

- 5) Sun X-y, Takagishi Y, Okabe E, Chishima Y, Kanou Y, Murase S, Mizumura K, Inaba M, Komatsu Y, Hayashi Y, Peles E, Oda S-i, Murata Y: A novel Caspr mutation causes the shambling mouse phenotype by disrupting axo-glial interactions of myelinated nerves. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 68(11): 1207-1218, 2009.
- 6) Hayashi Y, Yamamoto M, Mizoguchi H, Watanabe C, Ito R, Yamamoto S, Sun X-y, Murata Y: Mice deficient for glucagon Gene-derived peptides display normoglycemia and hyperplasia of islet  $\alpha$ -cells but not of intestinal I-cells. *Molecular Endocrinology* 23(12): 1990-1999, 2009.
- 7) Rashid M H-O, 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): 3-6, 2010.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 1) ○村田善晴:各論 第3章 専門知識・甲状腺ホルモン不応症. 田上哲也, 西川光重, 伊藤公一, 成瀬光栄(編集):甲状腺疾患診療マニュアル. 東京:診断と治療社, 120-122, 2009.
- 2) ○村田善晴:甲状腺ホルモン不応症の最前線. 甲状腺診療 Update 2009. ホルモンと臨床 57(8): 69-75, 2009.
- 1) Nakajima Y, Yamada M, Horiguchi K, Satoh T, Hashimoto K, Tokuhira 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) Matsumoto S, Hashimoto K, Yamada M, Satoh T, Hirato J, Mori M. Liver X Receptor- $\alpha$  Regulates Proopiomelanocortin (POMC) Gene Transcription in the Pituitary. *Mol Endocrinol*. 23:47-60. 2009
- 3) Hashimoto K, Ishida E, Matsumoto S, Shibusawa N, Okada S, Monden T, Satoh T, Yamada M, Mori M. A liver X receptor (LXR)- $\beta$  alternative splicing variant (LXRBSV) acts as an RNA co-activator of LXR- $\beta$ . *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 390:1260-1265.
- 4) Hashimoto K, Ishida E, Matsumoto S, Okada S, Yamada M, Satoh T, Monden T, Mori M. Carbohydrate response element binding protein gene expression is positively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology*. 2009 150:3417-3424.
- 5) Umezawa R, Yamada M, Horiguchi K, Ishii S, Hashimoto K, Okada S, Satoh T, Mori M. Aberrant histone modifications at the thyrotropin-releasing hormone gene in resistance to thyroid hormone: analysis of F455S mutant thyroid hormone receptor. *Endocrinology*. 2009 150:3425-3432.
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.
- 5) Watanabe M, Hayashi F, Nanba T, Inoue N, Akamizu T, Iwatani Y: Association of the -31C/T Functional Polymorphism in the Interleukin-1 $\beta$  Gene with the Intractability of Graves' Disease and the Promotion of TH17 Cells. 80<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Thyroid Association. Palm Beach, Florida. Sept.23-27, 2009.
  - 6) Moriyama K, Matsuda K, Yamamoto H, Hataya Y, Kanamoto N, Akamizu T, Arai H, Tagami T, Nakao K: Curative effects of steroid pulse therapy followed by oral steroids on Graves' ophthalmopathy. 9<sup>th</sup> Asia and Oceania Thyroid Association Congress. Nagoya Congress Center. Nov.1-4, 2009.
  - 7) 赤水尚史:臨床内分泌入門6 甲状腺クリーゼの診断と治療.第20回臨床内分泌代謝 Update. 札幌コンベンションセンター. H23年1月28日~29日.
  - 8) 磯崎収、佐藤哲郎、鈴木敦詞、脇野修、飯降直男、坪井久美子、門傳剛、幸喜毅、大谷肇、手良向聡、赤水尚史:「甲状腺クリーゼ」1. 全国疫学調査と診断基準(第一版)の検証. 第53回日本甲状腺学会. 長崎ブリックホール(長崎市), 2010年11月11日~13日.
  - 9) Akamizu T: Novel diagnostic criteria for thyroid storm. Thyroid Satellite Symposium of ICE 2010, March.25. Shiran Kaikan (Inamori Hall).
  - 10) Hinata T, Watanabe Y, Morita K, Kimura F, Akamizu T: Influence of sera and TSH monoclonal antibodies from patients with Graves' disease/ophthalmopathy on growth and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology, Kyoto International Conference Center, March.26-30, 2010.
  - 11) 赤水尚史:甲状腺機能異常と循環器疾患. 第73回日本循環器学会・学術集会 ランチョンセミナー58. 平成21年3月22日. ホテルNCB.
  - 12) 赤水尚史:甲状腺クリーゼの新診断基準と治療. 第82回日本内分泌学会学術総会. 平成21年4月23日~25日. 群馬県民会館.
  - 13) 井上直哉、中口あづさ、上田大史、渡邊幹夫、赤水尚史、岩谷良則:自己免疫性甲状腺疾患の難治性および重症度とIL-12/IL-12R 遺伝子多型との関連. 第82回日本内分泌学会学術総会. 平成21年4月23日~25日. 群馬県民会館.
  - 14) 延原崇之、林文明、渡邊幹夫、赤水尚史、岩谷良則:自己免疫性甲状腺疾患の難治性及び重症度とCTLA-4 遺伝子における+49A/G 及びCT60A/G 多型との関連. 第82回日本内分泌学会学術総会. 平成21年4月23日~25日. 群馬県民会館.
  - 15) 渡邊幹夫、林文明、南波崇、井上直哉、赤水尚史、岩谷良則:IL 1B 遺伝子-31C/T 多型とバセドウ病の難治性および Th17 細胞比率との関連. 第16回日本遺伝子診療学会大会. ホテル札幌ガーデンパレス. H21年7月30日~8月1日.
  - 16) Watanabe M, Nanba T, Akamizu T, Iwatani Y: Patients of Hashimoto's Disease With -590CC Genotype in the *IL4* Gene Would Develop Hypothyroidism. 79<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Thyroid Association. Chicago, Oct.1-5, 2008.
  - 17) 赤水尚史:内分泌学会臨床重要課題「甲状腺クリーゼの診断基準作成と全国疫学調査」第81回日本内分泌学会学術総会. H20年5月16日~18日. ホテル青森、青森市文化会館.
  - 18) 井原善明、瀬尾麻里、日向崇、吉田理恵、高祖祐司、盛田幸司、渡邊康裕、元吉和夫、赤水尚史、田中祐司:バセドウ病患者血清/分画による甲状腺細胞増殖刺激経路の検討. 第81回日本内分泌学会学術総会. H20年5月16日~18日. ホテル青森、青森市文化会館.
  - 19) 渡邊幹夫、南波崇、赤水尚史、岩谷良則:IL-4-590C/T 多型は橋本病における甲状腺破壊の重症度の予測因子である. 第15回日本遺伝子診療学会大会. H20年7月31日~8月2日. 仙台市戦災復興記念館.
  - 20) 赤水尚史、磯崎収:1. 緒言 臨床重要課題「甲状腺クリーゼ」:その病態と臨床、および全国疫学調査. 第51回日本甲状腺学会. H20年11月21日~23日. 栃木県総合文化センター.
  - 21) 井原善明、日向崇、盛田幸司、渡邊康裕、元吉和夫、赤水尚史、田中祐司:バセドウ病患者由

来単クローン TSH 受容体抗体による甲状腺細胞増殖経路の検討. 第 51 回日本甲状腺学会. H20 年 11 月 21 日~23 日. 栃木県総合文化センター.

- 1) Kitaoka T, Namba N, Miura H, Hirai H, Nakajima S, Ozono K, et al. Intravenous administration of pamidronate decreases serum levels of FGF23 rapidly in patients with osteogenesis imperfecta. 29<sup>th</sup> Annual meeting of the American society for bone and mineral research: 07.09.16-19, Hawaii,U.S.A.
- 2) 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.
- 3) 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. 32<sup>nd</sup> annual Meeting ASBMR 2010: 10.10.14-21, Toronto.
- 4) 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. 32<sup>nd</sup> annual Meeting ASBMR 2010: 10.10.14-21, Toronto
- 5) Miura K, Namba N, Ozono K. A Survey on Vitamin D Deficiency in Children in Japan. 32<sup>nd</sup> annual Meeting ASBMR 2010: 10.10.14-21, Toronto
- 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
- 3) 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
- 4) 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
  - 5) 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
  - 6) 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
  - 7) 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 (5/27-29/10、岡山)腎機能正常な CAG 施行男性例において HbA1c 及び骨吸収(コラーゲン代謝)マーカーは冠動脈狭窄病変枝数や心機能障害の予測因子となる 井上大輔、天木幹博、中津裕介、綾部健吾、大橋潤一、檜垣忠直、田井宣之、中村文隆、岡崎亮
  - 8) 第 28 回日本骨代謝学会学術集会 (7/21-23/10、東京) 骨代謝回転は 1,25 ビタミン D と独立な血清 FGF23 濃度の規定因子である。井上大輔、天木幹博、福本誠二、清水祐一郎、田井宣之、中村文隆、岡崎亮

- 9) 第12回日本骨粗鬆症学会(10/22-24、大阪)低カルボキシル化オステオカルシン/総オステオカルシン比は高骨代謝回転で増加し、高血糖で低下する。井上大輔、天木幹博、田井宣之、中村文隆、岡崎亮
- 10) 第12回日本骨粗鬆症学会(10/22-24、大阪)糖尿病、高血圧及び脂質代謝異常合併骨粗鬆症患者に対するリセドロネート(RIS)の有効性と安全性—日本国内 Phase3 データを利用したサブ解析— 岡崎亮、西澤良記、井上大輔、杉本利嗣
- 11) 14th International Congress of Endocrinology (Kyoto, Japan, 3/26-30/10) MMP-dependent collagen breakdown is a major contributor to the increased bone markers in cardiovascular diseases: CHIBA (Coronary Heart Diseases 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
- 12) IOF WCO-ECCEO10 (Florence, Italy, 5/4-8/2010) 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, Toshihiro Amaki, Yusuke Nakatsu, Kengo Ayabe, Jun-ichi Ohashi, Tadanao Higaki, Nobuyuki Tai, Fumitaka Nakamura, Ryo Okazaki
- 13) ASBMR 32th Annual Meeting (Toronto, ON, Canada 10/15-19/10) (Plenary Poster) Bone turnover and 1,25-dihydroxyvitamin D are independent determinants of circulating FGF23: a sub-analysis of CHIBA (Coronary Heart Disease of Ischemia and Bone Association) study. Daisuke Inoue, Toshihiro Amaki, Yuichiro Shimizu, Seiji Fukumoto, Yusuke Nakatsu, Kengo Ayabe, Jun-ichi Ohashi, Tadanao Higaki, Nobuyuki Tai, Fumitaka Nakamura, Ryo Okazaki
- 14) ASBMR 32th Annual Meeting (Toronto, ON, Canada 10/15-19/10) Safety and efficacy of Risedronate in osteoporosis patients with diabetes mellitus, hypertension or dyslipidemia—A pooled analysis of three clinical trials in Japan— Ryo Okazaki, Daisuke Inoue, Yoshiki Nishizawa, Ryoichi Muraoka, Toshitsugu Sugimoto
- 15) Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Nawata K and Sugimoto T. Decreased PTH secretion is associated with low bone formation and vertebral fracture risk in postmenopausal women with type 2 diabetes. The American Society for Bone Mineral Research 32th annual meeting, (Toronto), 2010. 10.15-19, ASBMR 2010 Annual Meeting Abstracts, S84, 2010
- 16) Matsumoto T, Sugimoto T, Sowa H, Tsujimoto M, Hatano M, Awa T, Iikuni N, Miyauchi A, Warner MR and Nakamura T. Teriparatide treatment in Japanese subjects with osteoporosis at high risk of fracture: Effect on bone mineral density and bone turnover markers during 12 month, randomized, placebo-controlled, double-blind and 12-month open-label study periods. The American Society for Bone Mineral Research 32th annual meeting, (Toronto), 2010. 10.15-19, ASBMR 2010 Annual Meeting Abstracts, S204, 2010
- 17) 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との関係. 第83回日本内分泌学会学術総会(京都)2010年3月25~28日
- 18) 山内美香, 杉本利嗣. VitaminD insufficiencyと骨代謝. Vitamin D insufficiency と骨脆弱性. 第28回日本骨代謝学会(東京)2010年7月21-23日. 第28回日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録集. p116. 2010
- 19) 杉本利嗣. PTH(anabolic agent)の基礎と臨床. 骨形成促進剤としてのPTHの臨床応用への展開. 第28回日本骨代謝学会学術集会(東京)2010年7月21-23日. 第28回日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録集. p127. 2010
- 20) 高岡伸, 山口徹, 矢野彰三, 山内美香, 山本昌弘, 杉本利嗣. スロロンチウムの骨芽細胞活性化、骨形成促進作用におけるカルシウム感知受容体の関与. 第28回日本骨代謝学会(東京)2010年7月21-23日. 第28回日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録集. p242, 2010

- 21) 山本昌弘, 名和田清子, 山内美香, 山口徹, 杉本利嗣. 閉経後2型糖尿病女性の低PTH分泌に伴う低骨形成状態は、骨密度とは独立した椎体骨折の危険因子である. 第12回日本骨粗鬆症学会(大阪)2010年10月21-23日. Osteoporosis Japan 18, Suppl.1:209, 2010
- 22) 山内美香, 山口徹, 名和田清子, 高岡伸, 杉本利嗣. 閉経後女性における脆弱性骨折リスクと血清25(OH)Dの関係:PTHの関与の検討. 第12回日本骨粗鬆症学会(大阪)2010年10月21-23日. Osteoporosis Japan 18, Suppl.1:230, 2010
- 1) 第52回日本甲状腺学会 臨床重要課題「甲状腺結節取り扱い診療ガイドライン」作成について  
中村浩淑  
(日本内分泌学会誌 85(2): 2009)
- 2) International Thyroid Congress 2010  
IMPLEMENTING GUIDELINES FOR THYROID NODULES  
Hirotoshi Nakamura
- 3) 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)
- 1) Ito N, Suzuki H, Shimizu Y, Saito T, Fukumoto S, Fujita T: Evaluation of clinical utility of venous sampling for FGF23 in identifying and confirming responsible tumors for tumor-induced osteomalacia (TIO): Analysis of 15 patients. Thirtieth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Montreal, Canada). J Bone Miner Res 23(Abstract): S98
- 2) Saito T, Suzuki H, Ito N, Igarashi T, Fujita T, Fukumoto S: Rare cases of X-linked hypophosphatemic rickets/osteomalacia mimicking autosomal recessive hypophosphatemic rickets/osteomalacia. Thirtieth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Montreal, Canada). J Bone Miner Res 23(Abstract): S126
- 3) Suzuki H, Ito N, Fukumoto S, Fujita T: Significance of O-linked glycosylation of FGF23 protein. Thirtieth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Montreal, Canada). J Bone Miner Res 23(Abstract): S174
- 4) 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. Thirtieth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Montreal, Canada). J Bone Miner Res 23(Abstract): S222
- 5) Shimizu Y, Saito T, Suzuki H, Ito N, Fukumoto S, Fujita T. Analysis of circulatory FGF23 protein. 2nd Joint Meeting of the International Bone & Mineral Society and the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society. Bone 2009: 44, S130.
- 6) Suzuki H, Ito N, Fukumoto S, Fujita T. Significance of mucin-type O-linked glycosylation of FGF23 protein. 31st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Denver, USA).
- 7) Shimizu Y, Ito N, Suzuki H, Okamoto T, Hori M, Fukumoto S, Fujita T. Significance of measurement of FGF23 in the management of patients with tumor-induced osteomalacia (TIO). ICE2010 Endocr J 2010: 57, S499.
- 8) Shimizu Y, Saito T, Suzuki H, Fukumoto S, Fujita T. Role of processed FGF23 fragments. 32nd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Toronto, Canada).  
(皆川先生)
- 1) 武内陽子, 菱沼 昭, 今井常夫, 梶村益久, 林良敬, 村田善晴: 正常アリの甲状腺発現抑制によりクレチン症を発症した NIS 遺伝子変異 T354P ヘテロ接合体の一例. 日本内分泌学会雑誌 85(1): 267, 2009.
- 2) 青木智之, 常川勝彦, 森村匡志, 萩原貴之, 関 耕二, 深田修二, 村田善晴, 村上正巳: Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> Symporter 異常による甲状腺機能低下症における甲状腺ホルモン代謝酵素発現の検討.

- 日本内分泌学会雑誌 85(1): 286, 2009.
- 3) Murata Y: Congenital hypothyroidism due to dysmorphogenesis and its clinical features. 2010 Korean Thyroid Association, 3, 2010.
  - 4) ○村田善晴、林 良敬: 甲状腺ホルモン不応症の診断基準の作成. 日本内分泌学会雑誌 86(1): 90, 2010.
  - 5) Murata Y, Murakami M, Hishinuma A: Increased thyroidal type 2 iodothyronine deiodinase (D2) activity may account for serum T3 predominance over T4 in patients with abnormal thyroglobulin (Tg) or sodium/iodine symporter (NIS). Endocrine Journal 57(Suppl. 2): S240, 2010.
  - 6) Watanabe C, Hayashi Y, Yamamoto M, Fukuwatari T, Shibata K, Murata Y: Hepatic gene expression profile in mice deficient for glucagon gene-derived peptides. Endocrine Journal 57(Suppl. 2): S361, 2010.
  - 7) ○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, 2010.
  - 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, 渋谷信行, 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) 渋谷信行, Genniefer 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 による隣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, 渋谷信行, 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, 渋谷信行, 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) 渋谷信行, 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, 渋谷信行, 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, 渋谷信行, 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, 渋谷信行, 橋本貢士, 山田正信, 森昌朋, 核内受容体 PPARγ 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, 渋谷信行, 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, 渋谷信行, 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) 渋谷信行, 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, 渋谷信行, 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, 渋谷信行, 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
- 29) 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 Nov8-12<sup>th</sup> 2008
- 30) 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
- 31) Shibusawa N, Horiguchi K, Hashimoto K, Satoh T, Yamada M, Mori M, Effect of Thyroid hormone receptor  $\beta$  mutation in development of cerebellar Purkinje cells. The 13th Meeting of the European NeuroEndocrine Association, Antalya Turkey ,2008
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 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
- 35) 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
- 36) 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
- 37) 橋本貢士、松本俊一、石田恵美、堀口和彦、吉野聡、小澤厚志、渋谷信行、門傳剛、佐藤哲郎、山田正信、森昌朋 甲状腺ホルモン不応症(RTH)における耐糖能と糖代謝関連遺伝子発現の解析、第52回日本甲状腺学会、名古屋、2009
- 38) 橋本貢士、土屋天文、佐藤哲郎、上原豊、岡田秀一、山田正信、清水弘行、森昌朋 甲状腺ホルモン不応症(RTH)における糖代謝異常の解析、第52回日本糖尿病学会年次学術集会、大阪、2009
- 39) 橋本貢士、石田恵美、松本俊一、田口亮、片野明子、堀口和彦、吉野聡、梅澤良平、中島康代、橋田哲、渋谷信行、佐藤哲郎、山田正信、門傳剛、森昌朋バルプロ酸ナトリウムは甲状腺ホルモン不応症の遺伝子発現異常を改善する、第82回日本内分泌学会学術集会、前橋、2009
- 40) 中島康代、山田正信、橋本貢士、佐藤哲郎、森昌朋 視床下部 TRH の新たな TSH 発現制御機構の発見、第82回日本内分泌学会学術集会、前橋、2009
- 41) 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, Kyoto, 2010

## G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 総合研究報告書

### 骨・ミネラル代謝調節機構およびその異常による疾患に関する研究

分担研究者 福本誠二（東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科 講師）

**研究要旨** 線維芽細胞増殖因子 23(fibroblast growth factor 23: FGF23)は、血中リン、1,25-水酸化ビタミン D 濃度を低下させるホルモンである。過剰な FGF23 活性により、いくつかの低リン血症性くる病/骨軟化症が惹起されることが明らかにされた。また *in vitro* の検討で、一部の FGF23 蛋白は分泌前にプロセッシングを受け、不活性なフラグメントに分解されることが知られている。しかし、過剰な FGF23 活性により惹起される疾患の詳細、および FGF23 蛋白プロセッシングの意義は不明である。本研究では、低リン血症性疾患患者の血中 FGF23 濃度の測定や FGF23 関連低リン血症性くる病の原因遺伝子の検討により、含糖酸化鉄投与による低リン血症も過剰な FGF23 活性により惹起されること、本邦の FGF23 関連低リン血症性くる病の大部分は X 染色体優性低リン血症性くる病であることが明らかとなった。さらに血漿中の FGF23 蛋白の検討などにより、一部の FGF23 蛋白は *in vivo* でもフラグメントとして存在すること、FGF23 フラグメントは全長 FGF23 活性を抑制することが示された。したがって FGF23 フラグメントが増加する高リン血症性腫瘍状石灰沈着症では、FGF23 フラグメントによる FGF23 活性の抑制が、病態形成に関与する可能性が考えられた。

#### A. 研究目的

線維芽細胞増殖因子 23(fibroblast growth factor 23: FGF23)は、血中リン、1,25-水酸化ビタミン D 濃度を低下させるホルモンである。過剰な FGF23 活性により、いくつかの低リン血症性くる病/骨軟化症が惹起されることが明らかにされた。また *in vitro* の検討で、一部の FGF23 蛋白は分泌前にプロセッシングを受け、不活性なフラグメントに分解されることが知られている。しかし、過剰な FGF23 活性により惹起される疾患の詳細、および FGF23 蛋白プロセッシングの意義は不明である。そこで本研究では、低リン血症性疾患の発症における FGF23 の関与を明らかにするとともに、FGF23 プロセッシングの *in vivo* での意義を解明することを目的とした。

#### B. 研究方法

低リン血症性疾患の血中 FGF23 濃度を測定すると共に、FGF23 関連低リン血症性くる病の原因遺伝子として知られている *phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome*

(*PHEX*)、*FGF23*、*dentin matrix protein 1 (DMPI)*、および *ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1)* 遺伝子変異を検討した。さらに血中の FGF23 蛋白をウェスタンブロットで検出すると共に、全長 FGF23 蛋白による Egr-1 プロモーター活性の上昇に及ぼす FGF23 フラグメントの効果を検討した。

#### C. 研究結果

従来低リン血症を惹起することが知られていた含糖酸化鉄による低リン血症患者の血中 FGF23 濃度は高値であり、含糖酸化鉄投与中止により FGF23 は速やかに低下した。また 13 家系 20 名の FGF23 関連低リン血症性くる病患者の検討では、11 家系 17 名に *PHEX* 遺伝子変異が、また 1 家系 1 名に *ENPP1* 遺伝子変異が認められた。さらにウェスタンブロットでは、血中の FGF23 の約 30% がプロセッシングを受けたフラグメントとして存在し、全長 FGF23 と同等濃度以上のフラグメントを添加した場合には、FGF23 フラグメントは全長 FGF23 の作用を抑制することが明らかとなっ

た。

#### D. 考察

我々は、過剰な FGF23 作用以外の原因による低リン血症では、FGF23 は低値であることが報告している。従って含糖酸化鉄投与による低リン血症も、過剰な FGF23 活性により惹起されるものと考えられる。また、本邦の FGF23 関連低リン血症性くる病の大部分は *PHEX* 遺伝子異常による X 染色体優性低リン血症であるものの、*PHEX* 以外の遺伝子異常による疾患も存在することが明らかとなった。また FGF23 蛋白のプロセッシングが亢進し、全長 FGF23 が低下することにより FGF23 活性障害が惹起される疾患として、高リン血症性腫瘍状石灰沈着症が知られている。本症では、全長 FGF23 の低下に加え、FGF23 フラグメントの増加によっても FGF23 作用障害が惹起される可能性が明らかとなった。

#### E. 結論

過剰な FGF23 活性は、低リン血症性くる病に加え、含糖酸化鉄投与による低リン血症の発症にも関与している。また本邦の FGF23 関連低リン血症性くる病の大部分は、X 染色体優性低リン血症性くる病である。さらに FGF23 蛋白の一部は *in vivo* でもフラグメントとして存在し、過剰なフラグメントは腫瘍状石灰沈着症の病態形成に関与する可能性が明らかとなった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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* 2008; 55(5), 787-794.
- 2) Ogura E, Kageyama K, Fukumoto S, Yagihashi N, Fukuda Y, Kikuchi T, Masuda M, Suda T: Development of tumor-induced osteomalacia in a subcutaneous tumor, defined by venous blood sampling of fibroblast growth factor-23. *Intern Med* 2008; 47(7), 634-641.
- 3) Nasu T, Kurisu S, Matsuno S, Tatsumi K, Kakimoto T, Kobayashi M, Nakano Y, Wakasaki

H, Furuta H, Nishi M, Sasaki H, Ito N, Suzuki H, Fukumoto S, Nanjo K: Tumor-induced hypophosphatemic osteomalacia diagnosed by the combinatory procedures of magnetic resonance imaging and venous sampling for FGF23. *Intern Med* 2008; 47(10), 957-961.

- 4) Yamazaki Y, Tamada T, Kasai N, Urakawa I, Aono Y, Hasegawa H, Fujita T, Kuroki R, Yamashita T, Fukumoto S, Shimada T: Anti-FGF23 neutralizing antibodies demonstrate the physiological role and structural features of FGF23. *J Bone Miner Res* 2008; 23(9), 1509-1518.
- 5) 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. 2008; 42(6), 1235-1239.
- 6) Saito T, Fukumoto S, Ito N, Suzuki H, Igarashi T, Fujita T: A novel mutation in GATA3 gene in a Japanese patient with PTH-deficient hypoparathyroidism. *J Bone Miner Metab* 2009; 27(3), 386-389.
- 7) Saito T, Nishii Y, Yasuda T, Ito N, Suzuki H, Igarashi T, Fukumoto S, Fujita T. Familial hypophosphatemic rickets caused by a large deletion in PHEX gene. *Eur J Endocrinol* 2009; 161(4), 647-651.
- 8) Shimizu Y, Tada Y, Yamauchi M, Okamoto T, Suzuki H, Ito N, Fukumoto S, Sugimoto T, Fujita T. Hypophosphatemia induced by intravenous administration of saccharated ferric oxide. *Bone* 2009; 45(4), 814-816.
- 9) Aono Y, Yamazaki Y, Yasutake J, Kawata T, Hasegawa H, Urakawa I, Fujita T, Wada M, Yamashita T, Fukumoto S, Shimada T. Therapeutic effects of anti-FGF23 antibodies in hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J Bone Miner Res* 2009; 24(11), 1879-1888.
- 10) Fukumoto S. The role of bone in phosphate metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 310(1-2), 63-70.

- 11) Ito N, Shimizu Y, Suzuki H, Saito T, Okamoto T, Hori M, Akahane M, Fukumoto S, Fujita T. Clinical utility of systemic venous sampling of FGF23 for identifying tumours responsible for tumour-induced osteomalacia. J Intern Med 2010: 268(4), 390-394.
  - 12) Mori Y, Ogasawara T, Motoi T, Shimizu Y, Chikazu D, Tamura K, Fukumoto S, Takato T. Tumor-induced osteomalacia associated with a maxillofacial tumor producing fibroblast growth factor 23: report of a case and review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010: 109(3), e57-e63.
  - 13) Hasegawa H, Nagano N, Urakawa I, Yamazaki Y, Iijima K, Fujita T, Yamashita T, Fukumoto S, Shimada T. Direct evidence for a causative role of FGF23 in the abnormal renal phosphate handling and vitamin D metabolism in rats with early-stage chronic kidney disease. Kidney Int 2010: 78(10), 975-980.
2. 学会発表
- 1) Ito N, Suzuki H, Shimizu Y, Saito T, Fukumoto S, Fujita T: Evaluation of clinical utility of venous sampling for FGF23 in identifying and confirming responsible tumors for tumor-induced osteomalacia (TIO): Analysis of 15 patients. Thirtieth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Montreal, Canada). J Bone Miner Res 23(Abstract): S98
  - 2) Saito T, Suzuki H, Ito N, Igarashi T, Fujita T, Fukumoto S: Rare cases of X-linked hypophosphatemic rickets/osteomalacia mimicking autosomal recessive hypophosphatemic rickets/osteomalacia. Thirtieth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Montreal, Canada). J Bone Miner Res 23(Abstract): S126
  - 3) Suzuki H, Ito N, Fukumoto S, Fujita T: Significance of O-linked glycosylation of FGF23 protein. Thirtieth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Montreal, Canada). J Bone Miner Res 23(Abstract): S174
  - 4) 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. Thirtieth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Montreal, Canada). J Bone Miner Res 23(Abstract): S222
  - 5) Shimizu Y, Saito T, Suzuki H, Ito N, Fukumoto S, Fujita T. Analysis of circulatory FGF23 protein. 2nd Joint Meeting of the International Bone & Mineral Society and the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society. Bone 2009: 44, S130.
  - 6) Suzuki H, Ito N, Fukumoto S, Fujita T. Significance of mucin-type O-linked glycosylation of FGF23 protein. 31st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Denver, USA).
  - 7) Shimizu Y, Ito N, Suzuki H, Okamoto T, Hori M, Fukumoto S, Fujita T. Significance of measurement of FGF23 in the management of patients with tumor-induced osteomalacia (TIO). ICE2010 Endocr J 2010: 57, S499.
  - 8) Shimizu Y, Saito T, Suzuki H, Fukumoto S, Fujita T. Role of processed FGF23 fragments. 32nd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Toronto, Canada).
- 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）

## 総合研究報告書

### 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** 血清カルシウム制御機構に重要な分子はカルシウム感受容体(CaSR)と副甲状腺ホルモン(PTH)であり、CaSRの活性型変異(ADH)ではPTHが低下して低カルシウム血症となる。ADHのアンケート調査では、血清Mg値はADH群で治療前・治療後ともに低値であった。ビタミンD受容体(VDR)の核移行に、核孔の構成分子であるNUP214との相互作用が重要であることを見出した。血清リン制御機構としては、線維芽細胞成長因子23(FGF23)が中心的役割を担う。リン値が高い臍帯血では、FGF23値は低値で、可溶性Klothoは高値であることを示した。さらに、胎盤がKlothoの発現臓器であることを見いだした。FGF23が異常高値となる低リン血症性くる病(小児)のアンケート調査を行い、135人の患者が把握された。大多数の患者は活性型ビタミンD製剤および経口リン酸製剤で治療されていた。

#### A. 研究目的

血清カルシウム・リン制御機構としては、活性型ビタミンD、副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone: PTH)、線維芽細胞成長因子23(fibroblast growth factor 23: FGF23)などが重要なホルモンである。これらホルモンの分泌調節機構、作用機序について臨床データを中心に解析し、新しい病態の解明とその治療方法を検討する。特に、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、カルシウム・リン代謝制御については不明な点が多く残されているので、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

##### 1. ビタミンD受容体(vitamin D receptor: VDR)の作用機序

Yeast two-hybrid systemによりVDRと相互作用する分子のスクリーニングを行った。同定された分子が、実際にVDRと相互作用するかどうかはFLAGタグをつけた蛋白質を合成させ、immunoprecipitation-western blotting(IP-western)法で検討した。同定された

分子がVDRの転写活性化能に及ぼす影響について、VDR応答配列を有するreporter assayにより検討した。

##### 2. カルシウム感受容体(CaSR)

副甲状腺機能低下症のうち、CaSR活性亢進によるものは、活性型ビタミンD治療により高カルシウム血症を来しやすく、そのため腎石灰化、腎・尿路結石、さらには腎不全のリスクが高くなる。したがって、活性型VDによる治療を進める上でCaSRの活性化の有無は臨床的に非常に重要な問題である。CaSRの活性亢進は、恒常活性型の遺伝子変異によるもの常染色体性優性低カルシウム血症(autosomal dominant hypocalcemia、以下ADH)、あるいは活性型の自己抗体によるものが知られており、欧米の教科書には散発性の単独副甲状腺機能低下症の全例で遺伝子検査を行うことが推奨されるとの記載がある。「ホルモン受容機構異常に関する調査研究」班員にアンケートを送付し、現在治療中の患者データを収集した。患者データよりCaSR変異あり群、CaSR変異なし群を抽出し、

両群における各種パラメーターを比較検討した。遺伝子検査については各班員が患者あるいは保護者よりインフォームドコンセントを得た上で施行した。

### 3. 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。(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。

### 4. 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。

#### アンケート調査

本邦における治療実態を解析のため、日本小児内分泌学会、および日本小児腎臓病学会評議員の所属する施設・診療科にアンケートを送付した。今回は日本小児内分泌学会評議員の所属する 68 施設に送付したアンケートを解析した。対象は 6 ヶ月以上低リン血症が持続している患者で、調査は 11/11/2009～5/21/2010 に実施された。

#### 自験例における解析

当院で経過観察中の XLH 患者 14 名のうち、2 回以上血清 FGF23 値を測定し、かつ治療中である 9 名を対象に、血清 FGF23 (Kainos 社キット) とともに、年齢、身長、体重、治療内容、血清 Ca、P、Alb、ALP、PTH、1,25(OH)2D、25OHD、BUN、Cre、尿 Ca、P、Ca/Cr、%TRP、TmP/GFR、推定 GFR (Schwartz の式より計算) を測定した。

## C. 研究結果

### 1. 核膜孔の構成成分である CAN/Nup214 の一部がクロニングされた。Yeast-two hybrid screening において VDR との相互作用担当部位は C 端側の FG リピートを含む領域であった。CAN/Nup214 による VDR 依存性転写活性化の制御に、VDR の DNA 結合領域が必要であるこ

とが推察された。また、GR や RAR においても、CAN/Nup214 が同様の作用を示すことが示唆された。

2. ADH のアンケート調査研究では、アルファカルシドール投与量と治療後尿中 Ca/Cr 比の検討において、CaSR 変異あり群では 0.05  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  以上投与されている症例がないこと、ほぼ全例でサイアザイドが投与されていることが判明した。症例の半数はオーバーラップするが、変異あり群において治療前、治療後ともに低い傾向が認められ、治療前血清 Mg 値が正常下限を下回った症例は全例変異あり群であった。

3. 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 値は低値で可溶性 Klotho は高値であった。重回帰分析では、臍帯血血清リン値は、可溶性 Klotho と最も強く相関した。

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。

#### アンケート調査

送付した 68 施設のうち、53 施設より回答が得られ、有効回答率は 78% であった。持続性低リン血症患者数は 135 人、うち家族性 (遺伝性) は 126 人であった。大多数は活性型ビタミン D 製剤および経口リン酸製剤で治療されていた。リン酸製剤はほとんどが院内製剤であり、投与量は概ね P として 40-60  $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$  (分 3-4) であった。また、治療指標として血清 IP、ALP、intact PTH、尿 Ca/Cre、骨 X 線所見などが用いられており、総合的に判断されていた。

#### 自験例における解析

FGF23 値は、多くの XLH 症例で治療経過中に増加し、P 投与量と正の相関が認められた。%TRP と負の相関が認められた。また、血清 Cr および推定 GFR とそれぞれ正、負の強い相関が認められた。そして、P 投与量  $> 60\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$  で軽度腎機能低下を来す可能性が示唆された。ただし、推定 GFR は 2 ポイントを除き、すべて  $\geq 90 \text{ ml}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2$  (慢性腎臓病ステージ 1) であり、ステージ 3 以上の重症例はいなかった。

## D. 考察

1. CAN/Nup214 による VDR 依存性転写活性化の制御に、VDR の DNA 結合領域が必要であることが推察された。また、GR や RAR においても、CAN/Nup214 が同様の作用を示すことが示唆された。この、CAN/Nup214 による VDR 依存性転写活性化の制御には、VDR の核局在性の変化が関与している可能性がある。
2. ADH の検討では血清 Mg 値が正常下限を下回った症例全例が CaSR 変異あり群であったことより、副甲状腺機能低下症で Mg 値が正常下限未満の場合は、原発性低 Mg 血症の除外は必要だが、CaSR の機能亢進による可能性が高いと考えられる。ただし、CaSR 変異あり群の半数は変異なし群とオーバーラップするので、血清 Mg 値が基準値内であっても慎重に治療を進める必要がある。治療後のパラメーターの検討では、血清 Ca、intact PTH、尿中 Ca/Cr 比、FECa では変異あり群と、変異なし群との識別は困難であった。血清 Mg 値に有意差は認められなかったものの、やはり変異なし群で低い傾向を示した。また、ADH を活性型ビタミン D で尿中カルシウム排泄 (Ca/Cr 比) が過剰とならないように治療する場合、投与量を少なく抑え、サイアザイドを併用する必要があることが明らかとなった。
3. 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、臍帯血中の可溶性 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。

### アンケート調査

施設により投与量に若干のばらつきはあるものの、低リン血症性くる病に対し、ビタミン D 製剤と合わせて経口リン酸製剤が広く使用されており、特に経口リン酸製剤は未だに認可されて

いないため、認可の必要性は強い。

自験例における解析により、XLH 患者では、FGF23 値と P 投与量は正の相関を示すことより、FGF23 分泌の増加は、治療による P 負荷増加を反映していると考えられた。また、P 投与量 > 60mg/kg/day で軽度腎機能低下を来たす可能性が示唆されたが、XLH 患者では FGF23 の基礎値が高いため、腎機能を比較的鋭敏に反映し、相関関係を見出すことができたと考えられる。XLH では治療により腎機能低下を来たす危険性があり、FGF23 値、治療内容、腎機能について今後更なる検討が必要である。なお、アンケート調査で得られた P 投与量 (40-60 mg/kg/day) より、リンの過剰投与は概ね経験的に避けられてきたと解釈することもでき、興味深い。

## E. 結論

1. 核膜孔複合体の構成因子である CAN/Nup214 は VDR と相互作用し、その機能を制御する。
2. 血清 Mg 値は CaSR 変異あり群で治療前・治療後ともに低値であり、特に治療前値が 1.7 mg/dl 以下の場合、ADH (あるいは自己免疫性の CaSR 活性化) の可能性が高いと考えられる。
3. 尿中カルシウム排泄 (Ca/Cr 比) が過剰とならないように治療した場合、CaSR 活性化による副甲状腺機能低下症では、活性型ビタミン D の投与量が少なく、大多数でサイアザイドの併用療法が行われている。
4. 臍帯血中の FGF23 濃度は低く、可溶性 Klotho 濃度は高い。
5. ビタミン D 欠乏症では FGF23 濃度は低い。
6. XLH 患者においても、血清 FGF23 値の上昇は腎機能の低下を鋭敏に反映している可能性があり、治療の最適化を念頭に、今後その有用性についてさらに検討を加える必要性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ohata Y, Yamamoto T, Kitai Y, Mizoguchi Y, Iwaki M, Ozono K, et al. A case of primary hyperparathyroidism in childhood found by a chance hematuria., Clin Pediatr Endocrinol, 2007,

- 16(1):11–16.
- 2) Yamamoto T, Michigami T, Aranami F, Segawa H, Yoh K, Ozono K, et al. Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria: a study for the phosphate transporter gene type IIc and osteoblastic function., *J Bone Miner Metab*, 2007, 25(6):407–413.
  - 3) Arahori H, Tamura A, Wasada K, Shimoya K, Wada K, Ozono K, et al. Sonographic femur length to trunk cross area ratio: prediction of fetal outcome in 30 cases in which micromelia was suspected., *J Obstet Gynaecol Res*, 2007, 33(3):248–253.
  - 4) Namba N, Etani Y, Kitaoka T, Nakamoto Y, Nakacho M, Ozono K, et al. Clinical phenotype and endocrinological investigations in a patient with a mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter. *Eur J Pediatr*, 2007, 167(7):785–791.
  - 5) Endo I, Fukumoto S, Ozono K, Namba N, Tanaka H, Inoue D, et al. Clinical usefulness of measurement of fibroblast growth factor 23 (FGF23) in hypophosphatemic patients: proposal of diagnostic criteria using FGF23 measurement. *Bone*, 2008, 42(6):1235–1239.
  - 6) Kubota T, Michigami T, Sakaguchi N, Kokubu C, Suzuki A, Ozono K, et al. Lrp6 hypomorphic mutation affects bone mass through bone resorption in mice and impairs interaction with Mesd. *J Bone Miner Res*. 2008, 23(10):1661–1671.
  - 7) 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 $\beta$  in Osteoblastic saos-2 Cells. *J Cell Biochem*, 2008, 104(1):304–317.
  - 8) Fukumoto S, Namba N, Ozono K, Yamauchi M, Sugimoto T, Michigami T, et al. Causes and Differential Diagnosis of Hypocalcemia – Recommendation Proposed by Expert Panel Supported by Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. *Endocr J*, 2008, 55(5):787–794.
  - 9) 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.
  - 10) 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.
  - 11) Kubota T, Michigami T, Ozono K. Wnt signaling in bone metabolism. *J Bone Miner Metab*, 2009, 27(3):265–271.
  - 12) 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.
  - 13) Yoshida H, Hashii Y, Okuda T, Kusuki S, Sato E, Ozono K, et al. A case of congenital bone marrow failure with radio-ulnar synostosis. *Int J Hematol*, 2010, 91(2):331–332.
  - 14) Kubota T, Michigami T, Ozono K. Wnt Signaling in Bone. *Clin Pediatr Endocrinol*, 2010, 19(3):49–56.
  - 15) Bessho K, Etani Y, Ichimori H, Miyoshi Y, Namba N, Ozono K, et al. Increased type 3 iodothyronine deiodinase activity in a regrown hepatic hemangioma with consumptive hypothyroidism. *Eur J Pediatr*, 2010, 169(2):215–221.
  - 16) Yoshida H, Matsumura R, Sato E, Hashii Y, Ohta H, Ozono K. Late-onset differentiation syndrome in a child with acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol*, 2010, 92(2):409–411.
  - 17) Kimata M, Michigami T, Tachikawa K, Okada T, Koshimizu T, Ozono K, et al. Signaling of extracellular inorganic phosphate up-regulates cyclin D1 expression in proliferating chondrocytes via the Na(+)/Pi cotransporter Pit-1 and Raf/MEK/ERK pathway. *Bone*, 2010, 47(5):938–947.
  - 18) Yamazaki M, Ozono K, Okada T, Tachikawa K, Kondou H, Ohata Y, et al. Both FGF23 and

extracellular phosphate activate Raf/MEK/ERK pathway via FGF receptors in HEK293 cells. J Cell Biochem, 2010, in press.

- 19) Miyoshi Y, Sakai N, Hamada Y, Tachibana M, Hasegawa Y, Ozono K, et al. Clinical aspects and adrenal functions in eleven Japanese children with X-linked adrenoleukodystrophy. Endocr J, 2010, 57(11):965-972.
- 20) Ohta H, Hashii Y, Yoshida H, Kusuki S, Tokimasa S, Ozono K, et al. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Against Recurrent Rhabdomyosarcoma. J Pediatr Hematol Oncol, 2011, 33(1):e35-e38.
- 21) Kitaoka T, Namba N, Miura K, Kubota T, Ohata Y, Ozono K, et al. Decrease in serum FGF23 levels after intravenous infusion of pamidronate in patients with osteogenesis imperfecta. J Bone Miner Metab, 2011, in press.
- 22) Ohata Y, Arahori H, Namba N, Kitaoka T, Hirai H, Ozono K, et al. Circulating Levels of Soluble  $\alpha$ -Klotho Are Markedly Elevated in Human Umbilical Cord Blood. J Clin Endocrinol Metab, 2011, in press.
- 23) 大藪恵一, カルシウム感知受容体遺伝子異常と副甲状腺機能低下症, 日本内科学会雑誌, 2007, 96(4):702-706.
- 24) 三善陽子, 大藪恵一, てんかんと誤診される副甲状腺機能低下症, 小児内科, 2007, 39(5):729-732.
- 25) 窪田拓生, 大藪恵一, ビタミン D 依存症, 骨粗鬆症治療, 2007, 6(3):221-225.
- 26) 大藪恵一, 偽性副甲状腺機能低下症 I a 型における  $Gs\alpha$  遺伝子異常, CLINICAL CALCIUM, 2007, 17(8):1214-1219.
- 27) 大藪恵一, くる病, 今日の治療指針—私はこう治療している—, 2008, 1039-1040.
- 28) 大藪恵一, 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 11月号, 2008, 22(6), 63(747)-67(751).

## 2. 学会発表

- 1) Kitaoka T, Namba N, Miura H, Hirai H, Nakajima S, Ozono K, et al. Intravenous administration of pamidronate decreases serum levels of FGF23

rapidly in patients with osteogenesis imperfecta. 29<sup>th</sup> Annual meeting of the American society for bone and mineral research: 07.09.16-19, Hawaii,U.S.A.

- 2) 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.
- 3) 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. 32<sup>nd</sup> annual Meeting ASBMR 2010: 10.10.14-21, Toronto.
- 4) 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. 32<sup>nd</sup> annual Meeting ASBMR 2010: 10.10.14-21, Toronto
- 5) Miura K, Namba N, Ozono K. A Survey on Vitamin D Deficiency in Children in Japan. 32<sup>nd</sup> annual Meeting ASBMR 2010: 10.10.14-21, Toronto

## G. 知的取得権の取得状況

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

## 総合研究報告書

### 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 研究およびビタミン D 不足による骨脆弱性の機序の検討

分担研究者 杉本利嗣（島根大学医学部内科学講座内科学第一 教授）  
山内美香（島根大学医学部内科学講座内科学第一 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。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 CaSR に対する抗体を有する明らかな結果は得られず、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。

ビタミン D(VD)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検討を行った。健常閉経後女性の約 8 割に VD 不足を認めること、25(OH)D 低値が年齢、PTH、骨代謝マーカーや骨密度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 25(OH)D と PTH で 4 分割し検討したところ、低 25(OH)D 低 PTH 群で最も高い骨折率を示した。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明らかにした。この機序について検討したところ、低骨代謝回転や耐糖能異常は関与しなかった。低 25(OH)D 低 PTH 群において骨折の有無で有意差を認める因子を検討したところ、Cr、eGFR に差を認めた。つまり、VD 不足状態にもかかわらず、PTH が上昇せず骨脆弱性が高まる機序の一部に腎機能障害が関与することを初めて明らかにした。

#### A. 研究目的

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)の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。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は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。

次に、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、検討を行う。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し、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。さらに 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か否かを含め、その機序について検討する。

#### B. 研究方法

【Ca 代謝異常症における抗 CaSR 抗体の関与の検

## 討】

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 症例について、以下の検討を行った。

- a) 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) 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を用いて、患者血清の PTH 分泌能に及ぼす影響について検討した。

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、蛋白電気泳動を行い、CaSR 抗体の有無を確認した。同様の検討を弧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 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。

### 【VD 不足による骨脆弱性の機序の検討】

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(ng/mL)、Ca(mg/dl)、P(mg/dl)、Cr(mg/dl)、HbA1c(%), intact PTH(pg/mL)、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) (ng/mL)、オステオカルシン(OC) (ng/mL)、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) (ng/mL)を測定し、DXA 法で腰椎(L2-4)、大腿骨頸部(FN)BMD を測定した。椎体骨折の有無は 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。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

### 【Ca 代謝異常症における抗 CaSR 抗体の関与の検討】

- a) 2 症例とも 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 IHP18 症例の患者 IgG においても、明らかな immunoblot を認めなかった。

- 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。

### 【VD 不足による骨脆弱性の機序の検討】

対象群の平均年齢は 63.3 ± 7.4 歳で、全脆弱性骨折既往者は 64 名であった。対象群の背景は身長 151.5 ± 5.3cm、体重 52.6 ± 7.2kg、25(OH)D 16.3 ± 4.4ng/ml、PTH 45.8 ± 14.9ng/ml、CTX 0.40 ± 0.15 (0.03~0.26) nM/mM・Cr、PINP 54.5 ± 16.4 (15.4~59.9) ng/mL、L2-4BMD 0.841 ± 0.147 g/cm<sup>2</sup>、Z 値 0.3 ± 1.1、T 値 -1.5 ± 1.3、FN BMD 0.621 ± 0.090 g/cm<sup>2</sup>、Z 値 0.1 ± 1.0、T 値 -1.5 ± 0.8 であった。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 は年齢および PTH と有意な負相関を認めた。骨代謝マーカーの PINP、CTX とも有意な負相

関を認め、L2-4BMD、FNBMD と有意な正相関を認めた。重回帰分析にて、25(OH)D と L2-4BMD および FNBMD 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]

骨折群で有意に年齢が高く、L2-4BMD、FNBMD 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、ロジスティック回帰分析にて、年齢、BMI、Ca、P、Cr、CTX、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。25(OH)D は筋力やバランス機能に関与するとされることから、前述の独立因子に加え、握力、継足歩行能、VD 摂取量を加えたが、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 0.60 (0.38-0.94),  $p<0.05$ ]

#### [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、FNBMD によるカットオフ値は 21ng/ml であった。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検討したところ、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、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 0.44(0.22-0.92),  $p<0.05$ ]。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% であった。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、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 (1.19 - 5.63),  $p<0.05$ ]。

#### [低 25(OH)D 低 PTH 群と低 25(OH)D 高 PTH 群の比較]

低 25(OH)D であるにもかかわらず PTH が上昇しない群の特徴を検討するため、低 25(OH)D 低 PTH 群と低 25(OH)D 高 PTH 群で比較した。2 群で年齢、BMI、BMD に差を認めなかったが、PINP、OC、CTX は低低群で有意に低値を示した。空腹時血糖や HbA1c、Cr、eGFR (estimated glomerular filtration rate)(ml/min/1.73m<sup>2</sup>)などに差は認めなかった。

#### [PTH レベルおよび骨代謝マーカーと骨折の関係]

我々はこれまでに糖尿病患者において、低 PTH かつ低 OC が椎体骨折のリスク因子である結果を得ているため、PTH と OC あるいは PTH と PINP や CTX で 4 群に分け骨折との関係を検討したがいずれの群でも差を認めなかった。

#### [低 25(OH)D 低 PTH 群における全脆弱性骨折の有無での比較]

骨折の有無で年齢、BMI、BMD、骨代謝マーカー、HbA1c に差を認めなかったが、Cr が骨折群で有意に高値、eGFR が有意に低値を示した。Cr は年齢、BMI、25(OH)D、PTH、CTX、FNBMD で補正後も有意な予測因子として選択され [OR 3.19 (1.13 - 9.04),  $p<0.05$ ]、eGFR も BMI、25(OH)D、PTH、CTX、FNBMD で補正後も有意であった [OR 0.23 (0.07 - 0.73),  $p<0.05$ ]。

## D. 考察

### 【Ca 代謝異常症における抗 CaSR 抗体の関与の検討】

PTH の相対的高値を伴う高 Ca 血症のうち、家族性に発症するものの原因として 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、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 血症をきたす 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。免疫沈降反応を加えた Western blotting 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。実際、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。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