

1,25(OH)<sub>2</sub>D 濃度はいずれも野生型と比較し有意な差は認められなかった。しかしながら MBD4 ノックアウトマウスの骨の表現型について軟 X 線撮影および骨密度測定により検討した結果、MBD4 ノックアウトマウスは野生型と比較し皮質骨の骨量および骨密度が有意に減少していることが明らかになった。

次に MBD4 ノックアウトマウスの骨密度減少の原因を明らかにする目的で、マイクロアレイ解析により MBD4 による脱メチル化を介し制御される標的遺伝子の同定を試みた。その結果、野生型と比較し MBD4 ノックアウトマウスの骨において有意に発現が上昇する標的遺伝子候補が数種類同定された。このうち MEPE (Matrix extracellular phosphoglycoprotein) について、リアルタイム PCR により追試を行った結果、マイクロアレイの結果と同様、MBD4 ノックアウトマウスの骨において有意に発現が上昇することが明らかになった。

#### D. 考察

これまでの研究結果から、ビタミン D 投与により野生型、MBD4 ノックアウトマウスともに 1 $\alpha$ (OH)ase 遺伝子発現は効果的に抑制され、PTH 刺激により野生型では発現抑制の解除が認められるものの、MBD4 ノックアウトマウスでは抑制が解除されず、1 $\alpha$ (OH)ase 遺伝子発現における PTH 応答性の低下が認められている。今回の研究結果では、通常状態の MBD4 ノックアウトマウスでは血中カルシウム、リン、PTH、1,25(OH)<sub>2</sub>D 濃度はいずれも野生型と比較し有意な差は認められないものの、MBD4 ノックアウトマウスは野生型と比較し皮質骨の骨量および骨密度が有意に減少していることが明らかになった。よって MBD4 はビタミン D 代謝異常に対しては 1 $\alpha$ (OH)ase 遺伝子発現制御を介して、正常化するよう働くが、ビタミン D 代謝が正常な場合においても MBD4 は作用をもち、骨代謝を正に制御する因子であることが示唆された。

またマイクロアレイ解析の結果、野生型と比較し MBD4 ノックアウトマウスの骨において有意に発現が上昇する標的遺伝子候補の一つとして MEPE が同定された。MEPE は Phex (phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome)の基質として同定された糖タンパクで骨細胞に発現しており、C 末にある ASARM モチーフがヒドロキシアパタイトと結合し石灰化障害をきたすことが報告されている。よって MBD4 ノックアウトマウス

で観察された骨量減少は、MBD4 による MEPE 遺伝子の発現抑制の解除により生じた可能性が示唆された。

#### E. 結論

本年度の研究により、DNA メチル化制御因子の機能欠損は骨代謝に影響をおよぼすことが明らかになった。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、骨代謝を考える上で新しい知見となり得ると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takahashi, S., Watanabe, T., Okada, M., Inoue, K., Ueda, T., Takada, I., Watabe, T., Yamamoto, Y., Fukuda, T., Nakamura, T., Akimoto, C., Fujimura, T., Hoshino, M., Imai, Y., Metzger, D., Miyazono, K., Minami, Y., Chambon, C., Kitamura, T., Matsumoto, T., and Kato, S.: Noncanonical Wnt signaling mediates androgen-dependent tumor growth in a mouse model of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011 (in press).
- 2) Baba, A., Ohtake, F., Okuno, Y., Yokota, K., Okada, M., Imai, Y., Ni, M., Meyer, A. C., Igarashi, K., Kanno, J., Brown, M. and Kato, S.: Signal-sensing activation of a histone lysine demethylase complex. *Nat. Cell Biol.* 2011 (in press).
- 3) Akimoto, C., Ueda, T., Inoue, K., Yamaoka, I., Sakari, M., Obara, W., Fujioka, T., Nagahara, A., Nonomura, N., Tsutsumi, S., Aburatani, H., Miki, T., Matsumoto, T., Kitagawa, H. and Kato, S.: Testis-specific protein on Y chromosome (TSPY) represses the activity of the androgen receptor in androgen-dependent testicular germ-cell tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 19891-19896, 2010.
- 4) Youn, M. Y., Takada, I., Imai, Y., Yasuda, H. and Kato, S.: Transcriptionally active nuclei are selective in mature multinucleated osteoclasts. *Genes to Cells* 15, 1025-1035,

- 2010.
- 5) Yokoyama, A., Okuno, Y., Chikanishi, T., Hashiba, W., Sekine, H., Fujiki, R. and Kato, S.: KIAA1718 is a histone demethylase that erases repressive histone methyl marks. *Genes to Cells* 15, 867–873, 2010.
  - 6) Matsuyama, R., Takada, I., Yokoyama, A., Fujiyama-Nakamura, S., Tsuji, N., Kitagawa, H., Fujiki, R., Kim, M., Kouzu-Fujita, M., Yano, T. and Kato, S.: Double PHD fingers protein DPF2 recognizes acetylated histones and suppresses the function of estrogen-related receptor alpha through histone deacetylase 1. *J. Biol. Chem.* 285, 18166–18176, 2010.
  - 7) Imai, Y., Kondoh, S., Kouzmenko, A. and Kato, S.: Minireview: osteoprotective action of estrogens is mediated by osteoclastic estrogen receptor-alpha. *Mol. Endocrinol.* 24, 877–885, 2010.
  - 8) Chikanishi, T., Fujiki, R., Hashiba, W., Sekine, H., Yokoyama, A. and Kato, S.: Glucose-induced expression of MIP-1 genes requires O-GlcNAc transferase in monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 865–870, 2010.
  - 9) Takada, I., Tsuji, N., Youn, M. Y., Fujiyama, S., Okada, M., Imai, Y., Kondo, S., Kitakawa, H., Yasuda, H. and Kato, S.: Purification and identification of estrogen receptor alpha co-regulators in osteoclasts. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1192, 201–207, 2010.
  - 10) Takada, I., Kouzmenko, A. P., Kato, S.: PPAR-gamma signaling crosstalk in mesenchymal stem cells. *PPAR Research* 2010, Article 341671, 6 pages.
  - 11) Youn, M. Y., Fujiyama-Nakamura, S., Takada, I., Imai, Y. and Kato, S.: Identification of osteoclastic factors in the nuclear envelope of mature, multinucleated osteoclasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 1956–1959, 2010.
  - 12) 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.: A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor. *Genes Dev.* 24, 159–170, 2010.
  - 13) Ochiai, E., Kitagawa, H., Takada, I., Fujiyama, S., Sawatsubashi, S., Kim, M. S., Mezaki, Y., Tsushima, Y., Takagi, K., Azuma, Y., Takeyama, K., Yamaoka, K., Kato, S. and Kamimura, T.: CDP/cut is an osteoblastic coactivator of the vitamin D receptor (VDR). *J. Bone Miner. Res.* 25, 1157–1166, 2010.
  - 14) 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.* 284, 32472–32482, 2010.
  - 15) Chambon, C., Duteil, D., Vignaud, A., Ferry, A., Messaddeq, N., Malivindi, R., Kato, S., Chambon, P. and Metzger, D.: Myocytic androgen receptor controls the strength but not the mass of limb muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 14327–14332, 2010.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

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 22 年度分担研究報告書

### 骨細胞における遺伝性低リン血症責任分子群の機能的連関

協力研究者 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、リン酸利尿因子である FGF23 をはじめとして、PHEX や DMP1 など、複数の遺伝性低リン血症責任分子が骨細胞に発現していることが示され、リン代謝における骨細胞の重要性が示唆されている。PHEX 機能喪失変異に基づく X 染色体優性低リン血症性くる病(XLH)においては血中 FGF23 値が高値を示すが、その機序は明らかではない。今回、XLH のマウスホモログである *Hyp* より単離した初代骨細胞／骨芽細胞を用いて、リン代謝関連分子群の発現を検討した。*Hyp* マウス又は野性型(WT)マウスから長管骨を摘出し、collagenase による基質の消化及び EGTA 処理による脱灰を反復することにより、骨芽細胞および骨細胞を分化度に応じて段階的に単離し、遺伝子発現を real time PCR により解析した。骨細胞マーカーである *Sost* の発現については、*Hyp*、WT 共に骨細胞に相当する分画で強い発現を認めた。*Hyp* マウス由来細胞における *Fgf23* の発現は WT 細胞と比較して著明に増加していた。興味深いことに、常染色体劣性遺伝性低リン血症の責任遺伝子で、骨細胞のマーカーとされる *Dmp1* についても *Hyp* 由来細胞で発現の増加が認められ、骨細胞のみならず骨芽細胞においても発現の増強を認めた。これらの結果から、*Phex* の機能喪失は *Fgf23* のみならず *Dmp1* の発現増加をもたらすことが推察され、骨芽細胞／骨細胞におけるこれらの分子群の密接な機能的連関が示唆された。

#### 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。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は明らかになっていない。本研究においては、XLH のモデルである *Hyp* マウスより単離した骨芽細胞、骨細胞を用いてリン代謝関連遺伝子の発現を詳細に解析することにより、PHEX、DMP1、FGF23 の機能的連関につ

いて検討することを目的とした。

#### B. 研究方法

- 1) マウス骨からの初代骨芽細胞／骨細胞の単離  
XLH のモデルで、*Phex* 遺伝子の 3'側に欠失を有する *Hyp* マウスを実験に用いた。*Hyp* マウスにおいては、雄性ヘミ個体と雌性ヘテロ個体が表現型として低リン血症や骨石灰化障害を呈する。今回は 20 週齢の雌性 *Hyp* ヘテロ個体を細胞単離に用いた。細胞の単離に用いた *Hyp* マウスについては、血清リン値及び FGF23 値の測定を行い、低リン血症、高 FGF23 血症の存在を確認した。FGF23 の測定には、カイノス社の ELISA キットを使用した。*Hyp* あるいは野性型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た。単離され

た細胞の性状は骨芽細胞、骨細胞マーカー遺伝子の発現により確認した。

## 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。また、E18.5 のマウス胎仔骨における遺伝子発現についても検討を行った。

### (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のもとに行った。

## C. 研究結果

野性型マウス長管骨より単離した細胞について骨芽細胞マーカー、骨細胞マーカー遺伝子の発現を検討した結果から、前述の方法により段階的に回収した細胞集団のうち(Fraction 1-9)、Fraction 3-5 が骨芽細胞に相当し、EGTA による脱灰を開始した後に回収された Fraction 6-9 が骨細胞に相当することが示唆された。

野性型マウス骨と *Hyp* マウス骨由来細胞の遺伝子発現を比較検討したところ、骨細胞マーカーとされている *Sost* の発現については、いずれのマウスにおいても、Fraction 6 以降で高く発現しており、各 Fraction における発現レベルは野性型細胞と *Hyp* 細胞の間でほぼ同等であった。一方、*Fgf23* については、*Hyp* 由来の細胞において発現の増強が認められた。さらに興味深いことに、*Dmp1* の発現については、野性型細胞では骨細胞に相当する Fraction 6 以降で高い発現を認めたが、*Hyp* 由来細胞では野性型細胞に比し著明な発現の増強が認められ、骨細胞のみならず、骨芽細胞に相当する Fraction 3-5 においても高い発現を認めた。III 型ナトリウム/リン酸共輸送担体である *Pit-1* の発現についても検討したところ、*Hyp* 細胞においては野性型細胞に比較して約2倍に発現が増加していた。

*Hyp* マウス由来の骨芽細胞/骨細胞で認められた *Fgf23* や *Dmp1* の発現増加が出現する時期を明らかにするため、胎齢 E18.5 の胎仔骨より RNA を抽出し、遺伝子発現を検討した。Genotyping により *Hyp* であることが確認された胎仔の骨においては、野性型胎仔の骨と比較して、*Fgf23*、*Dmp1* の発現が共に増加

していた。

## D. 考察

今回の検討から、*Hyp* マウスにおける *Phex* の機能の喪失は、*Fgf23* に加えて *Dmp1* の発現増強をもたらすことが明らかとなった。*Sost* の発現については genotype 間で明確な差が認められなかったことから、*Hyp* 細胞における *Fgf23*、*Dmp1* の発現増加は、単なる骨芽細胞分化の異常ではなく、分子特異的な機序によるものであることが推察される。XLH の患者においては、治療によるリン製剤や活性型ビタミン D の投与が血中 FGF23 値の上昇に寄与すると考えられているが、*Hyp* マウスにおいては胎仔期よりすでに *Fgf23*、*Dmp1* の発現増加が生じていたことから、*Phex* そのものが、骨局所においてこれらの遺伝子の発現制御に関わることが示唆された。胎生期の *Fgf23*、*Dmp1* の発現増強の病態への関与の有無については、今後検討する必要がある。XLH 妊婦の管理において重要な情報を提供することが期待される。

## E. 結論

*Phex* の機能喪失は *Fgf23* のみならず *Dmp1* の発現増加をもたらすことが示され、骨芽細胞/骨細胞におけるこれらの分子群の密接な機能的連関が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamazaki M, Ozono K, Okada T, Tachikawa K, Kondou H, Ohata Y, Michigami T. 2010. Both FGF23 and extracellular phosphate activate Raf/MEK/ERK pathway via FGF receptors in HEK293 cells. *J Cell Biochem*, 111(5):1210-1221.
- 2) Kimata M, Michigami T, Tachikawa K, Okada T, Koshimizu T, Yamazaki M, Kogo M, Ozono K. 2010. Signaling of extracellular inorganic phosphate up-regulates cyclin D1 expression in proliferating chondrocytes via the Na<sup>+</sup>/Pi cotransporter Pit-1 and Raf/MEK/ERK pathway. *Bone*, 47(5):938-47.
- 3) Sugita A, Kawai S, Hayashibara T, Amano A, Ooshima T, Michigami T, Yoshikawa H, Yoneda T. 2011. Cellular ATP synthesis mediated by

type III sodium-dependent phosphate transporter Pit-1 is critical to chondrogenesis. *J Biol Chem*, 286(4):3094-3103.

- 4) Ohata Y, Arabori H, Namba N, Kitaoka T, Hirai H, Wada K, Nakayama M, Michigami T, Imura A, Nabeshima Y-I, Yamazaki Y, Ozono K. Circulating levels of soluble  $\alpha$ -Klotho are markedly elevated in human umbilical cord blood. *J Clin Endocrinol Metab* 2011, in press.

## 2. 学会発表

- 1) Ohata Y, Yamazaki M, Okada T, Nakayama M, Ozono K, Michigami T. Placenta expresses klotho and FGFR1 in syncytiotrophoblast and might be a target organ of FGF23. *J Bone Miner Res* 2010, 25(Supple1) pp.S93. 32th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2010.10.15-19 : Toronto, Canada
- 2) Miyagawa K, Ozono K, Tachikawa K, Mikuni-Takagaki Y, Kogo M, Michigami T. Differential gene expression in osteoblast / osteocyte lineage cells between *Hyp* mouse and wild-type mouse. *J Bone Miner Res* 2010, 25(Supple1) pp.S157. 32th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2010.10.15-19: Toronto, Canada
- 3) 宮川和晃, 大藪恵一, 立川加奈子, 高垣裕子, 古郷幹彦, 道上敏美. *Hyp* マウスにおける初代骨細胞・骨芽細胞においては, リン代謝関連分子の発現が特異的に変化している. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会. 2010.7.21-23: 東京
- 4) 大幡泰久, 山崎美和, 岡田知子, 大藪恵一, 道上敏美. 胎盤合体栄養膜層は Klotho と FGFR1 を発現しており, FGF23 の標的となりうる. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会. 2010.7.21-23: 東京

## 3. その他 なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許の取得  
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）

## 平成 22 年度分担研究報告書

### 環境化学物質が骨代謝障害を惹起する可能性の検討 (II)

研究分担者 竹内靖博（虎の門病院 内分泌センター部長）

**研究要旨** 活性型ビタミン D<sub>3</sub> の分解・代謝は、腎では CYP24A1 が、肝・腸管では CYP3A4 等の薬物代謝酵素が主に関与している。ステロイド・ゼノバイオティク受容体 SXR は、オーファン核内受容体に属するリガンド依存性の転写因子で、肝臓や腸管に発現し CYP3A4 の遺伝子発現を調節している。抗結核薬のリファンピシンや抗てんかん薬のフェノバルビタールの連用は、それら薬剤が肝臓や腸管で SXR の結合を介し CYP3A4 の酵素誘導をきたす。その結果、活性型ビタミン D<sub>3</sub> 代謝が亢進し、骨軟化症を誘発する事が知られている。昨年度の研究により、我々は薬剤添加物として用いられているアセチルトリブチルクエン酸(ATBC)に SXR のリガンド活性があることを見出した。また、ヒト肝臓と腸管由来の培養細胞を用いた検討から、腸管由来の培養細胞でのみ、ATBC が SXR を介し CYP3A4 遺伝子発現を誘導し、酵素活性を増加させることを報告した。また、ラットに ATBC を腹腔内投与する実験からも、ATBC による酵素誘導が十二指腸に特異的に生じることを見出した。今年度は、活性型ビタミン D<sub>3</sub> 自身がビタミンD受容体を介して CYP3A4 発現を促進すること、その作用は ATBC-SXR 作用と相加的であることが、siRNAを用いた実験から明らかとなった。以上から、薬剤添加物に使用される ATBC はビタミンD作用と協同して、腸管特異的に CYP3A4 の酵素誘導をきたすと考えられる。腸上皮における活性型ビタミン D<sub>3</sub> 代謝の亢進は、腸粘膜からのカルシウム吸収の低下など、骨代謝に悪影響を及ぼす可能性が示唆される。

#### A. 研究目的

活性型ビタミン D<sub>3</sub> の分解・代謝は、腎で CYP24A1 が、肝・腸管では CYP3A4 等の薬物代謝酵素が主に関与している。ステロイド・ゼノバイオティク受容 SXR は、オーファン核内受容体に属するリガンド依存性の転写因子で、肝臓や腸管に発現し CYP3A4 や MDR1 等の薬物代謝酵素や薬物輸送体の遺伝子発現を調節している。

肝臓や腸管で SXR への結合を介して CYP3A4 の酵素誘導をきたす薬剤、即ち抗結核薬のリファンピシン (RFP) や抗てんかん薬のフェノバルビタール、フェニトイン等を連用すると、活性型ビタミン D<sub>3</sub> 代謝が亢進し、骨軟化症を誘発する事が古くから知られている。

SXR のリガンド活性物質の長期暴露は活性型ビタミン D<sub>3</sub> 作用の低下をきたし骨代謝に影響する可能性がある。環境化学物質の中には SXR のリガンドとして作用するものがあるが、そのビタミン D 代謝や骨代謝へ

の影響は不明である。我々は、薬剤添加物アセチルトリブチルクエン酸(ATBC)がリガンドとして SXR を活性化し、腸管細胞特異的に CYP3A4 の発現を誘導することを明らかにしてきた。今回は、活性型ビタミン D<sub>3</sub> である 1,25 水酸化ビタミン D<sub>3</sub> の CYP3A4 発現に対する影響と、その ATBC との相互作用について検討した。

#### B. 研究方法

1. リアルタイムPCR ヒト腸管由来細胞株:LS174T細胞、ヒト肝臓由来細胞株:HepaRG、FLC5、FLC7 を培養し種々の濃度の RFP または ATBC 存在下に 24 hr 培養後、Cell-to-Ct キット (Applied Biosystems) を用いて cDNA を調製した。CYP3A4 と GAPDH 発現を SYBR Green によるリアルタイム PCR にて測定し Δ Ct 法で GAPDH mRNA を用いて CYP3A4 mRNA 量を補正した。リガンドを加えない状態での CYP3A4 mRNA 量を 1 倍として表した。

2. siRNAによるビタミンD受容体 (VDR) およびSXR抑制 LS174T細胞にVDRあるいはSXRの遺伝子に対応するsiRNAを導入し、それぞれの発現を抑制した。それらの細胞に、ATBCあるいは1,25水酸化ビタミンD<sub>3</sub>を添加し、CYP3A4のmRNA発現について検討した。

## C. 研究結果

ヒト腸管由来のLS174T細胞を培養し1,25水酸化ビタミンD<sub>3</sub>やATBCを培養液に添加して24 hr後、リアルタイムPCRにてCYP3A4 mRNA発現を検討した。1,25水酸化ビタミンD<sub>3</sub>は0.1~10 nMの範囲で濃度依存性にLS174T細胞におけるCYP3A4の発現を増加させた。この効果は、ATBCのCYP3A4 mRNA発現増加効果と相加的であった。

VDRに対するsiRNAをLS174T細胞に導入すると、1,25水酸化ビタミンD<sub>3</sub>によるCYP3A4発現増加効果はほぼ完全に抑制されるものの、ATBCによる効果には影響しなかった。一方、SXRに対するsiRNAを導入すると、ATBCによるCYP3A4発現増加効果はほぼ完全に抑制されるものの、1,25水酸化ビタミンD<sub>3</sub>による効果には影響が認められなかった。

## D. 考察

骨軟化症は、カルシウムやリンなどミネラルの骨沈着が減少し、石灰化の不十分な骨組織(類骨)の割合が多くなり、骨変形・骨折・疼痛をきたす病態である。RFP やフェノバルビタール、フェニトイン、カルバマゼピン等の抗痙攣薬の連用はビタミン D 作用不全を引き起こし薬剤性骨軟化症の原因となることが知られている。これは、これらの薬剤が SXR のリガンドとして作用し、肝臓や腸管での CYP3A4 発現を促進しビタミン D 代謝を亢進させる事が主な原因と考えられている。健康人が2週間 RFP を内服すると血中 1,25 水酸化ビタミン D 濃度が低下する事から、特に低栄養や紫外線照射の少ない病人や老人が CYP3A4 を酵素誘導する薬物を長期摂取すると骨に影響を受けやすいと考えられる。

我々は、これまでの研究から、薬剤添加物として使用される ATBC には SXR リガンド活性が存在すること、ATBC は SXR の転写活性化を介して CYP3A4 の発現を促進すること、ATBC の作用は肝臓では認められず腸管において特異的に認められることなどを報告してきた。

今回の研究から、ヒト腸管由来細胞を用いた実験において、ビタミンD自身が VDR を介して CYP3A4 発現を促進することが明らかとなった。また、このビタミンD作用は ATBC による SXR 転写活性化を介する作用とは独立したものであり、両者が相加的に作用することも明らかとなった。

1,25 水酸化ビタミン D<sub>3</sub> により腸管細胞における CYP3A4 発現が誘導されるという現象は、能動的なカルシウム吸収を担っている腸管細胞におけるビタミン D 作用に関して、負の調節機構が腸管局所に存在することを示唆するものである。しかしながら、このようなビタミンD作用とは独立して ATBC が SXR を介して CYP3A4 を誘導することは、局所におけるビタミンD作用の程度や生体のカルシウム充足度とは関係なく、ATBC が 1,25 水酸化ビタミン D<sub>3</sub> の不活性化を促進する可能性を示すものであり、ヒトのカルシウム骨代謝に対して何らかの影響をもたらすことが懸念される。

これまでの我々の検討から、ATBC を含むある薬剤では、その最大投与量を内服すると一日あたり約 20 mg もの ATBC が毎日摂取されることが明らかになっている。レポーターアッセイでは ATBC が 1 μM 以上の濃度で明らかな転写活性の増加を認めたことから、経口的に摂取された場合には、腸粘膜局所では高濃度の ATBC が作用する可能性もあるため、その生物学的な影響が想定される。今後、長期にわたるラットへの ATBC 投与により、腸粘膜において 1,25 水酸化ビタミン D<sub>3</sub> 代謝が実際に亢進し、さらには骨量の減少をきたすかどうかを明らかにする研究を進めていくことが課題である。

## E. 結論

薬剤添加物のひとつであるATBCはSXRを介して腸管特異的にCYP3A4の酵素誘導を引き起こす。活性型ビタミンDである1,25水酸化ビタミンD<sub>3</sub>もまた、ATBCとは独立して腸上皮細胞におけるCYP3A4の発現を促進する。この成績は、腸上皮細胞における1,25水酸化ビタミンD代謝には生理的なビタミンD作用調節機序としての役割があることを示唆するものである。また、ATBCによるCYP3A4活性の誘導が、ビタミンDの腸上皮細胞での作用を抑制することにより、腸粘膜からのカルシウム吸収の低下など、骨代謝に悪影響を及ぼす可能性が示唆される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kinoshita Y, Fujii H, Takeshita A, Taguchi M, Miyakawa M, Oyama K, Yamada S, Takeuchi Y: Impaired glucose metabolism in Japanese patients

with acromegaly is restored after successful pituitary surgery if pancreatic b-cell function is preserved. Eur J Endocrinol. 2011 [Epub ahead of print]

- 2) Yamada S, Fukuhara N, Oyama K, Takeshita A, Takeuchi Y: Repeat transsphenoidal surgery for the treatment of remaining or recurring pituitary tumors in acromegaly. Neurosurgery. 67(4):949-956, 2010.

## 2. 学会発表

- 1) Takeuchi Y, Takeshita A, Taguchi M, Ito N, Miyakawa M, Uchida K, Oyama K, Yamada S. Involvement of pituitary hormones in bone metabolism in hypogonadism female patients with pituitary diseases. Endocr J. 2010; 57 (Suppl 2):S491.
- 2) Ito N, Shimizu Y, Takeshita A, Miyakawa M, Oyama K, Yamada S, Takeuchi Y. A possible involvement of TSH in human bone metabolism in patients with TSH producing pituitary adenoma is independent of thyroid hormone. Endocr J. 2010; 57 (Suppl 2):S491.
- 3) Takeshita A, Igarashi-Migitaka J, Koibuchi N, Takeuchi Y. Mitotane potentially causes drug-drug interactions through activation of intestinal SXR/PXR. Endocr J. 2010; 57 (Suppl 2):S546.

## 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22年度分担研究報告書

### 異所性甲状腺を合併した甲状腺ホルモン不応症に認めた

### 新規甲状腺ホルモン受容体変異体(R316C)の機能解析

分担研究者 森 昌朋 (群馬大学大学院病態制御内科学 教授)

研究協力者 山田正信 (群馬大学大学院病態制御内科学 講師)

中島康代 (群馬大学大学院病態制御内科学)

**研究要旨** 異所性甲状腺を合併した甲状腺ホルモン不応症の一症例に新たな甲状腺ホルモン受容体の変異 R316C を発見した。R316C 変異甲状腺ホルモン受容体は、T3との結合が障害され、ホモダイマー形成障害を認めた。また、SRC-1との結合能低下のため T3 による転写活性化能は障害されていた。さらに、NCoR との結合障害を認め、T3 による NCoR の解離も著しく障害されていた。この現象を反映し T3 による TRH 並びに TSH  $\beta$  遺伝子の転写抑制化能は著しく障害されていた。以上より、本症例では、甲状腺ホルモンによる TSH  $\beta$  遺伝子や TRH 遺伝子の抑制系に強い障害が起こり、合併した異所性甲状腺による甲状腺機能低下症に対し著しい高 TSH 血症を呈したと考えられる。

#### A. 研究目的

甲状腺ホルモン不応症(RTH)は、主に甲状腺ホルモン受容体  $\beta$  遺伝子(TR $\beta$ )の異常により発症し、変異 TR が正常 TR の機能を阻害する dominant negative 作用があり常染色体優性遺伝を示す。私たちは、新生児スクリーニングにて血清 TSH 値が極めて高値、甲状腺ホルモン低値、体重増加不良などの症状を認め、舌根部に異所性甲状腺を認めた女兒に新たなTR $\beta$ 変異 R316Cを発見した。これまでに甲状腺ホルモン不応症と異所性甲状腺を合併した症例は R320H の世界で1例しか報告がなく、しかも本症例は甲状腺機能低下症を乳児期から示した世界で初めての症例である。本研究では、この症例における病態を明らかとするため、R316C 変異TRの機能解析を行った。

#### B. 研究方法

1) 野生型 TR,R316C,R316H,R320H 変異受容体の発現ベクターを作製し T3 との結合能並びに

- EMSA を用いて DNA 結合能を検討した。
- 2) それぞれの変異体の甲状腺ホルモンによる遺伝子転写活性化並びに転写抑制化能を、甲状腺ホルモン応答配列(DR4 並びに Pal)、Thyrotropin-releasing hormone (TRH)遺伝子プロモーター、および Thyroid stimulating hormone  $\beta$  (TSH  $\beta$ )遺伝子プロモーターを CV-1 細胞に遺伝子導入し、種々の濃度の甲状腺ホルモン T3 を添加し測定した。
  - 3) 同様の系を用いて dominant negative 作用を検討した。
  - 4) GST pull-down 法を用いて転写共役因子 SRC-1、NCoR との結合能やリガンドの影響を検討した。

#### C. 研究結果

- 1) R316C,R316HはT3との結合が著しく障害されていたが、R320Hは比較的保たれていた。R316C,R316HはRXRとのヘテロダイマー形成は正常だが、ホモダイマー形成能が障害されていた。

- 2) T3で転写が刺激される系では、R320Hはほぼ正常だが、R316C,R316Hは転写活性化能が強く障害されていた。一方、T3で転写が抑制される系では、R316H、R320Hでの障害は軽度であったが、R316Cでは転写抑制化能が強く障害されていた。
- 3) 負の抑制系ではR316Cのみにdominant negative作用を認めたが、正の応答系ではいずれの変異においてもdominant negative作用は認められなかった。
- 4) SRC-1との結合はR320Hでは保たれていたが、R316C,R316Hで強く障害されていた。NCoRとの結合はいずれの変異においても障害されていたが、野生型で認められるT3添加によるNCoRの解離は、R316Cで著しく障害されていた。

#### D. 考察

本症例は、RTHに異所性甲状腺を合併し、甲状腺機能低下症状を認めた世界で初の症例である。これまでに RTH と異所性甲状腺を合併した症例は R320H の世界で1例しか報告がない (Grasberger 等、Thyroid 2005)。さらに本症例に認めた R316C は新規変異体であった。同部位変異ではこれまでに R316H の報告があるが、同様の障害を認めるかどうかは不明であり、病態の把握のため R316C の基礎的な機能解析が必要であった。本症例では正常の知能ならびに成長のため、通常必要量の倍以上のT4製剤の投与を行ったが、血清 TSH の変動は大きく、正常域にまで抑制するのは極めて難しい症例であった。機能解析の結果、R316CはT3結合が強く障害され、NCoRの解離障害によるTSHやTRH遺伝子抑制障害があり、その結果本症例はTSHの著しい高値を来したと考えられた。

#### E. 結論

異所性甲状腺を合併した甲状腺ホルモン不応症の一症例に新たな甲状腺ホルモン受容体の変異R316Cを発見した。R316C変異甲状腺ホルモン受容体は、T3結合能や転写共役因子との相互作用の障害により著しい高TSH血症を来したと考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakajima Y, Yamada M, Horiguchi K, Satoh T, Hashimoto K, Tokuhiko E, Onigata K, Mori M. Resistance to thyroid hormone due to a novel

thyroid hormone receptor mutant in a patient with hypothyroidism secondary to lingual thyroid and functional characterization of the mutant receptor. Thyroid. 2010 8:917-26

##### 2. 学会発表

- 1) 橋本貢士, 石田恵美, 片野明子, 田口亮, 堀口和彦, 吉野聡, 中島康代, 小澤厚志, 渋沢信行, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 森昌朋, Stearoyl-CoA desaturase-1 遺伝子発現は甲状腺ホルモンで負に調節されている、第53回日本甲状腺学会学術集会、長崎、2010
- 2) 渋沢信行, Gennifer Garay, 堀口和彦, 小澤厚志, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 山田正信, 森昌朋, TRHによる膵ランゲルハンス島遺伝子発現調節機構、第53回日本甲状腺学会学術集会、長崎、2010
- 3) 田口亮, 山田正信, 堀口和彦, 小澤厚志, 渋沢信行, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 森昌朋, 下垂体腫瘍など内分泌臓器特異的腫瘍発生を規定するmenin/MLL-p27の発現、日本神経内分泌学会学術集会、京都、2010
- 4) 小澤厚志, 山田正信, 堀口和彦, 田口亮, Stephen J Marx, 森昌朋, 多発性内分泌腫瘍症1型の腫瘍発生分子メカニズムの解明:モデルマウスの解析、日本神経内分泌学会学術集会、京都、2010
- 5) 田口亮, 山田正信, 中島康代, 堀口和彦, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 森昌朋, わずかなコルチゾールの過剰分泌は肥満症と脂質異常症を誘発する、日本肥満学会学術集会、前橋、2010
- 6) ガライ・ジェニファー, 渋沢信行, 堀口和彦, 石田恵美, 小澤厚志, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 山田正信, 森昌朋, TRH affects gene expression in the islet of Langerhans of the pancreas, 日本肥満学会学術集会、前橋、2010
- 7) 渋沢信行, 小澤厚志, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 山田正信, 森昌朋, 副腎腫瘍摘出術により肥満、糖尿病の著明な改善を認めた拡張型心筋症合併クッシング症候群の一例、日本肥満学会学術集会、前橋、2010
- 8) 小澤厚志, 斎藤従道, 橋本貢士, 渋沢信行,

- 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 森昌朋, 肥満・糖尿病コントロール不良の Prader-Willi 症候群に下肢蜂窩織炎を合併した一症例、日本肥満学会学術集会、前橋、2010
- 9) 山田正信, 堀口和彦, 梅澤良平, 田口亮, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 清水弘行, 森昌朋, チアゾリジン誘導体の NUCB2 mRNA 安定性制御機構、日本肥満学会学術集会、前橋、2010
  - 10) 佐藤哲郎, 吉野聡, 片野明子, 登丸琢也, 石塚高広, 小澤厚志, 渋沢信行, 橋本貢士, 山田正信, 森昌朋, メタボローム解析を用いた PDIP1KO マウスにおける高脂肪食誘導性脂肪肝抵抗性の分子病態解析、日本肥満学会学術集会、前橋、2010
  - 11) 片野明子, 佐藤哲郎, 吉野聡, 石塚高広, 登丸琢也, 小澤厚志, 渋沢信行, 橋本貢士, 山田正信, 森昌朋, 核内受容体 PPAR $\gamma$  の転写共役活性化因子 PDIP1 結合蛋白の同定、日本肥満学会学術集会、前橋、2010
  - 12) 石田恵美, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 森昌朋, 摂食調節ペプチド nesfatin-1 に対する細胞内シグナル伝達と melanocortin Receptor の関連、日本肥満学会学術集会、前橋、2010
  - 13) 吉野聡, 佐藤哲郎, 登丸琢也, 片野明子, 清水弘行, 有山泰代, 石塚高広, 小澤厚志, 渋沢信行, 橋本貢士, 岡田秀一, 山田正信, 森昌朋, PDIP1 ノックアウトマウスは低 TG 血症および高脂肪食誘導性肥満抵抗性と脂肪肝抵抗性を示す、日本肥満学会学術集会、前橋、2010
  - 14) 小澤厚志, 山田正信, 渋沢信行, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 森昌朋, MEN1 遺伝子ヘテロ欠損マウスにおいて発症する膵内分泌腺腫瘍の定量的解析、日本糖尿病学会、岡山、2010
  - 15) 渋沢信行, Guerrero Jennifer Garay, 中島康代, 石田恵美, 小澤厚志, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 清水弘行, 山田正信, 森昌朋, TRH の膵臓  $\beta$  細胞に対する作用解析、日本糖尿病学会、岡山、2010
  - 16) 吉野聡, 佐藤哲郎, 登丸琢也, 片野明子, 清水弘行, 有山泰代, 石塚高広, 小澤厚志, 渋沢信行, 橋本貢士, 岡田秀一, 山田正信, 森昌朋, PPAR $\gamma$  -DNA-binding domain-interacting protein 1(PDIP1)ノックアウトマウスはメタボリック症候群抵抗性を示す、日本糖尿病学会、岡山、2010
  - 17) 石田恵美, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 森昌朋, 摂食抑制ペプチド nesfatin-1 の細胞内シグナル伝達機構の解析、日本糖尿病学会、岡山、2010
  - 18) 片野明子, 佐藤哲郎, 吉野聡, 登丸琢也, 石塚高広, 小澤厚志, 渋沢信行, 橋本貢士, 山田正信, 森昌朋, マウス PPAR $\gamma$  -DNA-binding domain-interacting protein 1(PDIP1)のクローニングとその発現および in vitro 機能解析、日本糖尿病学会、岡山、2010
  - 19) 山田正信, 堀口和彦, 梅澤良平, 田口亮, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 清水弘行, 森昌朋, チアゾリジン誘導体の新たな non-genomic 効果 ERK1/2 経路を介した NUCB2 mRNA 安定性制御機構、日本糖尿病学会、岡山、2010
  - 20) Masanobu Yamada, Kazuhiko Horiguchi, Sumiyasu Ishii, Koshi Hashimoto, Tetsuro Satoh, Masatomo Mori, M. Hypothalamic-pituitary-thyroid axis in patients with pituitary adenoma: Analysis of 345 patients pre- and post- operation. International Thyroid Congress Paris, 2010
  - 21) Masanobu Yamada, Kazuhiko Horiguchi, Sumiyasu Ishii, Koshi Hashimoto, Tetsuro Satoh, Masatomo Mori, Aberrant histone modifications involved in resistance to thyroid hormone. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE 2010) Kyoto, 2010
  - 22) Garay Jennifer, Nobuyuki Shibusawa, Kazuhiko Horiguchi, Yasuyo Nakajima, Emi Ishida, Koshi Hashimoto, Tetsuro Satoh, Masanobu Yamada, Masatomo Mori, Thyrotropin-releasing hormone affects gene expression in the islets of Langerhans of the pancreas. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE 2010) Kyoto, 2010
  - 23) Emi Ishida, Koshi Hashimoto, Tetsuro Satoh, Shuichi Okada, Masanobu Yamada, Hiroyuki Shimizu, Masatomo Mori. Melanocortin 3/4 receptor is essential to the intracellular signaling

- pathway of Nesfatin-1. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE 2010) Kyoto, 2010
- 24) Satoshi Yoshino, Tetsuro Satoh, Takuya Tomaru, Hiroyuki Shimizu, Yasuyo Ariyama, Takahiro Ishizuka, Koshi Hashimoto, Masanobu Yamada, Masatomo Mori. Molecular mechanisms of hypotriglyceridemia and resistance to high-fat-diet induced obesity in PDIP1 knockout mice, 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE 2010) Kyoto, 2010
- 25) Kazuhiko Horiguchi, Masanobu Yamada, Ryo Taguchi, Atsushi Ozawa, Nobuyuki Shibusawa, Koshi Hashimoto, Tetsuro Satoh, Masahiko Tosaka, Shozo Yamada, Masatomo Mori. Gsp mutations and the MLL-p27 pathway in pituitary adenoma. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE 2010) Kyoto, 2010
- 26) Ryo Taguchi, Masanobu Yamada, Kazuhiko Horiguchi, Atsushi Ozawa, Koshi Hashimoto, Tetsuro Satoh, Masatomo Mori. Profile of gene in cells expressing wild-type and A242V menin. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE 2010) Kyoto, 2010
- 27) Koshi Hashimoto, Emi Ishida, Nobuyuki Shibusawa, Tetsuro Satoh, Masanobu Yamada, Fredric E. Wondisford, Masatomo Mori, An HDAC inhibitor, valproate improves the abnormalities in resistance to thyroid hormone. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE 2010) Kyoto, 2010
- 28) Tetsuro Satoh, Takahiro Ishizuka, Satoshi Yoshino, Takuya Tomaru, Yasuyo Nakajima, Akiko Katano, Nobuyuki Shibusawa, Atsushi Ozawa, Koshi Hashimoto, Masanobu Yamada, Masatomo Mori, Differential roles of 19S regulatory particles of 26S proteasome in the positive and negative gene regulation by thyroid hormone receptor. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE 2010) Kyoto, 2010
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許の取得  
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 22 年度分担研究報告書

### 甲状腺結節取り扱い診療ガイドライン作成

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** 甲状腺結節は非常に患者数が多く日常診療でつねに遭遇する疾患である。大部分の良性腺腫と一部の悪性腫瘍との鑑別が問題となるが、とくに甲状腺濾胞癌は術前診断が容易ではない。このため、悪性と診断できない甲状腺結節をどのように取り扱うべきかに関しては確立した方法がない。現時点で最良と考えられる指針を提示すべく「甲状腺結節取り扱い診療ガイドライン」を作成する。これまでに5回の委員会とメールによる討議を行い、US を行う対象、FNA を行う結節の基準、細胞診の病理分類方法、濾胞癌の捉え方などを決めた。

#### A. 研究目的

甲状腺超音波検査(US)、頸動脈超音波検査、頸部 CT などの普及に伴い、甲状腺結節が見つかる頻度は急激に増加しており、中高年では3, 4人に一人とも言われている。一方、甲状腺癌も患者数の急増が報告されており、アメリカではこの 30 年余に 2.5 倍に増加している。結節の大部分は良性であるが、この中から甲状腺癌を的確に見つけ出すことは、必ずしも容易ではない。とくに甲状腺濾胞癌は、腫瘍細胞の被膜浸潤、血管浸潤、遠隔転移を認めることが確定診断の条件であり、術前診断は困難である。このため、悪性と診断できない甲状腺結節、とくに濾胞性腫瘍をどのように取り扱うべきかに関しては確立した方法がない。甲状腺結節に対し、患者の精神的および経済的負担を最小限にし、医学的に現時点でベストと考えられる方針はなにか、どのような検査をどのように行い、どのように対処していくのが医療経済的にもよいのか、可能な限り文献的エビデンスに基づき、最良と考えられる取り扱い指針を提示すべく、「甲状腺結節取り扱い診療ガイドライン」を作成する。

#### B. 研究方法

日本甲状腺学会、内分泌外科学会、日本超音波学会甲状腺班の会員の中から、自薦、他薦をもとに25名の委員を選び、これに日本臨床細胞学会の中でとくに甲状腺病理を専門としている4名に委員を委嘱

し、計29名からなる作成委員会(委員長:中村浩淑)を立ち上げた。第一回委員会で診療ガイドライン作成のねらいと目的、作成方法などを定め、それを基に委員長がガイドラインの骨子を提示、委員の役割分担を決めた。年1, 2回委員会を開催するとともに、e-mail で委員間の意見調整、討議を行っている。2010年度は11月日本甲状腺学会の折りに第5回委員会を開催し、活発なディスカッションを行った。

(倫理面への配慮) 現時点で倫理面の問題は生じないと考えている。

#### C. 研究結果

第5回委員会で決定した事項

##### 1. US を行う対象

甲状腺USをスクリーニングとして施行することは、否定するものではないが、積極的には支持しない。

##### 2. FNA を行う結節の基準

委員間では、FNA は1cm 径以上の結節から行う、ただし US 所見で悪性を疑う所見がある場合は5mm を越えるものから、の意見が強かった。甲状腺超音波学会のガイドライン改訂との整合性を図りつつ決めることとした。

##### 3. 細胞診の病理分類

2009年に出た Bethesda System が今後世界的に主流となると考えられる。しかし、直ちにこの

方式で施行することになると混乱を招く恐れがある。当面は、現行の甲状腺癌取り扱い規約(6版)の「鑑別困難」を以下のように細分類した「修正取り扱い規約」を用いることとする。これであれば将来、Bethesda System にスムーズに切り替えられるであろう。

カテゴリー1. 検体不適正

カテゴリー2. 良性

カテゴリー3. 鑑別困難

3-A 濾胞性腫瘍が疑われる群

3-A1 良性の可能性が高いもの

3-A2 悪性の可能性が高いもの

3-B 濾胞性腫瘍以外が疑われる群

カテゴリー4. 悪性の疑い

カテゴリー5. 悪性

#### 4. 濾胞癌について

すべての濾胞癌を術前に診断することは実際上不可能である。また濾胞癌は、被膜浸潤だけの微少浸潤型と広範浸潤型では予後が大きく異なる。したがって広範浸潤型濾胞癌を見逃さないことを主眼として、そのための US 所見、FNA 所見を求めていくこととする。

#### D. 考察

甲状腺結節の診断にもっとも重要な検査である甲状腺 US をどのような結節から行うかに関しては種々の意見がある。委員会では、充実性結節なら 1cm 径以上から、甲状腺 US で悪性を疑う所見がある場合は 6mm 径以上から、の意見が強かったが、甲状腺超音波学会でも改訂ガイドラインを作成中であり、それとの整合性を図ることになった。それまでに各委員の意見を求め、集約することとした。

また FNA の病理分類は Bethesda System を直ちに取り入れるのは時期尚早として、現行の甲状腺癌取り扱い規約(6版)を修正することにした。「鑑別困難」のカテゴリーが混乱を招くため、これを濾胞性腫瘍が疑われる群(3-A)と濾胞性腫瘍以外が疑われる群(3-B)に二分することにした。両者は FNA の再試行の推奨度、組織診断のための葉切除術の推奨度が異なるため、この分類は重要である。さらに病理側委員の検討から、濾胞性腫瘍が疑われる群も悪性の可能性の低い群と高い群との鑑別はある程度可能と考えられ、FNA 報告書にはできるだけ悪性度の可能性についても記載することを推奨することになった。「修

正取り扱い規約」であれば将来 Bethesda System への切り替えもスムーズにいくと考えられる。

濾胞腺腫や腺腫様甲状腺結節と鑑別の難しい濾胞癌は被膜浸潤だけの微少浸潤型である。このタイプの濾胞癌は予後が非常に良く、術前に診断できなくても臨床的にはそれほど大きな問題にはならない。見落としは避けられない濾胞癌は広範浸潤型であることから、US、FNA で注意しなければならない所見を集めることにした。

#### E. 結論

ガイドラインにおける重要事項である FNA 施行の基準、FNA 病理分類、濾胞癌の捉え方などを定めた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) 甲状腺結節取り扱い診療ガイドライン  
中村浩淑  
日本甲状腺学会雑誌 1(2):91-104, 2010
  - 2) 甲状腺腫瘍診療ガイドラインのポイント  
中村浩淑  
日本臨牀 69(Suppl 2 増刊号「内分泌腫瘍」): 248-253, 2011
2. 学会発表
  - 1) International Thyroid Congress 2010  
IMPLEMENTING GUIDELINES FOR THYROID NODULES  
Hirotohi Nakamura
  - 2) 第 53 回 日本甲状腺学会 専門医教育セミナー  
甲状腺結節の診療の実際と課題  
中村浩淑  
(日本内分泌学会誌 86 (2):239 2010)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

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

### 新診断基準に基づく甲状腺クリーゼの全国疫学調査の実施

分担研究者 赤水尚史 (京都大学医学部附属病院 探索医療センター 教授)

**研究要旨** 甲状腺クリーゼは致死性の疾患であり、内分泌領域における救急で遭遇する代表的疾患である。しかしながら、わが国における疫学データも極めて乏しく、その診断基準は国内外において皆無に近い状況である。そこで、本研究班では、我が国における最初でかつ独自の甲状腺クリーゼの診断基準作成を行い、全国疫学調査を行って本邦における甲状腺クリーゼの実態を明らかにすることとした。昨年度は、我々が作成した診断基準(第1版)に基づいて、厚生労働省特定疾患の疫学に関する研究班と協同して全国疫学調査を行った。一次調査として、2009年1月～6月に、1,463施設の内科(内分泌代謝内科、循環器内科)、救急科、甲状腺専門病院、救急特定病院を対象に2004-2008年(5年間)の患者数調査を実施した。引き続き二次調査を2009年6月～2010年2月に行った。一次調査で患者ありと報告のあった230施設に、二次調査票を疫学班から送付して、患者背景、クリーゼ誘因の有無、クリーゼ診断時の臨床所見、クリーゼに対する治療内容、転帰、診断基準(第1版)との合致性、を調査した。本年度は、全国疫学調査によって得られた結果から信頼性と内容に富んだ質の高いデータベースの構築し、データ解析を実施した。その結果、282の確実例と74の疑い例のデータが集積され、甲状腺クリーゼの発症実態が明らかになった。致死率は、確実例と疑い例それぞれ11.0%と9.5%であった。また、この結果に基づいて診断基準の改訂(第2版)を作成した。

#### A. 研究目的

甲状腺クリーゼは「生命が危険となるような激しい症状を呈する甲状腺中毒症」であり、その基礎疾患の殆どはバセドウ病である。甲状腺クリーゼがひとたび発症すると、その予後は不良(死亡率10%以上)であり、我が国における明確な診断基準がなく、予後規定因子も不明のままである。また、我が国における甲状腺クリーゼの疫学的データはこれまでのところ成されておらず、その実態も明らかでない。以上の事実を踏まえて診断基準作成を行い、全国疫学調査により本邦における実態を明らかにする。さらに、重症度や予後因子を考慮した診療ガイドラインを作成する。本調査研究によって、甲状腺クリーゼの早期診断と治療や予後の改善を図ることが出来ると期待される。

#### B. 研究方法

日本内分泌学会(企画部会における臨床課題)および日本甲状腺学会(臨床重要課題)との共同で行う。

日本甲状腺学会委員会を中心に診断基準を作成し、厚生労働省疫学調査研究班と協力して全国調査を行う。全国調査の結果の解析は、日本甲状腺学会委員会を中心に行う。

#### C. 研究結果

##### 1) 全国疫学一次調査のデータ解析

厚生労働省特定疾患の疫学に関する研究班(研究代表者 永井正規教授(埼玉医科大学医学部 公衆衛生学))に調査依頼し、自治医科大学 公衆衛生学の中村好一教授に疫学調査担当となっていたいただいた。2009年1月～6月に、1,463施設の内科(内分泌代謝内科、循環器内科)、救急科、甲状腺専門病院、救急特定病院を対象に2004-2008年(5年間)の患者数調査を実施した。1,463施設中768施設から回答があり(回答率52.5%)、「患者あり」の施設が230施設、患者数計673人/5年間であった。その結果、

推計患者数は1585人(95%信頼区間:1213-1958人)と算出された。しかしながら、下記の二次調査結果に基づいて不相当例を除外したところ、推計患者数は1283±105人(95%信頼区間:1077-1489人)と再算出された。

## 2) 全国疫学二次調査の実施

2009年6月-2010年2月に、一次調査で患者ありと報告のあった230施設に、二次調査票を疫学班から送付して、患者背景、クリーゼ誘因の有無、クリーゼ診断時の臨床所見、クリーゼに対する治療内容、転帰、診断基準(第1版)との合致性、を調査した。その結果、282の確実例と74の疑い例の報告があった。そのデータを用いて、研究班において、診断基準(第1版)の検証、発症実態(発症率、予後)、中枢神経・循環器・消化器症状の解析、重症度・予後規定因子の解析、治療実態の把握と解析、を実施した。その結果、患者の臨床症状の分布、甲状腺機能レベル、性差、年齢などの実態が明らかになった。致死率は、確実例と疑い例それぞれ11.0%と9.5%であった。

## 3) 診断基準の改訂

全国疫学調査の結果から、甲状腺機能の評価や黄疸の判定基準などの改訂を行った。

## 4) 倫理面での配慮:

疫学研究に関する倫理指針に従って研究を行い、全国疫学調査に関しては疫学班担当者の施設で申請・承認されている。

## D. 考察

全国疫学調査(一次)によって、推計患者数は1283±105人(95%信頼区間:1077-1489人)と算出され、年間約260人発症していることが判明した。また、致死率は10%以上あり、非常に重症な疾患であることが裏づけられた。

## E. 結論

全国疫学調査(一次)によって、推計患者数は1283±105人(95%信頼区間:1077-1489人)と算出された。全国疫学調査(二次)によって、282の確実例と74の疑い例の報告があり、診断基準(第1版)の検証、発症実態(発症率、予後)、中枢神経・循環器・消化器症状の解析、重症度・予後規定因子の解析、治療実態の把握と解析が行われた。さらには、診断基

準の改訂を行った

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tamura Y, Sugimoto M, Murayama T, Minami M, Nishikaze Y, Ariyasu H, Akamizu T, Kita T, Yokode M, Arai H: C-C chemokine receptor 2 inhibitor improves diet-induced development of insulin resistance and hepatic steatosis in mice. *J Atheroscler Thromb.*17(3):219-28, 2010.
- 2) Inoue N, Watanabe M, Morita M, Tomizawa R, Akamizu T, Tatsumi K, Hidaka Y, Iwatani Y: Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of FOXP3 with prognosis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol.* 162(3):402-6, 2010.
- 3) Hattori Y, Kanamoto N, Kawano K, Iwakura H, Sone M, Miura M, Yasoda A, Tamura N, Arai H, Akamizu T, Nakao K, Maitani Y: Molecular characterization of tumors from a transgenic mouse adrenal tumor model: Comparison with human pheochromocytoma. *International Journal of Oncology* 37: 695-705, 2010.

### 2. 学会発表

- 1) T. Akamizu: Diagnosis and epidemiology thyroid crisis. 14th Asia-Oceania Congress of Endocrinology, Kuala Lumpur Convention Centre (Kuala Lumpur, Malaysia). Dec.2-5, 2010.
- 2) T. Akamizu: Subclinical hyper/hypothyroidism. 14th Asia-Oceania Congress of Endocrinology, Kuala Lumpur Convention Centre (Kuala Lumpur, Malaysia). Dec.2-5, 2010.
- 3) Akamizu T: Ethnic differences in the Genetics of AITD. 14<sup>th</sup> International Thyroid Congress, Palais Des Congres (Paris). Sept.11-16, 2010.
- 4) Akamizu T: Pathophysiology and Pathogenesis of Graves' disease. 14<sup>th</sup> International Thyroid Congress, Palais Des Congres (Paris).



Sept.11-16, 2010.

3. その他

**H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)**

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究協力者

佐藤 哲郎(群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学)

磯崎 収(東京女子医科大学内分泌内科)

鈴木 敦詞(藤田保健衛生大学医学部内科学内分泌代謝科)

脇野 修(慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科)

門傳 剛(獨協医科大学内分泌代謝内科)

幸喜 毅(琉球大学医学部内分泌代謝内科)

坪井久美子(東邦大学医学部糖尿病・代謝・内分泌)

大谷 肇(関西医科大学循環器内科)

手良向 聡(京都大学医学部附属病院探索医療センター)

飯降 直男(東京医科歯科大学内分泌・糖尿病・代謝内科)

# 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 22 年度分担研究報告書

### 甲状腺ホルモン不応症の診断基準作成に関する研究

分担研究者 村田善晴（名古屋大学環境医学研究所教授）

**研究要旨** 甲状腺ホルモン不応症は「T3 の作用機構上の何らかの異常により組織の甲状腺ホルモンに対する反応性が減弱し、不適切 TSH 分泌症候群(SITSH)を示す症候群」と定義された(日本甲状腺学会臨床重要課題「甲状腺ホルモン不応症の診断基準作成委員会」)疾患で、その多くは甲状腺ホルモン受容体(TR)β の変異が原因である。本研究の目的は、その診断基準を作成することにある。本年度も前年度に引き続き、SITSH を呈する患者より DNA を抽出し、TR β の遺伝子解析を行った。また、本症診断に至るアルゴリズムの試案を作成し、これを検証するための情報を収集した。

#### A. 研究目的

家系内発症が認められる甲状腺ホルモン不応症(以下 RTH)の原因の約 9 割は TR β 遺伝子変異(約 9 割)によるものとされているが、残り 1 割の原因はいまだに明らかではない。したがって、現時点では TR β 遺伝子検索のみでは、本症を診断することはできない。SITSH を示す患者には TSH 産生腫瘍などの鑑別に難渋することが多く、昨年度の調査結果では約 4 分の 1 の症例に於いて不適切と思われる治療が行われていたことが明らかとなった。そこで、本研究では、日本の診療事情に適した RTH の診断基準を作成することを目的とした。

#### B. 研究方法

医師が RTH を疑うのは、ほとんどの場合、SITSH を呈する患者に遭遇した時である。そこで、甲状腺疾患を専門に扱うことのできる全国の医療機関に呼びかけ、SITSH を呈する症例で、TR β 遺伝子検索の同意が得られた患者の末梢血から DNA を抽出し、TR β 遺伝子の変異の有無を検索した。また、本症診断の為のアルゴリズムの試案を作成し、日本甲状腺学会臨床重要課題委員会の場、および委員間のメールにより、試案を検証する作業を行った。

(倫理面への配慮)

TR β の遺伝子解析については名古屋大学環境医学研究所倫理委員会より承認を受けている(通算番号 282、遺伝子課題番号 G-4)。また、すべての被験者から書面によるインフォームドコンセントを得た。

#### C. 研究結果と考察

平成 22 年度は、SITSH を示す 8 家系 11 例において TR β 遺伝子変異の検索を行ったところ、3 家系に変異が認められた。このうち、A234T という変異が同定された症例は、バセドウ病を合併していた。

アルゴリズム試案に対する議論を行った結果、SITSH を呈する患者の中で、実際にどの位の頻度で RTH が存在するか、また、最も本症との鑑別が必要と思われる TSH 産生腫瘍の症例を経験したかを調査することとした。また、TRH テストの適応とその解釈、MRI を初めとする下垂体画像解析のアルゴリズム内での位置付けなどに関する意見が得られた。2009 年 Pediatric Research に発表された Tajima らの報告によると、北海道における RTH の発症頻度は約 4 万人に 1 人である。この発症頻度は米国オレゴン州で行われた調査結果とほぼ一致する。この頻度を日本全国に当てはめると日本にはおよそ 3,000 人の RTH 患者が存在することになる。これまでの報告例と今回のアンケート調査を併せても、TR β 変異により確認された RTH の症例は 100 例に満たず、日本にはまだ診断さ

れていない RTH 症例が多数存在するものと考えられる。昨年度の調査で確認された RTH 患者の約 4 人に 1 人は不適切と思われる治療を受けていたことを勘案すると本症診断の重要性が再認識された。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) RASHID M HO, ASAI M, SUN X-y, HAYASHI Y, SAKAMOTO J, MURATA Y: Effect of thyroid statuses on sodium / iodide symporter (NIS) gene expression in the extrathyroidal tissues in mice. Thyroid Research 3(1): 3, 2010.
- 2) SUN X-y, HAYASHI Y, XU S, KANOU Y, TAKAGISHI Y, TANG Y-p, MURATA Y: Inactivation of the *Rcan2* gene in mice ameliorates the age- and diet-induced obesity by causing a reduction in food intake. PLoS One 6(1): e14605, 2011.
- 3) IWAMA S, SUGIMURA Y, SUZUKI H, MURASE T, OZAKI N, NAGASAKI H, ARIMA H, MURATA Y, SAWADA M, OISO Y: Time-dependent changes in proinflammatory and neurotrophic responses of microglia and astrocytes in a rat model of osmotic demyelination syndrome. Glia 59(3) : 452-462 , 2011.
- 4) ○村田善晴 甲状腺ホルモン 内分泌・糖尿病・代謝内科 特集「内分泌ホルモンのすべて」科学評論社 2011 (in press)

##### 2. 学会発表

- 1) ○尾方秀忠, 岡島由樹, 森 雅也, 神田恵介, 林 良敬, 村田善晴:妊娠中 SITSH の経過をたどり、TRβ 遺伝子異常から RTH と診断した母子例. 日本内科学会第 212 回東海地方会抄録集 p58, 2010
- 2) ○神田恵介, 本田 茂, 六鹿泰弘, 勝見知代, 田中秀典, 大野敏行, 尾方秀忠, 岡島由樹, 森雅也, 林 良敬, 村田善晴:母親に TRβ 遺伝子変異を認めたことから診断し得た甲状腺ホルモン不応症の1症例 第 44 回日本小児内分泌学会学術集会プログラム・抄録集 p31, 2010

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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 22 年度分担研究報告書

### バセドウ病眼症の病因・病態の解明と診断・治療法の開発に関する研究

#### (1)バセドウ病眼症の疾患感受性遺伝子の検索

#### (2)バセドウ病悪性眼球突出症の診断基準と治療指針の作成

研究協力者 廣松雄治（久留米大学医学部内科学講座内分泌代謝内科部門 教授）

#### 研究要旨

- 1) TSH受容体遺伝子多型と眼症との関連性について日本人のバセドウ病眼症患者を対象に検討した。TSH受容体遺伝子多型(rs179247)のAA genotype 頻度は重症の眼症を有する群で高い傾向がみられた。
- 2) 「バセドウ病悪性眼球突出症の診断指針と治療指針の作成」に関する委員会にて検討を重ね、MRI を組みこんだ試案をまとめ、日本甲状腺学会、日本内分泌学会学術総会にて発表した。

#### 研究(1)

##### バセドウ病眼症の疾患感受性遺伝子の検索

##### A. 研究目的

バセドウ病はTSH受容体(TSHR)を自己抗原とする自己免疫疾患である。TSHRは甲状腺濾胞細胞や後眼窩脂肪組織に発現し、その増減はTSHR抗体とともに、自己免疫反応を決定する重要なファクターと考えられる。

TSHR遺伝子多型は、TSHR発現や受容体以降の免疫反応に影響を与えることから、バセドウ病やバセドウ病眼症の発症や増悪との関連が推察される。

そこで私どもはTSHR遺伝子多型が日本人のバセドウ病においても、その発症や眼症に関連しているかどうか検討した。

##### B. 研究方法

対象は久留米大学病院受診中のバセドウ病患者414例(アメリカ甲状腺学会の分類でclass III以上の眼症を有するもの122例)と医療スタッフの健常対照者231例を対象とした。TSHR遺伝子多型はApplied Biosystems TaqMan Assay (Code: rs179247:

C\_26928532\_10 と rs12101255: C\_31754698\_10)を用いたReal-Time PCR法によるジェノタイプングにて解析した。

##### (倫理面の配慮)

倫理委員会の承認および患者ならびに健常者から同意を得て行った。

##### C. 研究結果

- 1) バセドウ病患者におけるTSH受容体遺伝子多型(rs179247)のAA genotype 頻度は49%で、正常対照群における頻度(41%)と比較して有意に高かった。
- 2) TSH受容体遺伝子多型(rs179247)のAA genotype 頻度はATAクラスIV-VIの重症の眼症を有する患者群(64%)において、クラス0~Iの患者群(47%)に比較して高い傾向がみられた。

##### D. 考察

TSHR遺伝子イントロン1の遺伝子多型(rs179247)のAA genotype 頻度はバセドウ病患者特に重症の