

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
平成 21 年度分担研究報告書  
血清カルシウム・リン制御機構に関する研究

分担研究者 大藪恵一 大阪大学大学院医学系研究科小児科学教授  
研究協力者 難波範行 大阪大学大学院医学系研究科小児科学助教

## 研究要旨

線維芽細胞成長因子 23(fibroblast growth factor 23: FGF23)は、近位尿細管に作用してリン利尿を惹起し、低リン血症をもたらす。FGF23 は、IIIc 型 FGF 受容体 1(FGFR1IIIc)および Klotho を受容体とする。小児は、成人に比して血清リン値が高いことが知られているがその原因は明らかではない。分担研究者らは、新生児期の FGF23/Klotho の制御に着目し、臍帯血では、FGF23 値は低値で、可溶性 Klotho は高値であることを世界で初めて示した。さらに、胎盤が Klotho の発現臓器であるとのデータを得、また、胎盤での FGF23 の不活化が、胎児・新生児期での血清リン高値の原因である可能性が考えられた。

## A. 研究目的

線維芽細胞成長因子 23(fibroblast growth factor 23: FGF23)は、近位尿細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 1(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。しかしながら、骨代謝が活発な時期である新生児および小児期における、リン代謝制御については不明な点が多いので、その機序と疾患との関連性について検討する。

## B. 研究方法

正常新生児の血中 FGF23、Klotho の測定  
正常新生児は、在胎 37 週以上、41 週以下で出生した在胎期間相応体重 (appropriate for gestational age) で、合併奇形はなく、健常である児 32 例を対象とする。児が出生した後、胎盤娩出前に臍帯断端の臍帯静脈より注射器にて

臍帯血を採取する。得られた臍帯血で、カルシウム、リン、ALP、iPTH、25(OH)D、1,25(OH)2D、FGF23(Kainos 社キット)、可溶性 Klotho 濃度(協和発酵キリン社キット)を測定する。また、そのうち 10 例で生後 4 日目の採血も行った。対照として健常成人 35 名を用いた。(倫理面への配慮)研究計画は大阪大学大学院医学系研究科の倫理委員会に申請し承認された。承認内容に十分配慮して研究を遂行している。

低リン血症性くる病の正確な診断とより良い治療方針の決定。

ビタミン D 欠乏性くる病においては、低リン血症性くる病と異なり、FGF23 は低値となる事を見いだしたので、診断上の有用性についてさらに検討する。

## C. 研究結果

臍帯血のカルシウム、リン値は既報通り、成

人と比して有為に上昇していた。一方、iPTHは低下していた。臍帯血では成人血に比し、FGF23 値は低値で可溶型 Klotho は高値であった。重回帰分析では、臍帯血血清リン値は、可溶型 Klotho と最も強く相関した。

新たなビタミン D 欠乏性くる病の症例においても FGF23 の値は低値であった。

#### D. 考察

臍帯血中の FGF23 は濃度が低かったが、これは胎児の血清リン値が高いことの原因か結果か、今後検討していく必要がある。積極的な FGF23 の低値誘導メカニズムが胎盤におけるリンの能動輸送に関わっている可能性を現在考えている。一方、臍帯血中の可溶型 Klotho は濃度が高かったが、これは胎盤における Klotho の発現によると考えられ、実際、胎盤を用いた免疫組織化学法により Klotho の発現を認めている。リンの母体-胎児輸送について新規な知見と考えられ、さらに詳細に検討する。FGF23/Klotho の測定により、胎内でのリン、ビタミン D の充足状態が推定出来ると期待される

#### E. 結論

臍帯血中の FGF23 濃度は低く、可溶型 Klotho 濃度は高い。ビタミン D 欠乏症では FGF23 濃度は低い。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Miyoshi Y, Oue T, Oowari M, Soh H, Tachibana M, Kimura S, et al. A Case of Pediatric Virilizing Adrenocortical Tumor Resulting in Hypothalamic-pituitary Activation and Central Precocious Puberty Following Surgical Removal. *Endocr J*, 2009, 56(8):975-982.

- 2) 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, 106(6):1090-1101.

- 3) Kubota T, Michigami T, Ozono K. Wnt signaling in bone metabolism. *J Bone Miner Metab*, 2009, 27(3):265-271.

- 4) Ohata Y, Yamamoto T, Mori I, Kikuchi T, Michigami T, Ozono K, et al. Severe arterial hypertension: a possible complication of McCune-Albright syndrome. *Eur J Pediatr*, 2009, 168(7):871-876.

##### 2. 学会発表

- 1) Namba N, Ohata Y, Arahori H, Kitaoka T, Miura K, Ozono K, et al. Serum Levels of Soluble Klotho and FGF23 in Cord Blood. 91<sup>st</sup> Annual Meeting ENDO09: 09.06.10-13, Washington, D.C., U.S.A.

#### G. 知的所得権の取得状況

##### 1. 特許の取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

血清カルシウム・リン値の制御機構に関しては未知な点も多く、小児科医の立場から臨床的課題を設定した。順調に経過しているが症例数はさらに増やす必要があると考えられる。臍帯血での測定では健常成人と比較し、FGF23 は低値であり、Klotho は高値であることを見いだし、米国内分泌学会に報告した(Ohata Y,

Araori H et al. ENDO 2009, Washinton, D.C.).

今後、論文化して報告する予定である。

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 平成 21 年度分担研究報告書

### 閉経後女性の骨脆弱性と血清 25(OH)D ならびに PTH との関係

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

ビタミン D(VD)の充足状態を最も反映する 25(OH)D の臨床的有用性について、骨代謝の側面から検討を行った。健常閉経後女性における検討で、25(OH)D 不足(<20ng/ml)を示した例は 81%におよんだ。25(OH)D は PTH と有意な負、骨密度(BMD)と有意な正相関を認めた。これまで日本人において、血清 25(OH)D 低値が骨折リスクの増大に関わるか否かは不明であったが、25(OH)D 低値が年齢、PTH、骨代謝マーカーや BMD とは独立した全脆弱性骨折のリスク因子であることを明らかにした。さらに全脆弱性骨折の有無から算出した 25(OH)D のカットオフ値は 16ng/ml であった。VD 不足における骨脆弱性に続発性副甲状腺機能亢進が関与するとされるが、その詳細は明らかとなっていない。そこで、25(OH)D と PTH で 4 分割し検討を行った。25(OH)D 低下に伴う骨脆弱性に続発性副甲状腺機能亢進が関与するなら、低 25(OH)D かつ高 PTH 群における骨折率が最も高くなると想定された。しかし、最も高い骨折率を示したのは低 25(OH)D かつ低 PTH 群であった。つまり、VD 不足における骨脆弱性亢進に副甲状腺機能亢進状態は必ずしも関与せず、むしろ VD 不足にも関わらず PTH が上昇していないことが、骨折リスクの増大に関わる可能性を初めて明らかにした。

**A. 研究目的** ビタミン D(VD)の充足状態を最も反映する 25(OH)D の臨床的有用性について、骨代謝の側面から検討を行う。まず、日本人において、血清 25(OH)D 低値が骨折リスクの増大に関わるか否かを明らかにする。関与する場合は骨折リスクの観点から、25(OH)D のカットオフ値を検討する。VD 不足は PTH の上昇をきたし、この続発性副甲状腺機能亢進状態が骨脆弱性に関与するとされるが、その詳細については明らかになっていない。そこで、閉経後女性において、VD 不足における骨脆弱性に続発性副甲状腺機能亢進症が関与するか否かを検討する。

**B. 研究方法** 対象は骨粗鬆症健診を受けた閉経後女性 202 名。血液検査にて 25(OH)D、Ca、P、intact PTH、骨形成マーカーである I 型プロコラーゲン N-プロペプチド(PINP)、骨吸収マーカーである I 型コラーゲン架橋 C-テ

ロペプチド(CTX)を測定し、DXA 法で腰椎(L2-4)、大腿骨頸部(FN)骨密度(BMD)を測定した。椎体骨折の有無は胸椎腰椎 X 線検査にて判定した。非椎体骨折の有無は医師による個別聴取により確認した。交通事故や身長以上の高さからの転落のような外傷性の骨折は除外した。椎体骨折および非椎体骨折のいずれかを有する者を全脆弱性骨折有りと判定した。統計学的解析は StatView (Abacus Concepts, Inc.) を用いて行った。

**C. 研究結果** 対象群の平均年齢は 63.3 ± 7.4 歳で、全脆弱性骨折既往者 64 名であった。対象群の背景は身長(平均±SD) 151.5 ± 5.3cm、体重 52.6 ± 7.2kg、BMI 22.9 ± 3.1kg/m<sup>2</sup>、25(OH)D 16.3 ± 4.4ng/ml、補正 Ca 9.1 ± 0.3mg/dl、P 3.5 ± 0.4mg/dl、Cr 0.58 ± 0.10 (最小値 0.22~最高値 1.04) mg/dl、PTH 45.8 ± 14.9ng/ml、CTX 0.40 ± 0.15 (0.03~

0.26) nM/mM·Cr、PINP  $54.5 \pm 16.4$  (15.4~59.9) ng/mL、L2-4BMD  $0.841 \pm 0.147$  g/cm<sup>2</sup>、Z 値  $0.3 \pm 1.1$ 、T 値  $-1.5 \pm 1.3$ 、FN BMD  $0.621 \pm 0.090$  g/cm<sup>2</sup>、Z 値  $0.1 \pm 1.0$ 、T 値  $-1.5 \pm 0.8$  で、年齢相当の骨密度を有する群であった。Cr の正常範囲を越えるような腎障害を有するものは除外した。健常閉経後女性の81%にVD不足(25(OH)D <20ng/ml)を認めた。

#### 【25(OH)D と各因子の相関】

25(OH)D はこれまでの報告と同様、年齢 ( $r = -0.244$ ,  $p = 0.0005$ ) および PTH ( $r = -0.238$ ,  $p \leq 0.001$ ) と有意な負の相関を認めた。骨代謝マーカーとの相関については PINP ( $r = -0.161$ ,  $p = 0.022$ )、CTX ( $r = -0.207$ ,  $p = 0.003$ ) のいずれとも有意な負の相関を認めた。BMD については L2-4BMD ( $r = -0.235$ ,  $p \leq 0.001$ )、FNBMD ( $r = -0.264$ ,  $p \leq 0.001$ ) と有意な正の相関を認めた。25(OH)D は年齢、PTH、CTX と相関を認めたため、Multiple regression analysis にて検討したところ、25(OH)D と L2-4BMD ( $r = 0.144$ ,  $p = 0.037$ ) および FNBMD ( $r = 0.158$ ,  $p = 0.021$ ) との相関は年齢、BMI、Ca、P、Cr、PTH、CTX で補正後も有意であった。

#### 【全脆弱性骨折の有無での比較】

全脆弱性骨折群と非骨折群では骨折群で有意に年齢が高かったが ( $66.4 \pm 6.7$ ,  $62.9 \pm 7.3$ ,  $p \leq 0.001$ )、BMI には差を認めなかった。また、PTH、骨代謝マーカーには有意差を認めなかったが、L2-4BMD ( $0.790 \pm 0.142$ ,  $0.865 \pm 0.142$ ,  $p \leq 0.001$ )、FNBMD ( $0.595 \pm 0.095$ ,  $0.633 \pm 0.085$ ,  $p \leq 0.001$ ) は骨折群で有意に低値を示した。そして 25(OH)D は骨折群で有意に低値を示した ( $14.7 \pm 3.2$ ,  $17.1 \pm 4.6$ ,  $p \leq 0.001$ )。25(OH)D は年齢、PTH、CTX、BMD と相関を認めたことから、ロジスティック回帰分析にて検討したところ、年齢、BMI、Ca、P、Cr、PTH、FNBMD で補正後も全脆弱性骨折に関わる因子として選択された [OR 0.65 (95%CI 0.43-0.99),  $p = 0.048$ ]。

#### 【25(OH)D におけるカットオフ値の検討】

BMD による 25(OH)D のカットオフ値の検討を行ったところ、21ng/ml 以上の値での 2 群分けでは有意差を認めなかったが、21ng/ml 未満と以上の 2 群分けにて初めて有意差を認め

( $0.615 \pm 0.090$ ,  $0.654 \pm 0.083$ ,  $p = 0.025$ )、FNBMD によるカットオフ値は 21ng/ml であった。しかし、本対象群では 21ng/ml 未満の例が 84% を占めた。次に全脆弱性骨折の有無でのカットオフ値の検討を行ったところ、16ng/ml 未満と以上の 2 群分けにて有意差を認め (41.9%, 20.6%,  $p = 0.001$ )、全脆弱性骨折の有無によるカットオフ値は 16ng/ml であった。ロジスティック回帰分析にても、16ng/ml 以上群であることは年齢、BMD、Ca、P、Cr、PTH、CTX、FNBMD を考慮しても有意な骨折リスク低減因子として選択された [OR 0.444 (95%CI 0.215-0.919),  $p = 0.029$ ]。本対象群では 16ng/ml 未満の例は 48% であった。

#### 【25(OH)D および PTH レベルと骨折の関係】

25(OH)D と PTH で 4 分割した検討において、高 25(OH)D 高 PTH 群における骨折者の割合は 23.1%、高 25(OH)D 低 PTH 20.3%、低 25(OH)D 高 PTH 37.1%、低 25(OH)D 低 PTH 47.6% で、低低群は高高群および高低群に比して有意に高い骨折率を示した ( $p < 0.05$ )。ロジスティック回帰分析にて低低群であることは年齢、BMI、Ca、P、Cr、PTH、CTX、FNBMD を考慮しても有意な骨折リスク因子であった [OR 2.59 (95%CI 1.19 - 5.63),  $p = 0.017$ ]。

## D. 考察

活性型 VD は Ca・骨代謝調節ホルモンとして重要な役割を担っている。一方、25(OH)D は VD の充足状況を反映する最も有用な指標であるが、現在のところその測定は保険収載されていない。この測定が臨床的に有用なものであるか否かについて、骨代謝の面から検討を行った。

VD 不足は骨粗鬆症の重要なリスク因子のひとつである。実際、25(OH)D 低値は骨折予測因子のひとつであり、25(OH)D の 10ng/ml 低下により大腿骨頸部骨折リスクは、1.33 倍と有意に増大するとされる (Cauley JA et al, Ann Intern Med 149:242, 2008)。しかし、Ca 摂取量が低い日本人において、25(OH)D 低値が骨折リスク因子であるか否かは明らかとなっていなかった。今回の検討により、日本人においても、25(OH)D 低値が、年齢や PTH、骨代謝マーカー、BMD とは独立した全脆弱性骨折

のリスク因子であることを明らかにした。

海外の報告では大腿骨頸部骨折リスク低減のためには、25(OH)D 30ng/ml 以上を要するとされる(Dawson-Hughes B et al, Am J Clin Nutr 88:537, 2008)。また、本邦での検討において、BMD 低下を予防するには28ng/ml 以上を要すると報告されている(Nakamura K et al. Bone 42:271, 2008)。しかし、本対象群ではほとんどの例がこれらのカットオフ値未満に属する。今回、全脆弱性骨折から検討したカットオフ値は16ng/ml であり、本対象群では16ng/ml 未満の例は 48%であった。実際の臨床応用に向けたカットオフ値設定の一助となりうる結果と考える。

25(OH)D はいずれの年齢層においてもPTHと有意な負の相関を示す(Garnero P et al, Bone 40:716, 2007, Nakamura K et al, Bone 42:271, 2008)。そして25(OH)DはBMDと有意な正の相関を示すことから、VD 不足に伴う骨脆弱性の機序には続発性副甲状腺機能亢進が関わるとされる(Mezquita-Raya P et al, J Bone Miner Res 16:1408, 2001)。つまり、骨軟化症をきたすようなVD 欠乏ではなく、VD 不足の程度であってもPTHの上昇とそれに伴う骨吸収の亢進が、BMD 減少と骨折リスクの増加に関連するとされる。しかし、25(OH)D 濃度とPTH、および骨折の有無との関連性について同時に検討した報告はなく、ビタミンDにおける骨脆弱性に続発性副甲状腺機能亢進が関与するか否かは明らかとなっていない。本検討での25(OH)DとPTHで4分割した解析において、25(OH)D 低下に伴う骨脆弱性に続発性副甲状腺機能亢進が関与するなら、低25(OH)D かつ高PTH群における骨折率が最も高くなると想定された。しかし、最も高い骨折率を示したのは低25(OH)D かつ低PTH群との結果であり、VD 欠乏における骨脆弱性亢進に副甲状腺機能亢進状態は必ずしも関与せず、むしろVD 不足にも関わらずPTHが上昇していないことが、骨折リスクの増大に関わる可能性を世界に先駆け明らかにした。この結果から、これまではVDを補充する場合の指標は上昇したPTHを低減させることとされてきたが、この概念も再考する必要がある。

BMD が低値でないにも関わらず骨折をきたす症例が存在し、これには骨質の低下が関与するとされるが、その詳細は明らかとなっていない。25(OH)D 低値はBMDやPTHとは独立した骨脆弱性のリスク因子であり骨質に関与する因子のひとつである可能性がある。

## E. 結論

閉経後女性において、VD 不足は約8割に存在し、日本人においても25(OH)D 低値はBMDやPTHとは独立した骨脆弱性のリスク因子であるといえる。全脆弱性骨折の有無から算出した25(OH)Dのカットオフ値は16ng/ml であった。また、VD 不足における骨脆弱性亢進に副甲状腺機能亢進状態は必ずしも関与せず、むしろVD 不足にも関わらずPTHが上昇していないことが、骨折リスクの増大に関わる可能性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kaji H, Yamauchi M, Nomura R and Sugimoto T. Two-year longitudinal changes of cortical bone geometry in postmenopausal women with mild primary hyperparathyroidism without parathyroidectomy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2009, 117:633-636.
2. Kanazawa I, Yamauchi M, Yano S, Imanishi Y, Kitazawa R, Nariai Y, Araki A, Kobayashi K, Inaba M, Maruyama R, Yamaguchi T and Sugimoto T. Osteosarcoma in a pregnant patients with McCune-Albright syndrome. *Bone* 2009, 45(3):603-608.
3. Inoue Y, Canaff L, Geoffrey H, Hisa I, Sugimoto T, Chihara K and Kaji H. Role of smad3, acting independently of transforming growth factor- $\beta$  in the early induction of Wnt- $\beta$ -signaling by parathyroid hormone in mouse osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 2009, 108(1):285-294.
4. Takase H, Yano S, Yamaguchi T, Kanazawa I, Hayashi K, Yamauchi M,

Yamamoto M and Sugimoto T.  
Parathyroid hormone up-regulates  
BMP-2 mRNA expression mediated  
through mevalonate kinase inhibition in  
osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Horm  
Metab Res* 2009, 41:861-865.

5. Shimizu Y, Tada Y, Yamauchi M,  
Okamoto T, Suzuki H, Ito N, Fukumoto  
S, Sugimoto T and Fujita T.  
Hypophosphatemia induced by  
intravenous administration of  
saccharated ferric oxide—Another firm of  
FGF23-related hypophosphatemia.  
*Bone* 2009, 45(3):814-816.
6. Bergwitz C, Banerjee S, Abu-Zahra H,  
Kaji H, Miyauchi A, Sugimoto T and  
Jueppner H. Defective O-glycosylation  
due to a novel homozygous S129P  
mutation is associated with lack of  
fibroblast growth factor 23 secretion  
and tumoral calcinosis. *J Clin  
Endocrinol Metab* 2009,  
94(11):4267-4274.
7. 矢野彰三, 杉本利嗣. 私の処方: 維持  
血液透析中の二次性副甲状腺機能亢  
進症に対する内科的治療. *Modern  
Physician*. 2009, 29(4):534-535
8. 矢野彰三, 杉本利嗣. リン代謝の臨床:  
生体におけるリンの分布と生理的意義;  
存在様式、分布、生理機能. *Clinical  
Calcium*. 2009, 19(6):771-776
9. 比佐伊都子, 井上喜文, 河原啓, 片桐  
岳信, 杉本利嗣, 清野進, 梶博史. 血  
清中に BMP 作用阻害因子の存在が示  
唆された FOP 患者の一例. *日本内分  
泌学会雑誌*. 2009, 85 Suppl:98-100
10. 山内美香, 杉本利嗣. 電解質異常を  
手がかりとした内分泌疾患の診断と治  
療: 低カルシウム血症. *内分泌・糖尿病  
科* 2009, 29(5):413-419.

## 2. 学会発表

1. 山内美香, 山口徹, 名和田清子, 高  
岡伸, 杉本利嗣. 閉経後女性の骨脆  
弱性と血清 25(OH)D ならびに PTH と

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
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）

## 平成 21 年度分担研究報告書

### 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

活性型ビタミン D 製剤の内服によって治療中の偽性副甲状腺機能低下症 (PHP) の 15 例 (1a 型 5 例、1b 型 10 例) で PTH 反応性の違いを血清 PTH 濃度に対する尿カルシウム / クレアチニン比と血清アルカリフォスファターゼ活性の関係で検討した。刷子込み組織である腎尿細管での Ca 再吸収能力は PHP-1a と PHP-1b で違いがなかったが、非刷子込み組織である骨での PTH 反応性は一部の PHP-1b では障害されている。また、治療に要した活性型ビタミン D 製剤の量は PHP-1a に比べ PHP-1b で多く、ビタミン D 活性化機構その他のトータルとしての体内の Ca バランス維持機構は PHP-1b でより強く障害されているものと推測された。

#### A. 研究目的

偽性副甲状腺機能低下症 (PHP) の治療は、主として活性型ビタミン D 製剤の内服によって行われている。治療の目標は、血清カルシウム (Ca) 濃度の正常化であるが、活性型ビタミン D 製剤の投与量の調節指標として同時に高 Ca 尿症を避けることが腎石灰化や尿路結石を予防するために重要である。また、PHP では副甲状腺ホルモン (PTH) 不足性副甲状腺機能低下症とは異なり血清 PTH が十分抑制されていることも患者の Ca 需要が十分満たされていることを良く反映し、特に Ca 需要が多い小児の患者では大いに有用な指標である。

PHP の病因は PTH の細胞内シグナル伝達系に介在する  $G_s\alpha$  蛋白活性の低下によるホルモン / サイトカイン抵抗性であるが、 $G_s\alpha$  蛋白をコードする遺伝子である *GNAS* の発現調節は組織特異的な遺伝子刷子込みの制御下にある。PHP には臨床病型として 1a 型 (PHP-1a) と 1b 型 (PHP-1b) があるが、これらは分子生物学的病因が異なる。PHP-1a は *GNAS* コード領域のヘテロ変異が原因であり、 $G_s\alpha$  蛋白活性は刷子込み組織と非刷子込み組織の両方で低下している。

一方、PHP-1b は *GNAS* 発現調節領域の DN A メチル化異常が原因であり、刷子込み組織で  $G_s\alpha$  蛋白発現量が低下しているが、非刷子込み組織では  $G_s\alpha$  蛋白発現量は正常であると考えられている。

PHP-1a と PHP-1b では *GNAS* 刷子込み組織と非刷子込み組織での PTH 反応性の違いが臨床症状に影響しているものと考えられるが、これらの病型を考慮した治療指標の最適化が必要なのは明確でないため、分子生物学的に病型が確定している PHP-1a と PHP-1b の症例で治療中の臨床指標の変化に違いがあるかを検討した。

#### B. 研究方法

【対象】千葉大学医学部附属病院小児科外来通院中の PHP-1a と PHP-1b の症例 15 例を対象とした。病型は分子生物学的診断 (*GNAS* コード領域の変異をみとめたものを PHP-1a、*GNA S* プロモーター領域エクソン 1A に CpG メチル化異常を確認したものを PHP-1b とした) により確定した。



PHP-1aは5例(男4例、女1例)、PHP-1bは10例(男3例、女7例)であり、年齢はそれぞれ8歳~30歳、13歳から42歳であった。

【方法】病歴から現在の治療内容と治療中の下記パラメータを検討した。

(1) 刷子込み組織である腎尿細管でのPTH反応性を評価する目的で、血清インタクトPTHと尿中Ca濃度とクレアチニン濃度の比(U-Ca/Cr e)の関係

(2) 非刷子込み組織である骨でのPTH反応性を評価する目的で、血清インタクトPTHと血清アルカリフォスファターゼ活性(ALP)の関係

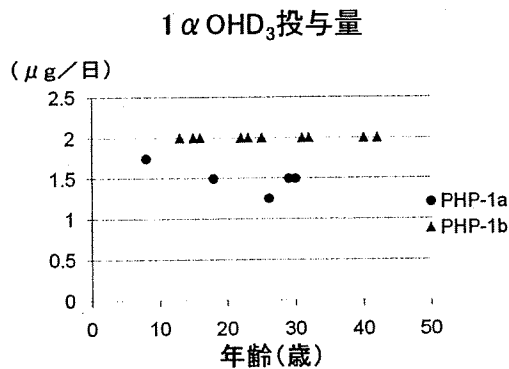
(倫理面への配慮)

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

#### 【活性型ビタミンD投与量の違い】

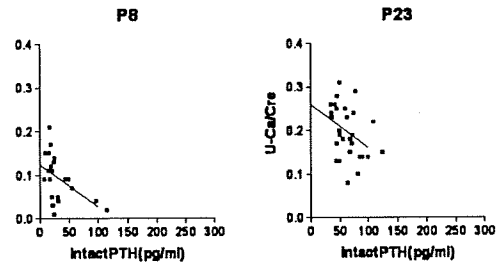
解析したすべての症例で活性型ビタミンD製剤は、 $1\alpha\text{OHD}_3$ を経口投与していた。投与量は、PHP-1aの5例では $1.2\mu\text{g}$ から $1.75\mu\text{g}$ 、PHP-1bでは10例すべてが $2.0\mu\text{g}$ であった。



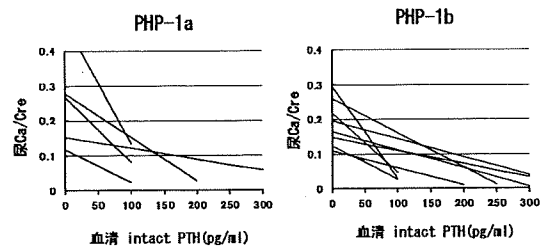
#### 【血清PTHとU-Ca/Cr eの関係】

PHPでは大部分の症例で高Ca尿症を回避しつつPTHを基準値上限以内に保つことが可能であったが、一部で困難な症例も存在した。このPTHを抑制したときの高Ca尿症の生じやすさには、PHP-1aとPHP-1bの違いは認めなかった。

### PHP-1b治療中のPTHと尿Ca/Cr eの関係

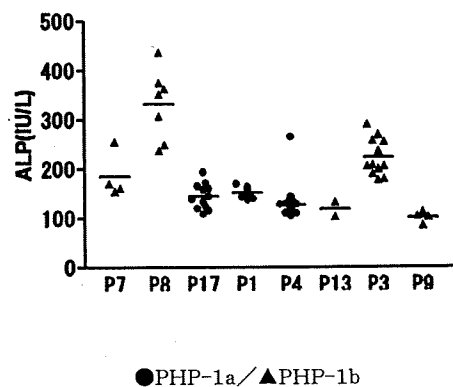


### 治療中PHPのPTHと尿Ca/Cr eの関係 (回帰直線)



### 【PTHを基準値内に維持したときのALP値(20歳以上)】

#### PTHを基準値内に維持したときの血清ALP値 (20歳以上)



PHP-1aではALPは変動幅が比較的安定した低値をとる。一方、PHP-1bではALPは変動幅が比較的大きく、高めの値をとる症例があった。PHP-1bではGNAS遺伝子プロモーターのエクソン1A以外のエクソンXL領域の epigenotype が異なる症例があるが、これによる違いはみられ

なかった。

Hajdu-Cheney syndrome: Infantile onset of hydrocephalus and serpentine fibulae. *Ped Int* (2009) 51(6): 831-833

#### D. 考察

骨は非刷り込み組織であり、Gs $\alpha$  蛋白のコード領域の変異が病因であるPHP-1aではGs $\alpha$  蛋白活性の低下がありこれによって中手骨中足骨の短縮や皮下の異所性石灰化が生じると考えられている。一方、PHP-1bでは骨でのPTH反応性は基本的に維持されていると考えられてきたが、PHP-1bに特徴的であるGNAS発現調節領域のDNAメチル化異常が骨の表現型がある症例にもみとめられることが最近報告されている(Mantovani et al. *J Clin Endocrinol Metab* 95:651,2010)。今回の検討結果でも血清ALPでみた骨でのPTH反応性はPHP-1bの症例のうちでも症例による違いがあり、PHP-1bでも骨での抵抗性は存在しうることを支持する。

一方、尿Ca排泄からみた刷り込み組織(腎尿細管)でのPTHの反応性はPHP-1aとPHP-1bで違いがなかった。しかし、治療に要した活性型ビタミンD製剤の量はPHP-1aに比べPHP-1bで多く、ビタミンD活性化機構その他のトータルとしての体内のCaバランス維持機構はPHP-1bでより強く障害されているものと推測される。

症例ごとの骨でのPTH抵抗性の違いを考慮すると、PHPの治療でPTHをどの程度に維持すべきかは骨密度や骨吸収マーカーなどの動きなども検討する必要がある。

#### E. 結論

刷り込み組織である腎尿細管でのCa再吸収能力はPHP-1aとPHP-1bで違いがなかった。非刷り込み組織である骨でのPTH反応性は一部のPHP-1bでは障害されている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 皆川真規. 低リン血症の治療. *Clinical Calcium* (2009) 19(6): 92-95
- 2) Takatani R, Someya T, Kazukawa I, Nishimura G, Minagawa M, Kohno Y.

##### 2. 学会発表

- 1) 高谷具純、皆川真規、松尾薫、木下香、高谷里依子、河野陽一 バソプレッシン受容体V2遺伝子に新規変異を認めた腎性尿崩症の一例 第43回日本小児内分泌学会学術集会 平成21年10月2日
- 2) 木下香、皆川真規、高谷具純、河野陽一、金谷裕美、木原真紀、長田久夫、生水真紀夫 自律性機能性卵胞嚢腫の1例 第43回日本小児内分泌学会学術集会 平成21年10月3日

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許の取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

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

ビタミンD不足を規定する血清 25(OH)D 濃度の閾値に関する研究

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不足は骨粗鬆症性骨折のリスクとなる。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 濃度の域値は不明である。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D<sub>3</sub>を経口負荷し、ビタミンD不足の閾値を検討した。その結果、血清 25(OH)D は PTH と負の相関を示し、25(OH)D 濃度 28 ng/ml 以上では 25D-PTH 近似曲線がほぼプラトー(PTH=35-40 pg/ml)に達した。負荷前後の PTH 変化量も負荷前の 25D と負に相関し、25D 前値が 28ng/ml 以上では PTH 上昇がみられなかった。一方、別のコホート(CHIBA study)においても 25D と PTH との関係はほぼ同様であり、血清 25D が 28ng/ml 未満の群では 28ng/ml 以上の群に比して有意に PTH および骨代謝マーカーが上昇していた。したがって、日本人成人のビタミンD不足の閾値として、血清 25(OH)D 濃度 28 ng/ml を提唱したい。

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、骨粗鬆症性骨折のリスクとなっていることが、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。

そこで本研究においては、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不足と充足の境界域値を28ng/mlと提唱した。本年度はさらにその妥当性について多角的な統計的検討を加えるとともに、他のコホートにおいてその妥当性を検証した。

#### 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(ビタミンD負荷試験)
- 2) 帝京大学ちば総合医療センターで冠動脈造影検査を受けた腎機能正常(eGFR>60ml/min)男性168名においてビタミンD代謝産物および諸種の骨・Ca関連指標の血中濃度を測定したCHIBA(Coronary Heart Disease of Ischemia And Bone Association) study。
- 3) 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

##### (1) ビタミンD<sub>3</sub>経口負荷試験

- 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) 上記の25D-PTH散布図においてビタミンD負荷前後の3次近似曲線はほぼ連続的であり、両者を合わせた曲線ではビタミンDが30ng/ml前後からPTHは35-40pg/mlのプラトーに達した。
- 3) 漸近線を有するモデルとして単純な $y=C_1+C_2\exp(-\lambda x)$ をあてはめると、25D→∞の時PTH=28に収束した。
- 4) ビタミンD負荷前後のPTHの変化( $\Delta$ PTH)は、負荷前の血清25(OH)D濃度と正の相関( $r = 0.21$ ,  $P < 0.05$ )を示した。回帰直線のX切片は、25(OH)D濃度28ng/mlであり、25(OH)D前値が28ng/ml未満の場合にビタミンD負荷後のPTH低下が生ずると考えられた。
- 5) 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。

##### (2) CHIBA study

- 1) 血清25D濃度は168名で40ng/ml未満であり、平均19.5ng/mlであった。これは前述の試験および他の国内の報告とほぼcomparableな値と考えられた。
- 2) 25D-PTH間には有意な負相関がみられ、3次近似曲線では前述のビタミンD負荷試験の場合とほぼ同様に、25Dが28ng/ml

前後からほぼ水平になり PTH=35-40pg/ml のプラトーに達した。

3) 25D=28ng/ml で2群に分けると、28未満の群では28以上の群に比して、PTH及び骨代謝マーカー( $\beta$  CTX, I-CTP, N-mid osteocalcin)が有意に高値であった。したがって、25Dが28未満では骨代謝の亢進が起こり骨粗鬆症のリスクが増大する可能性が示唆された。

#### D. 考察

以上の検討により、血清 25(OH)D 濃度が 28 ng/ml をビタミンD不足の域値とすることは妥当と判断した。またビタミンD充足状態における PTH は 35-40 pg/ml と考えられた。

しかしながら、ビタミンD不足は本邦においても高頻度であり大部分が 25D<28ng/ml となってしまうことから、本検討においてもこれ以上の高値域について十分な解析が不可能であった。したがってビタミンD不足の閾値は 28ng/ml 以上の高値である可能性があることに留意すべきであり、さらなる検討を要する。

#### E. 結論

日本人成人のビタミンD不足の閾値として、血清 25(OH)D 濃度 28 ng/ml を提唱する。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

CHIBA (Coronary Heart Disease 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 裕介、綾部 健吾、大橋 潤一、檜垣 忠直、中村 文隆、岡崎 亮

Osteoporosis Japan 17(2):238-240, 2009.

##### 2. 学会発表

1. 第 82 回日本内分泌学会学術総会 (4/23-25/2009、前橋):

Coronary Heart Disease of Ischemia and Bone Association (CHIBA) study: CAG 施行例における心機能と骨代謝との関連

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

2. 第 27 回日本骨代謝学会学術総会 (7/23-25/2009、大阪)

日本人のビタミンD不足を規定する血清 25 水酸化ビタミンD濃度の検討

岡崎亮、杉本利嗣、梶博史、藤井芳夫、白木正孝、井上大輔、遠藤逸朗、岡野登志夫、廣田孝子、松本俊夫

3. 第 11 回日本骨粗鬆症学会 (10/14-16/2009、名古屋) (English Session)

Association between Bone Metabolic Markers and Cardiac Function

-CHIBA (Coronary Heart Disease of Ischemia And Bone Association) Study-  
Daisuke Inoue, Toshihiro Amaki, Yusuke Nakatsu, Kengo Ayabe, Jun-ichi Ohashi,

Tadanao Higaki, Nobuyuki Tai, Fumitaka  
Nakamura, Ryo Okazaki

4. ASBMR 31th Annual Meeting (Denver,  
Colorado, USA 9/11-15/09)

ICTP Is the Best Predictor of Cardiac  
Damage And Dysfunction Among Bone  
Metabolic Markers And Hormones in Men:  
CHIBA (Coronary Heart Disease of  
Ischemia And Bone Association) Study

Daisuke Inoue, Mikihiro Amaki, Yusuke  
Nakatsu, Kengo Ayabe, Jun-ichi Ohashi,  
Tadanao Higaki, Nobuyuki Tai, Fumitaka  
Nakamura, Ryo Okazaki

H. 知的所有権の出願・取得状況  
特になし。

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 平成 21 年度分担研究報告書

### 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 D<sub>3</sub> 1 $\alpha$  水酸化酵素 [1 $\alpha$ (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、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、生体内カルシウム代謝制御におけるビタミン D および PTH 依存性 VDR 転写制御機構において、可逆的な DNA メチル化制御が重要な役割を担う可能性が示唆された。今回更に、MBD4 ノックアウトマウスを用いた解析で生体内においても MBD4 が 1 $\alpha$ (OH)ase 遺伝子の脱メチル化に必須の因子であることを明らかにした。これらの研究はホルモン依存的な DNA メチル化/脱メチル化の可逆的な転写制御機構が生体内においても重要な位置づけを占めていることを示唆するものであり、ビタミン D 代謝を考えるうえで新しい知見となり得ると考えられる。

#### 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 製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、ビタミン D<sub>3</sub> 1 $\alpha$  水酸化酵素 [1 $\alpha$ (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、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。これらの結果より、生体内カルシウム代謝制御におけるビタミン D および PTH 依存性 VDR 転写制御機構において、可逆的な DNA メチル化制御が重要な役割を担う可能性が示唆された。よって本研究では MBD4 ノックアウトマウスの解析により、DNA

メチル化制御因子の機能欠損がカルシウム代謝および骨代謝におよぼす影響を検討し、生体内カルシウム代謝に関わるビタミン D 依存的転写制御の分子機構の解明をめざす。

#### B. 研究方法

我々が、*in vitro* で同定した脱メチル化制御因子である MBD4 の重要性を個体レベルで評価するため、MBD4 ノックアウトマウスの解析をおこなう。

- 1) MBD4 ノックアウトマウスにおけるカルシウム代謝に関わる血中生化学データについて検討する。
- 2) MBD4 ノックアウトマウス及び野生型マウスにビタミン D 及び PTH を投与し、腎臓より RNA およびゲノム DNA を調製し、それぞれ 1 $\alpha$ (OH)ase 遺伝子発現および 1 $\alpha$ (OH)ase 遺伝子プロモーター領域のメチル化について検討する。

#### C. 研究結果および考察

まず、6 週齢の MBD4 ノックアウト (KO) マウスの

血清カルシウム、リン、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度を測定し、野生型マウスとの比較をおこなったが、有意な差は認められなかった。

次に、野生型(WT)マウスにカルシトリオール(VD3)の投与実験をおこなったところ

$10\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の量で3日間経口投与した場合に腎臓における $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子の発現が最も低下することが明らかになった。更に、この条件でVD3を3日間投与後、翌日PTHを $320\mu\text{g}/\text{kg}$ 単回投与すると、 $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子の発現量は無投薬群と同程度まで回復することが明らかになった。そこでこの系を用いて、WTとKOマウスの比較を行った。VD3を投与した群における $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子の発現は、WT、KOのいずれにおいても効果的に抑制された。次にVD3を投与後、PTHで刺激した群における $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子の発現量は前述の通り、WTでは無投薬群と同程度まで回復したが、KOでは回復せずに抑制されたままであった。また血中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度および腎臓での $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ mRNAを検出する*in situ* hybridization法でも、同様の結果となった。

次に、無投与、VD3投与、VD3投与後PTH刺激の3つの群のWT、KOマウスの腎臓からゲノムDNAを調製し、 $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子のプロモーターのメチル化状態をBisulfite sequencing法を用いて検討した。WT、KOともに、VD3投与により無投与群と比較し劇的に $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子のプロモーター上のメチル化CpGが増加した。また、WTでは、PTH刺激群においてメチル化CpGが減少したが、KOではPTH刺激群においてもメチル化CpGが増加したままであった。よって*in vivo*においても、VD3による $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子プロモーターのメチル化、PTHによる脱メチル化制御がみられ、この脱メチル化はMBD4を介していることが明らかになった。

以上のことから、 $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子におけるMBD4を介したDNA脱メチル化制御は生体内でも認められ、このDNA脱メチル化がビタミンD生合成において重要であることが明らかとなった。

#### D. 結論

本年度の研究により、*in vitro*で脱メチル化因

子として同定したMBD4が生体内においてもビタミンD代謝において必須であることを確定した。これらの結果は、*in vivo*におけるホルモン依存性のメチル化、脱メチル化の可逆的制御を世界に先駆けて証明するものであり、今後、ビタミンD関連疾患を理解する上で新しい知見を提唱するものである。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sawatsubashi, S., Murata, T., Lim, J., Fujiki, R., Ito, S., Suzuki, E., Tanabe, M., Zhao, Y., Kimura, S., Fujiyama, S., Ueda, T., Umetsu, D., Ito, T., Takeyama, K. and Kato, S. Histone chaperone DEK coactivates a nuclear receptor: a functional link to leukemia. **Genes Dev.** 2010, 24, 159-170.

2. Ochiai, E., Kitagawa, H., Takada, I., Fujiyama, S., Sawatsubashi, S., Kim, M.-S., Mezaki, Y., Tshushima, Y., Takagi, K., Azuma, Y., Takeyama, K., Yamaoka, K., Kato, S. and Kamimura, T. CDP/Cut is an osteoblastic co-activator of the vitamin D receptor (VDR). **J. Bone Miner. Res.** 2010, in press.

3. Oya, H., Yokoyama, A., Yamaoka, I., Fujiki, R., Yonezawa, M., Youn, M.-Y., Takada, I., Kato, S. and Kitagawa, H. Phosphorylation of WSTF by MAPK induces a switching between two distinct chromatin remodeling complexes. **J. Biol. Chem.** 2010, 284, 32472-32482.

4. Kim, M., Kondo, T., Takada, I., Youn,



- M., Yamamoto, Y., Takahashi, S., Matsumoto, T., Fujiyama, S., Shirode, Y., Yamaoka, I., Kitagawa H., Takeyama, K., Shibuya, H., Ohtake, F. and Kato, S. DNA demethylation in hormone-induced transcriptional derepression. **Nature** 2009, 461, 1007-1012.
5. Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, R. G., Kitagawa, H. and Kato, S. GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. **Nature** 2009, 459, 455-459.
  6. Yamagata, K., Fujiyama, S., Ito, S., Ueda, T., Murata, T., Naitou, M., Takeyama, K., Minami, Y., O'Malley, B. W. and Kato, S. Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor. **Mol. Cell** 2009, 36, 340-347.
  7. 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. P., 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.** 2009, 29, 1017-1034.
  8. Kouzu-Fujita, M., Mezaki, Y., Mtsumoto, T., Yamaoka, I., Sawatsubashi, S., Yano, T., Taketani, Y., Kitagawa, H. and Kato, S. Coactivation of estrogen estrogen receptor  $\beta$  by gonadotropin-induced cofactor GIOT-4. **Mol. Cell. Biol.** 2009, 29, 83-92.
  9. Imai, Y., Kondoh, S., Kouzmenko, A. and Kato, S. Regulation of bone metabolism by nuclear receptors. **Mol. Cell. Endocrinol.** 2009, 310, 3-10.
  10. Yoshimura, K., Kitagawa, H., Fujiki, R., Tanabe, M., Takezawa, S., Takada, I., Yamaoka, I., Yonezawa, M., Kondo, T., Furutani, Y., Yagi, H., Yoshinaga, S., Masuda, T., Fukuda, T., Yamamoto, Y., Ebihara, K., Li, D. Y., Matsuoka, R., Takeuchi, J. K., Matsumoto, T. and Kato, S. Distinct function of 2 chromatin remodeling complexes that share a common subunit, Williams syndrome transcription factor (WSTF). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 2009, 106, 9280-9285.
  11. 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. P., 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** 2009, 106, 3818-3822.
12. 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, 27, 127-130.
13. Fujiyama-Nakamura, S., Ito, S., Sawatsubashi, S., Yamauchi, Y., Suzuki, E., Tanabe, M., Kimura, S., Murata, T., Isobe, T., Takeyama, K. and Kato, S. BTB protein, dKLHL18/CG3571, serves as an adaptor subunit for a dCul3 ubiquitin ligase complex. **Genes to Cells** 2009, 14, 965-973.
14. Ohtake, F., Fujii-Kuriyama, Y. and Kato, S. AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. **Biochem. Pharmacol.** 2009, 77, 474-484.
15. Takada, I., Kouzmenko, A. P. and Kato, S. Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. **Nat. Rev. Rheumatol.** 2009, 5, 442-447.
16. Takada, I., Kouzmenko, A. P. and Kato, S. Molecular switching of osteoblastogenesis versus

adipogenesis: implications for targeted therapies. **Expert Opin. Ther. Targets.** 2009, 13, 593-603.

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
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）

## 平成 21 年度分担研究報告書

### リンの代謝調節における骨細胞の機能に関する研究

研究協力者 道上敏美（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

近年、リンの代謝調節における骨細胞の機能が注目されているが、適切なモデル細胞株の欠如もあり、その詳細は明らかになっていない。本研究においては、マウス長管骨より初代骨細胞及び骨芽細胞を単離し、これらを用いてリン代謝における骨細胞、骨芽細胞の機能を詳細に検討することを目的とした。今年度は、まず、野生型マウス由来の長管骨より、collagenase 処理による基質の消化と EGTA 処理による脱灰を反復することにより、骨芽細胞／骨細胞をその分化度に応じて段階的に単離する方法を確立した。単離した骨芽細胞および骨細胞について、遺伝性低リン血症性くる病／骨軟化症の責任遺伝子である *Fgf23*、*Phex*、*Dmp1* の発現を検討したところ、*Fgf23*、*Phex* は骨芽細胞、骨細胞ともに発現を認め、*Fgf23* の発現は骨細胞においてより強かった。*Dmp1* も骨細胞で高い発現を示した。また、骨細胞、骨芽細胞はともに III 型  $\text{Na}^+/\text{Pi}$  共輸送担体である *Pit-1*、*Pit-2* を発現しており、これらの細胞が細胞外無機リン酸に対して応答性を示すことが推察された。

#### A. 研究目的

骨細胞は骨芽細胞が終末分化に至り、骨基質に埋め込まれた細胞である。近年、常染色体優性遺伝性低リン血症性くる病(ADHR)や腫瘍随伴性低リン血症性骨軟化症(TIO)の責任分子である FGF23 に加えて、X 染色体優性遺伝性低リン血症性くる病(XLH)の責任分子である PHEX や、常染色体劣性遺伝性低リン血症性くる病(ARHR)の責任分子である dentin matrix protein 1 (DMP1) が骨細胞に発現していることが示され、血清リン酸濃度の調節において骨細胞が重要な役割を果たしていることが示唆される。しかしながら、体内のリンの過不足が骨細胞における FGF23 産生を制御する機序は現在のところ不明である。また、XLH や ARHR においては血中 FGF23 値が上昇しており、ADHR や TIO とともに FGF23 関連性低リン血症と位置づけられるが、PHEX や DMP1 の機能の喪失が FGF23 の産生増加をもたらす機序についても明らかになって

いない。リン代謝における骨細胞機能の研究が進みにくい理由の一つとして、適切なモデル細胞株の欠如が挙げられる。そこで、本研究においては、マウス長管骨より単離した骨細胞及び骨芽細胞を用いて、リン代謝調節における骨細胞、骨芽細胞の機能について詳細に検討することを目的とした。

#### B. 研究方法

1) マウス長管骨からの初代骨芽細胞／骨細胞の単離

10 週齢の C57BL/6J マウスより無菌的に長管骨を摘出、微細化し、collagenase 処理による基質の消化と EGTA 処理による脱灰を反復し、各ステップで遊離する細胞を回収することにより、骨芽細胞及び骨細胞を分化度に応じて段階的に単離し、fraction (Fr.) 1~9 とした。

2) 遺伝子発現解析

上記の方法で単離した初代骨芽細胞、骨細

胞より RNA を抽出し、TaqMan®システムによる real-time PCR を用いて遺伝子発現を検討した。

(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)の動物実験委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

上述の方法にてマウス長管骨より単離した骨芽細胞/骨細胞系列細胞の各分画について、まず、骨芽細胞、骨細胞のマーカー遺伝子の発現を検討した。骨芽細胞のマーカーである *alkaline phosphatase* や *osteocalcin* は Fr. 3-5 に発現しており、一方、骨細胞のマーカーである *Sost* については EGTA による脱灰を開始した Fr. 6 以降で高い発現が検出された。従って、Fr. 1, 2 では軟部組織に由来する線維芽細胞が回収され、Fr. 3-5 で骨芽細胞、Fr. 6-9 で骨細胞に富む細胞集団が単離されることが示唆された。

そこで、骨芽細胞 (Fr. 3-5) および骨細胞 (Fr. 6-9) に富むそれぞれの分画について、遺伝性低リン血症性くる病/骨軟化症の責任遺伝子である *Fgf23*、*Phex*、*Dmp1* の発現を検討したところ、*Fgf23*、*Phex* は骨芽細胞、骨細胞ともに発現を認め、*Fgf23* の発現は骨細胞においてより強かった。*Dmp1* も骨細胞で高い発現を示した。また、これらの細胞における  $\text{Na}^+/\text{Pi}$  共輸送担体の発現を検討したところ、骨芽細胞、骨細胞ともに III 型  $\text{Na}^+/\text{Pi}$  共輸送担体である *Pit-1*、*Pit-2* を発現していた。ビタミン D 受容体 (*Vdr*) の発現も、骨芽細胞、骨細胞ともに検出された。

### D. 考察

骨細胞が遺伝性低リン血症性くる病/骨軟化症の責任分子群 (*Fgf23*、*Phex*、*Dmp1*) や *Vdr*、III 型  $\text{Na}^+/\text{Pi}$  共輸送担体である *Pit-1*、*Pit-2* を発現していたことから、骨細胞がリンの代謝調節機構において重要な役割を担っていることが改めて示唆された。*PHEX* の機能喪失変異に基づく X 染色体優性遺伝性低リン血症性くる病 (XLH) や *DMP1* の機能喪失変異に基づく常染色体劣性遺伝性低リン血症性くる病 (ARHR) においては、血中 FGF23 値が上昇していることが報告されて

おり、*PHEX* や *DMP1* が FGF23 の産生制御に関与することが推察されるが、マウス由来骨芽細胞/骨細胞を用いた今回の私達の検討において、これらの細胞の分化過程における *Phex* と *Dmp1*、*Fgf23* の発現変化は一致しておらず、興味深い。今後、これらの分子間の機能的連関について、さらに検討する必要がある。また、私達は以前、細胞外無機リン酸濃度の変化が、 $\text{Na}^+/\text{Pi}$  共輸送担体を介して細胞内にシグナルを惹起することを見いだしており、骨細胞が *Pit-1*、*Pit-2* を発現していたことから、骨細胞は細胞外無機リン酸に対して応答性を示す可能性があると考えられ、今後検討を進める予定である。

### E. 結論

マウス長管骨からの初代骨細胞の単離方法を確立した。骨細胞はリン代謝に重要な分子群を発現しており、リン恒常性維持機構において中心的な役割を担っていることが示された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. 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, 106(6): 1090-1101

#### 2. 学会発表

1. Ohata Y, Yamazaki M, Okada T, Ozono K, Michigami T. Soluble form of Klotho functions as a humoral modulator in FGF23-and canonical Wnt-induced signaling. 31th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2009.9.11-15: Denver, U.S.A.
2. Miyagawa K, Ozono K, Tachikawa K, Mikuni-Takagaki Y, Michigami T. Signaling of osteocytes as a regulator of phosphate metabolism. 31th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2009.9.11-15: Denver, U.S.A.