での Gα 発現パターン



すなわち、この2種類の細胞株における GNAS プロモーター領域のヒストン修飾の差異がインプリンティング制御機構の作用を反映していると考え、修飾ヒストンに対する特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) を実施し、修飾ヒストンの定量を end-point PCR あるいは real-time PCR により行った。

ChIP アッセイに用いた沈降抗体は、acetyl-H3、acetyl-H4、demethyl-H3 (Lys4)、trimethyl-H3 (Lys4)、dimethyl-H3 (Lys9) に対するラビット抗体を用いた。

Exon1A~Exon1領域のChIP Assay



また、定量に用いた PCR プライマーは上図の Exon1A から Exon1 の領域に設定した。

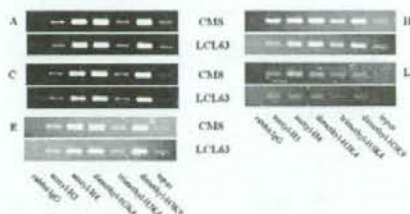
(倫理面への配慮)

本研究にあたってはすでに確立された培養細胞株を用いた実験を用いており、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

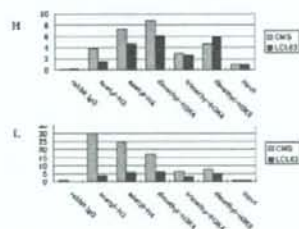
end-point PCR による半定量解析では、*GNAS* プロモーター領域の DMR に含まれる位置に設定した PCR 解析 (A, C, E) では、CMS (インプリンティングあり) と LCL63 (インプリンティングなし) との間で、増幅産物量のパターンに差がなかった。一方、非 DMR 領域 (両アレルの CpG 脱メチル化領域) にプライマーを設定した PCR 解析 (H, L) では、両者で増幅量の差がみられたため、real-time PCR により定量を行った。

ChIP Assay (end-point PCR)



real-time PCR 定量の結果は、両細胞間で違いがみられ、CMS では *GNAS* プロモーター領域 H のヒストン修飾は転写活性化に関連するとされる H3 のアセチル化、H3 の Lys4 のメチル化が上昇していることが示された。また、転写抑制に関連するとされる H3 の Lys9 のメチル化は CMS では低下していた。一方、翻訳開始点周辺領域 L では、アセチル H3、アセチル H4、H3 の Lys9 のメチル化はいずれも著しく上昇していた。

ChIP Assay (real-time PCR定量)



D. 考察

GNAS 遺伝子プロモーター-DMR では、インプリンティングの有無によってヒストン修飾の違いはみられなかったが、DMR

でない両アリル脱メチル化のみられる *GNAS* プロモーター領域では、ヒストン修飾のパターンは一般に転写促進状態でみられる特徴を示しており、未知のインプリンティング細胞特異的転写調節因子の作用は、DMR の脱メチル化アリルの転写抑制のみならずメチル化アリルの転写促進にも関わっている可能性が示された。この点は、インプリンティング機構の解明が PHP-Ia や PPHP の新規治療法の開発に有用な情報を与えてくれる可能性について示唆するものと考えられる。

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

Inoue Y, Shimojo N, Suzuki S, Arima T, Tomiita M, Minagawa M, Kohno Y.

Efficacy of intravenous alendronate for the treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis in children with autoimmune diseases. *Clin Rheumatol* 27(7): 909-912, 2008

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: Proposal of diagnostic criteria using FGF23 measurement. *Bone* 42(6): 1235-1239, 2008

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 -. *Endocr J* 55(5): 787-794, 2008

Hishiki T, Kazukawa I, Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata M, Matsuura G, Minagawa M, Kohno Y, Yoshida H. Diagnosis of adrenocortical tumor in a neonate by detection of elevated blood 17-hydroxyprogesterone measured as a routine neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia: a case

report. J Pediatr Surg 43(10): e19-22, 2008

南谷幹史, 荻田純子, 黒崎知道, 今田進, 皆川真規, 河野陽一. 5年後に甲状腺機能亢進症を進展した、成長障害、粘液水腫を伴った橋本病の一女児例 ホルモンと臨床 56巻臨時増刊: 88-93, 2008

木下香, 皆川真規. 低リン血症くる病・小児の内分泌疾患診療の手引き—いかに診断し治療するか 小児内科 40(11): 1786-1791, 2008

2. 学会発表

木下香, 皆川真規, 高谷具純, 南谷幹史, 河野陽一. 先天性甲状腺機能低下症マスキング精密検査から重症度を推測できるか. 第42回日本小児内分泌学会学術集会 平成20年10月3日

堀尚明, 石井智弘, 天野直子, 鳴海覚志, 皆川真規, 長谷川奉延. 偽性副甲状腺機能低下症 Ib の甲状腺機能の検討. 第42回日本小児内分泌学会学術集会 平成20年10月3日

上瀧邦雄, 鹿島京子, 南谷幹史, 今田進, 皆川真規. Y染色体成分を持つターナー

症候群5例の検討. 第42回日本小児内分泌学会学術集会 平成20年10月3日

南谷幹史, 鹿島京子, 高谷具純, 木下香, 皆川真規, 上瀧邦雄, 大西尚志, 渡辺智之, 真山和徳, 猪股弘明. 千葉県で病型が確定している先天性甲状腺機能低下症69例の解析—新生児マスキングで発見された症例. 第42回日本小児内分泌学会学術集会 平成20年10月4日

数川逸郎, 石田真穂, 高谷里依子, 染谷知宏, 皆川真規, 河野陽一. ペグミソマントで治療をおこなっているマスキューン・オルブライツ症候群の1例. 第42回日本小児内分泌学会学術集会 平成20年10月4日

佐藤浩一, 皆川真規, 杉原茂孝, 数川逸郎, 南谷幹史, 上瀧邦雄, 今田進, 猪股弘明, 真山和徳, 佐々木望, 河野陽一. 小児期発症バセドウ病の初診時における臨床像について. 第42回日本小児内分泌学会学術集会 平成20年10月4日

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

ビタミンD充足度とPTH反応性に関する研究

分担研究者 岡崎 亮 帝京大学ちば総合医療センター第三内科 教授

研究要旨：

骨軟化症を来さない程度のビタミンD不足が、副甲状腺ホルモン（PTH）の分泌を介した骨代謝回転の亢進や、筋力低下を介した転倒リスクの増大をもたらし、骨粗鬆症性骨折のリスクとなることは確立されている。しかし、日本人において、ビタミンD不足および充足を規定する、血清25(OH)D濃度の域値は明らかでない。本研究では、ビタミンD代謝異常のない日本人成人男女にビタミンD3を経口負荷し、PTHの変化から、域値を検討した。その結果、1)血清25(OH)DとPTH値は負の相関を示すこと、2)血清25(OH)D濃度28 ng/ml以上あるいはPTH値が33 pg/ml未満の場合、ビタミンD3負荷後のPTH低下が生じにくいこと、3)回帰直線でPTH33 pg/mlは、25(OH)D 40 ng/mlに相当することが明らかとなった。したがって、血清25(OH)D値28 ng/mlをビタミンD不足域値、40 ng/mlを充足域値と提唱したい。

A. 研究目的

体内のビタミンD貯蔵量は、血清25(OH)D濃度を測定することにより可能である。著しい低25(OH)D血症を呈するビタミンD欠乏症は、くる病・骨軟化症の原因となり、速やかな治療を要する。一方、欠乏症に至らない程度の低25(OH)D血症がPTH分泌上昇を介した骨代謝回転の亢進や、筋力低下と関連した転倒頻度の増大をもたらすことが、諸外国の検討から明らかにされ、このような状態は一般にビタミンD不足と呼ばれている。さ

らに、近年ではビタミンD不足が、糖尿病などの代謝疾患、心筋梗塞・高血圧などの心血管系疾患、感染症、自己免疫疾患などのリスクになっているとの報告もある。しかし、ビタミンD不足を規定する血清25(OH)D濃度については未だ一定の見解がない。

一般に、血清25(OH)D濃度とPTH濃度は負の相関関係を示すことから、ビタミンD不足の域値決定法としてPTHを用いることが最も多い。横断的に両者を検討した過去の欧米での結果からは、血清25(OH)D値20~44 ng/mlでPTH値は底値

に安定すると報告されている。しかし、ビタミンD充足時のPTH値は個人により異なると考えられ、事実、明らかにビタミンD不足・欠乏と考えられても、PTHが基準値内に収まる例も多い。また、現行のPTH基準値はビタミンD不足者を多く含む一般人口から設定されているため、横断的検討からPTHの分泌過剰の有無を判断するのは困難である。

そこで、本研究では、ビタミンD3負荷前後の血清25(OH)DとPTH値を測定し、PTHの変化からビタミンD不足および充足の域値を決定することを目的とした。

B. 研究方法

1) ビタミンD代謝異常がないと考えられる成人107名にビタミンD3 (800~1200国際単位/日)を4~8週間経口負荷した。その前後に、採血を行い、血清25(OH)D、PTH、Ca、P、Mgを測定した。また、食餌からのCa摂取量をアンケート法で調査した。

2) 倫理面への配慮：本研究のプロトコールは倫理委員会で承認された。

C. 研究結果及び考察

<結果>

1) 血清25(OH)DとPTH濃度の間には負の相関関係が認められた ($r = -0.24$, $P < 0.001$)。

2) ビタミンD負荷前後のPTHの変化(Δ PTH)は、負荷前の血清25(OH)D濃度と正の相関($r = 0.21$, $P < 0.05$)を示し、PTH濃度と負の相関($r = -0.58$, $P <$

0.0001)を示した。回帰直線のX切片は、それぞれ25(OH)D濃度28 ng/ml、PTH濃度33 pg/mlであり、負荷前の25(OH)D濃度が28 ng/ml未満、もしくはPTH濃度が33 pg/mlを超える場合に、ビタミンD負荷後のPTH低下が生ずると考えられた。

3) PTH 33 pg/mlは、前述の回帰直線では25(OH)D濃度40 ng/mlに相当した。

4) 多変量解析で血中PTHの規定因子を解析したところ、25(OH)D濃度以外に年齢が正の因子として抽出された。なお、血清Mg濃度や食餌からのCa摂取量はPTH濃度に影響を及ぼしていなかった。

D. 考察

以上の検討により、血清25(OH)D濃度が28 ng/ml以上あれば、ビタミンD負荷後もPTHの低下が有意に生じにくく、この値をビタミンD不足の域値とすることは妥当と考えられた。一方、PTH 33 pg/ml以上の群では、ビタミンD負荷後に有意なPTH低下が認められたことから、相対的なPTH分泌亢進があると考えられた。PTH 33 pg/mlに相当する血清25(OH)D濃度は40 ng/mlであり、PTHの分泌過剰を防ぐためのビタミンD充足域値としてこの数字が妥当と考えられた。

過去の多くの検討同様、今回の検討においても、明らかに血清25(OH)D濃度が低値を示すにもかかわらず、PTH濃度が33 pg/mlと分泌過剰が認められず、かつ、ビタミンD負荷後のPTH低下も認められない例が少なからず存在した。この様な例におけるPTH分泌反応性について今後

検討する必要がある。

特になし。

E. 結論

日本人成人のビタミンD不足の域値として、血清25(OH)D濃度28 ng/mlを、充足域値として、40 ng/mlを提唱したい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 岡崎 亮： ビタミンD不足を比較検証 日本 vs 諸外国. 薬局 59(7) : 2496-2501, 2008.

2. 岡崎 亮：原発性副甲状腺機能亢進症に伴う骨粗鬆症. The Bone 22(2): 23-28,2008

2. 学会発表

1. 第50回日本老年医学会学術集会・総会 (6/19-21/2008、千葉)

シンポジウム「骨粗鬆症と変形性関節症：研究と診療の最前線」 カルシウム代謝調節ホルモンから見た高齢者の骨粗鬆症. 岡崎 亮

2. 第10回日本骨粗鬆症学会 (10/31-11/2/2008、大阪)

CHIBA (Coronary Heart Diseases of Ischemia and Bone Association) Study: CAG 施行例における冠動脈疾患と骨代謝との関連についての検討

井上大輔、天木幹博、中津祐介、綾部健吾、大橋潤一、檜垣忠直、中村文隆、岡崎亮

H. 知的所有権の出願・取得状況

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] 遺伝子プロモーター領域のVDR転写抑制エレメント（nVDRE）に結合する転写因子VDIRおよび制御因子DNAメチル化酵素を同定した。今回更にVDIR機能を制御する因子として新規に脱メチル化酵素MBD4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依存的転写制御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) 同定タンパク質のビタミンD依存的な1 α (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、免疫沈降法にて検討を行った。

4) 同定タンパク質のDNAメチル化、脱メチル化への影響をin vitro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 FALG-VDIR 相互作用因子群の精製を行った。その結果、DNA メチル化酵素 Dnmt3b を同定した。1 α (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。

さらに、精製の結果、DNA glycosylase 活性を有する MBD4 を同定した。本因子の転写制御における機能は未知である。免疫沈降法にて検討を行った所、MBD4 と VDIR、VDR の相互作用を確認した。また、MBD4 の RNAi によって、PTH 依存的な 1 α (OH)ase 遺伝子 mRNA 発現誘導の解除が観察された。更に 1 α (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、PTH 処理後迅速に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 の脱メチル化を初めて見出す事が出来た。さらにノックダウンの結果、MBD4 は PTH 依存的な DNA 脱メチル化に必須であった。

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メチル化酵素に加えて新規にDNA脱メチル化酵素を同定した。これらの結果は、ビタミンDおよびPTH依存性VDR転写制御機構において可逆的なDNAメチル化修飾が重要な役割を担う可能性を示すものである。

E. 健康危険情報

国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報は特に無い。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, R. G., Kitagawa, H. and Kato, S. Nuclear protein GlcNAcylation facilitates retinoic acid-induced granulopoiesis through histone activating methylation. **Nature** 2009 (in press).

Imai, Y., Nakamura, T., Matsumoto, T., Takaoka, K. and Kato, S. Molecular mechanisms underlying the effects of sex steroids on bone and mineral metabolism. **J. Bone. Miner. Metab.** 2009 (in press).

Imai, Y., Kondoh, S., Kouzmenko, A. and Kato, S. Regulation of bone metabolism by nuclear receptors. **Mol. Cell. Endocrinol.** 2009 (in press).

Ohtake, F., Fujii-Kuriyama, Y. and Kato, S. AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. **Biochem. Pharmacol.** 2009 (in press).

Suzuki, E., Zhao, Y., Ito, S., Sawatsubashi, S., Murata, T., Furutani, T., Shirode, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Kimura, S., Ueda, T., Fujiyama, S., Lim, J., Matsukawa, H., Kouzmenko, A., Aigaki, T., Tabata, T., Takeyama, K. and Kato, S. Aberrant E2F activation by polyglutamine expansion of androgen receptor in SBMA neurotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 106, 3818-3822, 2009.

Zhao, Y., Takeyama, K., Sawatsubashi, S., Ito, S., Suzuki, E., Yamagata, K., Tanabe, M., Kimura, S., Fujiyama, S., Ueda, T., Murata, T., Matsukawa, H., Shirode, Y., Kouzmenko, A., Li, F., Tabata, T. and Kato, S. Corepressive action of CBP on Androgen Receptor transactivation in pericentric heterochromatin in a *Drosophila* experimental model system. **Mol. Cell. Biol.** 29, 1017-1034, 2009.

Kouzu-Fujita, M., Mezaki, Y., Mtsumoto, T., Yamaoka, I., Sawatsubashi, S., Yano, T., Taketani, Y., Kitagawa, H. and Kato, S. Coactivation of estrogen receptor β by gonadotropin-induced cofactor GIOT-4. **Mol. Cell. Biol.** 29, 83-92, 2009.

Tanabe, M., Kouzmenko, A., Ito, S., Sawasubashi, S., Suzuki, E., Fujiyama, S., Yamagata, K., Zhao, Y., Kimura, S., Ueda, T., Murata, T., Matsukawa, H., Takeyama, K. and Kato, S. Activation of facultatively silenced *Drosophila* loci associates with increased acetylation of histone H2AvD.

Genes to Cells 13, 1279-1288, 2008.

Zhao, Y., Lang, G., Ito, S., Bonnet, J., Metzger, E., Sawatsubashi, S., Suzuki, E., Le Guezennec, X., Stunnenberg, H. G., Krasnov, A., Georgieva, S. G., Schüle, R., Takeyama, K., Kato, S., Tora, L. and Devys, D. A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. **Mol. Cell** 29, 92-101, 2008.

Okada, M., Takezawa, S., Mezaki, Y., Yamaoka, I., Takada, I., Kitagawa, H. and Kato, S. Switching of chromatin-remodelling complexes for oestrogen receptor- α . **EMBO Rep.** 9, 563-568, 2008

Yokoyama, A., Takezawa, S., Schüle, R., Kitagawa, H. and Kato, S. Transrepressive function of TLX requires the histone demethylase LSD1. **Mol. Cell Biol.** 28, 3995-4003, 2008.

Kimura, S., Sawatsubashi, S., Ito, S., Kouzmenko, A., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Ueda, T., Fujiyama, S., Murata, T., Matsukawa, H., Takeyama, K., Yaegashi, N. and Kato, S. *Drosophila* arginine methyltransferase 1 (DART1) is an ecdysone receptor co-repressor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 371, 889-893, 2008.

Ohtake, F., Baba, A., Fujii-Kuriyama, Y. and Kato, S. Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 370, 541-546, 2008.

Kouzmenko, A. P., Takeyama, K., Kawasaki, Y., Akiyama, T. and Kato, S. Ligand-dependent interaction between estrogen receptor α and adenomatous polyposis coli. **Genes to Cells** 13, 723-730, 2008.

Akimoto, C., Kitagawa, H., Matsumoto, T. and Kato, S. Spermatogenesis-specific association of SMCY and MSH5. **Genes to**

Cells 13, 623-633, 2008.

Kouzmenko, A. P., Takeyama, K., Kawasaki, Y., Akiyama, T. and Kato, S. Truncation mutations abolish chromatin-associated activities of adenomatous polyposis coli. **Oncogene** 27, 4888-4899, 2008.

Matsumoto, T., Shiina, H., Kawano, H., Sato, T. and Kato, S. Androgen receptor functions in male and female physiology. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 109, 236-241, 2008.

Murata, T., Suzuki, E., Ito, S., Sawatsubashi, S., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Fujiyama, S., Kimura, S., Ueda, T., Matsukawa, H., Kouzmenko, AP., Furutani, T., Takeyama, K. and Kato, S. RNA-binding protein hoip accelerates polyQ-induced neurodegeneration in *Drosophila*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 72, 2255-2261, 2008.

2. 学会発表

【国内】

2008年度日本農芸化学会大会 (名古屋)

(2008. 3. 26-29)

新規クロマチン構造調節因子を介した転写抑制機構の解析

伊藤紗弥、沢津橋 俊、山形 薫、鈴木 絵里子、趙 越、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

酸化還元刺激によるグルコシル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、目崎善弘、清水崇史、加藤茂明

分子遺伝学とプロテオミクスのアプロー