

チによる新規 BTB/POZ タンパク質群の網羅的機能解析

藤山沙理、沢津橋 俊、伊藤紗弥、木村周平、村田拓哉、鈴木絵里子、田辺真彦、趙 越、上田 崇、松川紘之、山形 薫、武山健一、加藤茂明

ビタミンKは Msx2 遺伝子を転写調節することにより骨芽細胞分化を促進する

五十嵐 庸、過足芳子、三原正朋、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明

分子遺伝学的手法による新規転写共役因子の網羅的探索法の構築と機能解析

武山健一、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、村田拓也、松川紘之、Alexander Kouzmenko、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

ショウジョウバエ分子遺伝学とプロテオミクス解析による新規転写共役抑制因子 Z4 の解析

村田拓哉、沢津橋 俊、伊藤紗弥、鈴木絵里子、山形 薫、趙 越、田辺真彦、藤山沙理、木村周平、上田 崇、松川紘之、武山健一、加藤茂明

第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)
(2008. 12. 9-12)

新規クロマチン構造調節因子 BAHD1 を介した転写抑制機構の解明

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、林 珍仙、武山健一、加藤茂明

Y染色体遺伝子 Dby の miRNA 産生制御における機能解析

井上和樹、松本高広、山形 薫、秋本千央、米澤正祥、加藤茂明

Multinuclear expression of ER α in mature osteoclasts

Min-Young Youn, Ichiro Takada, Shino Kondoh, Yuuki Imai, Shigeaki Kato

絶食シグナルによるヒストン脱メチル化酵素 PHF2 活性制御機構の解明

奥野陽亮、馬場敦史、大竹史明、加藤茂明

オーファン核内受容体 TLX の転写抑制を介した神経幹細胞未分化維持機構の解明

横山 敦、竹澤慎一郎、北川浩史、加藤茂明

ER α はM期特異的にE3 ligase複合体を形成する

岡田麻衣子、大竹史明、加藤茂明

骨芽細胞におけるエストロゲンの作用の解明—骨芽細胞特異的エストロゲン受容体欠損マウスを用いて

金藤紫乃、今井祐記、高田伊知郎、中村貴、松本高広、加藤茂明

女性ホルモン・エストロゲンによるmiRNA
産生抑制機構の解析

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、林 珍仙、
汐崎裕美、武山健一、加藤茂明

ショウジョウバエZn-fingerタンパクZ4
の新規クロマチン凝集化機能の解析

村田拓哉、沢津橋 俊、伊藤紗弥、鈴木
絵里子、山形 薫、趙 越、田辺真彦、藤
山沙理、木村周平、上田 崇、松川紘之、
林 珍仙、武山健一、加藤茂明

新規ヒストンシヤペロン *Drosophila* DEK
はクロマチン構造変換を介してエクダイ
ソンレセプターの転写反応を正に制御す
る転写共役因子である

沢津橋 俊、武山健一、伊藤紗弥、鈴木
絵里子、田辺真彦、趙 越、山形 薫、木
村周平、村田拓哉、藤山沙理、上田 崇、
松川紘之、林 珍仙、多羽田哲也、伊藤 敬、
加藤茂明

シンポジウム「組織幹細胞とニッシェ」
骨組織分化におけるPPAR γ 機能制御因子
群の解析

高田伊知郎、須澤美幸、加藤茂明

シンポジウム「タンパク質分解を介した
新たな生理機能」

リガンド依存性転写因子はユビキチンリ
ガーゼ複合体として機能する
大竹史明、岡田麻衣子、西川亜美、藤井
義明、加藤茂明

第 81 回日本内分泌学会学術総会 (青森)

(2008. 5. 16-18)

グルココルチコイドレセプター(GR)によ
る未知炎症制御メカニズムの解析
北川浩史、山岡育子、目崎善弘、清水崇
史、加藤茂明

第 26 回日本骨代謝学会 (大阪)

(2008. 10. 29-31)

芽細胞を介したエストロゲンの直接作用
—骨芽細胞特異的エストロゲン受容体欠
損マウスの作出
金藤紫乃、今井祐記、高田伊知郎、中村
貴、松本高広、加藤茂明

成熟多核破骨細胞におけるエストロゲン
受容体 ER α の発現解析

延 珉榮、高田伊知郎、金藤紫乃、今井
祐記、加藤茂明

第16回日本ステロイドホルモン学会学術
集会 (福井) (2008. 11. 22)

グルココルチコイドレセプター(GR)によ
る未知炎症制御メカニズムの解析
北川浩史、山岡育子、岡田麻衣子、藤山
沙理、加藤茂明

【国際】

2008 Keystone Symposia Conference
(RNAi, MicroRNA, and Non-Coding RNA)

Whistler, Canada (2008. 3. 25-4. 1)

DEAD-box RNA helicase is required for
Drosha-mediated processing of a
subset of microRNAs.

K. Inoue, T. Matsumoto, K. Yamagata, C.
Akimoto, M. Yonezawa, S. Kato

Identification of novel insulator

function to regulate chromatin formation through Dcr-2/Ago2 pathway. E. Suzuki, S. Sawatsubashi, S. Ito, Y. Z Yao, K. Yamagata, M. Tanabe, S. Kimura, T. Ueda, T. Murata, S. Fujiyama, H. Matsukawa, A. Kouzmenko, K. Takeyama, Y. Tomari, H. Siomi, S. Kato

2008 Keystone Symposia Conference (Nuclear Receptors: Orphan Brothers)

Whistler, Canada (2008. 3. 29-4. 5)
A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signaling suppresses PPAR-gamma function.

I. Takada, M. Mihara, M. Suzawa, S. Kato

Novel corepressor, SNASH induces neurogenesis through the transcriptional repressing for notch signaling.

K. Takeyama, S. Ito, S. Sawatsubashi, A. Kouzmenko, E. Suzuki, Y. Zhao, K. Yamagata, M. Tanabe, S. Kimura, T. Ueda, T. Murata, H. Matsukawa, S. Fujiyama, Y. Hirabayashi, Y. Gotoh, S. Kato

Aberrant expression of a novel androgen corepressor in testicular tumors.

T. Ueda, S. Ito, S. Sawatsubashi, A. Kouzmenko, E. Suzuki, K. Yamagata, Y. Zhao, M. Tanabe, S. Kimura, T. Murata, H. Matsukawa, S. Fujiyama, T. Miki, K. Takeyama, S. Kato

2008 Keystone Symposia Conference

(Molecular Basis for Chromatin Modifications and Epigenetic Phenomena)

Snowmass, USA (2008. 4. 7-13)

Switching of chromatin-remodeling complexes for estrogen receptor α .

M. Okada, S. Takezawa, Y. Mezaki, I. Yamaoka, I. Takada, H. Kitagawa, S. Kato

Transrepressive function of TLX requires the histone demethylase, LSD1.

A. Yokoyama, S. Takezawa, R. Schüle, H. Kitagawa, S. Kato

Analysis of a novel co-repressor, Z4 with *Drosophila* molecular genetics and proteomics.

T. Murata, S. Sawatsubashi, S. Ito, Y. Zhao, K. Yamagata, E. Suzuki, M. Tanabe, S. Fujiyama, S. Kimura, T. Ueda, H. Matsukawa, K. Takeyama, S. Kato

Drosophila arginine methyltransferase 1 (DART1) modulates ecdysone receptor-mediated transcription in *Drosophila* metamorphosis.

Kimura, S., Ito, S., Sawatsubashi, S., Kouzmenko, A., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., T. Ueda, S. Fujiyama, T. Murata, H. Matsukawa, K. Takeyama, S. Kato

Integrated Signaling Network of Metabolic Dysfunction

Seoul, Korea (2008. 3.7)

The function of nuclear receptors in bone cells.

S. Kato

International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest under Stress

Okinawa, Japan (2008.4.6-10)

Nuclear O-glycosylation regulates histone methyltransferase activity of RAIGIN during retinoic acid-induced differentiation.

S. Kato

11th Frontiers in Nuclear Receptor Action Conference

Savannah, USA (2008.4.10-12)

Sex steroid hormones mediate osteoprotective effects by controlling osteoclast life cycle.

S. Kato

New York Academy of Science on Integrative Physiology

New York, USA (2008.5.14-16)

Nuclear receptor function in skeletal tissues.

S. Kato

The Endocrine Society's 90th Annual Meeting

San Francisco, USA (2008.6.15-18)

Control of gene expression by the VDR.

S. Kato

Annal Scientific Meeting of Endocrine

Society of Australia (ESA) & Society for Reproductive Biology (SRB)

Melbourne, Australia (2008.8.25-28)

Function of nuclear sex hormone receptors in target tissues.

S. Kato

Australian & New Zealand Bone & Mineral Society (ENZBMS)

Melbourne, Australia (2008.8.28-30)

Estrogen mediate osteoprotective effects by controlling osteoclast life cycle.

S. Kato, Y. Imai, T. Nakamura

A non-canonical Wnt signal induces osteoblastogenesis through attenuatin PPARgamma-mediated adipogenesis.

S. Kato, I. Takada

ASBMR 30th Annual Meeting

Montreal, Canada (2008.9.12-16)

Biochemical characterization of ERA co-regulators in multinucleated mature osteoclasts.

I. Takada, M.-Y. Young, Y. Imai, S. Kato

Multinuclear expression of ERA in mature osteoclasts.

M.-Y. Young, I. Takada, S. Kondou, Y. Imai, S. Kato

Molecular switching of osteoblastogenesis vs Adipogenesis.

S. Kato

The Mineralcorticoid Receptor - update
on Biology, Structure and Ligands

Berlin, Germany (2008.9.10-12)

Coactivator mediation of MR AF-1.

S. Kato

Dioxin Toxicity: Mechanisms, Models, &
Potential Health Risks

East Lansing, USA (2008.10.20-21)

Dioxin receptor is a ligand-dependent
E3 ubiquitin ligase.

S. Kato

The 20th Korean Society of Bone
Metabolism Autumn Scientific Congress

Jeju-do, Korea (2008.11.22)

Estrogen mediate osteoprotective by
controlling oseeoclast life cycle.

S. Kato

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

細胞外液リン濃度が尿細管の FGF23 応答性に及ぼす影響

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：

Fibroblast growth factor 23 (FGF23)はリン恒常性維持機構において中心的な役割を担うリン酸利尿因子である。しかしながら、血清リン値と FGF23 値との相関は必ずしも明確ではない。今回、ヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 を用いて細胞外無機リン酸濃度の差異が FGF23 応答性に与える影響を検討した。HEK293 細胞において、FGF23 は Klotho 依存性に extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 のリン酸化、標的遺伝子である early growth response 1 (Egr-1)の発現を誘導した。一方、細胞外液無機リン酸濃度の上昇も ERK1/2 のリン酸化、Egr-1 の発現を誘導し、このリン酸応答性には III 型 ナトリウム・リン酸共輸送担体である PiT-1 が関与していた。興味深いことに、細胞外無機リン酸濃度の上昇は、FGF 受容体の下流に存在する FGF receptor substrate 2 α (FRS2 α) のリン酸化をも誘導した。種々のリン酸濃度存在下で FGF23 を作用させたところ、高濃度リン酸存在下では FGF23 添加による ERK1/2 リン酸化の増強効果が減弱しており、尿細管の FGF23 応答性は細胞外無機リン酸濃度の影響を受ける可能性が示唆された。

A. 研究目的

Fibroblast growth factor 23 (FGF23)は腎近位尿細管におけるリン酸再吸収とビタミン D 活性化を調節する液性因子であり、骨で産生され、遠隔臓器である腎臓において FGF 受容体、Klotho と複合体を形成することにより作用を発揮する endocrine FGF である。リン酸利尿ホルモンとして作用することから、FGF23 の産生は

血清リン値により制御を受けることが推察されるが、実際には FGF23 値と細胞外液リン濃度との関係については必ずしも明確ではない。慢性腎疾患(CKD)においては、血中 FGF23 レベルの上昇と高リン血症の重症度との間に相関が認められることが報告されているが(Weber et al.: *J Bone Miner Res* 2003)、骨芽細胞などの培養細胞を用いた実験では、血清リン値による直

接的な FGF23 の発現制御は確認されていない。こうした状況から、本研究においては、細胞外液リン酸濃度そのものが腎臓における FGF23 応答性に影響を与える可能性について検討することを目的とする。

B. 研究方法

ヒト胎児腎尿管由来細胞株 HEK293 細胞を用いて以下の検討を行った。

- 1) HEK293 細胞の FGF23 応答性を検討した。FGF23 のソースとして、分解に対して抵抗性を有する機能獲得型 FGF23 変異体 FGF23[R179Q] を恒常的に発現する CHO 細胞を樹立し、その培養上清を使用した。
- 2) 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、ERK1/2 をはじめとする蛋白質群のリン酸化レベルを Western blot により解析した。
- 3) 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。
- 4) 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) および siRNA によるノックダウンを用いて、細胞外無機リン酸応答性におけるナトリウム・リン酸共輸送担体の関与について検討した。
- 5) 種々の濃度のリン酸存在下で HEK293 細胞に FGF23[R179Q] を添加し、ERK1/2 のリン酸化を指標として FGF23 応答性に対する細胞外無機リン酸濃度の影響について検討した。
- 6) HEK293 細胞において、細胞外無機リン酸濃度の上昇により誘導されるシグナルと、FGF23 シグナルとの収束点について解析を進めた。

(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) HEK293 細胞に FGF23[R179Q] を添加したところ、ERK1/2 のリン酸化、Egr-1 の発現誘導が認められた。Real-time PCR により Klotho の発現レベルを確認したところ、HEK293 には低レベルながら Klotho が発現していた。Klotho の過剰発現は、FGF23[R179Q] 添加による ERK1/2 のリン酸化、Egr-1 の発現誘導を増強した。
- 2) 通常、細胞外液中には約 1 mM のリン酸が存在する。HEK293 細胞に 4~10 mM の高濃度リン酸刺激を与えたところ、Raf/MEK/ERK 経路の活性化が誘導された。一方、p38MAPK や JNK、AKT については細胞外無機リン酸濃度を上昇させてもリン酸化の誘導は認められず、細胞外無機リン酸刺激による Raf/MEK/ERK の活性化には比較的特異性が存在することが示唆された。
- 3) 4~10 mM の高濃度リン酸刺激は、30 分以内に FGF23 の標的遺伝子である Egr-1 の発現を誘導した。
- 4) 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。また、HEK293 におけるナトリウム・リン酸共輸送担体の発現を real-time PCR により検討したところ、III 型ナトリウム・リン酸共輸送担体である PiT-1 の発現が優位であった。そこで、siRNA を用いて PiT-1 の発現を抑制したところ、HEK293 の細胞外無機リン酸応答性が減弱した。
- 5) 高濃度の無機リン酸存在下では、FGF23 添加による ERK1/2 リン酸化の増強作用が減弱していた。
- 6) 高濃度無機リン酸刺激は、FGF23 を添加した場合とおなじく、FGF 受容体の下流に存在する FRS2 α のリン酸化を誘導した。

D. 考察

今回の検討において、FGF23[R179Q] の添加及び細胞外無機リン酸濃度の上昇はいずれも、FRS2 α および ERK1/2 のリン酸化、Egr-1 の発現

誘導を引き起こし、両者のシグナルが下流のネットワークを共有していることが示唆された。また、今回検討に用いた HEK293 細胞においては、III 型ナトリウム・リン酸共輸送担体である PiT-1 が細胞外無機リン酸応答性に関与していることが推察されたが、他のナトリウム・リン酸共輸送担体も同様に細胞外無機リン酸応答性を仲介しうるか否かについては、今後検討する必要がある。また、今回の検討から、尿細管の FGF23 応答性が、細胞外無機リン酸濃度の影響を受けることが示唆された。前述したように、CKD においては、血中 FGF23 値と高リン血症との間に相関が認められ (Weber, et al. *J Bone Miner Res*, 2003)、これには高リン血症に伴う FGF23 応答性の低下も関連していることが推察される。また、高リン血症、正リン血症、低リン血症のそれぞれの場合において、尿細管の FGF23 応答性が変化している可能性があり、今後解析を進める予定である。

E. 結論

細胞外無機リン酸濃度の変化が尿細管細胞におけるシグナル伝達を惹起し、FGF23 に対する応答性に影響を与える可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki A, Ozono K, Kubota T, Kondou H, Tachikawa K, Michigami T. PTH/cAMP/PKA signaling facilitates canonical Wnt signaling via inactivation of glycogen synthase kinase-3 β in osteoblastic Saos-2 cells. *J Cell Biochem*, 104:314-317, 2008

Kubota T, Michigami T, Sakaguchi N, Kokubu C, Suzuki A, Namba N, Sakai N, Nakajima S, Imai K, Ozono K. An Lrp6 hypomorphic mutation affects bone mass through bone resorption in mice and impairs interaction with Mesd. *J Bone Miner Res* 23:1661-1671, 2008

Miyauchi Y, Sakaguchi N, Okada T, Makishima

M, Ozono K, Michigami T. Oncogenic nucleoporin CAN/Nup214 interacts with vitamin D receptor and modulates its function. *J Cell Biochem*, 2009 Feb 19 [Epub ahead of print]

2. 学会発表

Yamazaki M, Kimata M, Tachikawa K, Okada T, Kubota T, Ozono K, Michigami T. Effects of extracellular inorganic phosphate on FGF23 signaling in renal tubule cells. 35th European Symposium on Calcified Tissue. 2008.5.24-28: Barcelona, Spain

Yamazaki M, Okada T, Tachikawa K, Ozono K, Michigami T. Signaling of extracellular inorganic phosphate mediated via sodium-phosphate co-transporters influences FGF23 signaling in renal tubular cells. 30th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2008.9.12-16: Montreal, Canada

山崎美和、岡田知子、立川加奈子、大幡泰久、大藪恵一、道上敏美. ヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 における細胞外無機リン酸シグナル伝達には III 型 Na⁺/Pi 共輸送担体 PiT-1 と FGF receptor substrate 2 α (FRS2 α) が関与する. 第 26 回日本骨代謝学会学術集会. 2008.10.29-31: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。

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

性腺刺激ホルモン FSH の無月経女性の骨密度に対する影響に関する研究

研究協力者 竹内 靖博 虎の門病院・内分泌センター 部長

研究要旨：

閉経後に急速に進行する骨密度低下は高齢女性において骨粗鬆症を高頻度に認める主要な原因となっている。本研究では、閉経すなわち卵巣機能低下による内分泌異常のうち、特に下垂体からの卵胞刺激ホルモン（FSH）の分泌亢進が骨密度に及ぼす影響を明らかにすることを目的として臨床的な検討を行った。非機能性下垂体腺腫に対する手術を受けた無月経の女性18名を対象に検討したところ、術前の血中 FSH 濃度と腰椎骨密度 Z-score との間に負の相関を認めた。腰椎骨密度と血中エストロゲン濃度あるいは血中 LH 濃度との間には相関を認めなかったことから、卵巣機能不全により無月経となった女性における骨密度の低下に対して FSH 分泌亢進が関与している可能性が明らかとなった。

A. 研究目的

骨代謝におけるホルモン受容機構に関する知見は近年飛躍的に増加しており、従来の考え方に対して再検討が迫られている。特に、これまで骨への直接作用が想定されていなかったホルモンの骨芽細胞や破骨細胞への直接的影響を示唆する動物を用いた研究成績が蓄積されつつあり、骨における新たなホルモン受容機構の検討とそのヒトにおける意義を明らかにすることが臨床的に重要な課題となっている。今年度は特に下垂体前葉から分泌される性腺刺激ホルモンの FSH (follicular stimulating hormone) に焦点を絞って臨床的検討を行うこととした。

閉経後骨粗鬆症に対してエストロゲン補充療法が有効であることから、長年にわたり

エストロゲンは骨代謝においてきわめて重要な役割を果たすものと考えられてきた。一方遺伝子改変マウスの詳細な研究から、エストロゲンの低下とは独立して、閉経後に生じる性腺刺激ホルモン FSH の血中濃度の上昇が骨吸収の亢進と骨量の減少をもたらすことが 2006 年に報告された (Sun L, et al. Cell, 125:247-260, 2006)。

特に高齢女性にはエストロゲン補充療法は勧められないことから、FSH 自身がヒトの骨代謝におよぼす影響を明らかにすることは臨床的に重要な意義をもつ。しかしながら、自然閉経に伴う卵巣機能不全によるエストロゲン血中濃度の低下は FSH 分泌の亢進をもたらすことから、エストロゲンと FSH の骨作用を独立して検討することは不可能であ

る。この問題を解決するために、本研究では血中エストロゲンと FSH 濃度が同時に低下している非機能性下垂体腺腫をもつ無月経女性を対象として、血中 FSH 濃度と骨密度との関連を明らかにすることを目的として臨床的な検討を行った。

B. 研究方法

虎の門病院内分泌センターに入院した非機能性下垂体腺腫をもつ無月経女性で、他の内分泌異常を持たない症例 18 例 (平均年齢 60 歳) を対象とした。下垂体腫瘍摘除手術前に、血清 FSH, LH, estradiol (E2) 濃度および腰椎骨密度を測定した。

検査項目はすべて診療上必要なものであり、本研究のために追加して実施した検査や患者への侵襲はない。また、本研究は後方視的観察研究であり、倫理的問題はない。

C. 研究結果

腰椎骨密度 Z-score (年齢補正值) は血清 FSH 値と負の相関を示した ($p < 0.05$) が、LH あるいは E2 との間には相関を認めなかった。FSH > 8 IU/L を FSH 高値群それ以外を低値群として二群に分けると、高値群の骨密度 Z-score は低値群よりも低かった ($p < 0.05$)。両群間で血清 E2 値に差は認められなかった。血清 E2 値により症例を 2 群に分けても、両群間で腰椎骨密度に差を認めなかった。

D. 考察

卵巣機能不全のみで他の内分泌異常を持

たない下垂体腺腫症例を対象とした本研究から、血清 FSH 値の上昇が腰椎骨密度の低下と関連することが明らかとなった。この成績は、マウスと同様にヒトにおいても FSH 自身が骨代謝に密接に関与することを示唆するものである。また本研究結果は、ヒトの閉経後の骨密度減少の予測因子として、血中エストロゲン濃度の低下よりも FSH 値の上昇の方が重要であることを示唆する成績 (Sowers MR, et al. J Clin Endocrinol Metab 91:1261-1267, 2006) とも矛盾しない。

閉経後女性において骨密度に影響を与える因子としては、肥満度、除脂肪体重や飲酒、喫煙、遺伝的背景などが挙げられる。また、閉経後であっても血中 E2 濃度と骨密度との間に正の相関を認めるとする報告も散見される。今回の成績では、血中 E2 濃度と腰椎骨密度の間には相関は認められず、少なくとも今回の検討対象である無月経の下垂体腺腫症例においては、血中 E2 よりも FSH 濃度の方が骨代謝に重要であることを示唆している。今回は、内分泌学的指標以外には検討を行っていないことから、今後さらに肥満度や飲酒・喫煙などの生活習慣も含めた解析を行うことが必要であろう。

閉経後骨粗鬆症に対する治療方法は近年大きく進歩し、現在ではビスフォスフォネート製剤と選択的エストロゲン受容体モジュレータが確立された治療薬となっている。しかしながら、閉経後骨粗鬆症の治療はしばしば 10 年を超えて長期に及ぶことや前述の治療薬によっても骨折頻度を 1/2 以下には減らせないことなどから、全く新規の生理

的な治療方法の開発が望まれている。FSH 抑制療法は生理的であると同時に閉経後女性に対する副作用は想定されないことから、閉経後骨粗鬆症の治療戦略の一環として検討する価値があるものと考えられる。今後、閉経後骨粗鬆症の病態に関与するホルモンとしての FSH の意義をさらに解明していくことが重要である。

E. 結論

下垂体前葉ホルモンのひとつである FSH の血中濃度上昇は閉経後女性の腰椎骨密度低下と関連する可能性がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

内田香介ほか, 血中 FSH 濃度は性腺機能低下症女性における骨密度低下と相関する, 第 81 回日本内分泌学会学術総会, 2008 年 5 月 16 日-18 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

甲状腺ホルモン不応症（RTH）のヒストン脱アセチル化酵素阻害薬（HDACI）
による治療法の開発

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：

（背景）甲状腺ホルモン（TH）不応症（RTH）のモデルマウスとして、我々は遺伝子相同組み替え法を用いてTHレセプター（TR） β Δ 337T変異を導入したTR β Δ 337Tノックイン（KI）マウスを作成した。この変異はT3との結合不能なためco-repressorがTR β から解離せず、恒常的なヒストン脱アセチル化酵素（HDACs）の作用が予想される。（目的）現在RTHの有効な治療法はない。我々はHDACsが恒常的に作用する本症の治療に、HDAC阻害薬（HDACI）であるバルプロ酸ナトリウム（VPA）の応用を試みる。本研究ではKIマウスを用いてVPA投与後の肝及び脳での遺伝子発現の変化を検討した。（方法）KIマウスホモ体（4週齢雄）にVPA300mg/kgを14日間腹腔内投与、全脳及び肝からトータルRNAを抽出しコントロール群とVPA群の遺伝子発現をDNAマイクロアレイで解析した。（結果）KIマウスの各ゲノタイプにおいてVPA投与群と対照群間で体重、血清フリーT4、TSH値および下垂体におけるTSH β 遺伝子発現に差異を認めなかった。Co-repressorであるNCoRとTR β 1はKIマウスの肝臓において恒常的な結合が見られ、VPA投与によって、その解離が認められた。KIマウスの平衡能はVPA投与によって改善傾向が認められた。KIマウスにおいてVPA投与群のHDAC遺伝子発現はHDAC7aでのみ増加しHDAC10で減少していた。下垂体前葉ホルモン遺伝子発現はTSH β を含め、VPA投与群と対照群間で差異を認めなかった。VPA投与群ではNeurotrophic factor-3（NT-3）及びNeurotrophic tyrosine kinase receptor type 1（TrKA）の発現が増加していた。（結論）KIマウスへのVPA投与は、同マウスの遺伝子発現異常を改善し、VPAがRTHの治療薬となりうる可能性を示唆した。

A. 研究目的

甲状腺ホルモン不応症 (RTH) は甲状腺ホルモンに対する組織での反応性が著しく低下した病態である。多くの場合甲状腺ホルモンレセプター (TR) β 遺伝子変異が存在する。我々は近年、遺伝子相同組み替え法を用いて甲状腺ホルモン受容体

(TR) β 遺伝子座に $\Delta 337T$ 変異を導入した TR β $\Delta 337T$ ノックイン (KI) マウスを作成し、RTHの病態並びに発症メカニズムの解析を進めている。TR β $\Delta 337T$ 変異はRTH患者家系に実際に認められたもので、リガンドであるT3との結合能が欠如している。このためNCoRなどのco-repressorがTR β から解離せず、恒常的にヒストン脱アセチル化酵素 (HDACs) がTR β に作用している状態が予想されている。(Hashimoto K et al PNAS 98; 2001)。現在までにRTHの有効な治療法はない。最近HDAC阻害薬 (HDACi) が新たな癌への分子治療薬として臨床応用されている。我々はHDACsがTR β に恒常的に作用している本症の治療にHDACiであるバルプロ酸ナトリウム (VPA) の応用を試みる。本研究ではTR β $\Delta 337TKI$ マウスを用いてVPA投与後の肝及び脳での遺伝子発現の変化を検討した。

B. 研究方法

KIマウス各種ゲノタイプ (雄4-8週齢) にVPA 300mg/kgを14日間腹腔内投与し、

1) 対照群とVPA群の血清フリーT4、TSH値を測定した。

2) 下垂体トータル(t)RNAを抽出しTSH β

mRNAをTaqman™Real-time PCRで定量した。

3) 肝臓よりWhole Cell Extractを抽出し、抗TR β 1抗体と抗HDAC抗体及び抗NCoR抗体を用いて免疫沈降を行った。

4) KIマウス各種ゲノタイプ (対照群とVPA群) にBeam test (平衡感覚の評価) を行った。

5) ホモ体の全脳tRNAを抽出し、対照群とVPA群の遺伝子発現をFilgen社DNAマイクロアレイ (FilgenArray Mouse 32K) で解析した。

(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) TRノックイン (KI) マウスの各ゲノタイプにおいてVPA投与群と対照群間で体重、血清フリーT4、TSH値および下垂体におけるTSH β 遺伝子発現に差異を認めなかった。2) 肝臓におけるTR β 1の蛋白発現量並びにTR β 1とHDAC2との結合にVPAは影響を及ぼさなかった。3) Co-repressorであるNCoRとTR β 1はTRKIマウスの肝臓において恒常的な結合が見られ、VPA投与によって、その解離が認められた。4) TRKIマウスの平衡能はVPA投与によって改善傾向が認められた。

5) TRKIマウスにおいてVPA投与群のHDAC遺伝子発現はHDAC7aでのみ増加しHDAC10で減少していた。6) 下垂体前葉ホルモン遺伝子発現はTSH β を含め、VPA投与群と対照群間で差異を認めなかった。7) VPA

投与群ではNeurotrophic factor-3(NT-3)及び Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1(TrKA)の発現が増加していた。

D. 考察

KI マウスに対する VPA 投与によって、不適切 TSH 分泌 (SITSH) や甲状腺中毒症を是正することはなかったが、平衡能異常は改善傾向が認められた。また分子生物学的には VPA 投与は TR β 1 と HDAC2 との結合を解離しなかったが、NCoR と解離を認めた。DNA マイクロアレイでは脳内神経栄養因子の遺伝子発現を増加させ、KI マウスの高次脳機能異常の改善に寄与する可能性が考えられた。今後はヘテロ同士の交配時より VPA を経口投与し、胎生期からの VPA の RTH に対する効果を検討したい。

E. 結論

KIマウスに対するVPA投与は、脳内神経栄養因子の遺伝子発現を増加させ、中枢神経系の異常改善に寄与する可能性を示唆した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsumoto S, Hashimoto K, Yamada M, Satoh T, Hirato J, Mori M. Liver X Receptor- α Regulates Proopiomelanocortin (POMC) Gene Transcription in the Pituitary. *Mol Endocrinol.* 23:47-60.

2) 橋田哲、森昌朋

甲状腺疾患の実地診療の実際 「頻度の高い甲状腺疾患をいかに見つけるか」
Medical Practice 26巻1号 p 6-11

3) 渋谷信行、山田正信

「TRHの病態生理的意義」
ホルモンと臨床 56巻8号 p787-793

4) 渋谷信行、山田正信

ホルモンの病態異常と臨床検査 ホルモンの病態異常と検査 「下垂体前葉 TSH」
*臨床検査*52巻11号 p1189-1192

5) 橋本貢士

甲状腺機能異常の脂質代謝異常のメカニズム

ホルモンと臨床 56巻7号 p731-735.

6) 佐藤浩一、佐々木望、原田正平、田中敏章、赤須文人、朝山光太郎、荒田尚子、猪股弘明、大江秀美、鬼形和道、神崎晋、杉原茂孝、田尻淳一、田中弘之、西山宗六、長谷川奉延、長谷川行洋、深田修司、百溪尚子、横谷進、吉村弘、森昌朋、藤枝憲二、日本小児内分泌学会薬事委員会

小児期発症バセドウ病薬物治療のガイドライン 2008

日本小児科学会雑誌 112巻5号 p946-952.

7) 山田正信、梅澤良平、橋本貢士、森昌朋

甲状腺ホルモン受容体を介した転写制御機構 「心血管系ならびに脂質代謝への関与」

分子心血管病 9巻3号 p270-277.

8) 堀口和彦, 山田正信【透析患者診療のための診断基準・重症度スコア 適切な病態評価のために】臓器別のアプローチ 内分泌・代謝 甲状腺腫大 臨床透析 24 巻 7 号 p959-961.

9) 梅澤良平, 山田正信, 森昌朋

【内分泌代謝疾患における難病の現況とその対策】ホルモン受容機構異常症における難病の現況とその対策 甲状腺ホルモン不応症

ホルモンと臨床 56 巻 1 号 p53-59.

10) 森昌朋

【見落としがちな内分泌疾患】ホルモンの種類と分泌調節 総合臨床 57 巻 3 号 p405-410.

2. 学会発表

1) Hashimoto K, Ishida E, Matsumoto S, Okada S, Yamada M, Satoh T, Monden T and Mori M.

MOUSE CARBOHYDRATE RESPONSE ELEMENT BINDING PROTEIN (CHREBP) GENE EXPRESSION IS POSITIVELY REGULATED BY THYROID HORMONE.

International Congress of Endocrinology (ICE), RIO, Brazil Nov8-12th 2008

2) Yamada M, Horiguchi K, Hosoya T, Yamada S, Mori M. Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis in the Patients with Pituitary Adenoma: Analysis of 282 Pre- and Post- Operated Patients.

The 13th Meeting of the European

NeuroEndocrine Association, Antalya Turkey, 2008

3) Shibusawa N, Horiguchi K, Hashimoto K, Satoh T, Yamada M, Mori M. Effect of Thyroid hormone receptor β mutantation in development of cerebellar Purkinje cells.

The 13th Meeting of the European NeuroEndocrine Association, Antalya Turkey, 2008

4) 中島康代, 山田正信, 正村泰博, 佐藤哲郎, 橋本貢士, 安藤義孝, 森昌朋, メタボリックシンドロームと潜在性甲状腺機能低下症: 人間ドック 7318 名の解析から, 第 51 回日本甲状腺学会, 宇都宮, 2008

5) 佐藤哲郎, 吉野聡, 石塚高広, 橋田哲, 渋谷信行, 橋本貢士, 山田正信, 森昌朋, レプチン受容体遺伝子の甲状腺ホルモンによる制御機構の解析, 第 51 回日本甲状腺学会, 宇都宮, 2008

6) 橋本貢士, 松本俊一, 石田恵美, 橋田哲, 渋谷信行, 佐藤哲郎, 山田正信, 森昌朋, 甲状腺ホルモン不応症 (RTH) に対するバルプロ酸ナトリウム (VPA) による治療法の開発。

第 35 回日本神経内分泌学会, 東京 2008

7) 山田正信, 堀口和彦, 細谷剛, 中島康代, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 山田正三, 森昌朋, 中枢甲状腺機能低下症の病態と治療

第 81 回日本内分泌学会, 青森, 2008

8) 橋本貢士, 松本俊一, 石田恵美, 堀口和彦, 吉野聡, 梅澤良平, 中島康代,

石塚高広、橋田哲、佐藤哲郎、門傳剛、
山田正信、森昌朋、
Carbohydrate-response element-binding
protein (ChREBP) 遺伝子発現は甲状腺ホ
ルモンによって正に制御されている、第
81回日本内分泌学会、青森、2008

H. 知的所有権の出願、取得状況
現在のところなし。

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：
TRH による TSH β 遺伝子活性化機序について

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におけるもっとも重要な病態は、不適切 TSH 分泌状態 (SITSH) である。この解明のため、これまで TSH β 遺伝子制御機構の解析を進め、GATA2 が活性化因子であることを見出した。TSH β 遺伝子は T3 による転写抑制を受ける一方、TRH により転写活性化される。今回 TRH の TSH β 遺伝子活性化機序を検討し、TRH が GATA2 を介して作用すること、細胞内シグナル伝達機構としては PKC が司ること等を明らかにした。

A. 研究目的

TSH β 遺伝子は T3 により転写レベルで抑制されるが、一方で TRH により刺激される。いずれも、甲状腺ホルモン不応症の中心的病態である不適切 TSH 分泌状態 (SITSH) に深く関わると考えられるが、両者の接点については明らかでない。T3 による負の調節について、我々はこれまでに thyrotroph の分化を決定する転写因子 Pit1 と GATA2 を CV1 細胞に共発現させた系を用い、①TSH β 遺伝子の発現を活性化している真の因子が GATA2 であること、②甲状腺ホルモン受容体 (TR) が T3 依存性に TSH β 遺伝子を転写抑制すること、③TR の DNA 結合は必須でなく、TR は GATA2 の Zn フィンガーと蛋白-蛋白相互作用すること等を報告してきた。

TSH β 遺伝子に対する TRH 作用についてはほとんど解析されていないが、プロラクチン (PRL) 遺伝子も TRH に転写活性化され、Pit1 が関与することから、類似の分子機構が推定

されてきた。しかし、TRH や TRH 受容体のノックアウトマウスでは、TSH β と PRL の発現レベルは必ずしも相関しない。今回、我々の系を用いて、TRH の TSH β 遺伝子に対する作用機構を検討した。

B. 研究方法

CV1 細胞に Pit 1、GATA2、TRH 受容体の各発現プラスミド、TSH β プロモーター (-128bp) を融合した CAT レポーター遺伝子 (TSH β -CAT) を導入し、TRH 添加後 24 時間培養して CAT 活性を測定、TSH β プロモーターの活性を評価した。

(倫理面への配慮) In vitro の実験であり、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

既報の如く TSH β -CAT は Pit1 と GATA2 により著明に活性化された。ここに TRH 受容体

を共発現させ TRH を添加すると、その活性は受容体、TRH の用量依存性にさらに増強し、100nM TRH で約 2 倍となった。これは TSH β 遺伝子の長いプロモーター (-1193bp) を使った場合も、まったく同様に観察された。TRH 受容体には選択的スプライシングの違いにより、アミノ酸 412 個とアミノ酸 378 個のアイソフォームが存在するが、両者とも同様に TSH β -CAT(-128bp) を刺激した。

TRH/TRH 受容体で活性化される PRL 遺伝子については、下垂体由来 GH3 細胞を用いた解析から、TRH が受容体に結合するとプロテインキナーゼ C(PKC) に続いて MAP キナーゼ (MAPK) が活性化され、そのシグナルが Ets ファミリー転写因子を刺激、Pit1 との相乗作用の結果、PRL プロモーターが活性化を受けると考えられている。そこで GH3 細胞に GATA2 と TSH β -CAT を共発現させ、細胞内シグナル伝達機構を調べた。TRH により上昇した TSH β -CAT は、PKC 阻害剤で抑制されたが、MAPK 阻害剤には影響されなかった。MAPK は、PRL 遺伝子に対しては PKC とともに重要であるが、TSH β に対しては関与しない可能性が高い。

TSH β 遺伝子と PRL 遺伝子の差異は、両者共通の転写因子である Pit1 のパートナー蛋白である Ets と GATA2 の違いによる可能性がある。そこで TRH シグナルと GATA2 の関連を検討した。TSH β 遺伝子は、GATA 結合配列の直下 30 塩基領域 (-82/-52) (SR) を欠失させると、Pit1 非存在下で GATA2 のみで転写活性化される。GATA2 単独で活性化された SR 欠失レポーター遺伝子 (TSH β -D4-CAT なら

びに TSH β -EV-CAT) は、TRH によりさらに 2.5 倍活性が増強した。TRH の GATA2 への作用は、GATA 応答配列を有する TSH α 鎖やエンドセリン-1 プロモーターでも認められた。GATA2 の活性化能は、N 端や C 端を欠失しても認められることから、DNA 結合領域である Zn フィンガーに存在すると考えられた。事実、この領域に高い相同性を有する GATA1、GATA3 も TRH の刺激作用を示した。一方、GATA2 の Zn フィンガーにおける既報のリン酸化配列や Pit1 のリン酸化配列を破壊しても TRH 刺激効果は維持された。PKC 以降の段階で未知の因子が関与している可能性も考えられる。

GATA2 と TRH 受容体を発現した CV1 細胞の核抽出液を調整し、TSH β 遺伝子の GATA2 応答配列をプローブとしてゲルシフトアッセイを行うと、TRH 添加により GATA2 の DNA 結合の増強が見られた。

TRH による刺激作用と T3 による抑制作用を検討すると、100nM TRH で活性化された TSH 遺伝子活性は 1nM T3 で著明に抑制され、10nM T3 では完全に基礎転写レベルまで抑制された。従って T3 による負調節は TRH の刺激作用よりも優位であると考えられた。

D. 考察

今回の検討で、TRH/TRH 受容体による活性化シグナルと T3/TR による抑制化シグナルが、共に GATA2 を標的としていることが明らかとなった。また TRH の細胞内シグナル機構としては、PKC を介する。PKC がどのように GATA2 に作用するかは不明であるが、GATA2

の DNA 結合を促進することが推定された。GATA2 は VCAM1 遺伝子の発現を活性化するが、その際も PKC 刺激が GATA2 の DNA 結合を促進することが報告されている。どの PKC アイソフォームが thyrotroph において作用しているのかも、今後の検討をまたなければならない。

TRH による TSH β 遺伝子発現促進作用は PKC を介するが、PRL 遺伝子とは異なり MAPK の寄与は少ない。これは TRH や TRH 受容体欠失マウスで、PRL と TSH β の発現パターンが異なる *in vivo* の成績を反映するものかもしれない。Pit1 は両遺伝子に共通であることから、両者のシグナル伝達の差異は Pit1 のパートナー蛋白である GATA2 と Ets の違いに由来する可能性が考えられる。

また我々の系で、TRH による刺激作用より T3 による抑制作用のほうが圧倒的に優位であったが、GATA2 と T3/TR との相互作用、GATA2 と TR の両方に関わる重要な因子である TRAP220/MED1、CBP/p300 などとの関連は不明で、今後追求していかねばならない。

E. 結論

GATA2 は TSH β 遺伝子の活性化因子であり、T3/TR による負の調節の標的であるが、TRH による刺激作用も GATA2 を標的とする。TRH の細胞内シグナルは PKC を介するが、PRL の場合とは異なり MAPK には依存しない。PKC シグナルの詳細は不明であるが、GATA2 の DNA 結合を促進する。また、T3 による抑制効果の方が、TRH による刺激効果よりも明らかに優位である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Functions of Pit1 in GATA2-dependent transactivation of the thyrotropin β promoter.

Kashiwabara Y, Sasaki S, Matsushita A, Nagayama K, Ohba K, Iwaki H, Matsunaga H, Suzuki S, Misawa H, Ishizuka K, Oki Y, Nakamura H.

J Mol Endocrinol. in press

Inhibition of GATA2-dependent trans-activation of the TSH β gene by ligand-bound estrogen receptor α .

Nagayama K, Sasaki S, Matsushita A, Ohba K, Iwaki H, Matsunaga H, Suzuki S, Misawa H, Ishizuka K, Oki Y, Noh JY, Nakamura H.

J Endocrinol. 199(1):113-25, 2008

2. 学会発表

Nakamura H, Ohba K, Sasaki S et al.

The mechanism of TRH-induced transactivation of TSH β gene

33rd Annual Meeting of European Thyroid Association 2008年9月 (Thessaloniki, Greece)

Sasaki S, Ohba K, Nakamura H et al.

TRH-induced protein kinase C signal enhances DNA binding of GATA2 and stimulates transactivation of TSH β gene

79th Annual Meeting of American Thyroid Association 2008年10月 (Chicago, USA)

佐々木茂和、中村浩淑 他

TRH ならびに TPA は GATA2 依存性の TSH β 鎖転写活性化を刺激する

第 47 回日本甲状腺学会総会(前橋) 2004 年 11 月 (日本内分泌学会雑誌 80 (2): 300, 2004 Abst #04)

佐々木茂和、中村浩淑 他

TRH ならびに TPA は GATA2 の Zn フィンガー領域を介し TSH α 、 β 鎖の転写を活性化を刺激する

第 78 回内分泌学会総会 (東京) 2005 年 7 月 (日本内分泌学会雑誌 81 (1): 170, 2005Abst #P-274)

大場健司、佐々木茂和、中村浩淑 他

TRH による TSH β 遺伝子の転写活性化機序

第 50 回日本甲状腺学会総会 (神戸) 2007 年 11 月 (日本内分泌学会雑誌 83 (2): 326, 2007 Abst #P-A2-1(T10))

大場健司、佐々木茂和、中村浩淑 他

TRH は PKC を介し、GATA2 依存性の TSH β 遺伝子転写を活性化する

第 81 回内分泌学会総会 (青森) 2008 年 5 月 (日本内分泌学会雑誌 84 (1): 268, 2008 Abst #P2-059)

大場健司、佐々木茂和、中村浩淑 他

TRH は PKC および GATA2 の DNA 結合の増強を介して TSH β 遺伝子の転写を活性化する

第 50 回日本甲状腺学会総会 (宇都宮)

2008 年 11 月 (日本内分泌学会雑誌 83 (2): 412, 2008 Abst #P-YIA-6)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
5. 実用新案登録 なし
6. その他 なし